

Nitrátredukcióban hibás Rhizobium meliloti mutánsok
genetikai és biokémiai jellemzése

Írta:

Kiss György Botond

Doktori disszertáció

Készült az MTA Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézetében, 1978-ban



Disszertációm a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetében készítettem. Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik elméleti tanácsaikkal, kritikáikkal és gyakorlati segítségükkel hozzájárultak e munka elvégzéséhez.

Külön köszönetet mondok Kondorosi Ádámnak, aki fáradságot nem kímélve mindig készen állt a gyakran felmerülő problémák megbeszélésére, megvitatására, elbírálására és kiértékelésére.

Előadásai, kritikái, baráti tanácsai terelték figyelmemet a tudományos gondolkodás útjára.

Köszönetet mondok közvetlen munkatársaimnak Dr. Sváb Zórának, Dr. Dusha Ilonának, Forrai Tamásnak, Vincze Évának, Kálmán Zsuzsának, akiknek elméleti és gyakorlati segítsége nélkül e disszertáció aligha készülhetett volna el.

Köszönöm Dobó Katalinnak a kísérleti munkában végzett fáradságot nem kímélő segítségét.



Tartalomjegyzék

1. <u>Bevezetés</u>	1. oldal
1.1. A nitrátredukció biológiai szerepe	1. "
1.2. A gombák, algák és növények asszimilációs nitrátredukciója	2. "
1.3. Respirációs és asszimilációs nitrátredukció baktériumokban	11. "
1.4. Célkitűzés	16. "
2. <u>Anyagok és módszerek</u>	18. "
2.1. Baktériumtörzsek	18. "
2.2. Táptalajok	18. "
2.3. A baktériumok szaporítása és fenn- tartása	22. "
2.4. Mutagenézis és mutáns szelekció	22. "
2.5. A nitrátreduktáz aktivitásának meghatározása	23. "
2.6. Nitritmeghatározás	24. "
2.7. Fehérjemeghatározás	25. "
2.8. Poliakrilamid gélelektroforézis	25. "
2.9. Komplementációs teszt	26. "
2.10. Növényi teszt	27. "
2.11. A baktériumok konjugációja	27. "
3. <u>Eredmények</u>	28. "
3.1. Kétfajta nitrátredukció Rhizobium melilotiban	28. "
3.1.1. Asszimilációs nitrátredukció	28. "

3.1.2. "Respirációs" nitrátredukció	30. oldal
3.2. Asszimilációs nitrátredukcióban hibás mutánsok izolálása /Nar ⁻ /	32. "
3.3. A Nar ⁻ mutánsok növekedése külön- böző nitrogénforráson	34. "
3.4. A mutánsok NR aktivitása	36. "
3.5. A mutánsok XDH aktivitása	39. "
3.6. Komplementációs analízis a Neuro- pora crassa <u>nit-1</u> mutánsának segít- ségével	41. "
3.7. Szimbiótikus effektivitás	43. "
3.8. Reverziós analízis	43. "
3.9. A Nar ⁻ mutánsok genetikai analízise	45. "
4. <u>Az eredmények megvitatása</u>	51. "
5. <u>Összefoglalás</u>	56. "
6. <u>Irodalomjegyzék</u>	57. "

1. Bevezetés

1.1. A nitrátredukció biológiai szerepe

A nitrátot számos baktérium, gomba, alga és növény képes felhasználni szerves nitrogéntartalmu vegyületeinek felépítéséhez. A különböző organizmusokban a nitrát először ammoniává alakul, majd az ammonia közvetlen szerves molekulába épül be. Azt a folyamatot, mely során a nitrát két lépésben ammoniává redukálódik, nitrát asszimilációnak nevezzük. E redukció első lépését a nitrátreduktáz /NR/ katalizálja. A reakció terméke a nitrit, melyet a nitritreduktáz egy lépésben ammoniává alakít. A nitrát asszimiláció fiziológiai szerepe tehát a szervezet utánpótlása nitrogénnel.

Számos fakultatív anaerob baktérium számára a nitrát ion helyettesítheti az oxigént, mint végső elektron akceptort. Ezek a szervezetek nitráton anaerob növekedésre képesek, még olyan szénforrás jelenlétében is, melynek átalakításából energia nem termelődik. A nitrátot ebben az esetben nem a terminális oxidációs rendszer utolsó enzime, a terminális oxidáz redukálja, hanem egy másik, az ugynevezett respirációs vagy disszimilációs nitrátredukciós rendszer utolsó enzime a nitrátreduktáz. Ilyenkor a nitrát redukciója energia /ATP/

termeléssel kapcsolatos. A respirációs ~~nitrat~~ nitratredukció fiziológiai szerepe tehát energia termelés anaerob körülmények között.

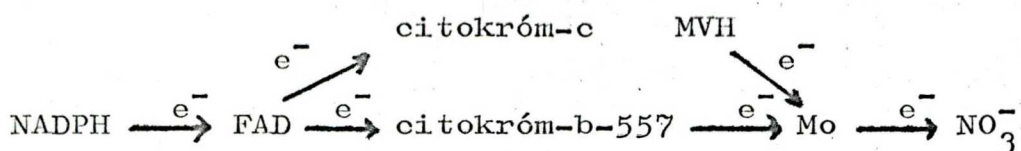
1.2. A gombák, algák és növények asszimilációs nitrat-redukciója

A nitrat asszimilációs redukciójáért felelős enzimrendszer biokémiai és genetikai tanulmányozása több évtizedes munka tekint vissza. Számos tudományos dolgozatban leírt kísérleti eredmény derít fényt a nitratredukció egyes részleteire. A kísérleteket a *Neurospora crassa* gombával kezdték meg és napjainkban a *Neurospora crassa* asszimilációs NR-a ismert a legjobban. A kutatások során számos egyéb gombában /pl. *Aspergillus nidulans*/, algában /pl. *Chlorella vulgaris*, *Chlamidomonas reinhardii*/ és növényben /pl. *Spinacia oleracea*, spenót; *Nicotiana tabacum*, dohány; *Hordeum vulgare*, árpa/ bizonyították az asszimilációs NR jelenlétét és derítették fel tulajdonságait. Összehasonlító vizsgálatokból kiderült, hogy ezen organizmusok asszimilációs NR-a nagy hasonlóságot mutat genetikai és biokémiai tulajdonságainak alapján a *N. crassa*éhoz, és ezért célszerű először a *N. crassa* NR-áról eddigi ismereteinket összefoglal-

ni és utána a többi organizmus egyedi sajátosságait bemutatni. Mivel respirációs nitrátredukció csak baktériumokban fordul elő ezért a baktériumok asszimilációs és respirációs NR rendszerét külön fejezet tárgyalja.

Evans és Nason /1952/ valamint Nason és Evans /1953/ mutatták ki először egyértelműen sejtmentes extraktumban, hogy a nitrát redukciójához NADPH szükséges mint elektron $/e^-/$ donor és az enzim prosztetikus csoportja a FAD. Molibdénmentes táptalaj előállításával illetve a NR tisztítása során az egyes preparátumok molibdéntartalmának meghatározásával bizonyították a molibdén jelenlétét az enzimben /Nicholas és mti, 1954; Nicholas és Nason, 1954/. Az egyre tisztább NR preparátumok NR specifikus aktivitásával párhuzamosan növekszik a citokróm-c-reduktáz /diaforáz/ specifikus aktivitása is, valamint a tisztított enzimnek redukált FAD és FMN kapcsolt NR aktivitása van /Kinsky és McElroy, 1958/. Sorger /1966/ mutatta ki, hogy mesterséges redoxfestékek /metilviologén, MV; benzilviologén, BV/ redukált formája aktiv az e^- donálásban és a FAD vagy FMN nem stimulálja a MV-kapcsolt NR aktivitást. Ebből következik, hogy a redukált MV a FAD tartalmu enzimrész után, a molibdén tartalmu enzimrésznek adja elektronjait. Sato /1956/ eredeti feltételezését alapul véve igazolták, hogy a citokróm-b-557 a NR alkotórésze és e^- közveti-

tőként szolgál /Garett és Nason, 1967/. A nitrátredukció teljes redukciós lépései a következők:



Garett és Nason /1969/, Antoine /1974/ valamint Pan és Nason /1978/ biokémiai munkáit röviden összefoglalva a következőket tudjuk a *N. crassa* NR-áról. A homogénre tisztított enzim négy enzimatisus aktivitással rendelkezik:

1. NADPH- NR
2. FADH- NR
3. Redukált MV-kapcsolt NR
4. NADPH-citokró-m-c-reduktáz

A négy aktivitás mérésével a NR különböző redukciós lépéseit ellenőrizhetjük. Az 1. reakció az enzim egész aktivitását méri a NADPH-től a nitrátig. A 2. és 3. reakció az enzim végső redukciós lépéséről ad felvilágosítást, míg a 4. aktivitás mérésével az e^- transzport első lépését ellenőrizhetjük. Ezen enzi-



matikus aktivitások jelenléte vagy hiánya a NR mutánsok elegáns jellemzésére ad lehetőséget.

Az enzim 230.000 D molekulasulyu és két azonos alegységből /115.000 D/ áll. Egy molekula molibdént és két hem-vasat tartalmaz. Szulfhidril csoport található az enzim FAD tartalmu részén. A molibdén egy ugynevezett molibdén kofaktor /Mo-ko/ alkotórésze. Egy Mo-ko tartja össze az enzim két nagy alegységét.

Az előbb említett organizmusokban megtaláljuk mind a négy enzimaktivitást és a FAD, citokróm-b és a Mo-ko alkotórészeket. Molekulasuly szempontjából azonban eltérések mutatkoznak, például az *A. nidulans*-ban 190.000 D /McDonald és Coddington, 1974/, *Chlorella vulgaris*-ban 356.000 D /Solomonson és mti, 1974/ az enzim molekulasulya. Mindegyik organizmusban az enzim a citoplazmában oldható állapotban van jelen. A gombák fiziológiai e^- donora a NADPH, míg a zöldalgáké és a növényeké NADH.

Az asszimilációs NR rendszer biokémiai vizsgálatával párhuzamosan folytak a genetikai vizsgálatok is. Asszimilációs nitrátredukcióban hibás mutánsokat, melyek képtelenek növekedni nitráton, mint egyedüli nitrogén forráson, több organizmusból izoláltak, így: *N. crassá*ból /de la Haba, 1950; Sorger, 1963/, *A. nidulans*ból /Cove és Pateman, 1963/, *C. reinhardii*ből

/Sosa és mti, 1978/, *N. tabacumból* /Müller és Grafe, 1978/ és *Hordeum vulgare*ből /Warner és mti, 1977/. Genetikailag a mutánsok több lókuszbba esnek, így: megkülönböztetünk strukturmutánsokat, melyekben a genetikai defekt a NR enzimfehérjéjének a strukturgénjében van; Mo-ko mutánsokat, melyekben a mutáció a Mo-ko bioszintézisét vagy a strukturgénjét érintette; regulációs mutánsokat, melyek a NR enzim szintéziséért felelős regulátor fehérjék génjeiben vagy a regulátor szekvenciákban szenvedtek genetikai károsodást. A *N. crassa* nit-3, az *A. nidulans* niaD, a *C. reinhardii* CR-305 és a *N. tabacum* nia mutánsai strukturmutánsok. Ezek nem rendelkeznek NADPH-nitrát illetve citokró-m-c-reduktáz aktivitással, de FAD és MV-kapcsolt NR aktivitásuk van /Antoin, 1974; Pateman és mti, 1964; MacDonald és mti, 1974; Sosa és mti, 1978; Mendel és Müller, 1978/. A mutáció a citokró-m-c redukciójáért felelős FAD tartalmu enzim strukturgénjében történt, változatlanul hagyva az enzim többi részének génjeit.

A mutánsok második csoportját alkotják a Mo-ko mutánsok. Pateman és mti, /1964/ mutatták ki első ízben, hogy a NR mutánsok egy része a nitráton kívül a hipoxantint sem képesek felhasználni egyedüli nitrogénforrásul és sejtmentes extraktumukban xantindehidrogenáz /XDH/ aktivitásuk nem volt. A legegyszerűbb

magyarázat- amit később sikerült is egyértelműen bizonyítani - az volt, hogy az aktiv NR és XDH egy közös kofaktort tartalmaz és ennek a bioszintézisét vagy strukturgénjét érintő mutáció, mind a NR mind a XDH aktivitás elvesztésével jár. Ezt a kismolekulájú, polipeptid természetű kofaktort később tisztították /Pienkos és mti, 1977/ és kimutatták, hogy molibdént tartalmaz, ezért Mo-ko -nak nevezik.

XDH aktivitással sem rendelkező Mo-ko mutánsok *N. crassaból* a nit-1 /Ketchum és mti, 1970/, *A. nidulansból* a cnxB, E, F, G, H /Pateman és mti, 1964/, *N. tabacumból* a cnx-68 /Mendel és Müller, 1978/. Az *A. nidulans* öt cnx mutánsa közül a cnxH feltételezhetően a Mo-ko strukturgénjében mutáns, mivel az erre a lokuszra előállított hőmérséklet érzékeny /ts/ mutánsok NR-a hőérzékeny volt sejtmentes extraktumban. A többi cnx mutáns pedig valószínűleg az aktiv Mo-ko bioszintéziséért felelős /MacDonald és Cove, 1974/.

Érdekes megfigyelés volt az, hogy a nit-1 mutáns sejtmentes extraktumában NADPH függő citokróm-c-reduktáz aktivitás mérhető /a NR első redukciós lépését nem befolyásolta a mutáció/, és ezért az aktivitásért felelős fehérje molekulásúlya pontosan fele /115.000 D/ az intakt enzimének /230.000 D, Sorger, 1966/. Ha a nit-1 és nit-3 mutáns sejtmentes kivonatát összekeverik,

megfelelő inkubációs idő után NADPH-NR aktivitás mérhető. Ezt a helyreállítódást in vitro komplementációnak nevezik. E komplementáció folyamán megjelenik a NADPH-NR aktivitás, ami egyik mutáns kivonatában sem mutatható ki. A komplementáció során a nit-3 mutáns kivonatában lévő szabad Mo-ko-ok a nit-1 mutáns extraktumában található két szabad /115.000 D/ alegységgel párosulva hozzák létre a teljes aktivitással és molekulasúllyal /230.000 D/ rendelkező enzimet /Nason és mt-i 1970/.

A fentiekből kitűnik, hogy a nit-1 mutáns nyerskivonata alkalmas aktiv Mo-ko-ok tesztelésére. Aktiv Mo-ko preparátumot készíthetünk molibdén tartalmu enzimekből /emlős xantinoxidáz, patkánymáj, aldehydoxidáz és csirke xantindehidrogenáz/ savkezeléssel /pH 2.5/. Az így szabaddá tett Mo-ko-ok képesek helyreállítani a nit-1 NADPH-NR aktivitását. Ezekkel a kísérletekkel biokémiaailag is igazolni lehetett a NR és XDH közös Mo-ko-át /Ketchum és mt-i, 1970/.

A mutánsok harmadik csoportjába a regulációs mutánsok tartoznak. NR aktivitás A.nidulánsban csak nitrát ionok jelenlétében és ammonia ionok hiányában mérhető /Cove, 1966/. Mivel az ammonia nem befolyásolja a NR in vitro aktivitását, feltételezhető, hogy a nitrát indukálja, az ammonia represszálja a NR szintézisét.

Pateman és mti /1967/ mutatták ki, hogy a nitrát valóban indukálja a NR-t, és a nia-D illetve a cnx mutánsokban a maradék aktivitások /citokrom-c-reduktáz, MV-kapcsolt NR/ konstitutív szinten termelődnek, tehát nitrát nem szükséges az enzim indukciójához. Ezekben a mutánsokban az ammonia azonban kifejti még represszív hatását, így a nitrát indukció és az ammonia represszió két független szabályozó rendszeren keresztül közvetítődik. Az első regulációs mutánst /nirA/ A.nidulansból izolálták /Pateman és mti, 1967/. A nirA mutánsban a NR-on kívül a nitritreduktázt/NIR/ sem tudták kimutatni, tehát a nirA génben bekövetkezett mutáció pleiotrop hatása a NR és NIR-re. Pateman és Cove /1967/ izoláltak egy olyan mutánst, mely nem igényelte a nitrátot a NR szintéziséhez, tehát az konstitutív szinten termelődött. Ez a mutáció /nirA^c/ egy helyre térképeződött a nirA-val, tehát ennek allelje. Ezért feltételezhető volt hogy a nirA gén egy pozitív regulátor fehérjét kódol, mely közvetíti a nitrát által történő indukciós folyamatot.

Arst és Cove /1973/ másfajta tulajdonságokkal rendelkező regulációs mutánsokat /areA/ izoláltak. Az areA lókuszt egy olyan fehérjét kódol, amelyik szükséges a nitrogén metabolizmusban résztvevő enzimek, - így a NR és NIR - szintéziséhez, de ammonia jelenlétében in-

aktiv. Ez is pozitív reguláló fehérje, mely közvetíti az ammonia repressziót *A.nidulans*-ban. A *N.crassaban* szintén leírták a regulációs mutánsokat, melyek nagymértékű hasonlóságot mutatnak az *A.nidulans* regulációs mutánsaihoz, így a nit-2 megfelel az areA-nak, míg a nit-4 és nit-5 a nirA-nak /Coddington, 1976/.

A nitrát asszimilációjában résztvevő enzimek tehát két, egymással összehangolt regulációs mechanizmus alatt állnak. Az egyik felelős a NR és NIR szintézisének gátlásáért, olyan körülmények között, amikor a táptalajban a nitráton kívül jobb /ammonia, aminosavak/ nitrogén forrás áll a sejtek rendelkezésére. A másik a NR és a NIR szintézisének stimulálásáért felelős nitrát ionok jelenlétében. /Cove és Pateman, 1969; Arst és Cove, 1973; Rand és Arst, 1978/.

Az enzimek szabályozása nemcsak az enzim szintézisének repressziója vagy derepressziója útján történhet. Aktivitásuknak reverzibilis vagy irreverzibilis inaktivációja fontos és számos organizmusban ismert szabályozási mechanizmus. Reverzibilis inaktiváció általában végtermékgátlás útján /feedback/ valósul meg. Ilyen típusu reverzibilis inaktivációt a NR esetében *Chlorella vulgaris*-ban találtak és derítették föl részleteit. /Moreno és mti, 1972; Solomonson és mti, 1973; Solomonson és Speher, 1977/. Az irreverzibilis inaktivációt az

1970-es évektől kezdve tanulmányozzák részletesebben. Majdnem minden esetben az enzimek inaktiválódásáért egy fehérje a felelős, mely a kukorica esetében specifikus a NR-ra. Proteáz aktivitással rendelkezik: a NR enzimet specifikus helyeken bontja /Wallace 1974, 1975/. N. crassából két NR-t inaktiváló /inaktivátor I és II/ aktivitást mutattak ki, melyek fiziológiai szerepe részleteiben még nem ismert /Walls és mti, 1978; Sorger és mti, 1978/.

1.3. Respirációs és asszimilációs nitrátredukció baktériumokban

A nitrátrespirációt először Questel és mti /1925/ mutatták ki *Escherichia coli* tenyészetével. Megfigyelték, hogy a sejtek laktát - mint egyedüli szénforrás - és ammonia jelenlétében anaerob növekedésre csak abban az esetben képesek, ha nitrátot tettek a táptalajba. Anaerob körülmények között a laktát nem képes a Szentgyörgyi-Krebs cikluson keresztül oxidálódni és ezáltal energiát termelni, mert O_2 hiányában a ciklusban résztvevő enzimek aktivitása nagyon alacsony és az oxidatív foszforiláció nem működik /Wimpenny és Cove, 1967/. Anaerob körülmények között tehát a laktát szénforrásként szolgál a szerves vegyületek számára,

míg a növekedéshez szükséges energia /ATP/ a nitrát redukciója folyamán szabadul föl /Takahasi és mti, 1957/.

Az E.coli respirációs nitrátredukciójáért felelős enzimrendszer hasonlóságokat és különbségeket mutat az asszimilációs nitrátredukcióért felelős enzimrendszerhez. Hasonlóság, hogy mindkettő molibdént és b típusu citokrómot tartalmaz, valamint mindkettő képes a nitrátot nitritté redukálni. Különbség az, hogy a respirációs enzimrendszer membránkött, szintézisét az oxigén represszálja, míg az ammonia nem, és a nitrát nem szükséges az enzimrendszer indukciójához /Showe és DeMoss, 1968/. Mivel a respirációs enzimrendszer a nitráton kívül a klorátot is redukálja, fiziológiai szerepe pedig az energiatermelés az A típusu NR-okhoz tartozik /Pichinoty és Piéchaud, 1968/.

Azokban az organizmusokban melyekben A típusu NR található egy rendkívül egyszerű, pozitív szelekció áll rendelkezésre nitrátredukcióban hibás mutások izolálására /Hackenthal és mti, 1964; Piéchaud és mti, 1967/. Azok a baktériumok, melyekben a nitrátredukcióért felelős enzimrendszer valamelyik fehérjéje funkcióképtelen, a klorátot nem tudják a sejtekre toxikus klorittá redukálni, ezért klorát jelenlétében életképesek és növekedni tudnak. Klorátrezisztencia

/chIR/ alapján E.coliból az eddig izolált mutánsok 7 független lókuszbba térképeződnek /chIA, B, C, D, E, F és G/ /Puig és Azoulay, 1967; Vanables és Guest, 1969; Ruiz-Herrera és mti, 1969; Glaser és DeMoss, 1972; Bachman és mti, 1976/. A chIC mutáció kivételével mindegyik mutáció a nitrátredukción kívül a formiát-dehidrogenáz és formiát-hidrogénliáz aktivitásokat is befolyásolta /Rolfe és Onodery, 1972/. E.coliban a respirációs nitrátreduktáz enzimkomplex fiziológiai e⁻ donora a formiát. A formiátot a formiát-dehidrogenáz oxidálja széndioxiddá, miközben redukálja a NR-t. A két enzim egy enzimkomplexet alkot, melynek közös részei vannak, ami magyarázatul szolgál a NR mutánsok pleiotrop tulajdonságaira /Enoch és Lester, 1975/. A mutációk közül a chIC gén a NR strukturfehérjéjét kódolja /Guest, 1968/. A chID gén/ek/ terméke a Mo-ko bioszintézisében és annak apoproteinnel való egyesítésében vesz részt, melynek eredményeként jön létre az aktív NR /Sperl és DeMoss, 1975/. A chID mutánsok nitrátredukcióra képesek, ha a táptalaj 10⁻³ M molibdátot tartalmaz /Glaser és DeMoss, 1971/. A chIA gén terméke valószínűleg a Mo-ko-hoz kapcsolódó fehérje, mely nélkülözhetetlen a nitrátredukcióhoz. A chIB gén terméke az enzimkomplex membránhoz való kötődését biztosítja /MacGregor és

Schnaitman, 1973/. A ch1E, F és G géntermékek pontos fiziológiai funkciója még nem ismert.

Mint láttuk az *E.coli* csak anaerob körülmények között redukálja a nitrátot nitritté és ennek a folyamatnak energia termelés az eredménye. A baktériumok egy része azonban a nitrátot - mint egyedüli nitrogénforrást - aerob is tudja redukálni, tehát asszimilációs nitrátredukcióra is képes. Mindkét nitrátredukcióra képes például a *Klebsiella aerogenes*.

A *Klebsiella aerogenes* aerob körülmények között nitráton mint egyedüli nitrogénforráson a nitrátot asszimilálja. Az asszimilációs nitrátredukcióért felelős enzimrendszer a citoplazmában oldott állapotban van jelen és a szintézise nitráttal indukálható, ammoniával represszálható.

Anaerob körülmények között, ha nitrát az egyedüli nitrogénforrás, a nitrátot egyidejűleg két enzimrendszer redukálja, mégpedig az előbb említett asszimilációs és a respirációs. A respirációs nitrátredukcióért felelős enzimrendszer membránkötött és működése közben energia termelődik /Hadjipetron és Stouthamer, 1965/. Ammonia jelenlétében az asszimilációs represszálódik, viszont a respirációs szintézisében változás nem történik. Oxigén jelenléte viszont csak a respirációs rendszer szintézisét



represszája /Van't Reit és mti, 1968/.

Az asszimilációs és respirációs nitrátredukcióért felelős enzimrendszer azon fehérjérsze, amelyen a nitrátredukció valójában megtörténik, közös mindkét komplexben /Stouthamer, 1967 a, 1967 b/. Azok a mutánsok melyekben a mutáció ennek a fehérjének a strukturgénjét érintette, sem asszimilációs sem respirációs nitrátredukcióra nem képesek. Ez a fehérje aerob körülmények között, nitrát jelenlétében olyan fehérjékkel kapcsolódik komplexé, melyek oxigén jelenlétében is e^- donálásra képesek. Az aerob e^- transzportláncban bekövetkezett mutáció csak az aerob nitrátasszimilációt érinti.

Anaerob körülmények között egy membránkötött komplex alakul ki. Ebben a komplexben az előzőektől eltérő fehérjék vesznek részt az e^- donálásban, ezért ezekben a fehérjékben mutáns baktériumoknak csak az anaerob nitrátredukciója sérült. Ezek a mutánsok általában pleiotróp tulajdonságokkal rendelkeznek, ami a formiát-oxidációnak; illetve a gáztermelésnek a hiányában nyilvánul meg /Stouthamer és mti, 1967/. Hasonló tulajdonságokkal rendelkező mutánsokról számolt be *Pseudomonas aeruginosa* esetében Hartingsveldt és Stouthamer, 1973.

A baktériumok harmadik csoportját alkotják azok,

amelyek a nitrátot csak aerob körülmények között tudják redukálni, tehát csak asszimilációs nitrátredukcióra képesek. Ebbe a csoportba tartozik a *Rhizobium meliloti*, mely a *Medicago sativa* /lucerna/ gyökereiben található gumókban a levegő nitrogénjét /N₂/ ammoniává képes redukálni, ezáltal pótolni a saját illetve a növény nitrogénszükségletét.

1.4. Célkitűzés.

A nitrát redukciójáért felelős enzimrendszerek rövid áttekintésekor láttuk, hogy a NR a molibdént egy Mo-ko formában tartalmazza, és ez a kofaktor közös a XDH-ban található Mo-ko-val. Bulen és Le Comte /1966/ kimutatta, hogy a nitrogenáz is molibdén tartalmú enzim és a *Rhizobium japonicum* nitrogenázának I-es komponenséből savkezeléssel szabaddá tett Mo-ko helyettesíteni tudja a *N. crassa* NR-ának Mo-ko-át /Nason és mti, 1971/. Ebből az eredményből azt a következtetést vonták le, hogy a NR, a XDH és a nitrogenáz enzimeknek közös Mo-ko-a van. Ezt a feltételezést azonban Shah és Brill /1977/ valamint Pienkos és mti /1977/ biokémiai eredményei cáfolni látszóttak. Az a kérdés, hogy a szóban forgó három enzim egy vagy többfajta Mo-ko között osztozik-e genetikai

módszerekkel eldönthető. Genetikai károsodás a Mo-ko strukturgénjében vagy a bioszintézisében résztvevő enzimek génjeiben pleiotróp hatású lesz mindazon enzimekre nézve, melyek azonos Mo-ko-t tartalmaznak. Mivel a Rhizobium meliloti rendelkezik mindhárom enzimmel /NR, XDH, nitrogenáz/, alkalmas objektum e genetikai munka elvégzésére.

E dolgozatban leírjuk a Rhizobium meliloti két-fajta nitrátredukciójának jellemzését, asszimilációs nitrátredukcióban hibás mutánsok izolálását, a mutánsok biokémiai jellemzését, genetikai analizisét, valamint a mutációk pleiotróp hatását a XDH-ra és a szimbiotikus nitrogénkötésre.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Baktériumtörzsek

A baktériumtörzseket, melyeket használtunk, az 1. táblázatban tüntettünk föl.

2.2. Táptalajok

Az alaptáptalaj /BM/ a következő vegyületeket tartalmazta literenként: 0,1 g K_2HPO_4 , 1 g NaCl, 3 g Tris, 246 mg $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 11 mg $CaCl_2$, 0,27 mg $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$, 0,242 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$, 3 mg H_3BO_3 , 2,32 mg $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$, 0,287 mg $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,125 mg $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, 0,065 mg $CoCl_2$ és 2 mg biotin. A GTS táptalaj, BM kiegészítve literenként: 2 g flükóz, 2,7 g Na-szukcinát. IND táptalaj, BM kiegészítve literenként: 10 g glükóz, 2,7 g Na-szukcinát, 1 g Na-glutamát, 10 mg élesztőkivonat /Difco/. FNO_3 táptalaj, BM kiegészítve literenként 2 g fumársav, 0,85 g $NaNO_3 \cdot HYP$ táptalaj, BM kiegészítve 1 g/l hipoxantinnal. Komplet /GTA/ táptalaj, GTS kiegészítve literenként: 1 g élesztőkivonat /Difco/, 10 g Bacto trypton /Difco/, 10 g NH_4Cl . Mindegyik táptalaj 7,5 pH-ju volt. A szilárd táptalajok 2 %-os Bacto agart /Difco/ tartalmaztak.

1. táblázat A felhasznált baktériumtörzsek és plazmidok

Törzsek	Fenotípus	Genotípus	Eredet
Rm41	vad	-	Dr Szende K.
GY39	Nar ⁻ Met ⁻	<u>narA-168 met-168</u>	GY152 származéka
GY43	Nar ⁻ Phe ⁻	<u>narB-15 phe-15</u>	GY154 "
GY44	Nar ⁻ Ade ⁻	<u>narB-15 ade-15</u>	GY154 "
GY45	Nar ⁻ Trp ⁻	<u>narB-15 trp-15</u>	GY154 "
GY75	Nar ⁻ Met ⁻ Km ^R Tc ^R	<u>narA-168 met-168 /R68.45/</u>	GY39 "
GY81	Nar ⁻ Phe ⁻ Km ^R Tc ^R	<u>narB-15 phe-15 /R68.45/</u>	GY43 "
GY83	Nar ⁻ Ade ⁻ Km ^R Tc ^R	<u>narB-15 ade-15 /R68.45/</u>	GY44 "
GY138	Cys ⁻ Str ^R Km ^R Tc ^R	<u>cys-46 str-1 /R68.45/</u>	AK194 gly ⁺ ade ⁺ tyr ⁺ rekombinánsa
GY141	Cys ⁻ Tyr ⁻ Str ^R Km ^R Tc ^R	<u>cys-46 tyr-1 str-1</u>	AK194 gly ⁺ ade ⁺ rekombinánsa
GY152	Nar ⁻	<u>narA-168</u>	Rm41 származéka
GY154	Nar ⁻	<u>narB-15</u>	Rm41 "
GY156	Nar ⁻ Hyp ⁻	<u>narC-191</u>	Rm41 "

az 1. táblázat folytatása

GY157	Nar ⁻ Hyp ⁻	<u>narD-240</u>	Rm41 származéka
GY197	Nar ⁻ Str ^R	<u>narA-168</u> <u>str-168</u>	GY152 "
GY200	Nar ⁻ Hyp ⁻ Str ^R	<u>narC-191</u> <u>str-191</u>	GY156 "
GY201	Nar ⁻ Hyp ⁻ Str ^R	<u>narD-240</u> <u>str-240</u>	GY157 "
GY202	Nar ⁻ Str ^R	<u>narB-15</u> <u>str-15</u>	GY154 "
GY248	Nar ⁻ Hyp ⁻ Km ^R Tc ^R	<u>narC-191</u> /R68.45/	GY156 "
GY465	Cys ⁻ Str ^R Km ^R Tc ^R	<u>cys-46</u> <u>str-1</u> /R68.45/	GY138 egy klónja
GY491	Nar ⁻ Hyp ⁻ Km ^R Tc ^R	<u>narD-240</u> /R68.45/	GY157 származéka
AK194	Cys ⁻ Gly ⁻ Ade ⁻ Tyr ⁻ Str ^R	<u>cys-46</u> <u>gly-1</u> <u>ade-4</u> <u>tyr-1</u> <u>str-1</u>	Kondorosi és mti./1977b/
AK317	Nar ⁻ Ade ⁻ Gm ^R	<u>narB-15</u> <u>ade-15</u> <u>gen-15</u>	GY44 származéka
AK351	Nar ⁻ Ade ⁻ Str ^R	<u>narB-15</u> <u>ade-15</u> <u>str-17</u>	GY44 "
N461	Eff ⁻ RNR ⁻		Kondorosi és mti. /1973/
EV62	Nar ⁻ Trp ⁻ Str ^R	<u>narB-15</u> <u>trp-15</u> <u>str-16</u>	GY45 származéka
Neurospora			
crassa	Nar ⁻	<u>nit-1</u>	Dr Pienkos P.T.

az 1. táblázat folytatása

Plazmidok

R68.45 $Km^R Tc^R Cma^+ Inc-P1$

Dr Holloway B.W.

$Nar^- Hyp^-$: a nitrát illetve a hipoxantin hasznosítás hiánya.

Str^R , Km^R , Tc^R és Gm^R : rezisztencia 250 ug/ml streptomycin szulfát, 200 ug/ml kanamicin szulfát, 15 ug/ml tetraciklin-HCl és 30 ug/ml gentamicin ellen. Cma: kromoszóma mobilizációs képesség. Inc: inkompatibilitás. Eff: szimbiotikus effektivitás. RNR: "respirációs nitrátredukció.

1
21
1

Az FNO_3 lemezek készítése előtt a Bacto agart desztillált vízben háromszor mostuk. Az összes felhasznált vegyület analitikai tisztaságu volt. A különböző nitrogénforrások koncentrációit, amelyeket a különböző táptalajokhoz adtunk a szövegben tüntettük föl.

2.3. A baktériumok szaporítása és fenntartása

A baktériumtörzseket 20 %-os glicerinben -20C° -on tartottuk fenn. Ujraélesztéskor 50 x-re higitottuk a törzskulturát GTA-ban és 34C° -on aerob szaporítottuk, vagy GTA lemezre egy telepre kikentük és inkubáltuk két napig, majd egy kaccsal egy telepet GTA folyadékban szuszpendáltunk. A baktériumok szaporodását spektrofotometriásan követtük, mérve 540 nm-en a kultúrák denzitását.

2.4. Mutagenézis és mutáns szelekció

Az NTG mutagenézist Rm 41 sejtekkel Kondorosi és mti /1973/ által leirt módszer alapján végeztük. Mutagenézis után a sejteket 0,9 %-os NaCl oldatban mostuk, GTA táptalajban felsuszpendáltuk és növesztettük, hogy a szegregáció létrejöjjön, majd ismételtén mostuk és kétszer passzáltuk 1 g/l NH_4Cl -el

kiegészített GTS táptalajban. A higitott mintákat, melyek körülbelül 100 sejtet tartalmaztak FNO_3 lemeze szélesztettük. A lemezeket egy olyan nylonzsákban inkubáltuk, melyet ammoniamentes levegővel öblítettünk át. Három nap után a kis átlátszó te-
lepeket eltettük a törzsgyűjteménybe.

2.5. A nitrátreduktáz aktivitásának meghatározása

A NR aktivitást minden egyes esetben a redukció folyamán keletkezett nitrit mennyiségének mérésével határoztuk meg. A NR aktivitás meghatározását intakt baktériumokban a következő módon végeztük: 1,0 ml mintát 30 másodpercig argonnal öblítettünk. A reakciót a NaNO_3 adásával indítottuk /10 mM végkoncentráció/ és a nitritreagens /Griess-Ilosvay/ hozzáadásával állítottuk le. A nitrittermelés 15 percig lineáris volt. Levegő jelenlétében a nitrittermelés azonnal leállt.

A metilviologén-kapcsolt aktivitást CTAB-val kezelt sejtekben határoztuk meg. CTAB-t adtunk a baktériumokhoz /végkoncentráció 0,1 mg/ml/ és 3 percig rázattuk. A sejteket lecentrifugáltuk 4 C° -on és a reakcióeleggyel /50 mM foszfátpuffer, pH 7,3, 850,0 mg/l NaNO_3 , 100 mg/l MV/ mostuk. Végezetül a

sejteket a sejteket 1 ml reakcióelegyben szuszpendáltuk és 0 C°-on tartottuk /max. 1 napig/. A NR aktivitást a következőképpen határoztuk meg: CTBA kezelt sejtek megfelelő hígítású szuszpenziójából 4,95 ml-t pipettáztunk egy kémcsőbe és 30 másodpercig argonnal öblítettük. A reakciót 0,05 ml frissen készített Na₂S₂O₄ oldat /25 mg/ml/ hozzáadásával indítottuk. A reakció argon áram alatt, nyitott kémcsőben, 30 C°-on játszódott le. 1 ml mintákat vettünk ki megfelelő időközben és ditionit gyors oxidálásával /erős keverés/ állítottuk be a reakciót. A nitrittermelődéssel 1 óráig lineáris volt. 1 nmól nitrit termelődése, 1 perc alatt 30 C°-on jelentette az enzim aktivitásának 1 egységét. A specifikus aktivitás az enzim egységek 1 mg fehérjére számított értéke jelentette. Nitritreduktáz aktivitást egyik esetben sem tudtunk kimutatni.

2.6. Nitritmeghatározás

A nitrit mennyiségét spektrofotometrián a Nicholas és Nason /1957/ által leírt módszer kis változtatásával határoztuk meg. 0,5 ml frissen készített Griess - Ilosvay reagenst adtunk a vizsgálandó minta 1 ml-éhez. /A Griess - Ilosvay reagens az 1 %-os szulfonilsav , 30 %-os ecetsavban és a 0,3 %-os 1- naftilamin, 30 %-os

ecetsavban oldott, 1:1 arányu keveréke/. 10 perc elteltével a mintákat locentrifugáltuk és a keletkezett szín optikai denzitását Spektromom 404 Spektrofotométeren határoztuk meg zöld szűrőt /540 nm/ használva.

2.7. Fehérjemeghatározás

A fehérjét Lowry és mti. /1951/ által leirt és Hartree és mti. /1972/ által módosított módszer alapján határoztuk meg. Ezt az eljárást jó reprodukálhatósággal egész sejtekre is használni tudtuk. Bovine Serum Albumine-t /Sigma/ használtunk összehasonlításul.

2.8. Poliakrilamid gélelektroforézis

Az elektroforézist 7.5 %-os gélben, pH 8.5-ön Davis /1964/ szerint hajtottuk végre. A sejtmentes kivonatot ultrahang feltárással /15 x 30 másodpercig, legnagyobb kijövőenergiával, MSE ultrahangozó készüléken/ állítottuk elő. A nyerskivonatot 4 C^o-on 20 percig 35000 g-vel centrifugáltuk. A felüluszt desztillált vízzel szemben egy éjszakán át dializáltuk. 200 ug fehérjét 20 %-os szacharózban tettük a gélek tetjére és gélenként 3 mA árammal futtattuk 4 C^o-on, míg a jelző szín /brómfenolkék/ el nem érte a gélek

alját. A géleket 1 %-os Coomassie Brilhoant Blue R-250 /isopropanol:ecetsav, 2.5:1/ oldattal hivatuk elő fehérjére, majd 10 %-os ecetsavval festéktelenítettük.

A gélek XDH aktivitását Mendel és Müller /1976/ módszere szerint mutattuk ki. A gélek NR aktivitásának előhívására a géleket nitrátmentes reakcióelegyben, melyet 25 mg/ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -el kiegészítettünk, 10 percig tartottuk majd áttettük olyan reakcióelegybe melyből hiányzott a MV. A NR helyén a sötétkék gél elszíntelenedett.

2.9. Komplementációs teszt

A *Neurospora crassa nit-1*-es mutánsát NH_4Cl tartalmu Friés táptalajban szaporítottuk, majd átraktuk NaNO_3 -ot tartalmazó táptalajba, hogy indukálja a NR szintézisét /Pienkos és mti, 1977/. A micéliumokat homokkal 4 C° -on homogenizáltuk /0,1 M foszfátpuffer, pH 7,2 5 mM EDTA, 1 mM fenil-metil-szulfonil fluorid, 1 mM NADPH, 1 % NaCl/ és centrifugáltuk 30 percig 30.000 g-vel. A vad típusu és mutáns Rm 41 sejteket GTA táptalajban exponenciális fázisig növesztettük és a nyers kivonatokat /9,2 - 17 mg/ml fehérje/ az elektroforézisnél leirt módszer szerint készítettük. Sav-

kezelt nyerskivonatot Nason és mti /1971/ által le-
irtak szerint kaptunk azzal a kivétellel, hogy ar-
gont használtunk nitrogén helyett. A nit-1 mutáns
sejtmentes kivonatának /11.4 mg/ml fehérje/ 0,25 ml-ét
30 percig szobahőn inkubáltuk a vad és mutáns bakté-
riumok 0,5 ml savkezelt nyers kivonatával. Az inkubá-
lás után meghatároztuk a minták NADPH₂ függő NR akti-
vitasát /Pienkos és mti, 1977/. A keletkezett nitri-
tet az előzőekben leirtak szerint határoztuk meg.

2.10. Növényi teszt

A baktériumok szimbiotikus effektivitását Kondorosi
és mti /1977 a/ szerint vizsgáltuk.

2.11. A baktériumok konjugációja

A keresztezéseket Dixon és mti /1976/ és Kondorosi
és mti /1977/ által leirtak szerint csináltuk. Hipoxan-
tin hasznosításra a szelekciót HYP lemezen végeztük.

3. Eredmények

3.1. Kétfajta nitrátredukció Rhizobium melilotiban

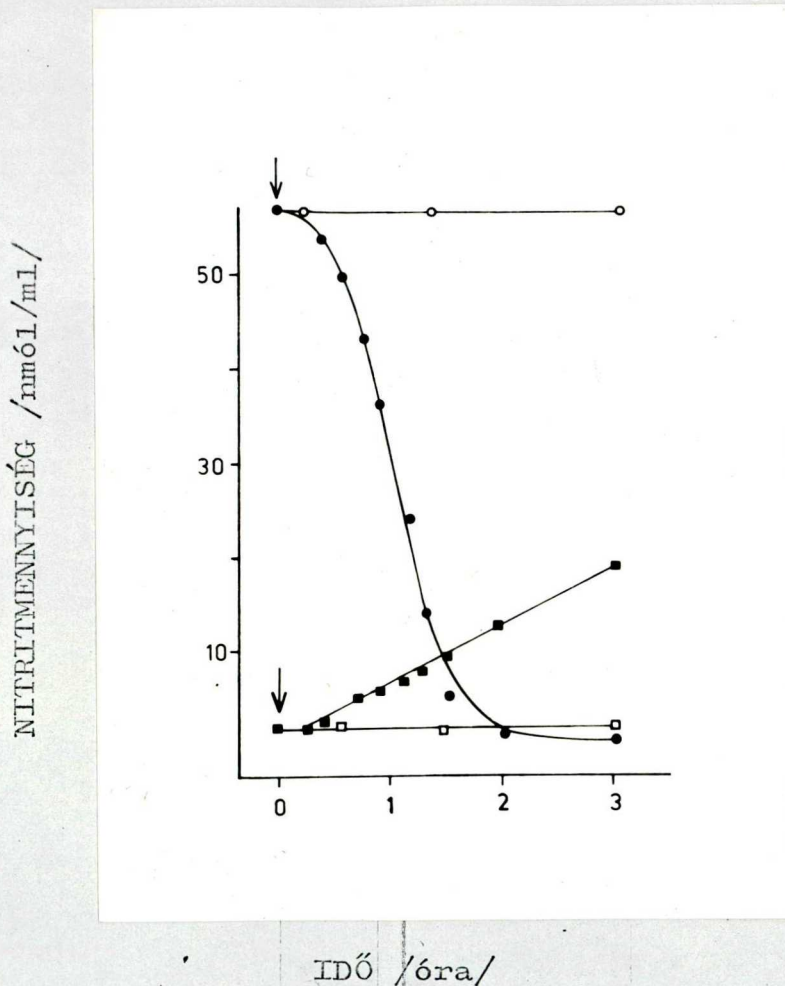
A Rm41 két különböző fiziológiai körülmény között mutat nitrátredukciós aktivitást. A nitrátredukcióban hibás mutánsok izolálása előtt szükséges e két aktivitás egyértelmű megkülönböztetése.

3.1.1. Asszimilációs nitrátredukció

Aerob körülmények között az Rm41 a nitrátot - mint egyedüli nitrogén forrást - hasznosítani tudja, melyből következik, hogy asszimilációs nitrátredukcióra képes. Az asszimilációs nitrátredukciót IND táptalajban tudjuk kimutatni. IND táptalajban az Rm41 körülbelül négy óras osztódási idővel szaporodik. Ha ehhez a táptalajhoz ammoniát, nitrátot vagy hipoxantint adunk, a generációs idő két órára csökken, jelezve hogy a IND táptalajban a baktériumok ellátása korlátozott. Az asszimilációs nitrátredukciót ezért IND táptalajban ki lehet mutatni, ha nitrát adása után követjük a nitrit felhasználódását /1.ábra/. Mivel magának a nitritnek az adása a nitrit eltűnésével jár /asszimilációs nitrátredukció/, az össz NR aktivitás feltételezhetően



1. ábra: Az asszimilációs nitrát- és nitritredukció kimutatása



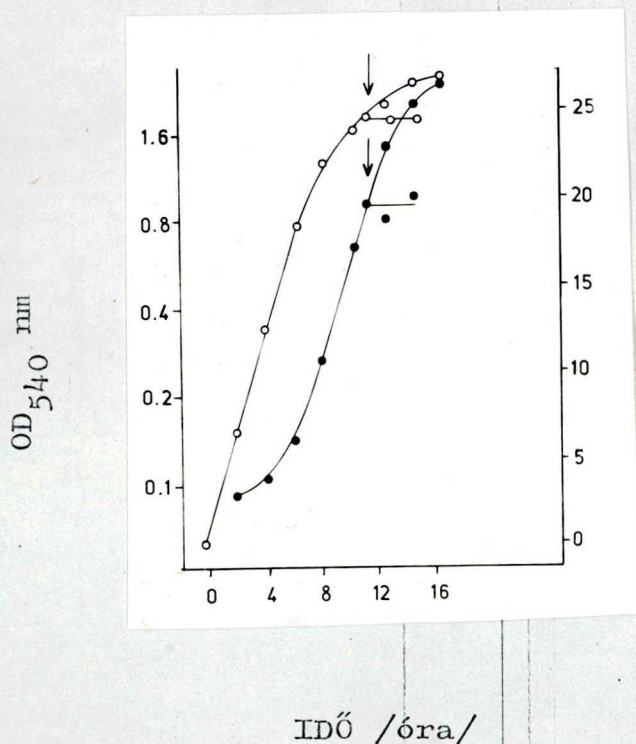
Az Rm41 sejteket IND táptalajban 34 C^o-on fölnövesztettük 1x10⁸ sejt/ml sűrűségig, majd négy részre osztottuk és tovább inkubáltuk. Különböző időkbén mintát vettünk és azonnal meghatároztuk a nitrit mennyiségét /lásd 2.6.pontot/. A következő vegyületeket adtuk a nyillal jelzett időben: KNO₂ /o/, KNO₂ és kloramfenikol vagy NH₄Cl. /•/, NaNO₃ /□/, NaNO₃ és kloramfenikol vagy ammonia /■/. A nitrogénforrásoknak 10 mM, a kloramfenikolnak 200 µg/ml volt a végkoncentrációja.

nagyobb, mint az össz NIR aktivitás. Kloramfenikol adása után sem nitritkezelést, sem fogyást nem tapasztaltunk, ami arra utal, hogy de novo fehérje-szintézis szükséges az asszimilációs nitrát - és nitritredukció beindulásához. Az ammonia adása ugyanilyen eredménnyel járt, ami az ammonia represziós hatására utal.

3.1.2. "Respirációs" nitrátredukció

Az Rm41 szigorúan aerob baktérium. Anaerob növekedésre sem nitrát jelenlétében, sem hiányában nem képes, legalábbis azokon a táptalajokon, amelyeken kipróbáltuk. Nitrátredukciós aktivitással azonban rendelkeznek a komplett /GTA/ táptalajon szaporodó Rm41 sejtek az exponenciális fázis végefelé. Ennek a nitrátredukciós aktivitásnak az indukcióját mutatja a 2.ábra. Nitritredukció ilyen körülmények között nem mutatható ki. Intakt baktériumokban az oxigén interferál ezzel a nitrátredukcióval. Kloramfenikol adása után sem a sejtosztódás, sem a nitrátredukció további indukciója nem folytatódik. Ammonia az indukciót nem befolyásolja. Más baktériumok nitrátredukciós rendszerével összhangban az utóbbi nitrátredukciót az egyszerűség kedvéért "respirációs"-nak ne-

2. ábra: A "respirációs" nitrátredukció indukciója
komplett táptalajban



Az Rm41 sejteket GTA táptalajban aerob növesztettük körülbelül $1-5 \times 10^7$ sejt/ml sűrűségig, majd különböző időpontokban mintát vettünk és meghatároztuk a sejtek densitását /lásd 2.3.pontot/ és az intakt sejtek NR aktivitását /lásd 2.5.pontot/. A kísérlet indításakor nagyfokú hígítás szükséges, hogy a maradék NR aktivitás eltűnjön a stacioner fázisu sejtekből. OD₅₄₀ /o/, nitrátreduktáz specifikus aktivitás /o/. Kloramfenikolt /200 µg/ml végkoncentráció/ adtunk a nyilakkal megjelölt időpontokban.

vezzük, habár respirációs funkciója nincs, de indukciójában hasonlít a respirációs típusu enzimekéhez /Van'T Reit és mti, 1968/.

3.2. Asszimilációs nitrátredukcióban hibás mutánsok izolálása /Nar⁻/

Asszimilációs nitrátredukcióban hibás mutánsok a nitrátot - mint egyedüli nitrogénforrást - hasznosítani nem tudják és így nitráton növekedni képtelenek. Nar⁻ mutánsokat nitrátot tartalmazó lemezen /FNO₃/ izoláltunk. Ha a nitrátot kihagytuk ebből a táptalajból, a vad típusu telepek kisebbek és átlátszóbbak voltak mint a nitrátot tartalmazó táptalajon növekedő telepek. /Ennek a kismértékű növekedésnek a táptalajban lévő ammonia, vagy más szerves nitrogén-szennyeződések a magyarázata/. Azt vártuk, hogy a Nar⁻ mutánsok telepei ugyanolyan fenotípussal rendelkeznek majd, mint a vad típusu telepek nitrát nélküli táptalajon. Ez így is történt, és ennek a rendszernek a segítségével 25 Nar⁻ mutánst izoláltunk az Rm41-ből. Az izolálás eredményeit a 2. táblázatban foglaltuk össze. A mutánsokat folyékony minimál táptalajba oltottuk, -mely nitrátot vagy nitritet tartalmazott- és ellenőriztük növekedésre valamint nitrit termelésre és fogyasztás-

2. táblázat: A muánsok izolálásának összefoglalása

Az átvizsgált telepek száma	A feltételezett telepek száma	Igazi Nar^- izolátumok száma	Nitrátot nem-hasznosítók száma	Nitritet nem-hasznosítók száma
4969	97	5	5	0
4576	62	6	3	3
3542	54	6	3	3
4928	69	14	9	5
6262	48	2	2	0
10602	61	2	2	0
5959	36	1	1	0

A mutagenizálás után a sejteket hét csőbe osztottuk szét. A szelekciót FNO_3 lemezen végeztük úgy, ahogy azt a 2.4. pontban leírtuk.

ra, ahogy azt az 1. ábra alatt leírtuk a vad típusu baktérium esetében. Ezek alapján a mutánsokat két csoportra tudtuk osztani: 1. nitrátot nem hasznosítók; 2. nitritet nem hasznosítók. A nitrátot nem hasznosító 25 mutánst biokémiai és genetikai vizsgálatok során /lásd később/ négy osztályba tudtuk sorolni. Mindegyik osztály egy-egy reprezentánsát /GY152, GY154, GY156, GY157/ választottuk ki a további vizsgálatokhoz.

3.3. A Nar^- mutánsok növekedése különböző nitrogénforráson

Számos mutáció eredményezheti azt a tulajdonságot, hogy az eredetileg nitráthasznosító baktérium nem tudja többé hasznosítani a nitrátot. Például a NR enzimrendszer struktur - vagy regulátorgénjeiben illetve a nitrát transzportjáért felelős génekben bekövetkezett mutáció eredményezheti ezt a fenotípust. A Mo-ko-ban vagy a különböző nitrogénhasznosítás regulációjában mutáns baktériumok viszont a nitrátredukció hiánya mellett más nitrogénforrást sem képesek hasznosítani. Ezért ellenőriznünk kell a mutánsok növekedését különböző nitrogénforrásokon /3. táblázat/. Mindegyik mutánstípus jól növekszik hiszti-

3. táblázat: A mutánsok növekedése különböző nitrogénforrást tartalmazó folyékony táptalajban

Törzsek	-	Nitrát	Ammonia	Xantin	Hipox.	Hugysav
Rm41	0.32	1.32	1.68	1.53	1.56	1.40
GY152	0.36	0.39	2.35	1.68	1.95	1.80
GY154	0.40	0.38	2.90	1.75	1.75	1.55
GY156	0.21	0.20	2.25	0.37	0.19	1.35
GY157	0.37	0.33	2.20	0.34	0.35	1.90

Az Rm41 és a mutáns baktériumok GTA táptalajban fel-
nőtt tenyészetét fiziológias sóoldatban $1-5 \times 10^3$ sejt/
ml-re higitottuk. 0.1 ml-t adtunk 5 ml GTS táptalajba,
amit különböző nitrogénforrásokkal egészítettünk ki
/lásd táblázat/. A nitrogénforrások végkoncentrációja
1 mg/ml. Három nap aerob inkubálás után megmértük a
tenyészetek optikai denzitását 540 nm-en.

Hipox. = hipoxantin

dinen, prolinon, glutaminon, aszparaginon és ureán. Két mutánsosztály egy-egy reprezentánsa /GY156 és GY157/ azonban nem nő hipoxantinon és xantinon, de nő hűgysavon - a purin anyagcsereút közttitermékein. Mivel a XDH felelős mind a hipoxantin mind a xantin oxidatív lebontásáért, e két mutáns növekedési tulajdonságai azt sejtetik, hogy bennük a NR aktivitás mellett a XDH aktivitás is hiányzik. A mutánsok közül egyik sem növekszik nitrátot tartalmazó táptalajon 10^{-2} M Na_2MoO_4 jelenlétében.

3.4. A mutánsok NR aktivitása

Az Rm41 nyerskivonatának NR aktivitását, nátrium-
conditionittal, mint e^- donorral és MV-al, mint e^- köz-
vetítővel in vitro mérni tudjuk. Ez az aktivitás akkor
is meghatározható, ha a sejteket nem tárjuk fel, hanem
membránjukat átjárhatóvá /permeábilissé/ tesszük CTAB
kezeléssel. A mutánsok MV-kapcsolt NR-ának meghatáro-
zásával eldönthető, hogy a mutáció érintette-e az ezért
az aktivitásért felelős fehérje strukturgénjét, vagy
regulációját. Fontos megjegyezni azt, hogy a GY152 meg-
tartotta in vivo "respirációs" nitrátredukciós akti-
vítását, míg a GY154, a GY156 és a GY157 elvesztette
az asszimilációs mellett a "respirációs" nitrátreduk-



ciós képességét is.

A 4. táblázat bemutatja a különböző nitrogénforráson szaporodott, exponenciális fázisu, CTAB kezelt vad típusu és mutáns baktériumok MV-kapcsolt NR aktivitását. Az exponenciális fázisu Rm41 sejtekben, amelyek ammonia vagy glutamáton nőttek - mint egyedüli nitrogénforráson - körülbelül husszor magasabb volt a NR specifikus aktivitás a komplett táptalajon szaporítottéhoz viszonyítva. Nitrát adása a glutamátot tartalmazó táptalajhoz kétszeres növekedést eredményezett. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a MV-kapcsolt NR aktivitás szintje a nitrogénforrás milyenségétől függ, és a nitrát nem elengedhetetlen az indukcióhoz, habár szinergetikus hatás nem zárható ki. Az N461-es mutáns, melyet Kondorosi és mti /1973/ előzőleg izoláltak és képtelen a szimbiotikus nitrogénkötésre, harmincszor -százszor kisebb aktivitással rendelkezik valamennyi táptalajon az Rm41-hez viszonyítva. Ez a mutáns azonban nitrát minimál táptalajon növekedni tud /Sik és Barabás, 1977/. Ez azt valószínűsíti, hogy a vad baktérium MV-kapcsolt NR-ának 1 %-a elegendő a nitrátasszimilációhoz.

A 4. táblázatban szintén láthatjuk, hogy a GY154, a GY156 és a GY157 mutánsoknak egyáltalán nincs MV-kapcsolt NR aktivitásuk a vizsgált táptalajokon. A GY152 mutánsnak valamivel magasabb aktivitása van mint az Rm41-nek, a GTA táptalajt kivéve, ami azt jelenti,

4. táblázat: A mutánsok MV-kapcsolt nitrátreduktáz aktivitásai

Törzsek	GTA	GTSNH ₄	IND	IND+NO ₃ ⁻
Rm41	1.47	13.80	23.40	42.40
GY152	0.90	16.90	104.40	124.60
GY154	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.01
GY156	< 0.01	< 0.01	< 0.02	< 0.01
GY157	< 0.01	< 0.01	< 0.02	< 0.01
N461	0.046	0.24	0.22	0.43

A MV-kapcsolt NR aktivitásokat exponenciális fázisu sejtekből /0.2-0.4 OD₅₄₀ nm/ határoztuk meg. A baktériumok a táblázatban feltüntetett táptalajokban szaporodtak. A sejteket CTAB-val kezeltük. A számértékek a NR specifikus aktivitását jelentik. Az ammónia és nitrát végkoncentrációja 1 mg/ml volt.

hogy a mutáció nem befolyásolta a NR strukturgénjét. Az Rm41 és GY152 nyerskivonatának NR aktivitása egy éles csikban mutatható ki poliakrilamid gélben elektrofokuszálás után. Mint az várható, enzimaktivitást gélben sem tudtunk kimutatni a GY154, a GY156 és a GY157 mutánsok nyerskivonataiból. Sajnos fehérje csik nem azonosítható az enzim aktivitásának a helyén az Rm41 esetében, ezért a mutánsok NR géntermékével kapcsolatban semmit sem mondhatunk.

3.5. A mutánsok XDH aktivitása

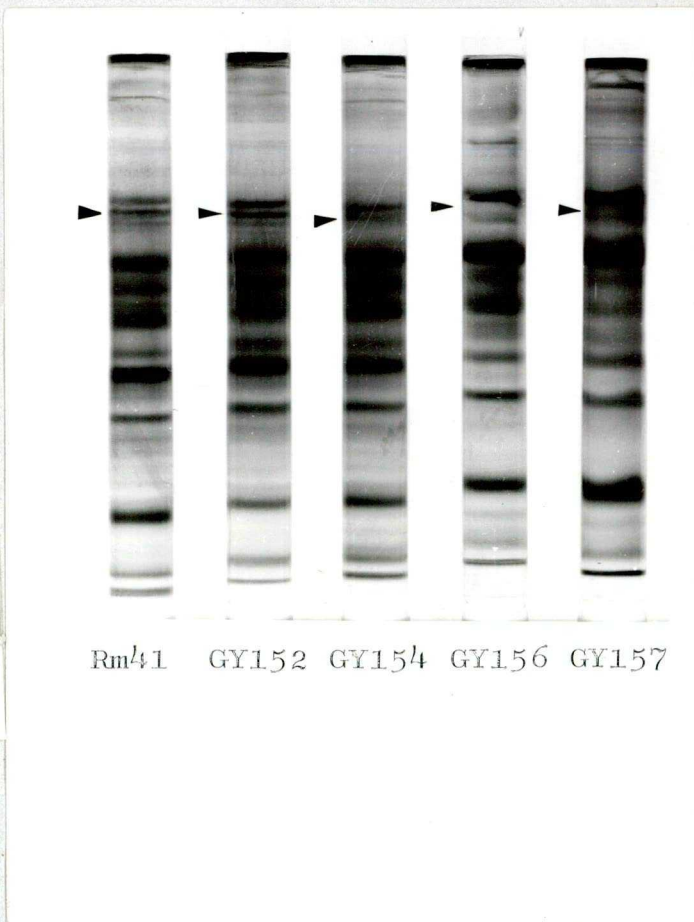
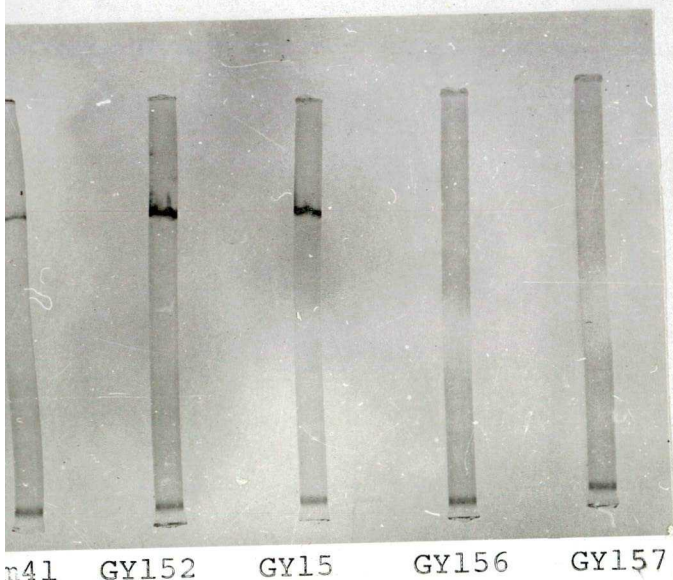
Fontos volt tudnunk azt, hogy a hipoxantin vagy a xantin transzportrendszere, vagy maga a XDH sérült-e azokban a mutánsokban melyek nem tudják hasznosítani a két vegyületet. Az Rm41 XDH aktivitása poliakrilamid gélben elektroforetizálás után kimutatható /3 A ábra/. A halványsárga p-nitrotetrazolium-kéket a XDH, hipoxantin jelenlétében egy barnásbibor színű vegyületté redukálja, így a gélben egy színes csik jelenik meg ott ahol a XDH található. A GY152 és a GY154 az Rm41-hez hasonlóan rendelkezik, míg a GY156 és a GY157 nem rendelkezik XDH aktivitással. Mivel csekély XDH aktivitás mutatható ki azokban a gélekben, amelyekben hipoxantinnal nem indukált Rm41-es sejtek nyerskivo-

3. ábra: A xantindehidrogenáz aktivitása és fehérje mintázata poliakrilamid gélben

6

A

B



Az Rm41 és mutáns baktériumokat IND táptalajban, 1 mg/ml hipoxantinnal kiegészítve növesztettük az exponenciális fázis végéig. A nyerskivonatot és a gélelektroforézist a 2.8.pontban leírtak alapján készítettük illetve hajtottuk végre. A: a gélek XDH aktivitása. B: a gélek fehérje mintázata.

natát futtattuk, a GY156 és a GY157 mutánsokban a mutáció a XDH strukturgénjét is érintette, mert ez a maradék aktivitásuk is eltűnt. Ha géleket fehérjére hívtuk elő /3 B ábra/ egy éles fehérjecsik jelent meg az Rm41, a GY152 és a GY154 baktériumok XDH aktivitásának a helyén. Ez a fehérjecsik nem látható a GY156 és a GY157 esetében.

3.6. Komplementációs analízis a Neurospora crassa nit-1 mutánsának segítségével

Különböző molibdéntartalmu enzimek vagy nyerskivonatok Mo-ko aktivitása mérhető az alapján, hogy képes-e helyreállítani a *N. crassa nit-1* mutánsának NADPH-NR aktivitását /Nason és mti, 1970; Nason és mti, 1971; MacGregor és Schnaitman, 1972; Ketchum és Downey, 1975/. Az 5. táblázat eredményei mutatják, hogy az Rm41, a GY152 és a GY154 baktériumok nyerskivonatából savkezeléssel aktiv Mo-ko szabadítható fel. A GY157-ben minimális a Mo-ko aktivitás, míg a GY156-ban egyáltalán nem mutatható ki. Ebből arra következtethetünk, hogy ebben a két mutánsban a mutáció vagy a Mo-ko strukturgénjét vagy a bioszintéziséért felelős enzimek génjét érintette. A Mo-ko hiánya magyarázhatja a mutáció pleiotróp tulajdonságait.

5. táblázat: A Neurospora crassa nit-1-es mutáns nitrát-reduktázának in vitro komplementációja az Rm41 és mutánsainak savkezelt nyerskivonatával

Törzsek	Helyreállított NR aktivitás
-	0.0
Rm41	40.0
GY152	40.0
GY154	56.0
GY156	0.0
GY157	2.1

A savkezélést és a komplementációt a 2.9. pontban leírtak alapján hajtottuk végre. Az Rm41 és mutáns baktériumok savkezelt nyerskivonatának nem volt NR aktivitása. A megadott értékek a NR specifikus aktivitását jelentik a nit-1 kivonatára vonatkoztatva.

3.7. Szimbiotikus effektivitás

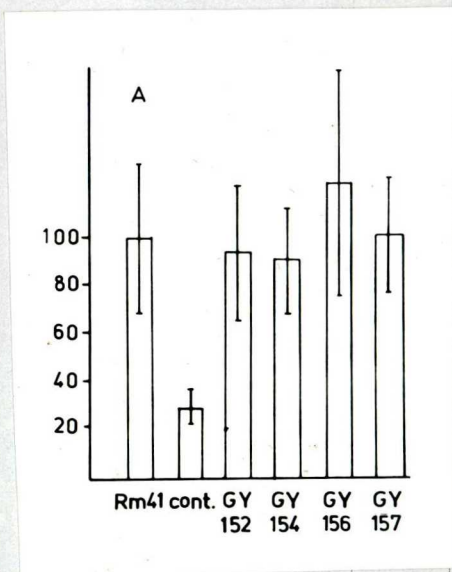
Az Rm⁴¹ és a mutáns törzseket növényi tesztben ellenőriztük, hogy a mutáció befolyásolta-e a szimbiotikus nitrogénkötést. Medicago sativa /lucerna/ növénykéket a baktériumokkal fertőztük, inkubáltuk és megfelelő idő /4-6 hét/ elteltével meghatároztuk a növények acetilénredukciós képességét illetve megmértük a növények szárazsúlyát. A 4. ábra mutatja, hogy a mutánsok éppolyan effektívek acetilénredukció és szárazsúly alapján, mint az Rm⁴¹. Mivel a baktériumok, melyeket a gumókból izoláltunk vissza, megtartották mutáns fenotípusukat, az effektivitás nem a mutációk reverziójának a következménye.

3.8. Reverziós analízis

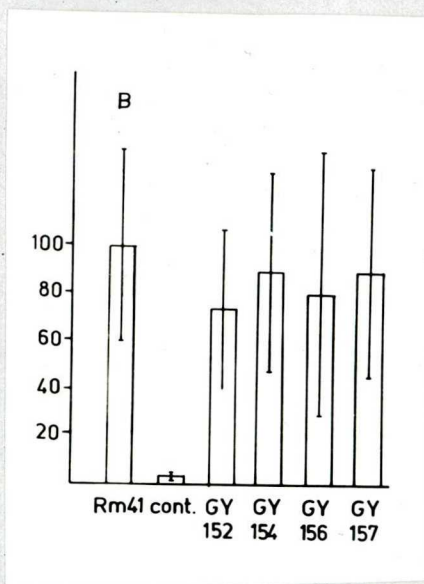
Két vagy ^{több} tulajdonság megváltozásánál az elsőrendű és legfontosabb kérdés az, hogy a szóbanforgó mutáns fenotípust egy vagy több génben bekövetkezett mutáció okozta-e, vagy sem. Ezt a kérdést revertánsok izolálásával és azoknak a jellemzésével lehet eldönteni. Ezért a mutáns baktériumokból streptomycin rezisztens származékokat izoláltunk /GY197, GY202, GY200, GY201/, mely a revertánsok azonosítását lehetővé tette.

4. ábra: Az Rm41 és mutáns baktériumok szimbiotikus
effektivitása

%-os SZÁRAZSÚLY /mg/növény/



%-os C₂H₂ REDUKCIÓ /mmól/



A növényi tesztet a 2.10.pontban leírtak szerint végeztük. Tíz növényt fertőztünk mindegyik baktériumtörzsszel és legalább háromszor megismételtük a kísérletet. Az oszlopokban lévő szakaszok 5 %-os szignifikanciaszintet jelentenek/ $n-1=9$ /. A: a növények szárazsúlya az Rm41-el fertőzött növények átlagos szárazsúlyának százalékában. B: acetilén redukció az Rm41-el fertőzött növények átlagos aktivitásának százalékában.



10^{-9} - 10^{-10} gyakorisággal kaptunk nitrátot hasznosító revertánsokat FNO_3 lemezen a GY197 és a GY202 baktériumokból és ugyanilyen gyakorisággal kaptunk nitrátot illetve hipoxantint hasznosító revertánsokat FNO_3 illetve HYP lemezeken a pleiotrópiát mutató baktériumokból /GY200, GY201/. Mindkét esetben mindkét mutáns összes revertánsa visszanyerte a vad fenotípust a hipoxantin illetve a nitrát hasznosítás szempontjából. Ez az eredmény azt jelenti, hogy a NR és XDH elvesztéséért mindkét mutáns esetében /GY156, GY157/ egyszeres pontmutáció felelős, tehát valódi pleiotróp mutációkkal állunk szemben.

3.9. A Nar^- mutánsok genetikai analizise

A közelmúltban munkacsoportunk megszerkeztette az $\text{Rm}41$ köralaku genetikai térképét az $\text{R}68.45$ plazmid segítségével /Kondorosi és mti, 1977a/. Az $\text{R}68.45$ kromoszóma mobilizációra képes és ezért segítségével genetikai rekombinációs analizist végezhetünk. Amennyiben két mutáció egy génben van, a markerek közötti rekombinációs gyakoriság olyan alacsony, hogy kimutatni nem tudjuk, amennyiben nem, a rekombinánsok számából a markerek közötti távolság meghatározható. Célunk volt tehát meghatározni azon lókuszok számát, melyek

résztesznek a nitrát asszimilációjában. Ezért először belevittük az R68.45 plazmidot, a három különböző fenotípusu Nar^- mutáns auxotróf származékába és keresztezést hajtottunk végre ezen donorok és az ugyanolyan fenotípussal rendelkező recipiensek között. Rekombinációk nem jelentek meg azokban a keresztezésekben, ahol a GY75-öt /a GY152 mutáns met-168 származéka, mely tartalmazza az R68.45-öt/, mint donort és a GY152 mutánssal azonos fenotípusú mutánsokat, mint recipienseket használtuk. Ezek a mutációk valószínűleg egy lókuszbba esnek és ezt a mutánstípust narA-nak neveztük el. Szintén nem jelentek meg rekombinációk azokban a keresztezésekben ahol a GY81-et /a GY154 mutáns phe-15 származéka, mely tartalmazza az R68.45-öt/, mint donort és a GY154 mutánssal azonos fenotípusú mutánsokat, mint recipienseket használtuk. Ezek a mutációk is valószínűleg egy lókuszbba esnek és narB-nek neveztük el. Amikor azonban a GY248-at /GY156 mely tartalmazza az R68.45-öt/ kereszteztük a 11 pleiotróp fenotípust mutató mutánssal 8 esetben kaptunk rekombinációkat. A nyolc mutáns /a GY157-et beleértve/ lókuszt narD-nek a maradék hármat /GY156-ot beleértve/ narC-nek neveztük.

A rekombinációs analízis után kezdtük el a nar mutációk helyét megállapítani a kromoszómán. A narB-15

lokalizációját úgy állapítottuk meg, hogy a GY154 egy auxotróf származékát használtuk recipiensként és megállapítottuk az auxotróf marker és a narB marker kapcsoltságát. Azt találtuk, hogy a narB marker a trp-15 és az ade-15 markerek között foglal helyet /6. táblázat 1-3. keresztezés/.

A narC és a narD gének helyét más módszerrel állapítottuk meg. Az R68.45 plazmidot átvittük a GY157-es törzsbe /GY491/ és ezt használva donorként kereszteztük AK351-el és EV62-vel. Streptomocinnel ellenszelektáltunk ade-15-re illetve trp-15-re szelektáltunk és meghatároztuk a szelektált markerek és a nemszelektált markerek /hipoxantin nemhasznosítás/ közötti kapcsoltságot replikázással. A 6. táblázat /4-5. keresztezés/ mutatja, hogy a narD szintén a trp-15 és az ade-15 markerek között található. A 6. táblázat 6., 7. és 8. keresztezése mutatja a tyr-1, a trp-15 és az ade-15 markerek kapcsoltsági adatait. Megfigyeltük, hogy a GY248-as törzset keresztezve az EV62-vel a trp-15 és narB-15 közti 57 %-os kapcsoltsági gyakoriság 0.06 %-ra csökkent. Ha ezt a donort kereszteztük AK351-el nem kaptunk ade-15⁺narB-15⁺ rekombinánsot. Ez az eredmény azt jelenti, hogy a narB-15 és narC-191 gének nagyon közel vannak egymáshoz és a narC-191 közelebb van az ade-15-höz. A nar gének térképhelyzetét az 5. ábrán láthatjuk. A narA-168 markert ezidáig még nem térképeztük be.

6. táblázat: A kromoszóma nar régiójának kapcsoltsági adatai

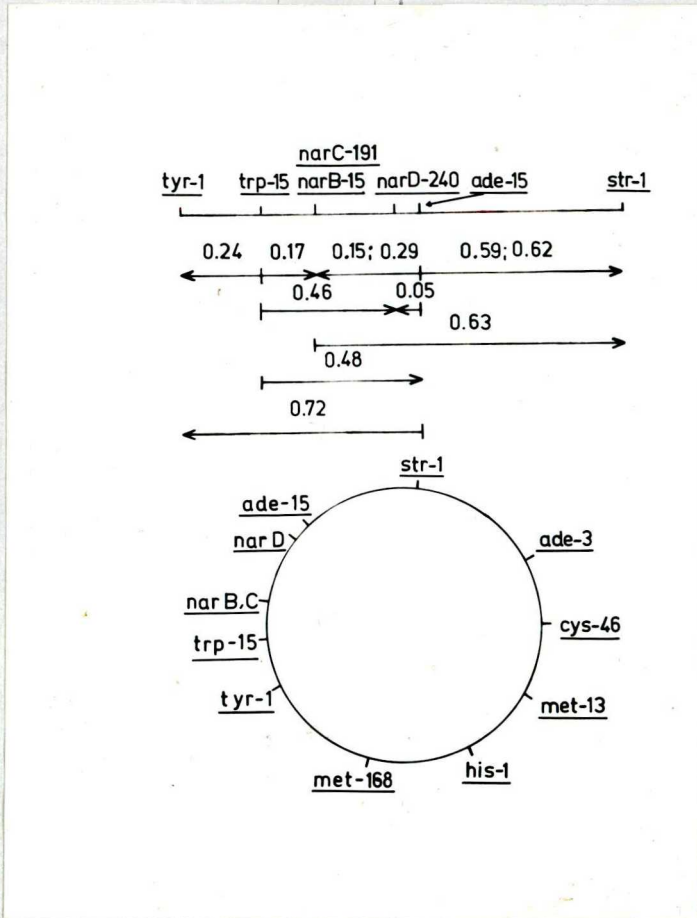
Keresz- tezés	Donor	Reci- piens	Ellenszelektált Szelektált marker	A rekombinánsok nemsze- lektált osztályai	%	A markerpárok kap- csoltsága	<u>c</u>	Térképtá- volság	<u>d</u>
1	GY138	GY44	<u>cys-46/ade-15⁺</u>	<u>narB-15⁺</u> <u>str-1⁺</u>	55	<u>ade-15⁺</u> <u>narB-15</u>	0.62	0.15	
				<u>narB-15</u> <u>str-1⁺</u>	38	<u>ade-15⁺</u> <u>str-1</u>	0.07	0.59	
				<u>narB-15⁺</u> <u>str-1</u>	5.2	<u>narB-15⁺</u> <u>str-1</u>	0.052	0.63	
				<u>narB-15</u> <u>str-1</u>	1.8				
2	GY465	GY44	<u>cys-46/ade-15⁺</u>	<u>narB-15⁺</u> <u>str-1⁺</u>	38	<u>ade-15⁺</u> <u>narB-15⁺</u>	0.38	0.29	1 87
				<u>narB-15</u> <u>str-1⁺</u>	62				
3		GY45	<u>cys-46/trp-15⁺</u>	<u>narB-15⁺</u> <u>str-1⁺</u>	57	<u>trp-15⁺</u> <u>narB-15⁺</u>	0.57	0.17	
				<u>narB-15</u> <u>str-1⁺</u>	43				
4	GY491	AK351	<u>str-2/ade-15⁺</u>	<u>narD-240⁺</u>	13	<u>ade-15⁺</u> <u>narD240</u>	0.87	0.05	
				<u>narD-240</u>	87				
5		EV62	<u>str-15/trp-15⁺</u>	<u>narD-240⁺</u>	84	<u>trp-15⁺</u> <u>narD-240</u>	0.16	0.46	
				<u>narD-240</u>	16				
6	GY141	GY44	<u>cys-46/trp-15⁺</u>	<u>tyr-1</u> <u>str-1⁺</u>	45	<u>trp-15⁺</u> <u>tyr-1</u>	0.45	0.24	
				<u>tyr-1⁺</u> <u>str-1⁺</u>	55				
				<u>tyr-1</u> <u>str-1</u>	0	<u>trp-15⁺</u> <u>str-1</u>	0.01	-	
				<u>tyr-1⁺</u> <u>str-1</u>	0				

a 6. táblázat folytatása

7	GY83	EV62	<u>str-15/trp15⁺</u>	<u>ade-15</u>	14	<u>trp-15⁺</u> <u>ade-15</u>	0.14	0.48
				<u>ade-15⁺</u>	86			
8	GY141	AK317	<u>cys-46/ade15⁺</u>	<u>tyr-1⁺</u>	98	<u>ade-15⁺</u> tyr-1	0.02	0.72
				<u>tyr-1</u>	2			
			<u>cys-46</u> <u>tyr-1/ade-15⁺</u> <u>str-1⁺</u>		94	<u>ade-15⁺</u> <u>str-1</u>	0.06	0.62
				<u>str-1</u>	6			

c: a markerpárok kapcsoltsági gyakorisága. d: additív térképtávolság a markerpárok között /önkéntes egységekben/. $d = 1 - c$ /Kondorosi és mti., 1977a/. A keresztezést minden esetben Dixon és mti. /1976/ által leírtak alapján végeztük. A szelektív minimál táptalajt /GTSNH₄/ szükség szerint kiegészítettük; az anyagokat az akábbi koncentrációban adtuk: aminosav /25 ug/ml/, adenin /20 ug/ml/, hipoxantin /1 mg/ml/ és streptomycin szulfát /250 ug/ml/. A markerek közötti távolságot a Lederberg-féle replika technikával határoztuk meg.

5. ábra: A nar gének helyzete a Rhizobium meliloti 41 kromoszómáján



A markerek közti szakaszok az additív térképtávolságok /d/ értékei /Kondorosi és mti, 1977a/, amiket független keresztezésekből kaptunk. A részleteket lásd a 6. táblázatban.

4. Az eredmények megvitatása

A *Rhizobium meliloti*-ban kétfajta nitrátredukció mutatható ki in vivo. A kettő közül valószínűleg csak az asszimilációs típusnak van alapvető fiziológiai funkciója. A "respirációs" nitrátredukciónak szerepe jelenleg még nem ismert. *Bacillus subtilis*-ben hasonló, ismeretlen funkcióju, a sporuláció alatt indukálódó nitrátredukciós aktivitást mutattak ki /Bohon és mti, 1976/. Az Rm41 "respirációs" nitrátredukciós aktivitás indukciója hasonlít a *Klebsiella aerogenes* nitrátrespirációs rendszer indukációjához /Van'T Reit és mti, 1968/. Az Rm41 NR aktivitását azonban 10 mM klorát nem befolyásolja, és mivel az enzim nem membránkötött, a Pichinoty féle B típusu enzimekhez hasonlít. Az in vivo "respirációs" nitrátredukciót az oxigén reverzibilisen gátolja, ami az oxigén felé történő preferenciális e^- áramlást jelentheti.

Kondorosi és mti /1973/ olyan mutánsokat izoláltak Rm41-ből, ahol a mutáció a "respirációs" nitrátredukciót érintette. E mutánsok egy reprezentánsa az N461, szimbiózisban ineffektív, de nitráton - mint egyedüli nitrogénforráson - szaporodni tud /Sik és Barabás, 1977/, ezért az asszimilációs nitrátredukciója normális kell hogy legyen. Azt találtuk /4. táb-



lázat/, hogy az N⁴61 30-100 szor kevesebb MV-kapcsolt NR aktivitással rendelkezik mint az Rm⁴1 azokon a táptalajokon, amelyeken megmértük. Nitrát asszimilációkor tehát ez az alacsony aktivitás is elegendő ahhoz, hogy a sejteket a maximális növekedéshez szükséges nitráttal ellássa. Az N⁴61-ben a mutáció valószínűleg a NR enzimrendszer szabályozását érintette.

Az asszimilációs nitrátredukcióban hibás Rm⁴1 mutánsok között három különböző fenotípussal rendelkező osztályt figyelhetünk meg. Az első osztályba tartoznak azok a mutánsok /narA/, melyek képtelenek hasznosítani a nitrátot, de normális "respirációs" nitrátredukciós képességgel rendelkeznek komplett táptalajban in vivo körülmények között. A mutánsok nyerskivonatában az Rm⁴1-hez hasonló MV-kapcsolt NR aktivitás mérhető. Ezekből az adatokból következik, hogy a narA mutációk nem a nitrátfelvételét, hanem a NR-t redukáló e⁻ transzportlánc valamelyik tagját érintették. Azt feltételezzük, hogy egy másik, az oxigén felé történő e⁻ transzportlánctól független, e⁻ transzport komponens szintetizálódik nitrátasszimilációkor, és ez a két mechanizmus egymástól függetlenül funkcióképes. Valószínűleg ezt az e⁻ transzportrendszert szabályozzák az aminosavak és a glutamin szintetáz /Kondorosi és mti, 1977b/. A MV-kapcsolt NR aktivitásért felelős

fehérjét az ammónia nem szabályozza, mivel ammónia jelenlétében derepresszált szintü aktivitás mérhető

A mutánsok második osztályába /narB/ tartoznak azok, melyek sem asszimilációs sem "respirációs" nitrátredukcióval nem rendelkeznek. A mutánsok nyerskivonatában MV-kapcsolt NR aktivitást kimutatni nem lehetett. E tényből arra következtethetünk, hogy az asszimilációs és "respirációs" nitrátredukcióért felelős enzimrendszerben vannak olyan fehérjék, például MV-kapcsolt NR aktivitásért felelős fehérje, melyek mindkét rendszerben közösek és csak egy strukturgénjük van. A narB gén valószínűleg a NR apoprotein strukturgénje.

A mutánsok harmadik fenotipikus osztályát alkotják azok /narC és narD/, melyek az asszimilációs és "respirációs" nitrátredukciójuk mellett a hipoxantin- és a xantinhasznosítási képességüket is elvesztették. A mutánsok nyerskivonatából sem MV-kapcsolt NR sem XDH aktivitást kimutatni nem lehetett. A kísérleti adatok arra utalnak, hogy a mutáció a hipoxantin és a xantinfelvételét nem befolyásolta. Mivel mind a NR mind a XDH molibdén tartalmu enzim, a mutáció a molibdén asszimilációját is érinthette. Ebben az esetben 10^{-3} - 10^{-4} molibdát adásával mindkét enzim aktivitása helyreállítható. Így helyreáll a NR aktivitás az *E. coli* ch1D mutánsaiban /Sperl és DeMoss, 1975/, a NR

és XDH aktivitás az *A. nidulans* cnxE /Arst és mti, 1970/ és a *Pseudomonas aeruginosa* narD /Van Hartingsveldt és Stouthamer, 1973/ mutánsaiban. 10^{-2} M molibdát azonban egyik Rm41 mutáns esetében sem állította helyre a vad fenotípust.

A harmadik csoportba tartozó mutánsok reverziós analíziséből kiderült, hogy a pleiotrópiát egyszeres pontmutáció okozta, ami a két enzim közös regulációját vagy közös szerkezeti alegységét károsította. A narC és narD mutánsok biokémiai fenotípusa hasonlít más organizmusok Mo-ko hiánymutánsaihoz /Pateman és mti, 1974; Nason és mti, 1970; Mendel és Müller, 1978/. Biokémiai komplementációs kísérletekben azt találtuk, hogy a narA és narB mutánsok helyre tudják állítani a *N. crassa* nit-1 mutánsának a NR aktivitását míg a narC és narD nem. Ezért a narC és narD mutánsokat Mo-ko mutánsoknak tartjuk. Mivel e két mutánsnak nem tudtuk kimutatni a XDH apoproteinjét, valószínű, hogy az aktív Mo-ko hiánya befolyásolja az enzim stabilitását vagy az alegység összetételét. Azotobacter vinelandii nitrogénázának I-es komponenséből Shah és Brill /1977/ izolált egy FeMo-ko /vas-molibdén kofaktor/-t, amelyről Pienkos és mti /1977/ kimutatták, hogy specifikus a nitrogénázra és különbözik a Mo-ko-tól, melyet xantinoxidázból izoláltak. A FeMo-ko

képes helyreállítani egy *Azotobacter vinelandii* nif mutáns nitrogénáz aktivitását, de képtelen a *N. crassa* nit-1 mutáns NR-ának a helyreállítására. Ezek a tények megfelelnek a mi eredményeinkkel, mivel mindkét mutáns éppen olyan effektív növényi tesztben mint az Rm41. Így a Mo-ko mutánsok aktív nitrogénázzal rendelkeznek, melyből az a következtetés vonható le, hogy csak a NR és a XDH enzimeknek a Mo-ko-a közös és ez a Mo-ko nem a prekuzora a nitrogénázban található FeMo-ko-nak.

Rekombinációs analízis segítségével négy lókuszbba tudtuk /narA, narB, narC és narD/ sorolni a 25 Nar⁻ mutánst. Kapcsoltsági adatok azt mutatják, hogy a narB, C és D lókuszek a trp-15 és az ade-15 markerek közé térképeződnek az Rm41 köralakú kromoszómáján. A pleiotróp tulajdonságokkal rendelkező Mo-ko mutánsokat egyértelműen két külön lókuszbba tudtuk osztani/narC és narD/;


5. Összefoglalás

Rhizobium melilotiból 25 független mutánst izoláltunk, melyek nem tudták hasznosítani a nitrátot, mint egyedüli nitrogénforrást. A mutációk négy különböző helyen /narA, narB, narC és narD/ térképeződnek. A narB, narC és narD lókuszkokat a trp-15 és az ade-15 közé lokalizáltuk a kromoszómán. A narA mutánsokban a mutáció csak az asszimilációs nitrátredukciót befolyásolta míg a "respirációs" aktivitást nem. Metilviologén-kapcsolt nitrátreduktáz aktivitással rendelkeznek. A narB mutánsok sem asszimilációs sem "respirációs" nitrátredukcióval nem rendelkeznek, és nincs metilviologén-kapcsolt nitrátreduktáz aktivitásuk. A narC és narD mutánsokban a mutáció nem csak az asszimilációs és a "respirációs" nitrátredukciót, hanem a xantindehidrogenáz aktivitást is befolyásolta. Ezen mutánsok savkezelt nyerskivonata nem állítja helyre a *Neurospora crassa* nit-1 mutáns NADPH-NR aktivitását, jelezve, hogy ezek a mutánsok nem rendelkeznek aktív molibdén kofaktorrall.

Mind a 25 mutáns effektív volt szimbiótikus nitrogénkötésben, és nitrogenáz aktivitással rendelkezett. Az eredményekből, arra lehet következtetni, hogy a nitrátreduktáz és a nitrogenáz nem rendelkezik közös molibdénkofaktorrall.

6. Irodalomjegyzék

- Antoine, A.D. /1974/. Purification and properties of nitrate reductase isolated from *Neurospora crassa* mutant nit-3. Kinetics, molecular weight determination, and cytochrome involument. *Biochemistry* 13, 2289-2294.
- Arst, H.N. és Cove, D.J. /1973/. Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Molec. gen. Genet.* 126, 111-141.
- Arst, H.N.Jr., MacDonald, D.W. és Cove, D.J. /1970/. Molybdate metabolism in *Aspergillus nidulans*. I. Mutations affecting nitrate reductase and/or xanthine dehydrogenase. *Molecular and General Genetics* 108, 129-145.
- Bachmann, B.J., Low, K.B. és Taylor, A.L. /1976/. Recalibrated linkage map of *Escherichia coli* K-12. *Bact. rev.* 40, 116-167.
- Bohin, J.P., Bohin, A. és Schaeffer, P. /1976/. Increased nitrate reductase A activity as a sign of membrane alteration in early blocked asporogenous mutants of *Bacillus subtilis*. *Biochimie, Paris* 58, 99-108.
- Bulen, W.A. és LeComte, J.R. /1966/. The nitrogenase system from *Azotobacter*: two enzyme requirements for N_2 reduction, ATP-dependent hydrogen evolution, and ATP hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 56, 979-986.

- Coddington, A. /1976/. Biochemical studies on the nit mutants of *Neurospora crassa*.
Molec. gen. Genet. 145, 195-206.
- Cove, D.J. /1966/. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*.
Biochim. Biophys. Acta 113, 51-56.
- Cove, D.J. és Pateman, J.A. /1963/. Independently segregating genetic loci concerned with nitrate reductase activity in *Aspergillus nidulans*.
Nature 198, 262-263.
- Cove, D.J. és Pateman, J.A. /1969/. Autoregulation of the synthesis of nitrate reductase in *Aspergillus nidulans*.
J. Bact. 97, 1374-1378.
- Davis, B.J. /1964/. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins.
Annals of the New York Academy of Sciences 121, 404-427.
- Dixon, R.A., Cannon, F.C. és Kondorosi, A. /1976/.
Construction of a P plasmid carrying nitrogen fixation genes from *Klebsiella pneumoniae*.
Nature, London 260, 268-271.
- Enoch, H.G. és Lester, R.L. /1975/. The purification and properties of formate dehydrogenase and nitrate reductase from *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. 250, 6693-6705.
- Evans, H.J. és Nason, A. /1952/. The effect of reduced triphosphopyridine nucleotide on nitrate reduction by purified nitrate reductase.
Arch. Biochem. Biophys. 39, 234-235.
- 

- Garett, R.H. és Nason, A. /1967/. Involvement of a b-type cytochrome in the assimilatory nitrate reductase of *Neurospora crassa*.
P.N.A.S. 58, 1603-1610.
- Garett, R.H. és Nason, A. /1969/. Further purification and properties of *Neurospora* nitrate reductase.
J. Biol. Chem 244, 2870-2882.
- Glaser, J.H. és DeMoss, J.A. /1971/. Phenotypic restoration by molybdate of nitrate reductase activity in child mutants of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 108, 854-860.
- Glaser, J.H. és DeMoss, J.A. /1972/. Comparison of nitrate reductase mutants of *Escherichia coli* selected by alternative procedures.
Mol. gen. Genet. 116, 1-10.
- Guest, J.R. /1969/. Biochemical and genetic studies with nitrate reductase C gene mutants of *Escherichia coli*.
Molec. gen. Genet. 105, 285-295.
- De la Haba, G. /1950/. Studies on the mechanism of nitrate assimilation in *Neurospora*.
Science 112, 203-204.
- Hackenthal, E., Mannheim, W., Hackenthal, R. and Becher /1964/. Die reduction von perchlorat durch bacterien.
Biochem. Pharmacol. 13, 195-206.
- Hadjipetrou, L.P. és Stouthamer, A.H. /1965/. Energy production during nitrate respiration by *Aerobacter aerogenes*.
J. Gen. Microbiol. 38, 29-34.
- Hartree, E.F. /1972/. Determination of protein: Modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal. Biochem. 48, 422-427.

- Kennedy, C. és Postgate, J.R. /1977/. Expression of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation genes in nitrate reductase mutants of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* 98, 551-557.
- Ketchum, P.A., Cambier, H.Y., Fraizer III., W.A., Madansky, C.H. és Nason, A. /1970/. In vitro assembly of *Neurospora* assimilatory nitrate reductase from subunits of a *Neurospora* mutant and the xanthine oxidizing or aldehyde oxidase systems of higher animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 66, 1016-1023.
- Ketchum, P.A., és Downey, R.J. /1975/. In vitro restoration of nitrate reductase: Investigation of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa* nitrate reductase mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* 385, 354-361.
- Kinsky, S.C. és McElroy, W.D. /1958/. *Neurospora* nitrate reductase: the role of phosphate, flavine and cytochrome C reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 73, 466-483.
- Kiss, G.B., Kondorosi, A. és Sváb, Z. /1977/. Isolation and characterisation of assimilatory nitrate reductase mutants from *Rhizobium meliloti*. *Acta microbiologica Academiae scientiarum hungaricae* 24, 85.

- Kondorosi, A., Barabás, I., Sváb, Z., Orosz, L., Sik, T. és Hotchkiss, R.D. /1973/. Evidence for common genetic determinants of nitrogenase and nitrate reductase in *Rhizobium meliloti*.
Nature, London, 246, 153-154.
- Kondorosi, A., Kiss, G.B., Forrai, T., Vincze, E., és Bánfalvi, Z. /1977a/. Circular linkage map of *Rhizobium meliloti* chromosome.
Nature, London 268, 525-527.
- Kondorosi, A., Sváb, Z., Kiss, G.B. és Dixon, R.A. /1977b/. Ammonia assimilation and nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*.
Molecular and General Genetics 151, 221-226.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. és Randall, R.J. /1951/. Protein measurement with the Folin phenol reagent.
Journal of Biological Chemistry 193, 265-275.
- MacDonald, D.W. és Coddington, A. /1974/. Properties of the assimilatory nitrate reductase from *Aspergillus nidulans*.
Eur. J. Biochem. 46, 169-178.
- MacDonald, D.W. és Cove, D.J. /1974/. Studies on temperature-sensitive mutants affecting the assimilatory nitrate reductase of *Aspergillus nidulans*.
Eur. J. Biochem. 47, 107-110.
- MacDonald, D.W., Cove, D.J. és Coddington, A. /1974/. Cytochrome-C reductases from wild-type and mutant strains of *Aspergillus nidulans*.
Molec. gen. Genet. 128, 187-199.

MacGregor, C.H. és Schnaitman, C.A. /1972/. Restoration of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-nitrate reductase activity of a *Neurospora* mutants by extracts of various chlorate-resistant mutants of *Escherichia coli*.

Journal of Bacteriology 112, 388-391.

MacGregor, C.H. és Schnaitman, C.A. /1973/. Reconstitution of nitrate reductase activity and formation of membrane particles from cytoplasmic extracts of chlorate-resistant mutants of *Escherichia coli*.

J. Bacteriol. 114, 1164-1176.

Mendel, R.R. és Müller, A.J. /1976/. A common genetic determinant of xanthine dehydrogenase and nitrate reductase in *Nicotiana tabacum*.

Biochemie und Physiologie der Pflanzen 170, 538-541.

Mendel, R.R. és Müller, A.J. /1978/. Reconstitution of NADH-nitrate reductase in vitro from nitrate reductase-deficient *Nicotiana tabacum* mutants.

Molecular and General Genetics 161, 77-80.

Moreno, C.G., Aparicio, P.J., Palacián, E. és Losada, M. /1972/. Interconversion of the active and inactive forms of *Chlorella* nitrate reductase.

Febs. Letters 26, 11-14.

Müller, A.J. és Grafe, R. /1978/. Isolation and characterization of cell lines of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase.

Molec. gen. Genet. 161, 67-76.

Nason, A., Antoine, A.D., Ketchum, P.A., Frazier III.,
W.A. és Lee, D.K. /1970/. Formation of assimilatory
nitrate reductase by in vitro inter-cistronic
complementation in *Neurospora crassa*.

Proceedings of the National Academy of Sciences of
the United States of America 65, 137-144.

Nason, A. és Evans, H.J. /1953/. Triphosphopyridine
nucleotide-nitrate reductase in *Neurospora*.

J. Biol. Chem. 202, 655-673.

Nason, A., Lee, K.-Y., Pan, S.-S., Ketchum, P.A.,
Lamberti, A., és De Vries, J. /1971/. In vitro
formation of assimilatory reduced nicotinamide
adenine dinucleotide phosphate nitrate reductase
from a *Neurospora* mutant and a component of molybdenum
-enzymes.

Proceedings of the National Academy of the United
States of America 68, 3242-3246.

Nicholas, D.J.D. és Nason, A. /1954/. Molybdenum and
nitrate reductase. II. Molybdenum as a constituent
of nitrate reductase.

J. Biol. Chem. 207, 353-360.

Nicholas, D.J.D. és Nason, A. /1957/. Determination of
nitrate and nitrite. In *Methods in enzymology*. Vol.
III, pp. 983-984.

Edited by S.P. Colowick and N.O. Kaplan. New York:
Academic Press.

Nicholas, D.J.D., Nason, A. és McElroy, W.D. /1954/.
Molybdenum and nitrate reductase. T. Effect of
molybdenum deficiency on the *Neurospora* enzyme.

- J. Biol. Chem. 207, 341-351.
- Pagan, J.D., Scrowcroft, W.R., Dudman, W.F. és Gibson, A.H. /1977/. Nitrogen fixation in nitrate reductase-deficient mutants of cultured rhizobia. Journal of Bacteriology 129, 718-723.
- Pan, S.-S. és Nason, A. /1978/. Purification and characterization of homogeneous assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-nitrate reductase from *Neurospora crassa*. Biochim. Biophys Acta 523, 297-313.
- Pateman, J.A. és Cove, D.J. /1967/. Regulation of nitrate reduction in *Aspergillus nidulans*. Nature 215, 1234-1237.
- Pateman, J.A., Cove, D.J., Rever, B.M. és Roberts, D.B. /1964/. A common co-factor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase. Nature, London 201, 58-60.
- Pateman, J.A., Rever, B.M. és Cove, D.J. /1967/. Genetic and biochemical studies of nitrate reduction in *Aspergillus nidulans*. Biochem. J. 104, 103-111.
- Pichinoty, F. és Piéchaud, M. /1968/. Recherche des nitrate-réductases bactériennes A et B: méthodes. Annales de l'Institut Pasteur de Lille, France 114, 77-98.

- Piechaud, M., Puig, J., Pichinoty, F., Azoulay, E. és LeMinor, L. /1967/. Mutations affectant la nitrate-reductase A et d'autres enzymes bacteriennes d' oxydoreduction. Etude preliminaire.
Ann. Inst. Pasteur 112, 24-37.
- Pienkos, P.T., Shah, V.K. és Brill, W.J. /1977/.
Molybdenum cofactors from molybdoenzymes and in vitro reconstitution of nitrogenase and nitrate reductase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74, 5469-5471.
- Puig, J. és Azoulay, E. /1967/. Etude genetique et biochemique des mutants resistant au ClO_3^- /genes *chlA*, *chlB*, *chlC*/.
C.R.Acad. Sci. /Paris/ 264, 1916-1918.
- Quastal, J.M., Stephenson, M. és Wetham, M.D. /1925/.
Biochem. J. 19, 301.
- Rand, K.N. és Arst, H.N. /1978/. Mutations in *nirA* gene of *Aspergillus nidulans* and nitrogen metabolism. Nature 272, 732-734.
- Rolfe, B. és Onodera, K. /1972/. Genes, enzymes and membrane proteins of the nitrate respiration system of *Escherichia coli*.
J. Membrane Biol. 9, 195-207.
- Ruiz-Herrera, J., Showe, M.K. és DeMoss, J.A. /1976/. Nitrate reductase complex of *Escherichia coli* K-12: Isolation and characterization of mutants Unable to reduce nitrate.
J. Bacteriol. 97, 1291-1297.

- Sato, R. /1956/. in Inorganic Nitrogen Metabolism,
Szerkesztette: McElroy, W.D. and Glass, B.
/Baltimore: Johns Hopkins University/ 163. oldal.
- Shah, V.K. és Brill, W.J. /1977/. Isolation of an
iron-molybdenum cofactor from nitrogenase.
Proceedings of the National Academy of Sciences
of the United States of America 74, 3249-3253.
- Showe, M.K. és DeMoss, J.A. /1968/. Localization
and regulation of synthesis of nitrate reductase
in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 95, 1305-1313.
- Sik, T. és Barabás, I. /1977/. The correlation of
nitrate reductase and nitrogenase in *Rhizobium*
symbiosis. In Recent developments in nitrogen
fixation pp. 365-373. Edited by W. Newton, J.R.
Postgate, C. Rodriguez Barrueco. London:
Academic Press.
- Skotnicki, M.L. és Rolfe, B.G. /1977/. Interaction
between the nitrate respiratory system of
Escherichia coli K12 and the nitrogen fixation
genes of *Klebsiella pneumoniae*.
Biochemical and Biophysical Research Communications
78, 723-726.
- Solomonson, L. P., Jetschman, K. és Vennesland, B.
/1973/. Reversible inactivation of the nitrate
reductase of *Chlorella vulgaris* Beijerinck.
Biochim. Biophys. Acta 309, 32-43.

- Solomonson, L.P., Lorimer, G.H., Hall, R.L.,
Borchers, R. és Bailey, J.L. /1975/.
Reduced nicotinamide adenin dinucleotide-nitrate
reductase of *Chlorella vulgaris*.
J. Biol. Chem. 250, 4120-4127.
- Solomonson, L.P. és Spehar, A.M. /1977/. Model for
the regulation of nitrate assimilation.
Nature 265, 373-375.
- Sorger, G.J. /1963/. TPNH-cytochrome C reductase
and nitrate reductase in mutant and wild type
Neurospora and *Aspergillus*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 395-402.
- Sorger, G.J. /1966/. Nitrate reductase electron
transport system in mutant and wild-type strains
of *Neurospora crassa*.
Biochim. Biophys. Acta 118, 484-494.
- Sorger, G.J., Premakumar, R. és Gooden, D. /1978/.
Demonstration in vitro of two intracellular
inactivators of nitrate reductase from
Neurospora
Biochim. Biophys. Acta 540, 33-47.
- Sosa, F.M., Ortega, T. és Barea, J.L., /1978/. Mutants
from *Chlamydomonas reinhardtii* affected in their
nitrate assimilation capability.
Plant. Sci. Letters 11, 51-58.
- Sperl, G.T. és DeMoss, J.A. /1975/. *ch1D* gene function
in molybdate activation of nitrate reductase.
Journal of Bacteriology 122, 1230-1238.

- Stouthamer, A.H. /1967a/. Nitrate reduction in *Aerobacter aerogenes*. T. Isolation and properties of mutant strains blocked in nitrate assimilation and resistant against chlorate. *Arch. Microbiol.* 56, 68-75.
- Stouthamer, A.H. /1967b/. Nitrate reduction in *Aerobacter aerogenes*. II. Characterization of mutants blocked in the reduction of nitrate and chlorate. *Arch. Microbiol.* 56, 76-80.
- Stouthamer, A.H., Bettenhausen, C.W., von Hartingsveldt, J., Van'T Reit, J. és Planta, R.J. /1967/. Nitrate reduction in *Aerobacter aerogenes*. III. Nitrate reduction, chlorateresistance and formate metabolism in mutant strains. *Arch. Microbiol.* 58, 228-247.
- Takahaski, H., Taniguchi, S. és Egami, F. /1957/. Nitrate reduction in aerobic bacteria and that in *Escherichia coli* coupled in phosphorylation. *J. Biochem. /Tokyo/* 43, 223.
- Van Hartingsveldt, J. és Stouthamer, A.M. /1973/. Mapping and characterization of mutants of *Pseudomonas aeruginosa* affected in nitrate respiration in aerobic or anaerobic growth. *Journal of General Microbiology* 74, 97-106.

- Van'T Reit, J., Stouthamer, A.M. és Planta, R.J.
/1968/. Regulation of nitrate assimilation and
respiration in *Aerobacter aerogenes*.
Journal of Bacteriology 96, 1455-1464.
- Venables, W.A. és Guest, J.R. /1968/. Transduction
of nitrate reductase loci of *Escherichia coli*
by phages P1 and
Mol. gen. Genet. 103, 127-140.
- Wallace, W. /1974/. Purification and properties
of a nitrate reductase-inactivating enzyme.
Biochim. Biophys. Acta 341, 265-276.
- Wallace, W. /1975/. Effects of a nitrate reductase
inactivating enzyme and NNADPH of the nitrate
reductase from higher plants and *Neurospora*.
Biochem. Biophys. Acta 377, 239-250.
- Walls, S., Sorger, G.J., Gooden, D. és Klein, V.
/1978/. The regulation of the decay of nitrate
reductase. Evidence for the existence of at least
two mechanisms of decay.
Biochim. Biophys. Acta 540, 24-32.
- Warner, R.L., Lin, C.J. és Kleinhofs, A. /1977/.
Nitrate reductase-deficient mutants in barley.
Nature 269, 406-407.
- Wimpenny, J. W.T. és Cove, J.A. /1967/. The regula-
tion of metabolism in facultative bacteria. III.
The effect of nitrate.
Biochim. Biophys. Acta 148, 233-242.

