

**Antimikrobiális hatású gümő-specifikus ciszteinben  
gazdag (NCR) peptidek hatásmechanizmusának  
feltárása és a velük kölcsönhatásba lépő bakteriális  
fehérjék azonosítására alkalmas rendszer kidolgozása**

Ph.D. értekezés

**Radvánszkiné Mikuláss Kata**  
**Témavezető: Dr. Kereszt Attila**

Biológia Doktori Iskola  
MTA SZBK Biokémiai Intézet  
SZTE TTIK

Szeged

2016.

1.	Irodalmi áttekintés	4
1.1.	A nitrogénkötő szimbiotikus kapcsolat jelentősége	4
1.2.	A nitrogénkötő szimbiózis kialakulása	5
1.2.1.	A szimbiotikus gümők kialakulása	7
1.2.2.	A szimbioszómák kialakulása	10
1.2.3.	Bakteroidok terminális differenciálódása az IRLC pillangósok gümőiben	13
1.2.4.	Gümő specifikus ciszteinben gazdag peptidek (NCR-ek)	18
1.3.	Kationos antimikrobiális peptidek hatásmechanizmusa	25
1.4.	Fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatása	32
1.4.1.	Élesztő két-hibrid rendszer	33
1.4.2.	Az élesztő két-hibrid rendszer eredményeinek megerősítésére szolgáló technikák: immunprecipitáció, pull-down	36
2	Célkitűzés	40
3	Anyagok és módszerek	41
3.1.	Kationos peptidek hatásmechanizmusának vizsgálatához kapcsolódó anyagok és módszerek	41
3.1.1.	Kolóniát képző egységek (CFU: colony forming unit) számának meghatározása	41
3.1.2.	Külső membrán permeabilitásának vizsgálata	41
3.1.3.	Atomerő mikroszkópos vizsgálatok (AFM)	42
3.1.4.	Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok (SEM)	43
3.1.5.	Belső membrán áteresztőképességének vizsgálata	43
3.1.6.	Membránpotenciál meghatározása	45
3.2.	Molekuláris biológiai anyagok és módszerek	46
3.2.1.	Kompetens sejtek készítése	46
3.2.1.1.	Escherichia coli kompetens sejt készítése és transzformálása	46
3.2.1.2.	Saccharomyces cerevisiae AH109 kompetens sejt készítése és transzformálása	46
3.2.1.2.a	Élesztő két-hibrid rendszer során alkalmazott táptalajok	46
3.2.1.2.b	Élesztő két-hibrid rendszer során alkalmazott élesztő törzs, és kompetens sejt készítés	47
3.2.1.2.c	Élesztő sejtek transzformálása	47
3.2.2.	Genomi és plazmid DNS tisztítás	48
3.2.2.1.	Genomi DNS tisztítás Sinorhizobium meliloti-ból	48
3.2.2.2.	Plazmid tisztítás E. coli sejtekből	48
3.2.2.3.	Plazmid tisztítás Saccharomyces cerevisiae sejtekből	49
3.2.3.	PCR technikák	50
3.3.	A kationos NCR peptidek kölcsönható partnereinek meghatározásához kapcsolódó anyagok és módszerek	50
3.3.1.	Az ORFeome alapú S. meliloti élesztő két-hibrid könyvtár létrehozása	50
3.3.2.	Kontroll konstrukciók létrehozása	51
3.3.3.	Szekvenálás Illumina MiSeq készülékkel	53
3.3.4.	Az élesztő ko-transzformáció hatékonyságának meghatározása	53

3.3.5.	A fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatása a transzformált élesztő sejtekben	54
3.3.6.	A kölcsönható partnerek azonosítása	54
3.3.7.	Teljes „screen” technika	55
3.3.8.	Az élesztő két-hibrid rendszer eredményeinek megerősítésére alkalmazott biokémiai módszerek	55
3.3.8.a	Poli-hisztidin affinitás kromatográfiás tisztítás (pull-down) kísérletek	55
3.3.8.b	Immunprecipitáció	56
4.	Eredmények és megvitatásuk	58
4.1.	A kationos NCR peptidek antimikrobiális hatásának és hatásmechanizmusának vizsgálata	58
4.1.1.	A kationos NCR peptidek baktericid hatással rendelkeznek <i>S. meliloti</i> baktériumon in vivo körülmények között	58
4.1.2.	A kationos peptidek hatásmechanizmusának vizsgálata	60
4.1.2.a	A peptidkezelés hatására a baktériumok sejt felszíne erőteljesen megváltozott	60
4.1.2.b	A kationos NCR peptidek kis mértékben megbontják a külső membrán szerkezetét	64
4.1.2.c	A kationos NCR peptidek megszüntetik a belső membrán integritását	66
4.1.2.d	A kationos NCR peptidek a <i>S. meliloti</i> baktérium membránpotenciálját eliminálják	69
4.2.	Új, az élesztő két-hibrid rendszerre átalakított, <i>S. meliloti</i> 1021 ORFeome könyvtár létrehozása	72
4.2.1.	Az új ORFeome könyvtár létrehozása	73
4.2.2.	Az új élesztő két-hibrid könyvtár tesztelése-kontroll konstrukciók létrehozása	74
4.2.3.	Élesztő transzformációs protokoll optimalizálása	76
4.2.4.	A kontrollként használt fehérjék és pool-ok közötti kölcsönhatások kimutatása, ill. további lehetséges kölcsönható partnerek azonosítása	77
4.2.5.	Az új rendszer hatékonyságának ellenőrzése a HfQ kölcsönható partnereinek meghatározásával a teljes könyvtár használatával (full screen)	81
4.3.	Az NCR247 peptid kölcsönható partnereinek meghatározása az új <i>S. meliloti</i> ORFeome könyvtár segítségével	82
4.3.1.	NCR247 peptid kölcsönható partnereinek meghatározása a teljes <i>S. meliloti</i> ORFeome könyvtár használatával (full screen)	83
4.3.2.	NCR247 peptid kölcsönható partnereinek megerősítése más biokémiai technikák alkalmazásával (pull-down, immunprecipitáció)	83
5.	Összefoglalás	88
6.	Summary	91
7.	Függelék	94
8.	Irodalomjegyzék	99
9.	Köszönetnyilvánítás	108

10.	Publikációs lista	110
-----	-------------------	-----

# 1. Irodalmi áttekintés

## 1.1. A nitrogénkötő szimbiotikus kapcsolat jelentősége

A Földet benépesítő pillangósvirágúak (*Fabaceae*) családjába tartozó növények mind mezőgazdasági, mind ökológiai szempontból nagy fontossággal bírnak. Egyrészt fontos tápanyagforrásnak tekinthetők magas fehérje, keményítő és olaj tartalmuk révén, másrészt a hatékony, nitrogénkötésre képes együttműködések révén növelik a talaj nitrogéntartalmát, ami miatt gyakran alkalmazzák őket vetésforgóban, illetve hozzájárulnak bolygónkon a nitrogén körforgásához.

A talajban lévő, növények által is hasznosítható szervesetlen nitrogén vegyületek, nitrátok, ammónium sók gyakran csak korlátozott mennyiségben állnak rendelkezésre a növények számára, míg a nagy mennyiségben jelen lévő légköri nitrogén a növények számára hasznosíthatatlan. A légköri nitrogén megkötésére csak bizonyos, diazotróf baktériumok képesek, melyek képesek a légköri nitrogént ammóniává alakítani a nitrogenáz enzimrendszerük segítségével. Ezen baktériumok egy része szabadon élve, vagy növényekkel laza kapcsolatban végzi a nitrogén redukcióját, mint például az *Azospirillum*, *Anabaena* és *Acetobacter* fajok. A közös néven rhizobiumoknak nevezett, a Proteobaktériumok  $\alpha$  (pl. *Rhizobium*, *Sinorhizobium* fajok) és  $\beta$  (pl. *Burkholderia*, *Cupriavidus* fajok) ágába tartozó baktériumok a pillangósvirágú növényekkel alakítanak ki szimbiózist, melyben rendkívül hatékonyan végzik a nitrogén megkötését. Ebben a szoros, szimbiotikus kapcsolatban a növény számára hasznosíthatóvá válik a légköri nitrogén, ezért cserébe a gazdaszervezet biztosítja a baktériumok számára a megfelelő mennyiségű tápanyagot (szén és energiaforrást, szénhidrátok formájában), valamint a nitrogén redukálásához szükséges alacsony oxigéntartalmú (microaerob) környezetet. E folyamat részletesebb megismerése lehetőséget biztosíthat arra, hogy a nitrogénkötés képességét kiterjesszék más mezőgazdaságilag fontos fajokra is, háttérbe szorítva ezzel a környezetszennyező műtrágyák alkalmazását.

A szimbiotikus nitrogénkötés egy újonnan, leggyakrabban a gyökéren kialakult szervben, a gümőben történik. A gümő szöveteinek kialakulása, valamint a gümő sejteinek bakteriális infekciója precízen összehangolt folyamatok, bármelyik elakadása esetén leáll a teljes folyamat. A baktériumok, a leginkább tanulmányozott interakciókban (pl. *Medicago-Sinorhizobium*, *Lotus-Mesorhizobium*) egy infekciós fonálnak nevezett csőszerű struktúrán keresztül jutnak be a gümő belsejébe. Ott egy, az endocitózishoz hasonló folyamat révén, növényi membránnal körülvéve fűződnek le a növényi sejtek citoplazmájába, s alakulnak át a bakteroidnak nevezett nitrogénkötő formává. A pillangósvirágú növények egy szűk csoportjában (IRLC: Inverted Repeat Lacking Clade) a gümőkben a baktériumok bakteroiddá történő átalakulása nemcsak fiziológiai változással jár, hanem a bakteroidok DNS-tartalma és mérete is megnő, a sejtek elvesztik osztódási képességüket, így terminálisan, visszafordíthatatlanul differenciálódnak. Ebben az esetben a terminális differenciációt olyan, specifikusan a gümőben termelődő peptidek irányítják, melyek a veleszületett immunitás effektor molekuláihoz, a defenzinekhez hasonlítanak, s egy részük valóban antimikrobiális aktivitással is rendelkezik.

Munkánk során a *M. truncatula* és a *S. meliloti* között kialakuló szimbiotikus kölcsönhatás szolgáltatja azt a modellrendszert, mely segítségével egyrészt vizsgálhatjuk a növények által termelt, gümő specifikus peptidek szimbiota partnerre gyakorolt hatását, valamint lehetőség nyílik ezen peptidek kölcsönható partnereinek azonosítására.

## 1.2. A nitrogénkötő szimbiózis kialakulása

A talajban található,  $\alpha$  proteobaktériumok közé tartozó *Rhizobium* baktériumok és a *Leguminosae* családba tartozó hüvelyes növények (pl.: *Medicago truncatula*), illetve a *Parasponia* nemzetség tagjai között kialakuló nitrogénfixáló szimbiotikus kölcsönhatás során, a gazdanövény gyökerein, illetve ritkább esetekben a száron kialakuló új szervben, a gümőben zajlik a baktériumok bakteroidokká történő differenciálódása és a légköri nitrogén redukálása ammóniává. A nitrogénfixáló

folyamat révén valósul meg (Jones, Kobayashi és mtsai. 2007; Gibson, Kobayashi és mtsai. 2008). A hüvelyes növényekre, mint pl. a modellnövényként használt *Medicago truncatula* (*M. truncatula*) és a *Lotus japonicus* (*L. japonicus*), általánosságban jellemző, hogy a fajra jellemző összetételű flavonoidokat szabadítanak fel a rhizoszférában, ahol azok indukálják a *Rhizobium* partnerre jellemző kémiai szerkezetű, lánchosszú válaszmolekula, a Nod faktor (NF) termelését, mely általában elengedhetetlen a gümők kialakulásának indukálásához. A NF-ok érzékelése, és az általuk kiváltott szignál transzdukciós folyamatok számos biokémiai (ion ki- és beáramlás, valamint a korai (gümőképzési) gének expresszióját indukáló  $\text{Ca}^{2+}$  „spiking”) és morfológiai változást idéznek elő a növények gyökerén (Oldroyd és Downie 2008). Ezek közé tartozik a gyökér kortexben elinduló sejtosztódás, mely a gümő primordium kialakulását eredményezi. Ezzel párhuzamosan a NF-ok hatására, a gyökérszőrök meggörbülnek, körbezárva ezzel a hozzájuk tapadó baktériumokat, majd indukálják a tubuláris szerkezetű, infekciós fonalak (IF) képződését, melyek a gyökér kortex felé haladva segítik elő a baktériumok eljutását a gümő primordiumokhoz. Habár ez a NF-és IF-függő intracelluláris penetráció a leggyakoribb, nem szabad megfeledkezni az IF-független inváziós folyamatokról sem, ahol a baktériumok a gyökér epidermisz folytonossági hiányain keresztül (crack-entry) lépnek be, illetve transz-celluláris infekciós fonalakon keresztül haladnak a mélyebben fekvő szövetek felé (Held, Hossain és mtsai. 2010). Ez utóbbi folyamatok az ősbibb inváziós mechanizmusokhoz tartoznak, melyek még a ma létező hüvelyes növényekre is jellemzőek (Sprent 2007). Meglepő, hogy azokban az esetekben, ahol a NF – és IF – függő út nem járható, mint pl. a *Lotus japonicus snf1* (T265I aminosavcsere a kalcium kalmodulin-függő kinázban) mutációja esetén, ahol a NF felismerésének folyamata károsodott, a gyökereken mégis nitrogénfixáló érett gümőket fedeztek fel, melyek kialakulását a már korábban említett ősbibb mechanizmusok segítették elő (Madsen, Tirichine és mtsai. 2010). A baktériumok, az IF-ba jutásukat követően, vagy ott maradnak, létrehozva ezzel az ún. fixációs fonalat (*Parasponia* fajok, néhány *Papilionoideae* faj és több *Caesalpinioideae* faj), vagy, ami gyakoribb, a baktériumok egy endocitózishoz hasonló folyamat révén bejutnak a növényi sejtek citoplazmájába, ahol egy

membránnal körülvett új organellum-szerű képletet, az ún. szimbioszómát hozzák létre (Sprenst 2007).

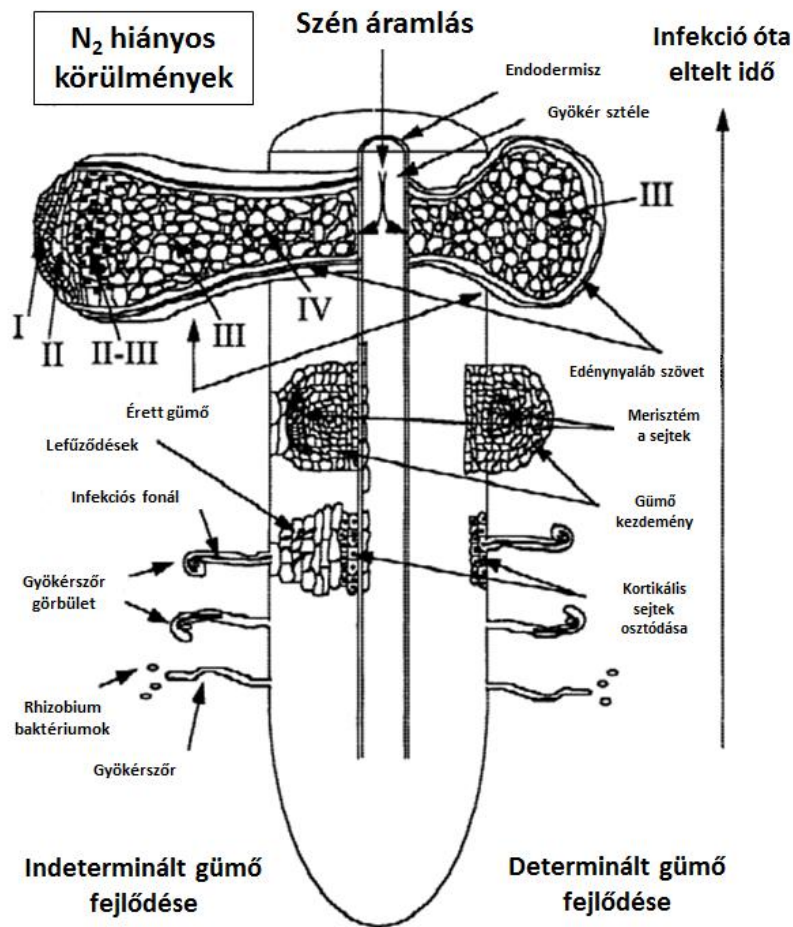
### 1.2.1. A szimbiotikus gümők kialakulása

A baktériumok a gyökérszőrök felszínéről a gümő primordiumokhoz az IF segítségével jutnak el. Az IF-ak növényi eredetű, membrán és sejtfal anyagokkal határolt, belsejükben pedig a növények és baktériumok által közösen szintetizált mátrixból álló képződmények, ahol a baktériumok osztódása történik (Brewin 2004). Az IF-ak akár inter - akár intracellulárisan növekednek, a bennük található baktériumok mégis mindig az extracelluláris térben maradnak. Az IF növekedését az IF csúcsában osztódó baktériumok szabályozzák. Az IF-ból kiszabaduló baktériumok nitrogén fixáló bakteroidokká történő differenciálódása (Vasse, de Billy és mtsai. 1990; Szczyglowski, Shaw és mtsai. 1998; Cermola, Fedorova és mtsai. 2000) a két főbb gümő típus (determinált és indeterminált) esetén eltérő (Crespi és Frugier 2008; Popp és Ott 2011) (1. táblázat) (1. ábra).

INDETERMINÁLT GÜMŐ	DETERMINÁLT GÜMŐ
<i>Medicago sp., Pisum sp., Vicia sp.</i>	<i>Lotus sp., Phaseolus sp., Glycine sp.</i>
gümő primordium	
kortex belső része	kortex külső része
merisztematikus aktivitás	
állandó	korai fázisban megszűnik
gümő növekedése	
merisztematikus sejtek osztódásával	sejtek megnyúlásával
differenciálódás	
teljes differenciálódási mintázat (térben válik el)	részleges differenciálódási mintázat (időben válik el)

**1. táblázat Az indeterminált és determinált gümő főbb jellegzetességeinek összehasonlítása.**





1. ábra Az indeterminált és determinált gümők kialakulása (Crespi és Galvez 2000).

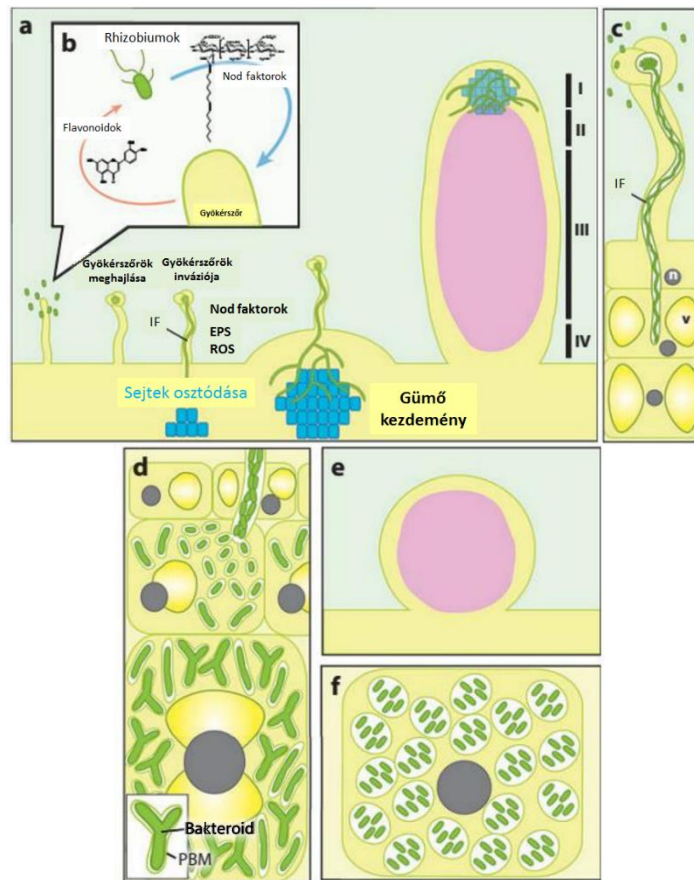
A kétféle gümőtípusban megfigyelhető különbségek alapvetően az eltérő merisztematikus aktivitásukra vezethetők vissza. A determinált gümők esetén a merisztéma a gümő primordium kialakulásáig és a fertőzött növényi sejtek nitrogén fixáló állapotának szinkronizálódásáig funkcionál. Ezt követően a gümő növekedése a sejtekben lezajló endoreduplikáció és sejtnagyobbodás eredménye. Ezzel szemben az indeterminált gümők csúcsi részét állandó merisztematikus aktivitás jellemzi, vagyis a sejtek újabb és újabb generációja alakul ki, melyek alkalmasak a baktériumok befogadására, így egy fejlődési gradiens alakul ki, mely pontosan nyomon követhető a gümő szerkezeti egységeit figyelve. Ezek alapján az indeterminált gümőkön 5 zónát különíthetünk el. I. zóna az apikális merisztéma,

mely alatt helyezkedik el a II. zóna, az inváziós zóna, ahol a baktériumok az infekciós fonálból a növényi sejtekbe jutnak. A II.-III. zóna között található az átmeneti zóna, ahol a növényi sejtek és a bakteroidok (a legtöbbet tanulmányozott fajokban, mint pl. *Medicago*, *Pisum*) terminális differenciációja megy végbe (Oke és Long 1999; Mergaert, Uchiumi és mtsai. 2006). A III. zóna a nitrogénfixáló zóna, ahol a kialakult bakteroidok a légköri nitrogén redukcióját végzik. A IV. zóna a szenescens vagy öregedési zóna, ahol az előregedett növényi és bakteriális sejtek lebomlanak és sejtalkotó anyagai reciklizálódnak. Az I., II. és II-III. zóna mérete állandó, míg a III. és IV. zóna mérete a gümő életkorával nő. A determinált gümőkre ez a szerkezeti eloszlás nem jellemző (2. ábra e). A gömbölyű determinált gümő nagy részét a nitrogénfixáló zóna tölti ki, ahol a szenescens régió a gümő belsejében alakul ki (Popp és Ott 2011).

Sokáig élt az a feltételezés, hogy az indeterminált gümőkben nagyméretű, terminálisan differenciálódott bakteroidok alakulnak ki. Azonban néhány évvel ezelőtt megjelent munkák során ez a kép megváltozott. Két, a mimosoid kládba tartozó, és indeterminált gümő kialakítására képes hüvelyes növény (*Mimosa pudica* és *Leucaena glauca*) bakteroidjai (az  $\alpha$ - illetve a  $\beta$ -rhizobiumok közé tartozó *Cupriavidus taiwanensis* és *Bradyrhizobium* sp. OK-79A) nem mennek keresztül a terminális bakteroid differenciáció folyamatán (Ishihara, Koriyama és mtsai. 2011; Marchetti, Catrice és mtsai. 2011). Az *Azorhizobium caulinodans* a *Sesbania rostrata*-val kétféle gümőtípus, indeterminált gyökérgümő és determinált szár gümő kialakítására képes. A szabadon élő baktériumokhoz hasonlítva, a kétféle gümőből tisztított bakteroidokat vizsgálva azt tapasztalták, hogy a gümő típusától függetlenül a bakteroidok mind méretben, morfológiában, DNS tartalomban és membrán integritásban megegyeznek (Mergaert, Van de Velde, Holsters and Kondorosi személyes közlés). Filogenetikailag, a *Medicago*, a borsó és a bükköny fajok, mind az úgynevezett Inverted-Repeat-Lacking (IRLC) kládba tartoznak a *Papilionoidae* alcsaládon belül (Wojciechowski, Lavin és mtsai. 2004). Ezekből a kísérletieredményekből arra következtethetünk, hogy a terminális bakteroid differenciáció nem általános jelenség a *Rhizobiumok* között, inkább az IRLC kládba tartozó hüvelyes növényekre jellemző, gümő típustól függetlenül.

### 1.2.2. A szimbioszómák kialakulása

Mindkét gümőtípusra jellemző, hogy a nitrogénfixáló szimbiotikus sejtek endoreduplikációval megnagyobbodott poliploid sejtek. Az indeterminált gümők esetén ez az endoreduplikáció a II. zónában és a II-III. interzónában történik meg. A baktériumok az IF-akból mindkét gümőtípus esetén, az IF csúcsi, sejtfa nélküli részéről, mint infekciós cseppek fűződnek le a fiatal gümő sejtek citoplazmájába. A növényi sejtek citoplazmájában az infekciós csepp membránja körbezárja a baktériumokat, majd további átalakulás után létrejön a specifikus peribakteroid membrán (PBM). A szimbiotikus kompartment kialakulását követően a baktériumok és az őket körülvevő PBM-ok további osztódásokon mennek keresztül, melyben a gümő típusától függően, egy terminálisan differenciálódott bakteroid (2. ábra d.), vagy a PBM-ok fúziója, ill. további baktérium osztódás következtében egynél több bakteroid található (2. ábra f.). Azokban a szimbioszómákban ahol több sejt található, a bakteroidok mérete és morfológiája megegyezik a szabadon élő baktériumokéval (Bisseling, Vandenbos és mtsai. 1977; Paau, Oro és mtsai. 1979; Szczyglowski, Shaw és mtsai. 1998; Suganuma, Nakamura és mtsai. 2003). Ilyen szimbioszómák figyelhetők meg a *Lotus japonicus*, a szója (*Glycine max*) és a bab (*Phaseolus vulgaris*), illetve az indeterminált gümőket létrehozó *Leucaena* és *Mimosa* fajok gümőiben (Ishihara, Koriyama és mtsai. 2011; Marchetti, Catrice és mtsai. 2011). Ezzel ellentétben az IRLC-hez tartozó, indeterminált gümőket létrehozó lucerna (*Medicago sativa*), borsó (*Pisum sativum*) és a bükköny (*Vicia sativa*) gümősejtjeiben a bakteroidok erősen megnyúltak és gyakran elágaznak. A baktériumok differenciációja nagymértékben megváltoztatja a génexpressziós mintázatot, a sejt felszíni struktúrákat, valamint a sejtek metabolikus aktivitását is.



## 2. ábra A nitrogén fixáló szimbiotikus gümők kialakulásának sematikus modellje.

a-b) A gazda növény és a szimbionta partner között lejátszódó jelcsere és a hatására végbemenő folyamatok, illetve az indeterminált gümők szerkezeti felépítése: I. Zóna: merisztéma, II. Zóna: inváziós zóna, III. Zóna: nitrogén fixáló zóna, IV. Zóna: szénescens zóna. c) A baktériumok vándorlása az infekciós fonálban (IF) a gümő merisztéma sejtek felé d) A baktériumok lefűződése a poliploid növényi sejtekbe és a szimbioszoma kialakulása (PBM: peribakteroid membrán) e) A determinált gümő szerkezete f) A determinált gümőkre jellemző szimbioszómák. (Gibson, Kobayashi és mtsai. 2008).

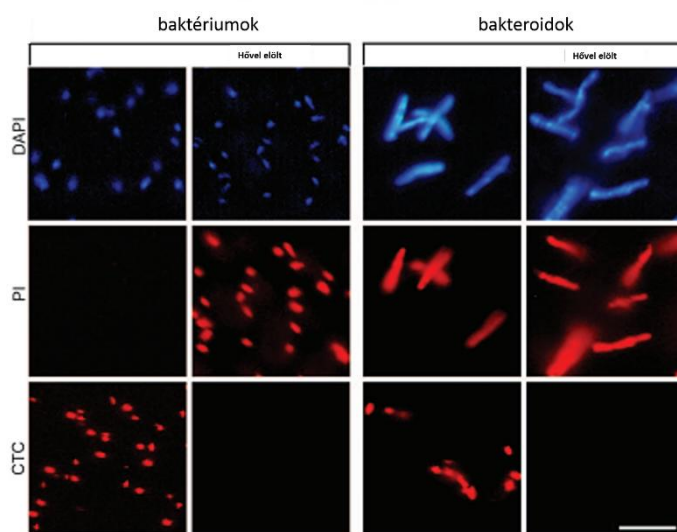
A bakteroidokat a PBM veszi körül, mely az infekciós csepp membránjának és az endoplazmatikus retikulumból(ER) és a Golgi-ból származó, PBM komponenseket tartalmazó vezikulumok fúziójával jön létre. Korábban az a nézet uralkodott, hogy a baktériumok a növényi sejtekbe egyfajta endocitotikus folyamat révén jutnak be a növényi sejtek citoplazmájába, de későbbi kutatások során (Roth és Stacey 1989; Limpens, Ivanov és mtsai. 2009) kiderült, hogy a szimbioszómáknak egyedi membrán alkotói vannak. Limpens és munkatársai kimutatták, hogy a korai (SYP4)

és a késői (Rab5) endoszómális markerek, melyek az endocitotikus útvonalra jellemzőek, nem jelennek meg a szimbioszóma kialakulása során. Ezzel szemben a Rab7, mely késői endoszómális és vakuoláris marker, azonban megjelenik a PBM-okban a szimbioszóma osztódásának leállását követően. Érdekesség, hogy plazma membránra jellemző SYP132 marker is megtalálható a PBM-ban (Catalano, Czymmek és mtsai. 2007; Limpens, Ivanov és mtsai. 2009). A Rab7 és a SYP132 marker egyidejű jelenléte a PBM-ban egyértelműen azt jelzi, hogy a membrán mozaik sajátosságokkal bír. A PBM-nak amellet, hogy fizikailag elválasztja a gazdaszervezet sejtjeit a baktériumoktól, ezzel megelőzve a patogén interakciókat, fontos szerepe van a szimbiotikus partnerek közötti anyagcsere folyamatokban (Udvardi és Day 1997; White, Prell és mtsai. 2007). Proteomikai és biokémiai kísérletek bizonyították (Panter, Thomson és mtsai. 2000; Saalbach, Erik és mtsai. 2002; Wienkoop és Saalbach 2003; Catalano, Lane és mtsai. 2004), hogy számos transzporter aktivitás és fehérje kapcsolódik a PBM-hoz, mint pl. a csatorna-szerű  $\text{NH}_4^+$  transzporter (Tyerman, Whitehead és mtsai. 1995), a dikarbonsav szállító fehérje (Ou Yang, Udvardi és mtsai. 1990), a nodulin 26 aquaporin (Rivers, Dean és mtsai. 1997), az anion transzporter nodulin N70 (Vincill, Szczyglowski és mtsai. 2005), vagy  $\text{Zn}^{2+}$  (Moreau, Thomson és mtsai. 2002) és  $\text{Fe}^{2+}$  (Kaiser, Moreau és mtsai. 2003), valamint szulfát transzporterek (Krusell, Krause és mtsai. 2005), stb. A PBM kialakulása során számos fehérje, ezen belül gümő specifikus géntermékek (nodulinok) szállítódnak a szimbioszóma membránjához és a peribakteroid térbe. Ilyen ismert nodulin fehérje az ENOD8 (Coque, Neogi és mtsai. 2008), a kalmodulin-szerű fehérjék egy kis családja (Liu, Miller és mtsai. 2006), valamint a PsNLEC1 lektin (Kardailsky, Sherrier és mtsai. 1996). Azonban, ezek biokémiai vagy sejt szintű funkciója ismeretlen. A *M. truncatula* gümőin végzett transzkriptóm vizsgálatok kimutatták, hogy a gümőspecifikus gének több mint 50 %-a szekréciós fehérjéket vagy peptideket kódol (Maunoury, Redondo-Nieto és mtsai. 2010). Ebből arra lehet következtetni, hogy a legtöbb gümő specifikus fehérje a szimbioszóma felé irányítódik. A fehérjék szimbioszóma felé történő szállításában fontos szerepet játszanak a szekréciós útvonalak. Erre az egyik jó példa a *M. truncatula* *dnfl* gén, mely egy, a gümő II. és III. zónájában aktiválódó (Maunoury, Redondo-Nieto és

mtsai. 2010), a szignál peptidáz komplex (SPC) egy szimbiózis specifikus SPC22 alegységét kódolja (Wang, Griffiths és mtsai. 2010). Ennek mutációja megakadályozza a szimbioszóma és a bakteroidok kifejlődését (Van de Velde, Zehirov és mtsai. 2010; Wang, Griffiths és mtsai. 2010) és blokkolja a gümő specifikus peptidek (NCR peptidek, későbbiekben részletesebben tárgyaljuk) transzportját a szimbioszómákba (Van de Velde, Zehirov és mtsai. 2010; Kereszt, Mergaert és mtsai. 2011).

### 1.2.3. Bakteroidok terminális differenciálódása az IRLC pillangósok gümőiben

A lucerna gümőkben megtalálható baktériumok a differenciálódás során számos morfológiai és citológiai változáson mennek keresztül. Ezek közé tartozik a sejtek nagymértékű megnyúlása (1-2  $\mu\text{m}$ -ról 5-10  $\mu\text{m}$ -re nyúlnak meg), melyek egyenként csomagolódnak be a PBM-ba (Vasse, de Billy és mtsai. 1990). Ez a méretbeli növekedés a genom minden replikonjának nagymértékű amplifikációjával társul (Mergaert, Uchiumi és mtsai. 2006). Ez a sajátosság a gazdasejtek fejlődéséhez mutat hasonlóságot, így ebből kiindulva feltételezték, hogy a bakteroidok sejtjeiben is hasonló folyamatok mennek végbe, vagyis számos DNS replikációs folyamat zajlik le citokinézis nélkül (Latch és Margolin 1997; Wright, Stephens és mtsai. 1997; Sibley, MacLellan és mtsai. 2006; Cheng, Sibley és mtsai. 2007). Mindezek mellett a megemelkedett detergensszel szembeni érzékenység (Sutton és Paterson 1980; Zhou, Tchan és mtsai. 1985) és propidium-jodid (PI) membrán-integritás indikátor festék lassú bejutása a sejtekbe (a PI az ép sejtekbe nem képes bejutni) arra utal, hogy a bakteroidok membránjának integritása megváltozott vagy a permeabilitása megemelkedett (Mergaert, Uchiumi és mtsai. 2006). Mivel a gümőkből izolált bakteroidok annak ellenére, hogy metabolikusan aktívak (Mergaert, Uchiumi és mtsai. 2006), osztódásra már nem képesek, így azokat a differenciálódás egy végső, irreverzibilis pontjának tekinthetjük, vagyis egyfajta terminális differenciáció tapasztalható a *Medicago* gümőkben (3. ábra).

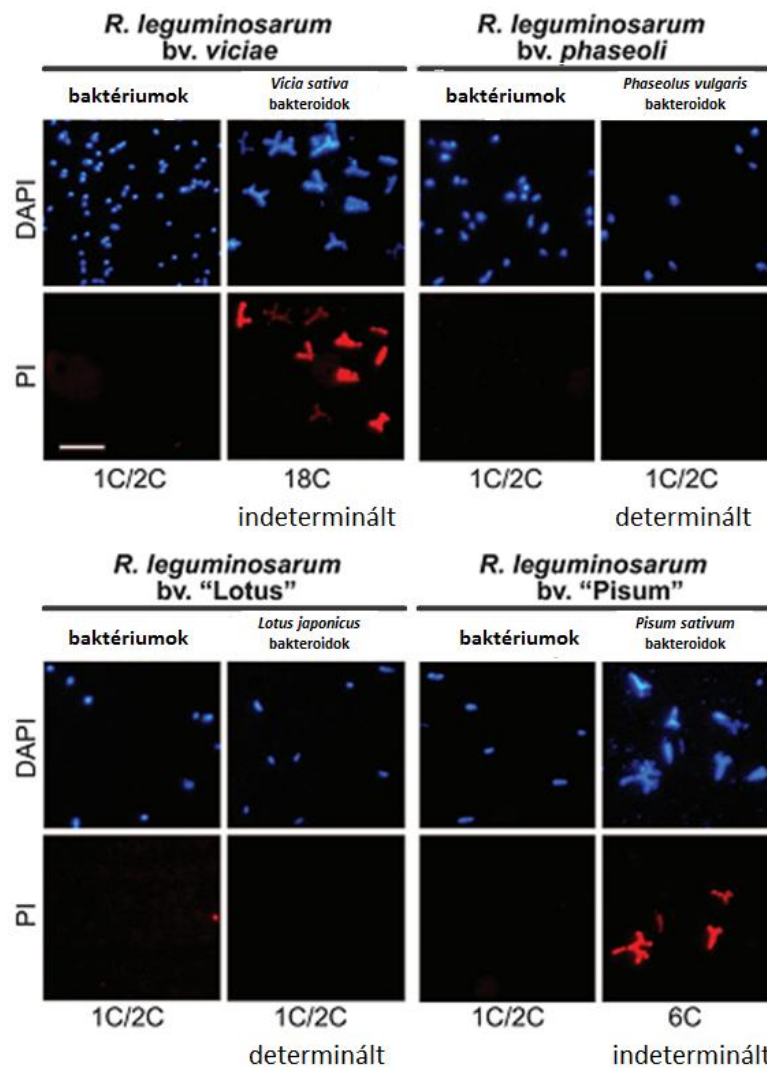


**3. ábra A szabadon élő és a gümőből tisztított bakteroidok méretének, alakjának és DNS tartalmának összehasonlítása.**

DAPI-val (4',6-diamidino-2-phenylindole,DNS-t festi), PI-dal (membránpermeabilitásában sérült sejtek DNS-éhez kötődő festék) és CTC-vel (5-cyano-2,3-di-4-tolyl tetrazolium kloride, a sejtlegzés aktivitásának indikátora) festett baktériumok és bakteroidok fluoreszcens mikroszkópos képe (a lépték 10  $\mu$ m). (Mergaert, Uchiumi és mtsai. 2006)alapján.

Ezek a bakteroid sajátosságok, mint a megemelkedett sejt méret és DNS tartalom, a megváltozott membrán permeabilitás, a reprodukciós képesség hiánya a bükköny és a borsó gümői esetén is megfigyelhető, de nem mutatható ki a *L. japonicus* és a bab gümőiből tisztított bakteroidokon, ahol a *Rhizobium* baktériumok nem mennek keresztül a terminális bakteroid differenciáción (Mergaert, Uchiumi és mtsai. 2006).

A bakteroidok eltérő differenciálódási tulajdonságait figyelembe véve felmerült a kérdés, hogy a bakteriális génállomány, vagy az IRLC kládba tartozó növényekre specifikus faktorok a felelősek a bakteroidok terminális differenciációjáért. A válasz megtalálása érdekében Mergaert és munkatársai(Mergaert, Uchiumi és mtsai. 2006) olyan közel izogenikus, rekombináns *Rhizobium* törzseket hasonlítottak össze, melyek képesek voltak nitrogénfixáló kölcsönhatás kialakítására a különböző gümőtípus létrehozására képes növényekkel.



**4. ábra** A bakteroid differenciáció típusát a gazdanövény határozza meg.

A bakteroidokat különböző szimbiotikus kombinációból izolálták és DAPI -val ill. PI – dal festették. Az indeterminált gümőkől származó bakteroidok minden esetben mutatják a terminális bakteroid differenciációra jellemző fenotípust (a lépték 10  $\mu$ m) (C-haploid DNS tartalom). (Mergaert, Uchiumi és mtsai. 2006) alapján.

A *R. leguminosarum* *bv. viciae* (eredetileg az indeterminált gümöket létrehozó növényekkel - borsó és bükköny - képes szimbiotikus kapcsolat kialakítására) módosításával elérték, hogy a *L. japonicus*-sal is képes legyen nitrogénfixáló szimbiotikus kölcsönhatás kialakítására. Ez a változat a *R. leguminosarum* *bv. „Lotus”*. Ezzel a baktériummal fertőzött *L. japonicus*-ból tisztított bakteroidokat



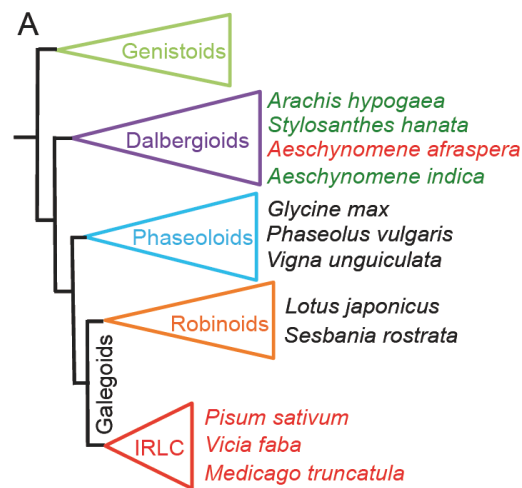
vizsgálva azt tapasztalták, hogy a baktériumok nem mentek át az endoreduplikáció folyamatán és nem változott meg a membrán permeabilitásuk sem. Ezzel párhuzamosan a *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (mely eredetileg determinált gümőket létrehozó növényekkel - bab - képes szimbiotikus kapcsolat kialakítására) módosításával létrehoztak egy olyan baktérium változatot, mely már képes a másik csoportba tartozó *Pisum sativum*-ot fertőzni. Ennek a változatnak a *R. leguminosarum* bv. „*Pisum*” nevet adták. Ezzel a módosított baktériummal fertőzött *P. sativum*-ból tisztított bakteroidok pedig mutatták az összes, a terminális bakteroid differenciációra jellemző fenotípust (Mergaert, Uchiumi és mtsai. 2006) (4. ábra).

Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a baktériumok differenciációjáért valamilyen, az IRLC kládba tartozó növényekre jellemző faktorok a felelősek. Hasonló dimorfizmus figyelhető meg a 32H1 jelű *Rhizobium* törzs esetén is, mely a szabadon élő baktériumokhoz hasonló bakteroidokká alakul tehénborsóval (*Vigna sinensis*) kölcsönhatva, míg a földimogyoróval kialakított kölcsönhatás során egy szokatlan bakteroid differenciációs útvonalon megy keresztül az „aeschynomenoid” típusú gümők kialakulása során, ahol a bakteroidok szintén megnagyobbodtak, viszont gömbölyűvé válnak (Sen, Weaver és mtsai. 1986).

A bakteroidok morfológiáját és DNS tartalmát, mint a terminális vagy reverzibilis differenciáció indikátoraiként alkalmazva, vizsgálták, hogy a terminális differenciáció a pillangósok evolúciójának mely szakaszában alakulhatott ki (Oono, Schmitt és mtsai. 2010). A vizsgálatok során megállapították, hogy a reverzibilis átalakulás a terminálishoz képest ősi, valamint a terminális differenciáció az evolúció során egymástól függetlenül a *Papilionoideae* alcsalád legalább öt kládjában megjelent, mely konvergens evolúcióra utal. Elképzelhető, hogy ezekben a hüvelyes vonalakban egy sajátos, specifikus mechanizmus alakult ki a szimbiotikus partner terminális differenciációra történő kényszerítésére (Kereszt, Mergaert és mtsai. 2011).

Az IRLC kládba tartozó *M. truncatula* gümőin végzett transzkriptom analízis során azonosították azt, a több mint 600 tagból álló gümő specifikus ciszteinben gazdag peptid (NCR: nodule-specific cysteine-rich peptides) családot, melynek tagjai

kizárólag a nitrogénfixáló gümők fertőzött sejtjeiben expresszálódnak. További vizsgálatok során más, szintén az IRLC kládba tartozó növény esetén (bükköny, borsó, vagy Galega) az NCR peptidekkel homológ szekvenciákat azonosítottak, azonban azokban a növényekben, ahol a baktériumok reverzibilis változásokon mennek keresztül a differenciáció során, mint pl. a *L. japonicus*, vagy *Phaseolus* fajok, általában hiányoznak ezek a peptid szekvenciák (Mergaert, Nikovics és mtsai. 2003; Alunni, Kevei és mtsai. 2007; Kereszt, Mergaert és mtsai. 2011).



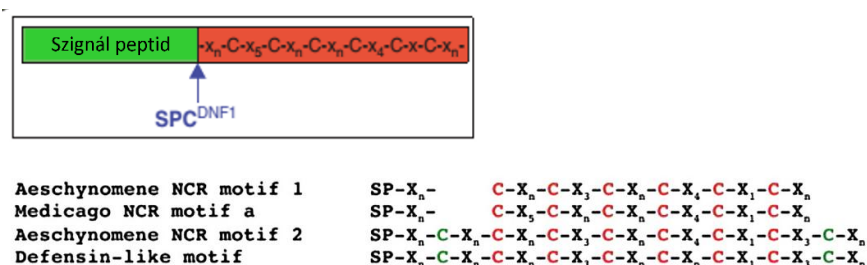
**5. ábraA Papilionoid alcsaládba tartozó hüvelyes növények bakteroid morfológiájának eloszlása.** Egyszerűsített filogenetikai fa, ahol háromszögek jelképezik a hüvelyes növények főbb kládjait, a jelentősebb fajok feltüntetésével, melyek bakteroid morfortípusa már ismert. Pirossal a megnyúlt morfortípusú, zölddel a gömb alakú, feketével pedig a változatlan morfológiájú bakteroiddal rendelkező növényeket jelölték. (Czernic, Gully és mtsai. 2015).

A közelmúltban azonban az IRLC kládnál ősi Dalbergioid kládba (ide tartozik a mogyoró is) tartozó *Aeschynomene* fajoknál is azonosítottak az NCR-ekhez hasonló peptideket, melyek jelenléte szükséges a funkcionális, szimbiotikus kölcsönhatás kialakításához. Érdekesség, hogy a különböző *Aeschynomene* fajok esetén eltérő bakteroid morfológiákat tapasztaltak. Az *A. afraspera* bakteroidjai az IRLC kládra jellemző megnyúlt morfológiát mutatja, míg a *A. indica* bakteroidjai a földimogyoró

gümőkben megfigyelt megnagyobbodott, gömb alakot vesznek fel a differenciációjuk során. A vizsgálatok során mindkét típus esetén azonosítani tudták ezeknek az NCR-szerű peptideknek a jelenlétét. Ezek alapján felmerült az a feltételezés, hogy a hüvelyes növények esetében általános stratégia a ciszteinben gazdag peptidek termelése a szimbióta partner terminális differenciációjának szabályozása során (5. ábra) (Czernic, Gully és mtsai. 2015).

#### 1.2.4. Gümő specifikus ciszteinben gazdag peptidek (NCR-ek)

A csoportunk által vizsgált NCR gének rövid, 25 – 60 aminosav hosszú, szekretált peptideket kódolnak, melyek érett formái négy vagy hat ciszteint tartalmaznak konzervált pozíciókban. Szerkezetük alapján hasonlóságot mutatnak a skorpió toxinjával, és a növényi, ill. állati defenzinokkal (Alunni, Kevei és mtsai. 2007; Maroti, Kereszt és mtsai. 2011) (6. ábra).



**6. ábra** A defenzin-szerű, a *Medicago* és *Aeschynomene* NCR-szerű polipeptidek szerkezete.(Mergaert, Nikovics és mtsai. 2003; Kereszt, Mergaert és mtsai. 2011; Czernic, Gully és mtsai. 2015).

Az NCR gének egy több mint 600 génből álló családot alkotnak *M. truncatula*-ban, melyek kizárólag a nitrogénfixáló gümők poliploid növényi sejtjeiben expresszálódnak, ahol már jelen vannak a szimbióta partnerek (Fedorova, van de Mortel és mtsai. 2002; Mergaert, Nikovics és mtsai. 2003; Alunni, Kevei és mtsai. 2007; Maunoury, Redondo-Nieto és mtsai. 2010).

Az NCR peptidek bakteroidokhoz történő szállítódását molekuláris biológiai, immunológiai és biokémiai technikák kombinálásával igazoltuk (Van de Velde, Zehirov és mtsai. 2010). Azóta csoportunk több mint száz NCR peptid jelenlétét mutatta ki a bakteroidokban (Durgo, Klement és mtsai. 2015).

Az azonosított NCR peptidek szerkezetüket tekintve hasonlóságot mutatnak a defenzinekhez, mely lehetséges antimikrobiális hatásra utalhat. A peptidek elsődleges szekvenciáját vizsgálva, csak gyenge homológia figyelhető meg, valamint jelentős eltérések mutatkoznak az expressziós mintázatukat, izoelektromos pontjukat tekintve. Csoportunk kimutatta, hogy a kationos NCR peptidek valóban antimikrobiális hatással rendelkeznek, mind a *Rhizobium* szimbionta partnerrel, mind egyéb Gram – és Gram + baktériummal szemben is (Van de Velde, Zehirov és mtsai. 2010; Tiricz, Szűcs és mtsai. 2013).

Transzkriptóm vizsgálatok során kimutatták, hogy az antimikrobiális hatással rendelkező NCR247 peptid szubletális koncentrációban további membrán vagy periplazmikus fehérjéket kódoló gének indukálódását váltja ki, melyek ionok, ásványi anyagok, sziderofórok és poliszacharidok transzportjában játszanak szerepet, ezzel elősegítve a baktérium, a peptid kezelés által kiváltott stresszhez történő, sejtszintű adaptációt (Penterman, Abo és mtsai. 2014). Csoportunkban megfigyeltük, hogy az NCR247 peptid szubletális koncentrációban alkalmazva, membrán depolarizáció-kapcsolt transzkripciós változásokat is indukál a *S. meliloti* baktériumokban (Tiricz, Szucs és mtsai. 2013). Ezek mellett, kimutattuk, hogy specifikusan csökkentette a ferredoxin-szerű hipotetikus fehérje expresszióját (Smc04329), valamint 11 gén esetében specifikusan megemelkedett az expresszió. Ezek közé tartozik pl. a szulfid oxidáz YedYZ alegysége, a vas felvevő ABC transzporter szubsztrát kötő fehérje prekuzora, valamint az ExbBD fehérje, mely a TonB fehérjével komplexet alkotva elősegíti vas komplexek felvételét (Tiricz, Szucs és mtsai. 2013). A transzkriptóm analízis során az NCR247 peptid mellett az NCR335 kationos peptid hatására bekövetkező génexpressziós változásokat is tanulmányozták. A szubletális kezelés hatására azt tapasztalták, hogy az NCR335 peptid specifikusan csökkenti 7 hipotetikus fehérje, egy zsírsav deszaturáz, a

transzkripciós faktort kódoló *mucR* gén, valamint 5 az RNS metabolizmusban szerepet játszó fehérjét kódoló gén expresszióját. Az 59 génből, melyeknek a génkifejeződését serkenti, 32 hipotetikus fehérjét, egy sztomatin-szerű membrán proteint, egy oxidoreduktáz domént tartalmazó fehérjét, egy plazmid stabilizáló fehérjét, egy a membrán módosításban szerepet játszó ciklopropán-zsír-sav-foszfolid szintáz fehérjét kódol.

Általánosságban elmondható, hogy mindkét peptidkezelés hatására olyan gének expressziója csökkent, melyek szerepet játszanak a gének transzkripciójában (RNS polimeráz alegységek, transzkripciós terminátorok, antiterminátorok), translációjában (transzláció iniciációs faktorok, elongációs faktorok, riboszómális alegységek), valamint RNS molekulák konformációs módosításában, metabolizmusában és érésében. Mindemellett, a peptidek hatására egy sor fehérje expressziója megemelkedett, mint pl. hősokk, és transzport fehérjék, valamint olyanoknak is, melyek a stressz-kapcsolt funkciókban játszanak szerepet (Tiricz, Szucs és mtsai. 2013).

Az NCR peptidek nagy számából, szerkezeti különbözőségéből fakadóan feltételezhető, hogy a peptidek eltérő funkcióval rendelkeznek. Azonban az is ismert, hogy NCR peptid család legalább 138 tagja a szimbioszómába szállítódik. Hiányukban a bakteroidok terminális differenciálódásának folyamata sérül. Így felmerül a kérdés, hogy a peptidek egymással kölcsön hatva, vagy egymástól függetlenül, más és más hatásmechanizmussal fejtik ki hatásukat a nitrogén fixáló gümők fejlődésében. A közelmúltban két olyan egyedi NCR peptidet (NCR169 és NCR211) is sikerült azonosítani, melyek hiánya nitrogén fixálásra alkalmatlan gümők kialakulását indukálta.

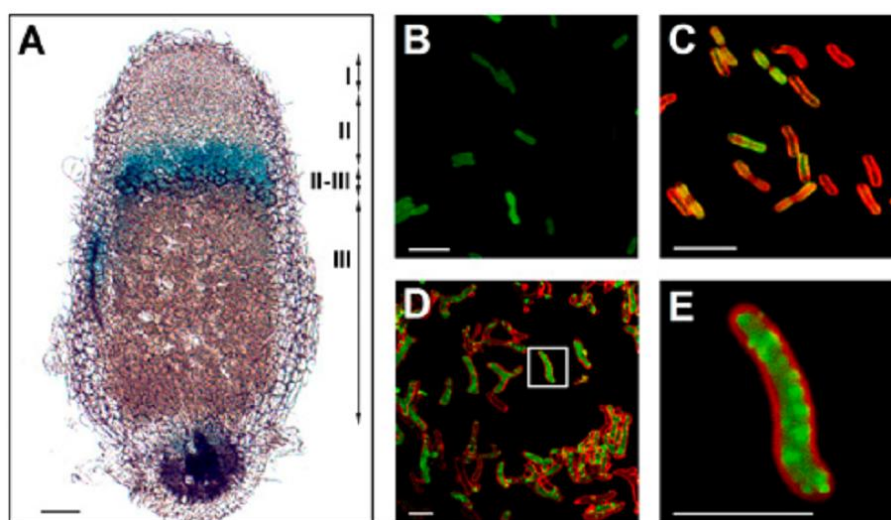
Az NCR169 peptidet kódoló génről ismert, hogy kizárólag a gümő fertőzött szimbiotikus sejtjeiben expresszálódik (inváziós zóna és az érett nitrogén fixáló zóna), és más NCR gének (64) expresszióját befolyásolja a szimbiotikus gümőkben. *AM. truncatula* deléciós mutáns *dnf7*(dnf: defective in nitrogen fixation) vonalában az NCR169 peptid hiánya meggátolta a szimbiotikus nitrogén fixálást. Vizsgálatok során kimutatták, hogy az NCR169 peptid jelenléte elengedhetetlen nitrogén fixáló

szimbiotikus gümő kialakulásának bizonyos folyamataihoz, mint pl.: a bakteroidok differenciálódása, azok túlélése a gümőkben, valamint a korai szeneszcencia elkerülése (Horvath, Domonkos és mtsai. 2015).

A *M. truncatula dnf4* mutáns vonalában kimutatták, hogy a nitrogén fixálás hiányáért szintén egy egyedi peptid, az NCR211 hiánya a felelős. Fenotípus vizsgálatok alapján elmondható, hogy a szimbiotikus folyamatok, az eddig vizsgált más *dnf* mutáns vonalakhoz (*dnf1*, *dnf2*, *dnf5*) képest, a *dnf4* esetében egy későbbi stádiumban sérülnek, hiszen számos késői szimbiotikus bakteriális és növényi gén expressziója fennmarad. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy a mutáns vonal esetén a gümőkben differenciálódott bakteroidok találhatóak. Az NCR211 peptidről kimutatták, hogy a peribakteroid térbe szállítódnak, és feltételezhető, hogy szerepük a differenciálódott bakteroidok túlélésének támogatásában van, hiszen az NCR211 peptid hiányában a bakteroidok a teljes differenciálódásuk befejezte előtt elpusztulnak. Érdekes, hogy a szintetikus NCR211 peptid hasonló antimikrobiális hatással rendelkezik, mint az NCR247 peptid. Ez a kettős hatás (bakteroidok védelme, szabadon élő baktériumok elpusztítása) arra utalhat, hogy az NCR211 peptidnek fontos szerepe lehet a gümőn belül található baktériumok megfelelő differenciációs állapotának fenntartásában (Kim, Chen és mtsai. 2015).

Napjainkban intenzíven vizsgált peptidek közé tartozik a kationos NCR247 peptid, melynek extrém hidrofil jellege a hatásmechanizmusának sokféleségére utal. A peptid az indeterminált gümők II. és a II.-III. átmeneti zónájában expresszálódik, ahol az endoszimbioták osztódása már leáll és az extrém sejt méret növekedés megkezdődik (7. ábra). A peptidnek valószínűleg szerepe van a sejtosztódás leállításában, részben az FtsZ monomerekhez (bakteriális sejtosztódásban szerepet játszó fehérje) kötődve, megakadályozva azok polimerizációját és ezzel az osztódási szeptum kialakulását (Farkas, Maroti és mtsai. 2014). Ezek mellett szubletális koncentrációban a fő sejtosztódásban szerepet játszó regulátor fehérjék (DnaA, GcrA, CtrA) expresszióját is csökkenti (Penterman, Abo és mtsai. 2014). Valamint kölcsönhatásba lép a GroEL fehérjével, és a nitrogenáz komplex valamely tagjával. Korábbról már ismert, hogy a GroEL szükséges a nitrogenáz enzim komplex

kialakulásához (Govezensky, Greener és mtsai. 1991). Az nem bizonyított, hogy ezek a nitrogénáz komplex fehérjéi direkt kölcsönhatásban lennének a peptiddel, de az elképzelhető, hogy a GroEL fehérjén keresztül kapcsolatba léphetnek egymással, ezzel is elősegítve a terminális differenciáció folyamatát (Farkas, Maroti és mtsai. 2014). Ezek mellett kimutatták, hogy más NCR peptidekkel (NCR028, NCR169, NCR290) is képes kölcsönhatásba lépni, így feltételezhető, hogy a peptidek heterokomplexek kialakítására is képesek (Farkas, Maroti és mtsai. 2014).

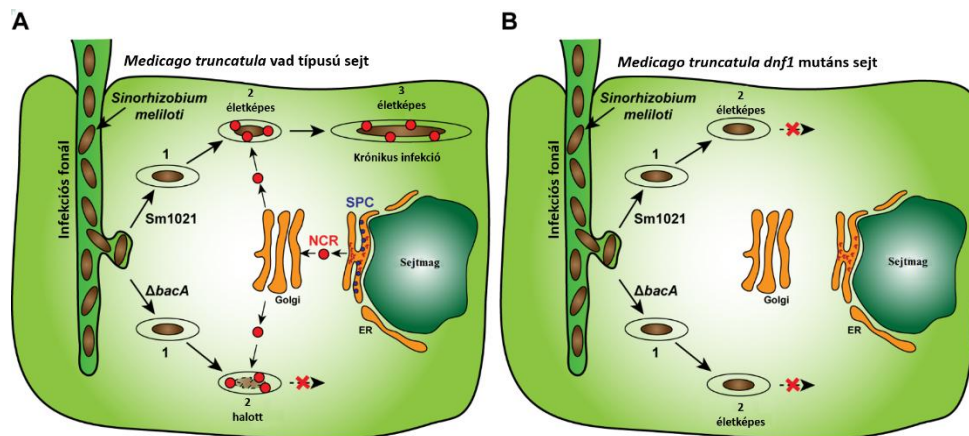


**7. ábra** Az NCR247 peptid lokalizációja a nitrogén fixáló gümőben és a bakteroidokban.

Az NCR247 promóter által meghajtott  $\beta$ -glucuronidáz (GUS) riporter gén expressziója az érett nitrogénfixáló gümőkben (A) a *S. meliloti* baktériumok festése FITC-cel (fluorescein isothiocyanate) jelölt NCR247-tel és PI-dal (B), FITC-cel jelölt NCR247-tel és FM 4-64-gyel (membrán specifikus fluoreszcens festék) (C), valamint a *S. meliloti* bakteroidok festése FITC-cel jelölt NCR247-tel és FM 4-64-gyel (D, E) (a lépték 5  $\mu$ m). (Farkas, Maroti és mtsai. 2014).

A ciszteinben gazdag peptidek (*Medicago* fajok - NCR peptidek, *Aeschynomene* fajok - NCR-ekhez hasonló peptidek) bakteroid differenciációban játszott szerepének kifejeződésében a DNF1 szignál peptidáznak és a BacA/BclA (*M. truncatula* - bakteroid development A; *Aeschynomene* spp.- Bacteroid development A-like (Guefrachi, Pierre és mtsai. 2015))peptid transzporternek van fontos szerepe. A *dnf1* mutáns növényekben (*M. truncatula*, *A. evenia* ssp. *serrulata*) a bakteroidok

differentenciációja elmarad, mivel a ciszteinben gazdag peptidek az endoplazmatikus retikulumban rekednek (8. ábra B.) (Van de Velde, Zehirov és mtsai. 2010; Wang, Griffiths és mtsai. 2010). Ugyanígy elmarad a baktériumok bakteroidokká történő differentenciációja a BacA/BclA peptid transzporterek hiányában, melyek szerepe a baktériumok lipid A komponensének módosításában van (8. ábra A.) (Glazebrook, Ichige és mtsai. 1993; Ferguson, Datta és mtsai. 2005; Haag, Baloban és mtsai. 2011).



#### 8. ábra A terminális bakteroid differentenciációt befolyásoló folyamatok a bakteroidok kialakulása során

(A) vad típusú *M. truncatula* gümő sejtekben vad típusú *S. meliloti* (Sm1021) illetve BacA mutáns törzs jelenlétében, valamint (B) *dnf1* mutáns *M. truncatula* gümő sejtek esetén (Haag, Baloban és mtsai. 2011).

Ezek alapján látható, hogy a bakteroidok differentenciációja az IRLC és Dalbergoid kládban jelen lévő ciszteinben gazdag peptidek szabályozása alatt áll. Hatásuk azonban számos más komponens (DNF1, BacA/BclA, stb.) jelenlététől is függ, mely jelzi a bakteroid differentenciáció folyamatának komplexitását.

A kationos NCR peptideknek, mint antimikrobiális ágenseknek, a baktériumokra gyakorolt hatása mellett kimutatták azok antifungális hatását is (Ordogh, Voros és mtsai. 2014). Vizsgálatuk szerint, azok a peptidek, melyek pI - ja (izoelektromos pont) 9 feletti (NCR192, NCR137, NCR147, NCR280, NCR183, NCR247, NCR044,



NCR030, NCR335), erős gombaölő hatással rendelkeznek, olyan koncentrációban (MIC= 1,42 – 10,5  $\mu$ M), mely összehasonlítható, a fungicidként használt Amphotericin B koncentrációjával (1,69  $\mu$ M). Az Amphotericin B a gomba membránban található szterolokhoz kötődve tönkreteszi a membránt, előidézve a monovalens ionok kiáramlását és ezzel a sejtek pusztulását. A vizsgált peptidek fungicid hatással bírnak a *Candida albicans* WO-1, és Sc5314, a *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* törzsekre. A gomba sejtekben a FITC - konjugált NCR247 peptid szubletális koncentrációban (5  $\mu$ g/ml) a sejtek membránjában akkumulálódik, majd a citoplazmában is kis mértékben megjelenik, melynek következtében elmondható, hogy a peptid elsődleges célpontja a gombák sejtmembránja (Ordogh, Voros és mtsai. 2014). Emellett a peptidek membrán integritására kifejtett hatását vizsgálva, megállapították, hogy az NCR335, NCR247 és NCR192 a *C. albicans* WO-1 törzs membrán integritását megváltoztatja. A peptidek gyógyászatban való alkalmazásához szükséges volt azok hatását vizsgálni különböző humán sejtvonalakon, mint pl. a vaginális epitel sejtek és a keratinociták esetében. A vizsgálatok során kimutatták, hogy a peptidek csak nagyon magas koncentrációban (>25 $\mu$ g/ml NCR335, 100  $\mu$ g/ml NCR247, és 100  $\mu$ g/ml NCR192) károsítják a humán sejteket, azonban a gombákra már sokkal alacsonyabb koncentrációban kifejtik fungicid hatásukat. Mivel a peptidek képesek a gombák hifás formáját is eliminálni a humán sejtek károsítása nélkül, alkalmassá válhatnak a Candida - fertőzések (candidiasis) kezelésére (Ordogh, Voros és mtsai. 2014).

Ezek alapján elmondható, hogy a gümő specifikus kationos NCR peptideknek szerepe lehet:

1. a hatékonyabb szimbiotikus kapcsolat kialakítása érdekében a szimbionta partner sejtciklusának és metabolizmusának megváltoztatásában,
2. a nitrogén fixálásban hibás baktériumok eliminálásában,
3. a szenteszcens bakteroidok elpusztításában,
4. gazdaszervezet sejtjeibe, toxikus hatásuk révén, más baktériumok és gombák bejutásának megakadályozásában.

### 1.3. Kationos antimikrobiális peptidek hatásmechanizmusa

A 'kationos antimikrobiális peptidek' kifejezést azokra a peptidekre kellene alkalmazni, melyek elsődleges biológiai funkciója a mikroorganizmusok elpusztítása. Amennyiben ezen peptidek más sajátosságára fókuszálunk (pl. kemoattraktáns, immunmoduláló, sebgyógyító vagy angiogenikus tulajdonság), vagy *in vivo* körülmények között ezek az alternatív biológiai funkciók a leggyakoribbak, akkor a 'gazda védelmi peptidek' kifejezést érdemesebb alkalmazni (Hancock és Patrzykat 2002).

Minden természetes antimikrobiális peptidre jellemző a kis méret (általában 12-50 aminosav hosszúak), a kationos töltés (átlagos töltés a +2 és +9 közötti), és a hidrofobicitás (Powers és Hancock 2003). Általában riboszómálisan szintetizált peptidek, melyek konstitutíven, vagy indukálhatóan expresszálódnak, valamint minden élő eukarióta és prokarióta képes a termelésükre.

A kationos antimikrobiális peptideket (a szintetikusakat is beleértve) szerkezetük alapján két csoportba szokták sorolni:  $\alpha$ -helikális és  $\beta$ -lemezes peptidek. Igaz, hogy az elsődleges és másodlagos szerkezetüket tekintve jelentős változékonyság tapasztalható közöttük, azonban a negyedleges szerkezetükben hasonlóságot mutatnak, miszerint amfifil molekulákat alkotnak, ahol a töltéssel rendelkező és hidrofób egységek a peptidek felszínére kerülnek elősegítve a membránokkal a kölcsönhatások kialakulását (Straus és Hancock 2006).

A legtöbb baktérium érzékeny a kationos antimikrobiális peptidekkel szemben, kivéve a *Burkholderia* valamint a *Serratia* és *Proteus* fajokat (Hancock és Patrzykat 2002). Bár sok ilyen peptidről tudunk, azonban ezek hatásmechanizmusának részletesebb vizsgálata csak néhány peptid esetében történt meg. A kationos antimikrobiális peptidek hatásmechanizmusukat tekintve 'piszkos drog'-nak tekinthetők (Peschel és Sahl 2006), mivel amfifil természetükből és kationos töltésükből kifolyólag számos célpontjuk lehet. Éveken át az a nézet uralkodott, hogy

a kationos peptidek a membránokhoz kapcsolódva, azok tönkretételével fejtik ki antimikrobiális hatásukat, azonban az elmúlt években kiderült, hogy ezeknek a peptideknek alternatív és/vagy további nem membrán célpontjaik is létezhetnek. Ezek alapján a peptideket két funkcionális csoportba lehet sorolni: membrán károsító és membránt nem károsító peptidek (Powers és Hancock 2003), azonban a különbségtétel nehézkes, hisz a peptidek hatásmechanizmusa eltérő lehet a különböző baktérium fajokon. Tekintet nélkül arra, hogy a peptidek melyik csoportba tartoznak, mindenképpen kölcsönhatásba kell lépniük a membránokkal, akár roncsolják azt, akár nem, hogy elérhessék a végső, sejten belüli célpontot (Jenssen, Hamill és mtsai. 2006).

A két főbb csoport ( $\alpha$ -helikális és  $\beta$ -lemezes) szerkezeti eltéréseiből adódik, hogy a peptidek a citoplazma membránon más-más módon jutnak át. Azonban a kationos peptidek és a bakteriális sejt közötti kölcsönhatások kezdeti lépései megegyeznek. A pozitívan töltött antimikrobiális peptidek a sejtek polianionos külső felszínéhez (Gram + baktériumok esetén a sejtfa asszociált teichonsavnak és lipoteichonsavnak, a Gram – baktériumok esetén pedig a lipopoliszaccharidnak (LPS) köszönhetően) kötődik. A kezdeti elektrosztatikus kölcsönhatást követően a Gram – baktériumok esetén a peptidek a 'saját maguk által kezdeményezett' mechanizmussal jutnak át a külső membránon (Hancock 1997). Azzal képesek ezt végrehajtani, hogy magasabb az affinitásuk a negatívan töltött LPS molekulákhoz kötődésben, mint a kétértékű kationoké, pl. a  $Mg^{2+}$  és a  $Ca^{2+}$  (Jenssen, Hamill és mtsai. 2006), ezzel megbontva a külső membrán stabilitását, ami elősegíti a kationos peptidek átjutását a membránon (2. táblázat).

Feltételezett aktivitás	Peptid	Hatásmechanizmus
Membránt károsító	Nisin	Csatorna formáló: lipid II gátlás és sejtfall bontó enzimek felszabadítása
	Alamethicin	'barrel-stave' (hordó-léc)
	Magainin 2	'toroidal-pore' (gyűrűs pórus)
	Cecropin	'carpet' (szőnyeg) modell
	Indolicidin	aggregációs modell
Membránt nem károsító	Buforin II	DNS szintézis
	Indolicidin	DNS szintézis, sejtosttódás
	Pleurocidin származék Der	P- RNS, fehérje szintézis
	PR39	fehérje szintézis, szeptum formálás
	CP10A	RNS, fehérje szintézis
	Dermaseptin, HNP-1	fehérje szintézis
	Pyrrhocoricin, apidaecin	drosocin, DnaK (chaperon) aktivitás gátlása
	Pep5	sejtfall bontó enzimek felszabadítása
	Microcin 25	szeptum formálás

HNP: humán neutrofil  
peptid

**2. táblázat** Kationos antimikrobiális peptidek és hatásmechanizmusuk összefoglalása (Hale és Hancock 2007).

A citoplazma membránnal való interakció a peptidek foszfolipidekhez történő kapcsolódásával veszi kezdetét. Amíg a peptid:lípíd arány alacsony, a kationos peptidek kötött állapotban maradnak, párhuzamosan a membrán felszínével (Brogden 2005), azonban ha ez az arány megemelkedik a peptidek már képesek aggregálódni és/vagy a membránba bejutva a membrán integritását megzavarni. Erre a folyamatra négyféle modellt írtak le részletesen: 'carpet' (szőnyeg) modell, 'barrel-stave' (hordóléc) modell, a 'toroidal-pore' (gyűrűs pórus) modell és az aggregációs modell. Mivel minden egyes modell egy-egy adott peptid hatásmechanizmusával kapcsolatban lett leírva, egyik modell sem pontosabb, általánosabb, mint a másik.

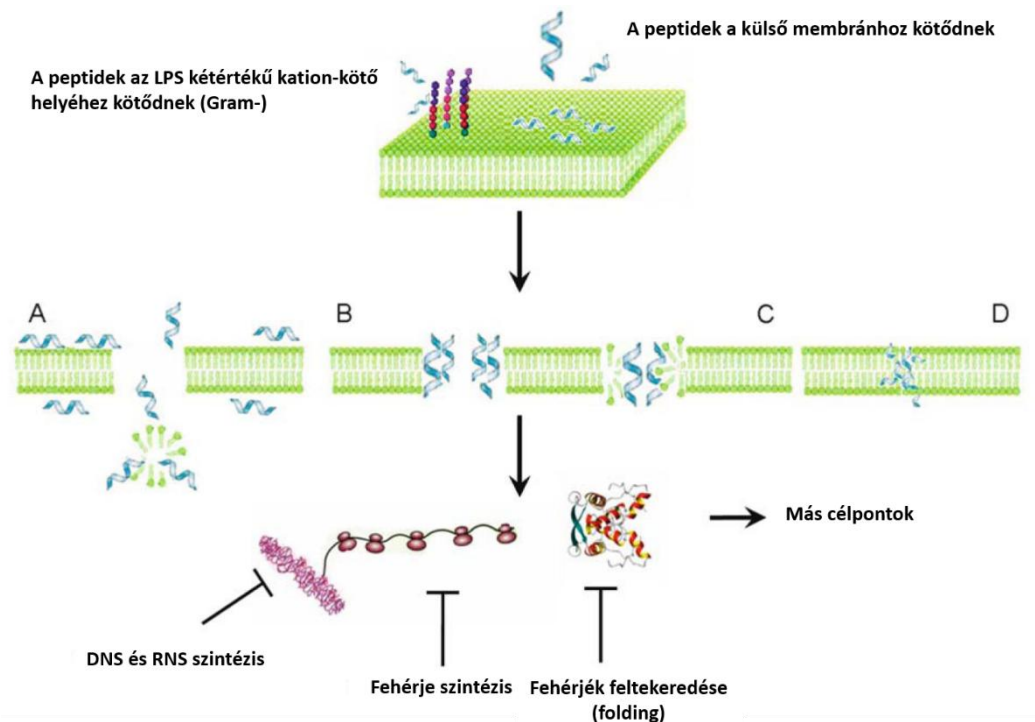
A **szőnyeg modell** ('Carpet' modell) esetén (pl. cecropin) (Gazit, Boman és mtsai. 1995) a kationos peptidek nem jutnak be a membránba, hanem a citoplazma membrán külső felületéhez kötődve maradnak. A peptid egy adott mennyiségének kötődése után, úgynevezett szőnyeg alakul ki, mely meggyengíti a kettős réteg szerkezetét azzal, hogy a membrán elektrosztatikusságát megszünteti, ezzel előidézve a membrán micellákra bomlását. A baktérium sejtek pusztulását a membrán komponensek elvesztésével indukálják a kationos peptidek. A modell szerint egy adott peptidkoncentráció szükséges a membrán tönkretételéhez, ez azonban nem mindig alátámasztható a kísérletes eredményekkel (Wu, Maier és mtsai. 1999) (9. ábra A.).

A **'barrel-stave' modell** vagy más néven, 'helical bundle' (helikális köteg) írja le pl. az alamethicin és a gramicidin S hatásmechanizmusát (Wu, Maier és mtsai. 1999; Brogden 2005). A peptidek citoplazma membránhoz kötődését követően, amennyiben a peptid:lípíd arány elér egy kritikus értéket, a peptidek a membránra merőlegesen elhelyezkedve a lipíd kettős rétegbe integrálódnak. Ekkor a peptidek orientációja megváltozik, mégpedig olyan módon, hogy a hidrofób oldalláncok a membrán hidrofób belseje felé néznek, míg a poláris oldalláncok egymás felé fordulva kialakítanak egy centrális hidrofil belső részt, mely a membrán teljes szélességén átível, kialakítva egy pórust, melyen a sejtartalom kiáramlik, ezzel okozva a baktérium pusztulását. Az azonban nem egyértelmű, hogy a legtöbb esetben, hogyan alakulnak ki ezek a pórusok, mivel a kialakuló pórusok mérete és

fennmaradásának ideje irreguláris és enyhén kation szelektív (míg ha a kationos csoportok a szűk pórus lumene felé irányítódnak, annak anion specifikusnak kellene lennie) (Wu, Maier és mtsai. 1999) (9. ábra B.).

A **'toroidal – pore' modell**ben (ide tartozik a magainin 2) (Yang, Harroun és mtsai. 1998) a peptidek a membránhoz kötődve, a lipidek befelé fordulását okozva, egy olyan csatornát alakítanak ki, melyet a lipidek fej csoportja és a membrán felszínéhez kötődő peptidek bélelnek ki, összekötve a membrán külső és belső felszínét. A peptidek többsége membránhoz kötődve marad, ellentétben a 'barrel-stave' modellel, ahol a peptidek csak kezdetben kötődnek a fej csoportokhoz. A kialakuló pórus a sejttartalom kiürülését eredményezi (Matsuzaki, Murase és mtsai. 1996) (9. ábra C.).

Az **aggregációs modell** szerint (ide tartozik a polyphemusin és az indolicidin) (Bechinger és Lohner 2006) a kationos peptideknek a membrán felszínéhez kötődve egy adott koncentrációt elérve megváltozik az orientációja, ezzel lehetővé téve micella-szerű komplexek kialakulását, mely a lipid kettős rétegbe bejutva egy peptid-lipid komplexet képez (Wu, Maier és mtsai. 1999) (9. ábra D.). A kationos antimikrobiális peptidek hatására, a membránon átívelő lipidből, a kationos peptidekből és vízből álló aggregátumok kialakításával egy, az ionok számára átjárható csatornát alkotnak, mely a sejttartalom kiáramlását segíti elő. Azonban a spontán dezorganizáció révén a kationos peptidek bejuthatnak a citoplazmába is, ahol adott célmolekulákon keresztül fejthetik ki ölü hatásukat (9. ábra) (Hancock és Patrzykat 2002).



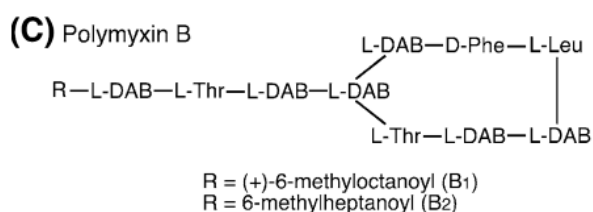
### 9. ábra Antimikrobiális peptidek Gram – baktériumokra gyakorolt hatásának mechanizmusa.

Ahhoz, hogy a kationos antimikrobiális peptidek kifejthessék hatásukat, át kell jutniuk a baktérium külső membránján, melynek első lépése az anionos lipopoliszaccharidokhoz való kötődés a kétértékű kation kötő helyen keresztül. A membrán permeabilizáció folyamatának lehetséges változatai: a 'carpet' (szőnyeg) modell (A), 'barrel-stave' (hordó-léc) modell (B), a 'toroidal-pore' (gyűrűs pórus) modell (C), és az aggregációs modell (D). A membránon kifejtett hatásuk következményeként a kationos antimikrobiális peptidek bejuthatnak a citoplazmába, ahol kötődhetnek, ill. akadályozhatják a DNS és RNS szintézist, fehérje szintézist, fehérje folding-ot és a sejtfal szintézist, vagy annak integritását megváltoztathatják (Hale és Hancock 2007).

A kationos peptidek azonban nem csak a membránok károsítása révén fejthetik ki antimikrobiális hatásukat. Számos olyan peptid létezik, melynek célpontja a sejten belül található, illetve a hatásukat a membránon átjutva fejtik ki, miközben a bejutásuk során a membránkárosítás csak, mint mellékhatás jelenik meg. Mindemellett ismert, hogy a kationos peptideknek akár több, sejten belüli célpontja is lehet (pl. indolicin) (Powers és Hancock 2003; Peschel és Sahl 2006). Ezek a kationos antimikrobiális peptidek töltésükből kifolyólag képesek kölcsönhatásba lépni számos anionos komponenssel, mint pl. a buforin II, mely a baktériumok DNS-

ével lép kölcsönhatásba (Park, Kim és mtsai. 1996), a cecropin, mely fehérje szintézis gátló (Agerberth, Lee és mtsai. 1991; Shi, Ross és mtsai. 1994), a pyrrolicorin, a drosocin és az apidaecin, melyek elsődleges célpontja a fehérje folding-ban szerepet játszó 70 kDa bakteriális chaperon, a DnaK (Otvos, O és mtsai. 2000), valamint a microcin25 (Salomon és Farias 1992) és az indolicidin (Subbalakshmi és Sitaram 1998), melyek a membrán-asszociált, a szeptum kialakításában szerepet játszó molekulákhoz kötődve képesek megállítani a sejtek osztódását (9. ábra).

Az ismertebb kationos antimikrobiális peptidek közé sorolhatóak a polymyxinek is. A polymyxinek bázikus penta vagy dekaeptid antibiotikumok közé tartoznak, melyek egy cikloheptapeptid gyűrűt tartalmaznak C9 vagy C10 zsírsavlánccal, és a *Bacillus polymyxa* termeli nem riboszómális úton (Storm, Rosenthal és mtsai. 1977). Antimikrobiális aktivitásuk célpontja a baktériumok membránja. Kationos polipeptidként a Gram - baktériumok külső membránját alkotó anionos lipopoliszaccharidokhoz kötődik, megbontva a membrán integritását, ezzel megnövelve a membrán permeabilitását (Schindler és Teuber 1975; Scholar és Pratt 2000). A polymyxinek által kiváltott ölü hatás a membrán permeabilitásának megemelésevel fejeződik ki (Zhang, Dhillon és mtsai. 2000).



10. ábraA Polymyxin B szerkezete(Mogi és Kita 2009).

A kationos ciklikus peptidek, mint a polymyxin B felhalmozódnak a baktériumok citoplazma membránjában és a perifériás vagy a membránba beépülő membrán



fehérjék hidrofób doménjének quinon-kötő helyét elérve fejtik ki hatásukat (Mogi és Kita 2009) (10. ábra).

A magasabb rendű szervezetekben megfigyelhető, hogy adott helyen többféle kationos antimikrobiális peptid termelése zajlik, mely a védekezés egy természetes módja (pl. az emberi bőr)(Chen, Niyonsaba és mtsai. 2005). Ezekben az esetekben feltételezhető, hogy a fokozottabb fertőzésveszély elhárítása érdekében a különböző kationos peptidek között szinergikus aktivitás alakul ki. A szinergia vizsgálatára és bizonyítására csak a standardizált technikák, mint pl. a checkerboard titrálás alkalmasak, más módon a peptidek közötti együttműködés nem, vagy csak nehezen mutatható ki (Yan és Hancock 2001). Más tanulmányok is bizonyították, hogy lehetséges a veleszületett védelem részeként a különböző kationos peptidek között megnyilvánuló szinergia, pl. a csirke gallinacins 7 és 9 között (Milona, Townes és mtsai. 2007). A hatékonyabb védelem szempontjából feltételezhető, hogy ezeknek a kationos antimikrobiális peptideknek eltérő a hatásmechanizmusa. A csoportunk által vizsgált NCR peptidek esetén is a peptidek nagy száma és sokfélesége arra enged következtetni, hogy az antimikrobiális hatással rendelkező kationos peptidek között szinergikus aktivitás áll fenn, annak érdekében, hogy a nitrogén fixáló szimbiotikus sejteket más mikroorganizmusok felül ne fertőzzék.

#### **1.4. Fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatása**

A széles körben elterjedt genom szekvenálások következményeként a prediktált gének száma megemelkedett, azonban ezek funkciójának meghatározásához sokféle, nagy hatékonyságú vizsgálat és azok kombinációja szükséges. A forward, vagyis előre mutató genetikai vizsgálatok, mint pl. a random transzpozon mutagenézis (Meade, Long és mtsai. 1982; Pobigaylo, Wetter és mtsai. 2006) és a gének, vagy genomi régiók célzott delécioja vagy tönkretétele (House, Mortimer és mtsai. 2004; Pickering, Yudistira és mtsai. 2012) segíthet a fontosabb biológiai folyamatokban

résztevő gének funkciójának meghatározásában. A teljes genom transzkriptom analízise, kiegészítve a microarray technológiával (Becker, Berges és mtsai. 2004), az RNS szekvenálással (Roux, Rodde és mtsai. 2014), a (célzott) transzkripció/transzlációs riporter gén fúziók használatával (Humann, Schroeder és mtsai. 2008), valamint a különböző fiziológiai kondíciók alatt végzett proteóm analízissel (Djordjevic 2004), lehetőséget biztosít olyan gének azonosítására, melyek a vizsgált feltételek mellett fontos biológiai funkciókkal rendelkeznek.

Azonban a vizsgált gének által kódolt fehérjék jelentős része nem önmagában, hanem komplexek formájában fejtik ki hatásukat, ezért a fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata fontos információt szolgáltat a fehérjék funkciójának megismerésében. A kölcsönhatások vizsgálatára számos biokémiai módszer alkalmas. Ide tartozik az élesztő két-hibrid rendszer, az immunprecipitáció és a pull-down analízis is.

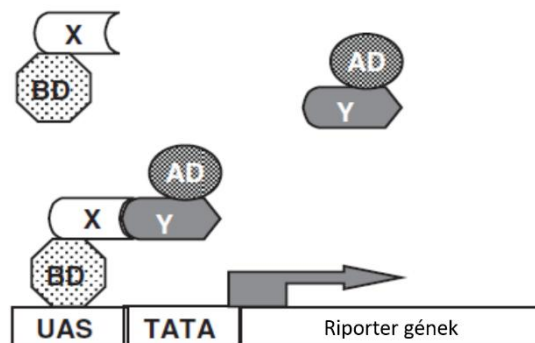
#### 1.4.1. Élesztő két-hibrid rendszer

A rendszer elnevezése azon alapszik, hogy a vizsgálat során kétféle hibrid, vagyis fúziós fehérjét használnak a kölcsönhatás kimutatására. Alapja, hogy a legtöbb eukarióta transzkripció faktor moduláris felépítésű, vagyis több doménből álló fehérjék. A transzkripció faktorok egyik doménje a megfelelő DNS szakaszokhoz (upstream szabályozó elemek, UAS) kötődik specifikusan (ezek a DNS-kötő domének) (11. ábra BD), míg a másik aktivátor doménnek nevezett része, a transzkripció szabályozásában szerepet játszó fehérjékként alakít ki kölcsönhatást (11. ábra AD), s ez a kölcsönhatás serkenti a gén transzkripcióját. Ha a két domént különálló fehérjékként termeltetjük, önmagukban nem tudnak fizikai kölcsönhatásba lépni, és nem tudják aktiválni a célgének expresszióját. Azonban ha más fehérjékhez fuzionáltatva termeltetjük őket (X-BD és Y-AD), és a fúziós partnerek kölcsönhatásba lépnek egymással, akkor a megfelelő térbeli közelség hatására a kiválasztott, riporter gén átírása megtörténik. A riporter gén kifejeződése alapján

választhatóak ki azok a klónok, melyekben a vizsgált fehérjék kölcsönhatásba lépnek egymással.

Az eredeti élesztő két-hibrid rendszerben a *S. cerevisiae* Gal4 transzkripciós faktor BD és AD alegységeit használták fel (Fields és Song 1989; Chien, Bartel és mtsai. 1991). A két-hibrid rendszerhez használt élesztő törzsek különböző aminosav és nukleotid bioszintézist érintő auxotrófiát okozó mutációt hordoznak, mint pl. a LEU2, TRP1, HIS3, URA3 és ADE2. A két-hibrid rendszerben alkalmazott plazmidok transzformációjával két mutáció komplementálódik, a fennmaradó auxotrófiák megszűnése pedig indikációja a vizsgált fehérjék között kialakuló kölcsönhatásnak.

Ebben a rendszerben a BD doménhez fuzionálják az ún. csali fehérjét (bait), míg az AD doménhez kötik az ún. préda (prey) fehérjét vagy fehérjéket. A kísérlet célja a csali fehérjék kölcsönható partnereinek azonosítása a préda fehérjék segítségével.



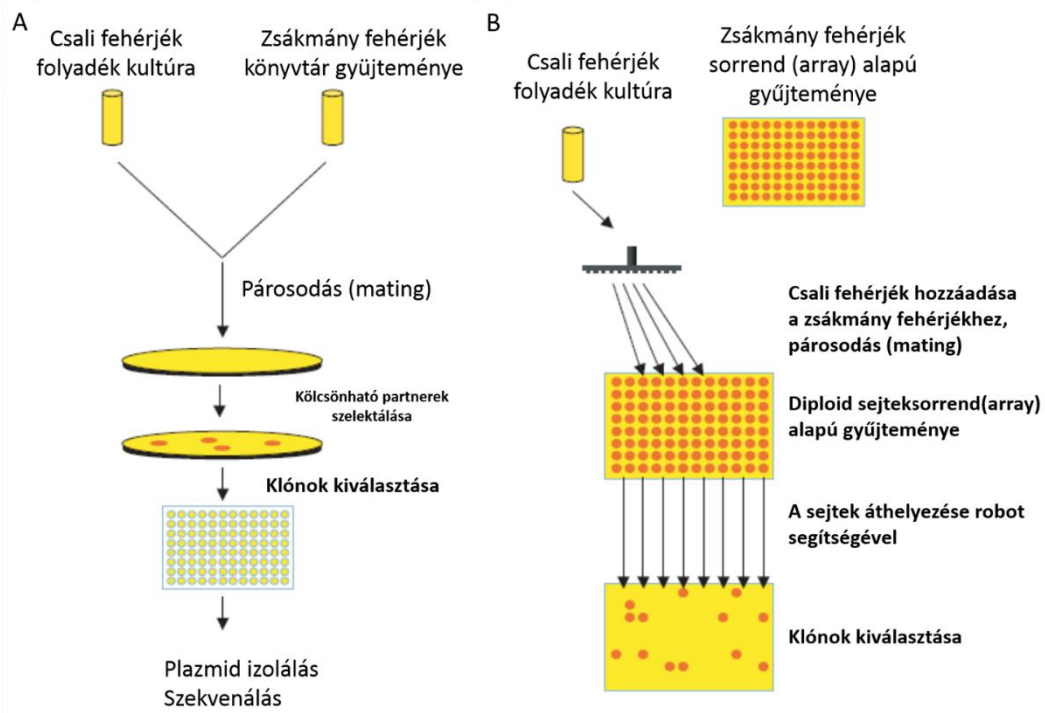
#### 11. ábra Az élesztő két-hibrid rendszer alapelve.

Az élesztő transzkripciós faktor DNS-kötő alegységét (DB) az X fehérjéhez fuzionálták, mely az upstream aktivációs szekvenciához (UAS) kötődik. A transzkripciós fehérje aktivációs alegységét (AD) pedig az Y fehérjéhez, mely az RNS polimeráz II odavonzásában segít. Amennyiben az X és Y fehérje kölcsönhatásba lép egymással, akkor a funkcióképes transzkripciós faktor helyreáll és a riporter gén expresszióját indukálja. TATA az élesztő minimál promoterét jelöli. (Guo, Rajamaki és mtsai. 2008).

Az élesztő két-hibrid rendszernek, gyakorlati alkalmazását tekintve, két típusát különböztethetjük meg: mátrix és a random cDNS könyvtár alapú megközelítés. A

mátrix esetében teljes hosszúságú open reading frame-ek (ORF) összes lehetséges kombinációjának szisztematikus vizsgálata történik a különböző mating típusú élesztő sejtek alkalmazásával. A kölcsönható partnerek meghatározása a hálózaton (mátrix) belül elfoglalt pozíciója alapján történik, nem szükséges a szekvenálás. Azonban a rendszer hátránya, hogy a vizsgálat a teljes hosszúságú ORF-ek egy csoportjára korlátozódik (a klasszikus élesztő két-hibrid rendszerekben a membrán fehérjék nem vizsgálhatóak), így előfordulhat, hogy nem minden kölcsönható partnert képes kimutatni, azaz fals negatív eredményeket kapnak (Stagljar 2005).

A klasszikus, random cDNS könyvtárak (préda) alkalmazása során a préda fehérjék nem egyesével hanem csoportosítva szerepelnek. A könyvtár azonban nem csak a lehetséges kölcsönható partnerek teljes kódoló szekvenciáját tartalmazza, hanem azok fragmentjeit is, mely bizonyos esetekben előnyös is lehet, ha a fehérje más doménjei amúgy megakadályoznák a kölcsönhatás kimutatását (Ito, Chiba és mtsai. 2001; Ito, Chiba és mtsai. 2001; Auerbach, Thaminy és mtsai. 2002). Azonban előfordulhat, hogy ezek a kis fragmentek nem specifikusan kötődnek a prey fehérjékhez és ezzel fals pozitív eredményt produkálnak. A kölcsönható partnerek meghatározásához ebben az esetben szükség van kolónia PCR-re, valamint a kapott fragmentek szekvenálására is. Könyvtárak alkalmazásával kiszűrhetők a fals negatív eredmények, azonban a fals pozitívak nem (Stagljar 2005)(12. ábra).



**12. ábra** Nagy áteresztőképességet eredményező technikák ötvözése az élesztő két-hibrid rendszerrel.

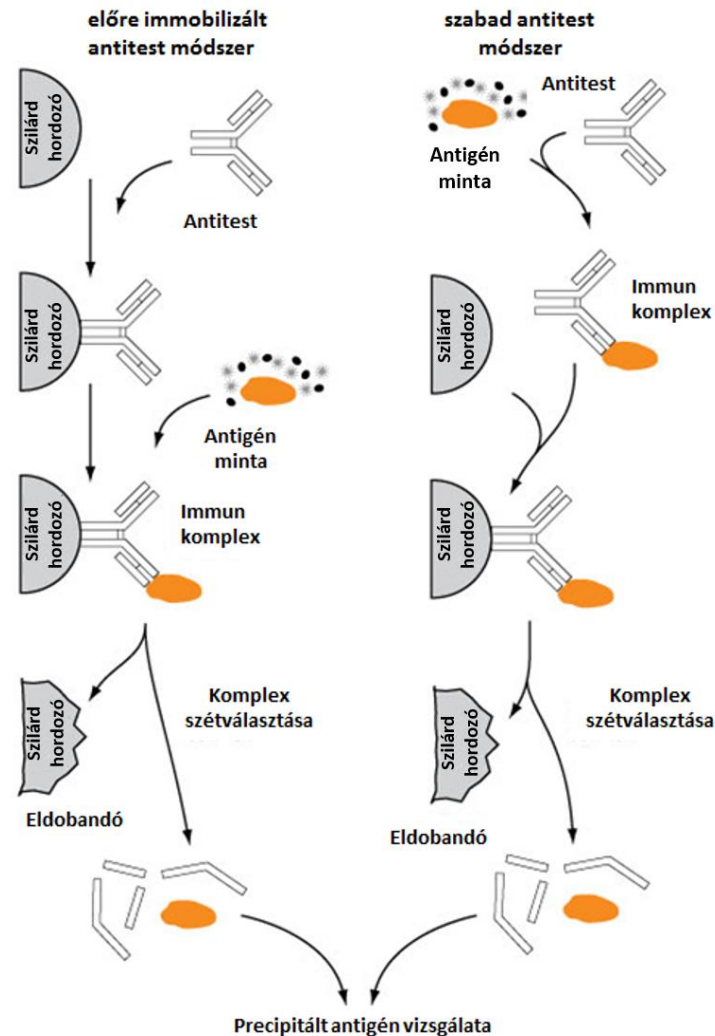
A) könyvtár alapú megközelítés, mely során a random prey fehérje a könyvtárból származik, azonosításához további kísérletek szükségesek. B) mátrix alapú megközelítés, melyben az adott prey fehérjék, adott pozícióban találhatóak, így a kölcsönhatás kimutatása során azonosításuk nem okoz problémát, további kísérleteket nem igényel (Stagljar 2005).

1.4.2. Az élesztő két-hibrid rendszer eredményeinek megerősítésére szolgáló technikák: immunprecipitáció, pull-down

Az élesztő két-hibrid rendszer segítségével azonosított kölcsönható partnerek ellenőrzésére, igazolására más biokémiai módszer/ek is szükséges/ek. Ezek közé tartozik a ko-immunprecipitáció és a pull-down technika is.

Az **immunprecipitáció** specifikus fehérjék, vagy fehérje komplexek sejtlizátumból történő tisztítására, koncentrálására alkalmas módszer, mely szilárd hordozóhoz kikötött specifikus antitestek segítségével valósul meg. A vizsgálat kétféleképpen is történhet: 1: az ellenanyagot első lépésként kikötik a szilárd hordozóhoz (affinitás

gyöngy), majd ezzel inkubálják együtt az antigént (keresett fehérjét) tartalmazó elegyet, mely a leggyakrabban sejtízátum (előre immobilizált antitest módszer), 2: az ellenanyag és a sejtízátum együttes inkubálása után adják a rendszerhez az affinitás gyöngyöket, mely megköti az antitest-antigén komplexet (szabad antitest módszer) (13. ábra).

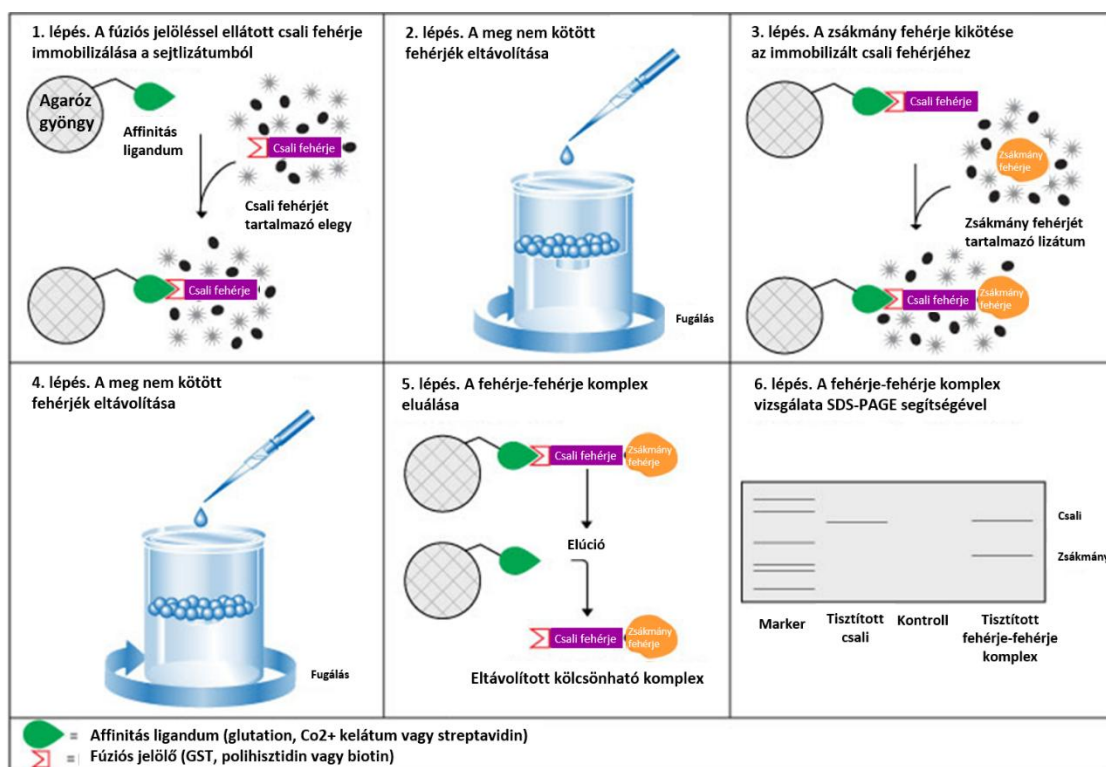


**13. ábra** Immunprecipitáció folyamata immobilizált és szabad antitestek alkalmazásával. (Thermo Fisher Scientific Inc.)

A **ko-immunprecipitáció** alapjaiban megegyezik az immunprecipitációval, azonban a rendszer az antigénhez kötődő bármilyen fehérje/fehérje komplexek azonosítására alkalmazható. Ebben az esetben az antigént (ismert fehérjét) bait (csali)

fehérjének, míg a kölcsönható partnereket prey (zsákmány) fehérjéknek is nevezhetik.

A **pull-down technika**, koncepció tekintetében hasonlít a ko-immunprecipitációra, vagyis ismert bait fehérje lehetséges kölcsönható partnereinek azonosítására alkalmas, azonban ez a rendszer nem ellenanyag-affinitás alapú. A bait fehérje szilárd hordozóhoz kötése kovalens kötéssel, vagy affinitás „cimkén” keresztül történik, mely a szilárd hordozó felületén található receptorhoz kötődik. A legismertebb és leggyakrabban használt fúziós „cimke” a His-tag (hexa-hisztidin „cimke”=His-tag), mely képes kétértékű kationokhoz kötődni. Ha  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  és  $\text{Cu}^{2+}$  ionok kelátoló ágens segítségével, valamely szilárd felülethez vannak kötve, tökéletes rendszerként szolgálnak His-tag-gel jelölt fehérjék megkötésére (14. ábra).



14. ábra A pull-down technika általános sematikus ábrázolása. (Thermo Fisher Scientific Inc.)

A hisztidin fúziós rendszer mellett gyakran alkalmazzák még a fehérjék közötti kölcsönhatás kimutatására a glutation/GST, valamint az avidin/biotin rendszert. A glutation/GST rendszerben egy 26 kDa nagyságú enzimet (GST: glutation- S-transzferáz) fuzionáltatnak a bait fehérjéhez, mely a szilárd hordozóhoz kötött glutationhoz (3 aminosavból álló peptid, ami az enzim szubsztrátja) képes erősen kötődni. Az avidin/biotin rendszerben a fehérjéket kémiai reakciókon keresztül biotinilálják, mely módosítás hatására a módosított fehérjék képesek a tetramer szerkezetű glikoproteinhez, az avidinhoz kötődni (14. ábra).

A prey fehérjék azonosítása többféleképpen történhet: tömegspektroszkópia, western analízis, stb.



## 2. Célkitűzés

Csoportunk korábban kimutatta, hogy a *M. truncatula* gyökérgümőiben termelődő gümő-specifikus ciszteinben gazdag (NCR) peptidek fontos szerepet töltenek be a szimbiotikus partner fejlődésében és többféle mechanizmussal járulnak hozzá a bakteroidok differenciálódásához. Emellett a kationos NCR peptidek széles spektrumú antimikrobiális anyagoknak is tekinthetők, mert élő hatással rendelkeznek nemcsak a szimbiotikus partnerrel, hanem számos Gram - és Gram + baktériummal, valamint élesztőszerűen növő és fonalas gombákkal szemben is.

Munkám során célul tűztük ki, az antimikrobiális hatással rendelkező, kationos peptidek hatásmechanizmusának vizsgálatát, illetve olyan technika kialakítását, mely megkönnyíti a növényi peptidek bakteriális kölcsönható partnereinek azonosítását.

A megvalósítás során a következő feladatokat terveztük végrehajtani:

1. Az NCR peptidek külső és belső membránra és membránpotenciálra gyakorolt hatásának meghatározása.
2. Az NCR peptidek baktériumokra kifejtett hatásának mikroszkópos vizsgálata.
3. A fehérje-fehérje kölcsönhatások tanulmányozására alkalmas, a *S. meliloti* 1021 törzs összes prediktált génjét tartalmazó (ORFeome) élesztő kettős-hibrid könyvtár létrehozása.
4. Az új *S. meliloti* ORFeome könyvtár használatának optimalizálása.
5. Az NCR247 peptid kölcsönható partnereinek azonosítása az új könyvtár alkalmazásával.
6. A kapott eredmények megerősítése más biokémiai technikák alkalmazásával

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Kationos peptidek hatásmechanizmusának vizsgálatához kapcsolódó anyagok és módszerek

##### 3.1.1. Kolóniát képző egységek (CFU: colony forming unit) számának meghatározása

A *Sinorhizobium meliloti* AK631 törzset TA táptalajban (Trypton 10gr/l, Yeast extract 1gr/l, NaCl 5gr/l, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>) éjszakán keresztül növesztettük. A logaritmusos növekedési fázisban lévő baktériumokat 10 ml TA táptalajban visszahígítottuk OD<sub>600</sub>=0,05 értékig. Majd tovább növesztettük 30 °C-on 250 rpm-mel rázatva. Amint a baktériumok elérték a megközelítőleg 10<sup>7</sup> (OD<sub>600</sub>=0,1) sejtszámot, ezeket centrifugálással (1 perc, 13000 rpm) összegyűjtöttük, majd kétszer mostuk 10 mM kálium-foszfát (pH=7) pufferrel, majd ugyanebben a pufferben szuszpendáltuk a baktériumokat. Megközelítőleg 10<sup>7</sup> (OD<sub>600</sub>=0,1) sejtet 30 percig inkubáltuk 50 µg/ml koncentrációjú NCR peptiddel, vagy ugyanilyen koncentrációjú Polymyxin B-vel 30°C-on. A kezelt sejteket négy lépcsős tízes hígítási sorban kentük ki TA lemezekre. A kapott telepszámok alapján határoztuk meg a sejtek túlélési képességét.

##### 3.1.2. Külső membrán permeabilitásának vizsgálata

A vizes oldatban fluoreszcenciát nem mutató 1-N-phenylnaphthylamine (NPN) festék a membrán károsodás hatására, a membrán hidrofób magjába bejutva, megemelkedett fluoreszcencia szintet mutat, melynek mérésével meghatározható a membrán permeabilitás mértéke, melyet mikrotiter lemez leolvasó készülék (FLUOstar OPTIMA; BMG Labtech) segítségével 355 nm-es excitáció és 405 nm-es emisszió mellett detektáltunk (Brito és Vaz 1986). A méréshez a baktériumokat hasonló módon növesztettük, mint a CFU meghatározása esetén, de a baktériumokat 5 mM HEPES pufferben (pH=7,2) szuszpendáltuk. A mérések során 96-lyukú FIA

típusú fekete lemezek lyukaiba 30  $\mu$ l 5 mM-os HEPES puffert (pH=7,2) és 50  $\mu$ l 40  $\mu$ M koncentrációjú, HEPES pufferben (pH=7,2) hígított NPN-t pipettáztunk, majd közvetlenül a mérés előtt adtuk 100  $\mu$ l baktérium szuszpenziót. Három mérési ciklust követően (minden ciklus 9 másodperc) adtuk az elegyhez a HEPES pufferben (pH=7,2) hígított peptideket 20  $\mu$ l térfogatban. A fluoreszcencia értékeket további 18 cikluson keresztül mértük. Kontrollként (i) csak HEPES-t és NPN-t, (ii) HEPES-t, NPN-t és peptidet, valamint (iii) HEPES-t, NPN-t és baktériumokat tartalmazó elegyeket alkalmaztunk. Minden mérést legalább háromszor ismételtünk meg. Az eredményeket relatív fluoreszcencia értékben adtuk meg. Ehhez a (ii-es) kontroll fluoreszcencia értékeit kivontuk a peptideket és baktériumokat is tartalmazó minták fluoreszcencia értékeiből. A mérések során abszolút pozitív kontrollként EDTA-t használtuk. A peptideket az alábbi koncentrációkban alkalmaztuk: (1) 50  $\mu$ g/ml, (2) 25  $\mu$ g/ml, (3) 12,5  $\mu$ g/ml és (4) 6,25  $\mu$ g/ml).

### *3.1.3. Atomerő mikroszkópos vizsgálatok (AFM):*

Az atomerő mikroszkópos kísérleteket Asylum Research MFP-3D típusú fejjel és Molecular Force Probe kontrollal (Santa Barbara, CA, USA) végeztük. Vezérlő programként (MFP-3D Xop) IGOR Pro szoftvert (6.22A verzió, Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) használtunk.

A mérésekhez arannyal bevont, szilícium-nitridből készült Biolever A (BL-RC150 VB-C1, Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan) típusú rugólapkát és tűt használtunk. A rugólapkák nominális rugóállandója 30 pN/nm, saját rezgési frekvenciája 37 kHz levegőben és görbületi sugara 30 nm. A rugólapkákat minden mérés előtt termális módszer alapján kalibráltuk (Hutter és Bechhoefer 1993; Butt és Jaschke 1995; Florin, Rief és mtsai. 1995).

A méréseket folyadékban végeztük AC (tapping) módban, a rugólapkát saját rezonancia frekvenciáján rezgetve. A képek 512x512 képpontos felbontással készültek. A pásztázás során a rugólapka mindkét irányba történő mozgását külön regisztráltuk, majd a kapott képeket összehasonlítva szűrtük ki az esetleges

műhibákat és beállítási problémákat. Minta előkészítés: A baktériumokat ugyanúgy készítettük elő, ahogy a túlélési tesztek során. Megközelítőleg  $10^7$  sejtet inkubáltunk  $30^\circ\text{C}$ -on 1 órán keresztül  $25\ \mu\text{g/ml}$  koncentrációjú NCR peptiddel. Az atomerő mikroszkópos mérésekhez a baktériumokat frissen hasított  $1\ \text{cm} \times 1\ \text{cm}$  területű muszkovit csillám (SPI-Chem™ Mica Sheets, Structure Probe, Inc., West Chester, PA, USA) felületére rögzítettük. A negatívan töltött csillám felszínét poli-L-lizinnel (PLL) kezelve olyan felület állítható elő, mely kedvező a Gram-negatív baktériumok – mint pl. a *S. meliloti* – adszorpciójához. A kísérletek során mindvégig kálium-foszfát puffert használtunk ( $10\ \text{mM}$ ,  $\text{pH}=7,0$ ).

#### *3.1.4. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok (SEM):*

A baktériumokat ugyanúgy készítettük elő, ahogy a túlélési tesztek során. Megközelítőleg  $10^7$  sejtet inkubáltunk  $30^\circ\text{C}$ -on 30 percen keresztül  $25\ \mu\text{g/ml}$  koncentrációjú NCR peptiddel (NCR247 és NCR335) valamint kontrollként a hasonló koncentrációjú Polymyxin B-vel. Negatív kontrollként a kálium-foszfát pufferben szuszpendált kezeletlen baktériumokat használtuk. A minták végtérfogata  $100\ \mu\text{l}$  volt. A mintákat  $2,5\%$  (w/v) - os  $0,1\ \text{M}$  kakodilát pufferben feloldott glutáraldehiddel fixáltuk, majd kálium-foszfát pufferrel alaposan mostuk, és fokozatosan emelkedő koncentrációjú ( $50\%-70\%-80\%-90\%-95\%-98\%-100\%$ ) etanollal dehidratáltuk. A sor végén az abszolút etanolt t-butil-alkoholra cseréltük. A mintákat egy éjszakán át  $4\ ^\circ\text{C}$ -on tároltuk. A mintákat fagyasztva szárítottuk, majd arannyal bevontuk. Az előkészített mintákat HITACHI S-4700 pásztázó elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

#### *3.1.5. Belső membrán áteresztőképességének vizsgálata*

##### *Propidium – jodid membrán permeabilizációs teszt:*

A baktériumokat ugyanúgy készítettük elő, ahogy a túlélési tesztek során. A mérések során  $96$ -lyukú FIA fekete lemezek lyukaiba megközelítőleg  $80\ \mu\text{l}$

( $OD_{600}=0,1$ ) *S. meliloti* sejtet, 50  $\mu\text{g/ml}$  végkoncentrációjú NCR peptidet, vagy Polymyxin B-t, valamint 5  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációjú PI-ot adtunk, úgy hogy a reakció elegy végtérfogata 100  $\mu\text{l}$  legyen. Pozitív kontrollként hővel kezelt (10 perc forralás) baktériumokat használtunk, míg negatív kontrollként a kezeletlen baktérium sejtek szolgáltak. A kezelés hatására bekövetkező fluoreszcencia intenzitásváltozásokat 530 nm excitációs és 600 nm emissziós hullámhossznál folyamatosan mértük mikrotiter lemez leolvasó készülék segítségével (FLUOstar OPTIMA; BMG Labtech.).

*$\beta$ -galaktozidáz enzim aktivitás teszt:*

Az NCR peptidek belső membrán permeabilizáló hatásának mértékét a  $\beta$ -galaktozidáz enzimet, a *hemA* gén promóteréről konstitutívan expresszáló *S. meliloti* AK631 (pXLGD4) törzs (Leong, Williams és mtsai. 1985) alkalmazásával határoztuk meg. Az enzim aktivitása a szintelen, mesterséges kromogén szubsztrát, az orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid (ONPG), sárga színű ( $\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$ ) orto-nitrofenol-lá (ONP) történő átalakulása révén detektálható (Miller 1972). Ezt a mesterséges szubsztrátot a baktérium sejtek nem veszik fel, s az intakt membránokon nem jut át, így enzimaktivitás csak a membrán folytonosságának megszűnése esetén mérhető.

A kísérlet során a *S. meliloti* AK631 (pXLGD4) sejteket a túlélési teszthez hasonló módon készítettük elő. Ezt követően megközelítően  $10^7$  db sejtet vettünk fel Z pufferben (0,06 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,04 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,01 M KCl, 0,001 M  $\text{MgSO}_4$  és 0,05 M  $\beta$ -merkaptó-etanol). Ezeket a sejteket 30 percig szobahőmérsékleten, 50  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációjú peptidekkel ill. Polymyxin B-vel kezeltük, valamint abszolút pozitív kontrollként a sejteket 20  $\mu\text{l}$  kloroformmal és 10  $\mu\text{l}$  0,1 % SDS-sel kezeltük. Negatív kontrollnak a Z pufferben felvett kezeletlen sejteket tekintettük. Az inkubálást követően a sejtekhez 150  $\mu\text{l}$ , 4mg/ml koncentrációjú ONPG-t adtunk. A sárga szín megjelenésekor a reakciót 400  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  hozzáadásával állítottuk le. A mintákat 5 percig 13000 rpm-mel centrifugáltuk. A felülúszó 420 nm-en kapott abszorbancia adatait ( $A_{420}$ ), a kezelés

időtartamát ( $t$ ), a kezelt minták térfogatát ( $V$ ) és a kezelt sejtek mennyiségét ( $OD_{600}$ ) figyelembe véve határoztuk meg a  $\beta$ -galaktozidáz enzim aktivitását (Miller Unit).

$$\text{Miller unit:} \quad (A_{420}/t * V * OD_{600}) * 1000$$

### 3.1.6. Membránpotenciál meghatározása

A szimbiotikus peptidek membránpotenciálra gyakorolt hatását a Life Technologies<sup>TM</sup> BacLight<sup>TM</sup> Bacterial Membrane Potential Kit segítségével határoztuk meg. A kit-ben található DiOC<sub>2</sub>(3) (3,3'-Dietiloxakarbocianin-jodid) fluoreszcens, membránpotenciál indikátor festék minden bakteriális sejtbe alacsony koncentrációban képes bejutni, mely zöld fluoreszcencia jelet eredményez. Azonban az egészséges sejtekben, ahol a membránpotenciál tartósan fennáll, ez a jel a vörös felé tolódik el a sejten belül felhalmozódó festék molekulák közötti kölcsönhatás kialakulása révén (Novo, Perlmutter és mtsai. 1999; Novo, Perlmutter és mtsai. 2000). A zöld, ill. vörös fluoreszcens jelet kibocsátó baktériumok flow citométer segítségével könnyen elkülöníthetőek. A kit-ben található a kontrollként használható CCCP (karbonil cianid m-klorofenil hidrazon) proton ionofór, mely a baktérium sejtek membránpotenciálját teljes mértékben megszünteti.

Mivel a relatív zöld, ill. vörös fluoreszcencia intenzitás nagymértékben változhat a sejtek méretének függvényében, ill. a lehetséges sejt-aggregáció következményeként, így a vörös/zöld fluoreszcencia értékek hányadosának használatával kiküszöbölhetőek a sejtek méretbeli eltéréseiből fakadó fluoreszcencia intenzitásbeli eltérések.

A sejteket ebben az esetben is a túlélési teszthez hasonló módon készítettük elő. A megközelítően  $10^7$  db sejtet vettünk fel a kitben található PBS pufferben (Gibco), majd 30 percen át inkubáltuk sötétben az 50  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációjú peptidekkel, ill. Polymyxin B-vel. Kontrollként egyrészt a kezeletlen sejteket, másrészt az 5  $\mu\text{M}$  végkoncentrációjú CCCP-vel kezelt sejteket használtuk. Az elegyekben a DiOC<sub>2</sub>(3)-t

30  $\mu\text{M}$  végkoncentrációval alkalmaztuk. A kísérletet 3 független biológiai párhuzamossal végeztük el.

## 3.2. Molekuláris biológiai anyagok és módszerek

### 3.2.1. Kompetens sejtek készítése, transzformáció

#### 3.2.1.1. *Escherichia coli* kompetens sejt készítése és transzformálása:

Munkánk során az *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (F<sup>-</sup>  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>) *phoA supE44*  $\lambda$ -*thi-1 gyrA96 relA1*) törzsét használtuk, melyet 37°C-on növesztettünk Luria- Bertani (LB) tápoldatban vagy LB agar lemezen (Sambrook, Fritsch és mtsai. 1989) a megfelelő antibiotikumok alkalmazásával. A kémiai kompetens sejtek előállítására a Maniatis - féle rutin eljárást alkalmaztuk (Sambrook, Fritsch és mtsai. 1989). A kémiai kompetens sejtek hatékonyságának min. 10<sup>6</sup> CFU/ $\mu\text{g}$  DNS vagy annál magasabb értéknek kellett lennie.

*E. coli* kompetens sejt transzformálása az alábbi protokoll alapján történt: A 100  $\mu\text{l}$  kompetens sejtet jégen felolvasztottuk, majd 3-5  $\mu\text{l}$  ligátummal 30 percen át jégen inkubáltuk. A 42 °C-on másfél percig tartó hősokkot követően a sejteket 5 percig 0 °C-ra tettük. Ezt követően 1 ml LB tápoldatot adtunk a sejtekhez, majd 1 órán át 37 °C-on rázattuk. Ebből a kultúrából 100  $\mu\text{l}$ -t a megfelelő antibiotikumot tartalmazó, szelektív LB agar lemezre szélesztettük és 37 °C-on egész éjjel át növesztettük.

#### 3.2.1.2. *Saccharomyces cerevisiae* AH109 kompetens sejt készítése és transzformálása:

##### 3.2.1.2.a Élesztő két-hibrid rendszer során alkalmazott táptalajok:

YPDA: komplett táptalaj (Yeast Protocols Handbook (BD Biosciences Clontech)).

SD-LT: Leucin és triptofán mentes minimál táptalaj élesztőknek (Clontech).

SD-HLT: Hisztidin, leucin és triptofán mentes minimál táptalaj élesztőknek (Clontech).

SD-AHLT: Adenin, hisztidin, leucin és triptofán mentes minimál táptalaj élesztőknek(Clontech).

### 3.2.1.2.b Élesztő két-hibrid rendszer során alkalmazott élesztő törzs, és kompetens sejt készítés:

A klasszikus élesztő-két hibrid rendszerhez a *Saccharomyces cerevisiae* AH109 törzset (*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *LYS2* : : *GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3*, *GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2*, *URA3* : : *MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ*) (Clontech Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System) használtuk. A kompetens sejtek elkészítése az alábbi protokoll alapján történt: 20 ml starter kultúrát inkubáltunk egy éjjelen át 30 °C-on YPDA tápoldatban, melyet másnap reggel OD<sub>546</sub>= 0,17-0,20-ra hígítottuk vissza 20 ml YPDA tápoldatban, melyet tovább rázattunk 30 °C-on 200-250 rpm-mel (20 ml kultúra elegendő 10 transzformációhoz). Az élesztő sejteket OD<sub>546</sub>= 0,6-0,8 növesztettük, melyet 50 ml-es Falcon csövekben 700x g (3000rpm)-vel 5 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük, a csapadékot 1 ml hideg, steril vízben szuszpendáltuk fel.

### 3.2.1.2.c Élesztő sejtek transzformálása:

A transzformációs puffer a következő komponenseket tartalmazta: 240μl 50% PEG 3350, 36μl 1M litium-acetát és 5-6 μl hővel denaturált ssDNS (10mg/ml, Deoxyribonucleic acid, single stranded from salmon testes, Sigma Aldrich). Mind a csali, mind a préda DNS-ből 600-600 ng-nyi mennyiséget alkalmaztunk. A transzformációs puffert, a plazmid DNS-eket és 100 μl vízben felsuszpendált és jégen tartott élesztő sejteket alaposan összekevertük (vortex) és 30 percen át 30 °C-on inkubáltuk. Ezt követően az elegyet 35 percre 42 °C-os vízfürdőbe tettük. Ezt követően 5 percig centrifugáltuk a mintákat 3000 rpm-mel szobahőmérsékleten, a



felülúszót leöntöttük, végül a sejtekre 100 µl 0,9 %-os (w/v) NaCl-ot mértünk. A felszuszpendált sejteket a megfelelő szelekciós SD lemezekre szélesztettük és 2-3 napig 30 °C-on inkubáltuk.

### 3.2.2. Genomi és plazmid DNS tisztítás

#### 3.2.2.1. Genomi DNS tisztítás *Sinorhizobium meliloti*-ből:

Egész éjjel át növesztett, 2 ml kultúrából a sejteket centrifugálással (1 perc 13000 rpm) összegyűjtöttük, majd szuszpendáltuk 560 µl TE (50mM TRIS, 20 mM EDTA pH=8) oldatban. A baktériumokhoz 30 µl 10 % SDS-t és 10 µl Proteináz K oldatot (20 mg/ml) adtunk, majd 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a sejtek 150 µl 5M NaCl-dal, majd 80 µl, 65 °C-ra felmelegített, 700 mM NaCl-ot és 10 % CTAB-t (Cetiltrimetilammonium bromid)tartalmazó oldattal kevertük össze, és 65 °C-on inkubáltuk 1 órán át. A mintákhoz 400 µl kloroform/izoamil-alkohol (24:1) keveréket adtunk, majd 5 percig centrifugáltuk (13000 rpm) őket. A felülúszót új csövekbe mértük és az előző lépést megismételtük, és a felülúszót olyan új csövekbe tettük, melyekben már 1 ml izopropanolt tettünk és finoman összekevertük a mintákat. A keveréket további 5 percig centrifugáltuk (13000 rpm), a csapadékot 70 %-os etanollal mostuk. Újabb centrifugálás után a mintákat beszárítottuk, és DNS-t 100 µl, 20 µg/ml RNázt tartalmazó TE (10 mM TRIS, 1mM EDTA pH=8,0) pufferben oldottuk.

#### 3.2.2.2. Plazmid DNS tisztítás *E. coli* sejtekből:

A plazmid DNS tisztítás a BIO BASIC INC EZ-10 Spin Column Plasmid DNA MiniPreps Kit segítségével történt. A 37 °C-on éjszakán át növesztett baktérium kultúra centrifugálásával összegyűjtött sejteket a Kit-ben található protokoll alapján kezeltük.

### 3.2.2.3. Plazmid tisztítás *Saccharomyces cerevisiae* sejtekből:

A plazmid DNS tisztításhoz a BIO BASIC INC EZ-10 Spin Column Plasmid DNA MiniPreps Kit segítségével történt. A gyári protokollt részben módosítottuk: Az élesztő sejteket 100 µl SolII oldatban szuszpendáltuk fel, majd 2 percen át üvegyöngyökkel együtt vortexeltük a sejteket. Ezt követően a Kit-ben található protokoll lépéseit követtük. Az így tisztított plazmid DNS mennyisége elegendő további PCR reakciókhoz.

Azokban az esetekben, amikor az előző módszerrel nem sikerült elegendő DNS-t tisztítanunk, az alábbi DNS tisztítási protokollokat alkalmaztuk:

a) Az élesztő sejteket 100 µl SolI-ben szuszpendáltuk fel és 100 µl szorbitolos litikáz (1,2 M szorbitol, 0,1 M Na-PO<sub>4</sub> pH=7,4, 5 mg/ml litikáz) oldatot adtunk. 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk a mintákat. Ezt követően 200 µl SolII-t és 350 µl SolIII-t adtunk a mintákhoz, majd a továbbiakban a BIO BASIC INC EZ-10 Spin Column Kit protokollját alkalmaztuk.

b) Az élesztő sejteket 2,5 M LiCl, 50 mM Tris-HCl pH=8,0, 0,4% Triton X-100, 62,5 mM EDTA tartalmazó oldatban szuszpendáltuk fel. 1 térfogat fenol-kloroform 1:1 arányú elegyét és 0,2 g üvegyöngyöt adtunk a sejtekhez. A keveréket 2 percig vortexeltük majd 3000 rpm-mel 2 percig centrifugáltuk. A vizes fázist olyan új csövekbe mértük, melyek 400 µl Binding Buffer II (EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit) tartalmaztak, és a továbbiakban a BIO BASIC INC EZ-10 Spin Column protokollját követtük.

c) A leghatékonyabbnak az alábbi protokoll bizonyult: az élesztő sejteket 50 µl TE (10 mM TRIS, 1mM EDTA pH=8,0) és 10 µl TE-ben oldott litikáz (800 U/ml) elegyében szuszpendáltuk fel. A keveréket 1 órán át inkubáltuk 37 °C-on, majd 10 µl 20% SDS-t adtunk hozzá. A keveréket 1 percen át vortexeltük, majd lefagyasztottuk és szobahőmérsékleten újra felolvasztottuk, majd újra 1 percen át vortexeltük. Ezek után a 30 µl SolI, 200 µl SolII majd 350 µl SolIII használatával a rutin DNS tisztítási protokollt folytattuk.

### 3.2.3. PCR technikák

*A kontroll fehérjéket kódoló gének amplifikálása Pfu DNS polimeráz (Thermo Scientific) segítségével.*

1 ciklus 95 °C, 5 percig a genomi DNS denaturációjához, 35 ciklus: 95 °C-on 30 másodpercig, 55°C-on 30 másodpercig, és 72°C-on 2 percig, majd 1 ciklus 72°C-on 6 percig, hogy minden PCR termék elkészüljön. A reakció 50 µl-es végtérfogatban történt. A reakcióelegy összetétele: 5 µl 10x koncentrációjú Pfu PCR puffer, 4 µl 25 mM MgSO<sub>4</sub>, 4 µl 2,5 mM dNTPmix, 2-2 µl 10 mM primer, 1 µl Pfu DNS polimeráz (Termo Scientific), 1 µl templát DNS.

*Kolónia PCR DreamTaq polimerázzal (Thermo Scinetific)*

1 ciklus 95 °C, 5 percig a DNS denaturálásához, 35 ciklus: 95 °C-on 30 másodpercig, 55°C-on 30 másodpercig, és 72°C-on 3 percig, majd 1 ciklus 72°C-on 6 percig, hogy minden PCR termék elkészüljön. A reakció 50 µl-es végtérfogatban történt. A reakcióelegy összetétele: 5 µl 10x koncentrációjú DreamTaq PCR puffer, 4 µl 2,5 mM dNTPmix, 2-2 µl 10 mM primer, 1 µl DreamTaq DNS polimeráz (Termo Scientific).Élesztő kolónia PCR eseténtovábbi 5 µl litikázzal kezelt (20 µl élesztő szuszpenzió és 50 µl litikáz (50U/ml) 30 percig 37 °C-on inkubálva) élesztő sejtet, baktériumok esetén pedig egy kis kacsnyi sejtmennyiséget adtunk a reakció elegyhez, mint templát.

## **3.3. A kationos NCR peptidek kölcsönható partnereinek meghatározásához kapcsolódó anyagok és módszerek**

### *3.3.1. Az ORFeome alapú S. meliloti élesztő két-hibrid könyvtár létrehozása*

A Gateway kompatibilis „préda” vektor kialakításához a pGADT7 AD vektort (Clontech) az EcoRI restrikciós enzimmel linearizáltuk, majd a túlnyúló végeket a DNS polimeráz I Klenow fragment segítségével feltöltöttük. Ezt követően a Gateway

Vector Conversion System (Life Technologies) RfB kazettáját inszertáltuk a felnyitott vektorba. A létrehozott vektort a továbbiakban pGADT7GW-AD vektorként említjük.

A *S. meliloti* ORFeome könyvtár (Schroeder, House és mtsai. 2005) pGADT7GW-AD vektorba rekombináltatásához a Gateway LR reakciójának egy költséghatékonyabb változatát alkalmaztuk.

Az eredeti LR reakcióhoz (Life Technologies) képest a reakció térfogatát 10 µl-re csökkentettük. A pGADT7GW-AD koncentrációja (300 ng/reakció) és az ORFeome könyvtár csoportjait tartalmazó entry klónok koncentrációja (100-300 ng/reakció) változatlan maradt, míg az LR Clonase™ enzim mix térfogatát a felére (2 µl) csökkentettük, valamint a reakció puffert (TE puffer, pH8,0) Milli-Q vízre (Millipore Corporation) cseréltük. A megfelelő hatékonyság elérése érdekében a szobahőmérsékleten történő inkubálás hosszát egész éjszakára meghosszabbítottuk. Másnap a felhasználandó 20 mg/ml koncentrációjú Proteináz K oldat reakciónkénti térfogatát a felére (1 µl) csökkentettük az eredeti protokollhoz képest. Az elegyet 37 °C-on 10 percig inkubáltuk. Ezután 25 µl kémiai kompetens DH5α sejtet (Life Technologies) adtunk a reakcióhoz. A keveréket 30 percen át jégen tartottuk, majd 42 °C-on hősokkoltuk a sejteket 90 másodpercen át, rázatas nélkül. Ezután a csöveket rögtön 0 °C-ra tettük. A sejtekhez 125 µl szobahőmérsékletű S.O.C. tápoldatot adtunk, majd 1 órán át 37 °C-on rázattuk (200 rpm) őket. A reakciót további 175 µl LB tápoldattal egészítettük ki, így a végtérfogat 300 µl lett, amit három előmelegített, 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB lemezre szélesztettünk. A lemezeket egy éjjel át 37 °C-on inkubáltuk. A lemezeken kinőtt összes telepet összegyűjtöttük a plazmid tisztításhoz.

### 3.3.2. Kontroll konstrukciók létrehozása

Az *S. meliloti* 1021 genomi DNS-éről amplifikáltuk a *Hfq*, *FixA* és *FixB* géneket, melyekhez a következő primereket használtuk:

Kontroll konstrukciók:

SmFixAfw	AAGAATTCGGATCCCACCTTGTAGTCTGTATCAA
SmFixArev	AAGTCGACTAGTCACGATTCTCGATCGACA
SmFixBfw	AAGAATTCGGATCCAAGAAGGGGCTACCCAAGCA
SmFixBrev	AACTCGAGACTAGTCACTGCACAACTTCTCAAG
HfQfw	GGGAATTCGGATCCGCGGAACGTTCTCAAACTTG
HfQrev	TTGTTCGACTAGTCAGGAGGCAGCTTCCTCATTC

A *S. meliloti* 16-3 fág C represszor fehérjéjének dimerizációs doménjének (16-3cIts) amplifikálásához az alábbi primereket terveztük:

16.3cIfw	CAATTGGATCCGGAGAAGGTGACG TC
16.3cIrev	CTCGCCGGAAAATATTGGTAGCCC

Az amplifikált géneket a pGADT7-AD és pBD-GAL4Cam vektorokba klónoztuk az alábbi restrikciós enzimreakciók segítségével:

A Hfq és a FixA PCR termékeket EcoRI és Sall restrikciós enzimekkel emésztettük és ezután az EcoRI és XhoI enzimekkel emésztett pGADT7-AD vektorba (*Hfq*, *FixA*) és a hasonlóan emésztett pBD-GAL4Cam vektorba (*Hfq*) klónoztuk. Az EcoRI-XhoI enzimekkel emésztett FixB fragmentet az EcoRI-Sall enzimekkel emésztett pBDGAL4Cam vektorba klónoztuk.

A tompa végekkel rendelkező 16-3cIts represszor fehérje fragmentet a SmaI enzimmal emésztett pK19 vektorba klónoztuk. Innen a megfelelő orientációjú klónból SmaI-MunI enzimek segítségével a SmaI-EcoRI enzimekkel hasított pBD-GAL4Cam és pGADT7-AD vektorokba klónoztuk.

A pGADT7-AD vektorral együtt a pGBKT7 DNA-BD vektor alkalmazása az ajánlott, azonban a kísérleteink során bizonyos „csali” fehérjék toxikus hatással voltak a gazdasejtekre. Így a másik, kompatibilis „csali” vektor pBD-GAL4Cam

mellett döntöttünk, melyben a T7 promoter amultiklónozó (poliklónozó) helyektől (MCS=multi cloning site) mögött (downstream) helyezkedik el, ezzel megakadályozva a promóter gyenge, „szivárgó” kifejeződését, mely hátrányos, ha a „csali” fehérje toxikus hatással bír.

### *3.3.3.Szekvenálás Illumina MiSeq készülékkel*

A létrehozott préda könyvtárak illetve a könyvtár szűrése során felnőtt telepekből amplifikált préda inszertek tömegben történő szekvenálására az Illumina cég MiSeq készülékét használtuk. Az egyes könyvtárakból és az amplifikált génekből 5-5 µg tisztított DNS-t küldtünk a Seqomics Kft-nek (Mórahalom), ahol a DNS-ekből szekvenáló könyvtárakat állítottak elő és elvégezték a szekvenálást, valamint a bioinformatikai analízist.

### *3.3.4. Az élesztő ko-transzformáció hatékonyságának meghatározása:*

Az *S. meliloti* ORFeome könyvtár 6317 klónját 67, egyenként általában 96 klónt tartalmazó csoportba rendezetten bocsátották a rendelkezésünkre (Schroeder, House és mtsai. 2005). A 67 csoportot egyenként transzformáltuk az élesztő sejtekbe. Ennek két oka volt: egyrészt így érhető el a magasabb transzformációs hatékonyság, másrészt a lehetséges kölcsönható partnerek meghatározása is egyszerűbb.

A transzformációs hatékonyságot az SD-LT agar lemezen kinőtt telepek száma alapján határoztuk meg. A transzformációt hatékonynak tekintettük, ha az SD-LT lemezeken legalább 300 telepet kaptunk, mely átlagban háromszoros lefedettséget jelentett, azaz minden klón átlagosan háromszor volt jelen a transzformánsok között.

### 3.3.5. A fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatása a transzformált élesztő sejtekben

A „replica plate” technika megfelelőnek tűnt az élesztő sejtekben található lehetséges kölcsönható fehérjék meghatározására és vizualizálására. Az SD-LT agar lemezekben felnőtt élesztő sejteket 200 µl SD-LT tápoldatban szuszpendáltuk fel a 96 lyukú mikrotiter lemezekben. Transzformációként három-három teljes lemezt használtunk. A lemezeket két napig 30 °C-on inkubáltuk. A kultúrákból két nap elteltével, egy replikázó eszközt használva, vittük át a sejteket a különböző szelektív táptalajokra (SD-LT, SD-HLT és SD-AHLT). A munkánk során azt tapasztaltuk, hogy a kolóniák színe már jelezheti a bennük található fehérjék közötti kölcsönhatás meglétét vagy hiányát. Alapja, hogy az AH109 *ade2-101* mutációt hordoz, vagyis alacsony adenin tartalmú táptalajokon, néhány nap múlva az élesztő kolóniák enyhe rózsaszín színt kapnak, melynek a színe napok múlva mélyülhet is. Abban az esetben, ha az élesztőben a fehérjék között kölcsönhatás lép fel, az *ADE2* marker komplementálja az AH109 *ade2-101* fenotípusát, így a kolóniák adenin hiányában is fehérek maradnak (Holm 1993). Ezt a tulajdonságot figyelembe véve könnyebb volt a kölcsönható partnerek beazonosítása.

### 3.3.6. A kölcsönható partnerek azonosítása

Első lépésként a kolóniák közül random kiválasztottunk ötöt-ötöt és kolónia PCR segítségével vizsgáltuk őket. A sejteket MQ vízben vettük fel, és ebből 20 µl-t 50 µl litikázzal (50 U/ml) kezeltük, és 37 °C-on 30 percig inkubáltuk, majd 10 percre 95°C-ra tettük a sejteket. A kezelt sejtekből 5 µl-t templátként használtuk a PCR reakcióhoz. A PCR reakciók során alkalmazott primerek:

Y2HsmORFr	TCATCTGCAGCTCGAGCTCGATGGA
Y2HsmORFf	CCAAAAAAGAGATCTTTAATACGAC
pGADT7_rev	AGATGGTGCACGATGCACAG
AdapSeq	GTTAATACGACTCACTATAGGG

Amennyiben a PCR reakció nem volt sikeres az élesztő sejtekből plazmidot tisztítottunk és azokon végeztük el a PCR reakciót.

A kapott PCR fragmenteket szekvenáltattuk.

### 3.3.7. Teljes „screen” technika

A teljes „screen” során a *S. meliloti* ORFeome könyvtár pool-jait külön-külön ko-transzformáltuk a csali vektorral, vagyis 67 transzformációt végeztünk. A transzformációkat ötösével csoportosítottuk és ezeket együtt kentük ki a szelektív táptalajokra, vagyis egy lemezre öt ko-transzformált reakció került. A felnőtt kolóniákat kolónia PCR-rel vizsgáltuk és a kapott fragmenteket szekvenáltuk.

### 3.3.8. Az élesztő két-hibrid szűrés eredményeinek megerősítésére alkalmazott biokémiai módszerek

#### 3.3.8.a Poli-hisztidin affinitás kromatográfiás tisztítás (pull-down) kísérletek

A *pepF* gént a *S. meliloti* genomi DNS-ről amplifikáltuk, melyet HincII-SmaI enzimekkel emésztve a hasonlóan emésztett 6xHis fúziós epitóp címkét tartalmazó Bluescript vektorba klónoztuk. A célgént a 6xHis címkét kódoló szakasszal együtt NcoI-Acc65I enzimek segítségével a pSParaC vektroba klónoztuk. A pSParaC-PepF6xHis konstrukciót TOP10 kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd 37°C-on növesztett sejteket reggel OD<sub>600</sub>=0,025-re visszahígítottuk és a sejteket 4 órán át 0,02% arabinózzal indukáltuk. Az inkubációs idő lejárta után a sejteket centrifugáltuk (10 perc, 4000 rpm), és szonikációs pufferben (50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,3 M NaCl, 10 mM imidazol, 1x complete EDTA free proteáz inhibitor (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml lizozim) szuszpendáltuk, majd 20 percig jégen inkubáltuk, és 10-szer 20 másodpercig, 20 másodperces szüneteket tartva ultrahanggal feltártuk. A mintát 15 percig 4°C-on 13000rpm-mel centrifugáltuk. A fehérje mintákat (PepF-6xHis) 1x SDS pufferben vettük fel, majd az SDS fehérje gélelektroforézist követő



monoklonális anti-hisztidin ellenanyaggal (Sigma-Aldrich) elvégzett Western analízissel mutattuk ki, hogy a fúziós fehérje legnagyobb mennyiségben a felülúszóban található.

A termeltetett fúziós PepF fehérje lizátumból 1500  $\mu$ l-nyit adtunk a 10  $\mu$ l His-Select® nikkellal mágneses agaróz gyöngyökhöz (Sigma-Aldrich), melyeket ezután 1 óráig át inkubáltunk 4 ° C-on. A gyöngyökhöz kötött PepF fehérjéket a puffert lecseréltük PepF reakció pufferre (20 mM Tris-HCl pH=7,4; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 20 mM NaCl), majd 3  $\mu$ g STREP-NCR247 szintetikus, fúziós peptidet adtunk a rendszerhez, melyet 45 percig szobahőmérsékleten inkubáltunk, majd stringens körülmények között (1 M NaCl, 10 mM  $\beta$ -merkaptoetanol, 1 % ipegal, 20% glicerin) mosva, a gyöngyöket felfőztük. A mintákat SDS fehérje gélelektroforézissel elválasztottuk, majd Western analízist hajtottunk végre, ahol a nitrocellulóz membrán előhívását anti-hisztidin ellenanyaggal (Sigma-Aldrich) és NCR247 peptid elleni ellenanyaggal végeztük.

### 3.3.8.b Immunprecipitáció

A *fecI* gént, valamint saját promóterét a *S. meliloti* genom DNS-ről amplifikáltuk, melyet Acc65I-SmaI enzimekkel emésztve, a hasonlóan emésztett HA fúziós tag-et tartalmazó pM1SRA-HAnosT vektorba klónoztuk. A konstrukciót háromszülős keresztezéssel SM1021 sejtekbe jutattuk, mely biztosította a FecI fehérje termelődését. A konstrukciót tartalmazó *S. meliloti*1021 sejteket egy éjszakán át 30 °C-on növesztettük, majd másnap OD<sub>600</sub>=0,05-re visszahígítottuk. A sejteket OD<sub>600</sub>=0,4-es értékig növesztettük, majd a sejteket centrifugáltuk (15 perc, 4500 rpm), és szonikációs pufferben (20 mM Tris-HCl pH=7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1 %  $\beta$ -merkaptoetanol; 1x complete EDTA free proteáz inhibitor (Sigma-Aldrich)) ultrahang segítségével (30-szer 20 másodpercig, 20 másodperces szüneteket tartva) feltártuk, majd további 1% Triton-X-et adtunk a mintákhoz. A mintát 15 percig 4 °C-on 13000 rpm-mel centrifugáltuk. A fehérje mintákat (FecI-HA) 1x SDS pufferben vettük fel, majd az SDS fehérje gélelektroforézist követő

poliklonális anti-HA ellenanyaggal (Agrisera) elvégzett Western analízissel mutattuk ki, hogy a fúziós fehérje legnagyobb mennyiségben a felülúszóban található.

Az immunprecipitáció során 10  $\mu$ l Pierce Anti-HA mágneses gyöngyöt (Thermo Scientific) ekvibráltunk a mosó pufferben (TBS pH=7,5; 0,05% Tween-20 detergenssel). A mosott gyöngyökhöz FecI-HA-t tartalmazó frakcióból 900  $\mu$ l adtunk, melyeket 30 percen át szobahőmérsékleten inkubáltunk. A gyöngyöket ezután háromszor mostuk a mosó pufferrel, eltávolítva így a rendszerből a nem megkötött FecI-HA fehérjéket. A rendszerhez 10  $\mu$ g NCR247 szintetikus peptidet adtunk, melyet további egy órán át inkubáltunk szobahőmérsékleten. Az inkubáció után a gyöngyöket ismét háromszor mostuk a mosó pufferrel, eltávolítva így a nem megkötött NCR247 peptidet. Elúció során a gyöngyökhöz 1x SDS puffert adtunk és 10 percig forraltuk a mintákat. A gyöngyök eltávolítása után 0,05M DTT-t adtunk a mintákhoz. A mintákat SDS fehérje gélelektroforézist követő poliklonális anti-HA ellenanyaggal (Agrisera), valamint az NCR247 peptid elleni ellenanyaggal elvégzett Western analízissel vizsgáltuk.

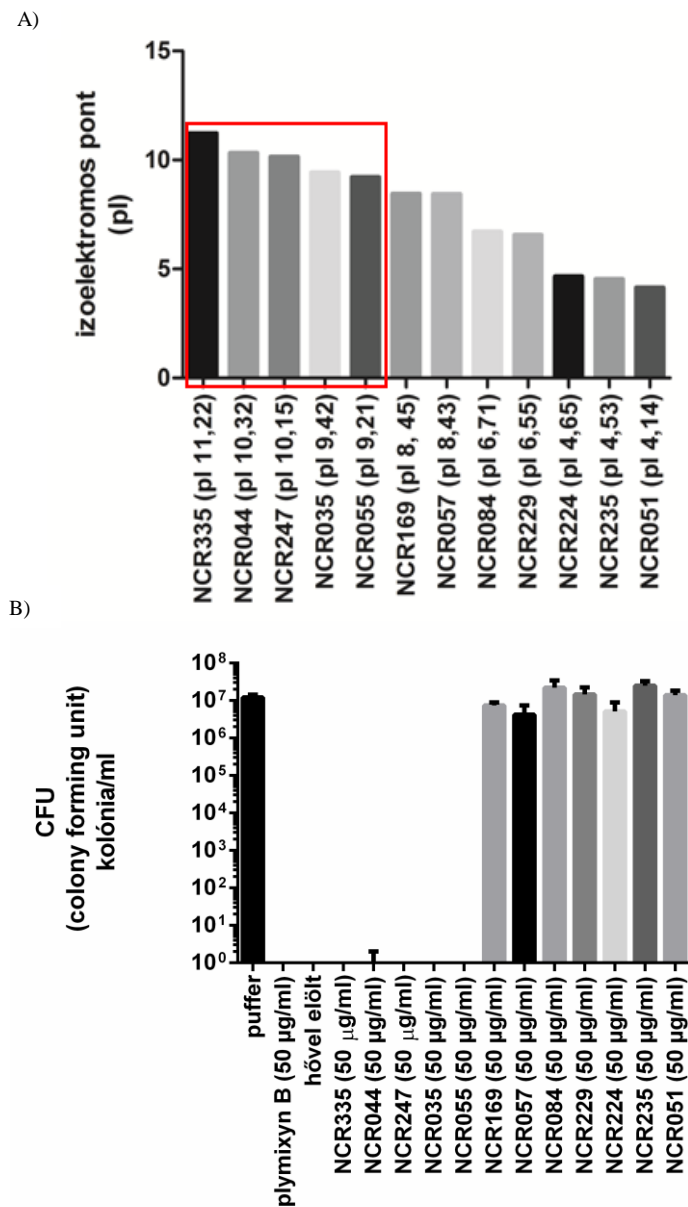
## 4. Eredmények és megvitatásuk

### 4.1. A kationos NCR peptidek antimikrobiálisanak és hatásmechanizmusának vizsgálata

4.1.1. A kationos NCR peptidek baktericid hatással rendelkeznek *S. meliloti* baktériumon *in vitro* körülmények között

A defenzinekhez való szerkezeti hasonlóságból kiindulva feltételeztük, hogy vannak olyan, a terminális bakteroid differenciációban szerepet játszó NCR peptidek, melyek szintén antimikrobiális hatással rendelkeznek. Kiválasztottunk 12 különböző izoelektromos ponttal rendelkező peptidet, és megvizsgáltuk, hogy 50 µg/ml végkoncentrációban alkalmazva őket, miképp hatnak a szabadon élő *S. meliloti* baktériumok kolóniaformáló képességére (CFU) (11. ábra).

Az egy órás kezelést követően a kationos peptidek (NCR335, NCR044, NCR247, NCR035, NCR055) teljes mértékben eliminálták a  $10^7$  sejt/ml sűrűségű kultúrából a baktériumokat, azaz antibakteriális, baktericid hatással bírnak, míg a semleges vagy anionos töltésű peptidekkel történő kezelés nem befolyásolta a baktériumok életképességét (15. ábra).



15. ábra A kationos NCR peptidek antimikrobiális hatása a *S. meliloti* baktériumokkal szemben.

A) A kísérlet során alkalmazott peptidek izoelektromos pont szerinti csoportosítása. A piros téglalapban találhatóak a kationos peptidek. B) Telepet formáló sejtek száma 1 órás peptid-kezelést követően. Puffer: kezeletlen kontroll. A méréseket háromszor végeztem el, az ábrákon a szórás értékeket is feltüntettem (SD).

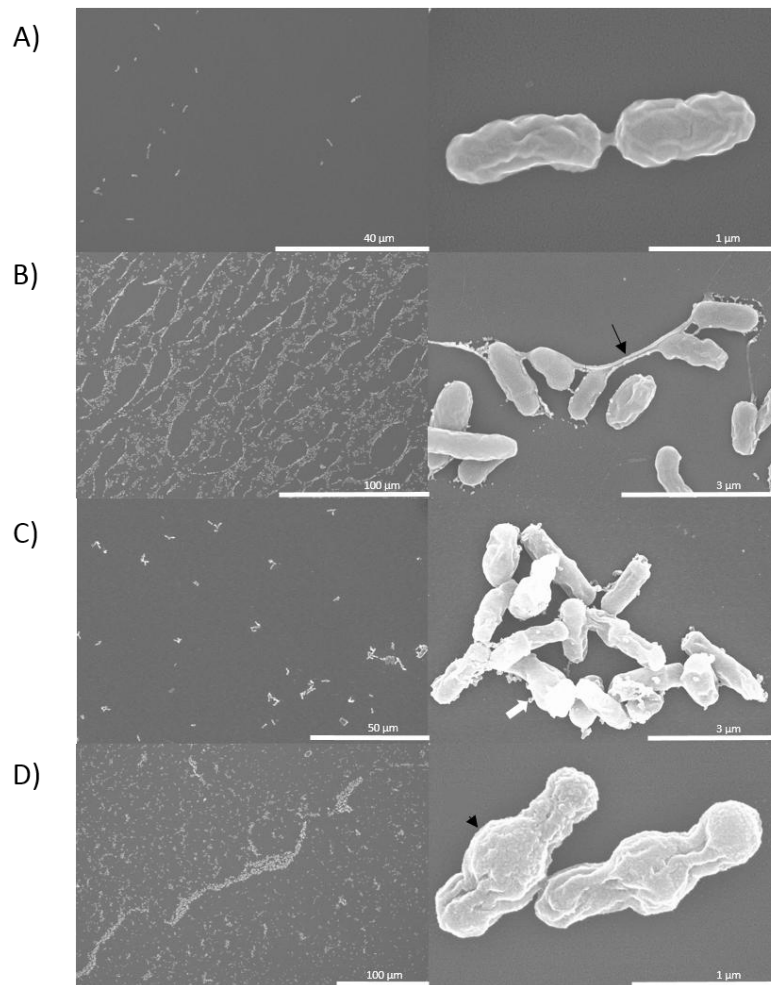
Csoportunk későbbi vizsgálatai kimutatták, hogy a kationos peptidek nemcsak a szimbiotikus partnerre, a *S. meliloti*-ra hatnak, hanem számos Gram - és Gram + (humán és növény-patogén) baktérium (Tiricz, Szucs és mtsai. 2013), valamint élesztőszerűen növekvő, illetve fonalas gomba (Ordogh, Voros és mtsai. 2014) ellen is hatásosak *in vitro*. Ez alapján elmondható, hogy ezek a peptidek széles-spektrumú antimikrobiális szerekeknek tekinthetők.

#### 4.1.2. A kationos peptidek hatásmechanizmusának vizsgálata

A peptidek gyakorlati hasznosításának valamint a szimbiózisban betöltött szerepének felderítése érdekében megkezdtük hatásmechanizmusuk vizsgálatát. Első lépésben vizsgáltuk, hogy miképp befolyásolják a szabadon élő szimbióta *S. meliloti* morfológiáját, majd tanulmányoztuk, miképp hatnak a baktériumok külső és belső membránjára, illetve a sejtek energia ellátásában alapvető fontosságú membránpotenciálra.

4.1.2.a. A peptidkezelés hatására a baktériumok sejtfelületén erőteljesen megváltozott

A kationos peptidek antimikrobiális hatásának kimutatásával felmerült a kérdés, hogy milyen módon fejtik ki hatásukat a baktériumokra. Ennek tanulmányozására letális koncentrációjú peptidekkel kezeltük a sejteket, majd pásztázó elektronmikroszkóp és atomerő-mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a kezelt baktériumokat.



**16. ábra** A kationos peptidek hatása a *S. meliloti* sejtekre

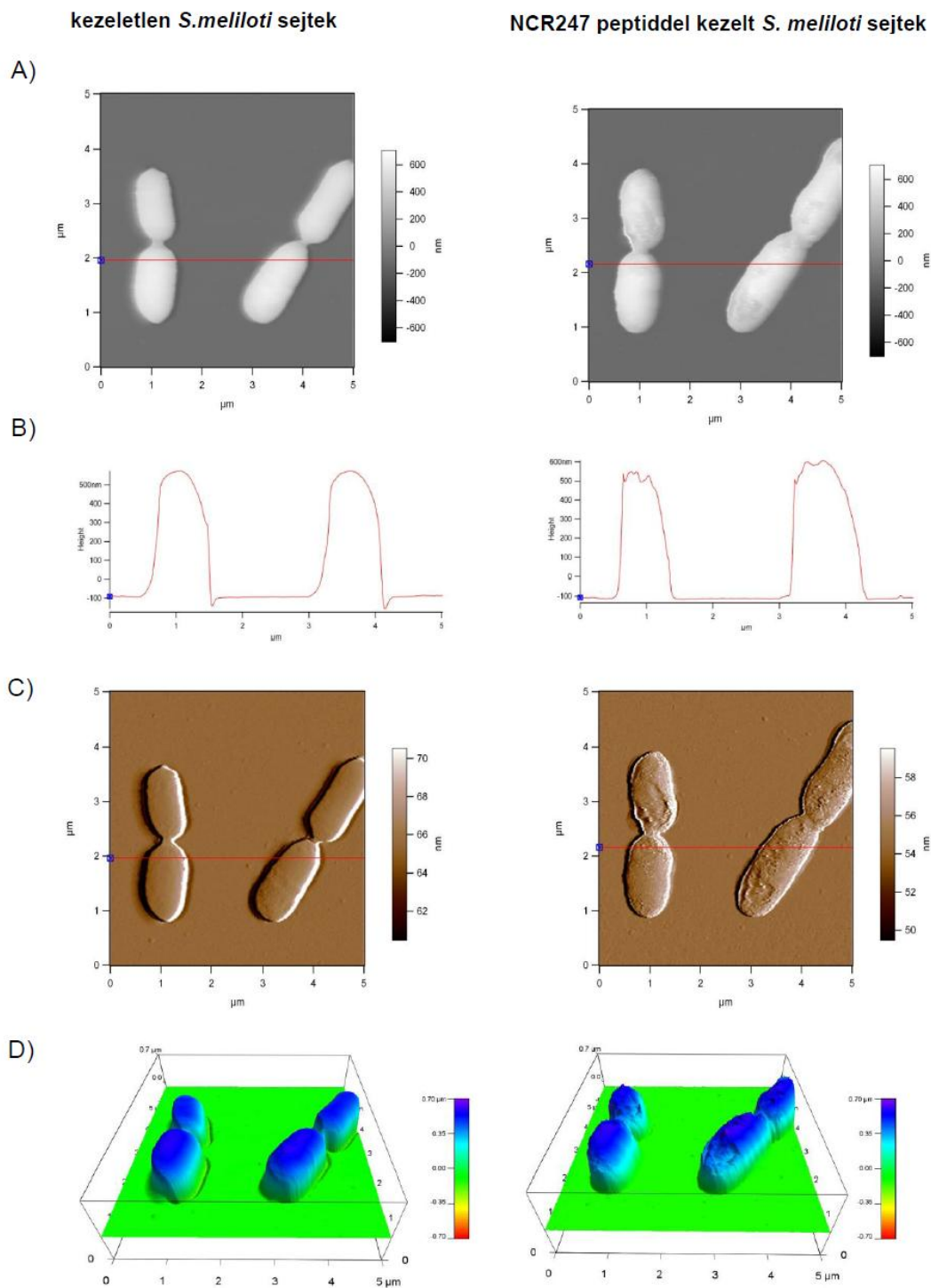
A) kezeletlen baktériumok B) NCR247 (25µg/ml) peptiddel C) NCR335 (25µg/ml) peptiddel D) Polymyxin B peptiddel kezelt *S. meliloti* baktériumok. Fekete nyíl: hálózat-formáló anyag; fehér nyíl: sejt felszíni kitüremkedés; nyílhegy: a kezelés hatására a sejtek közepe nagymértékben felduzzadt.

A kezeletlen minták esetén a baktériumok egyenletes eloszlása figyelhető meg, a látótérben a baktériumok száma alacsony, a sejtek egyesével vagy párokban, nagyon ritkán kisebb csoportokban helyezkednek el. Ezzel szemben, az NCR335 peptiddel történt kezelés hatására kisebb aggregálódott csoportok, bennük valószínűleg a sejt tartalmukat elvesztett vagy éppen elvesztő sejtek, míg NCR247 kezelést követően egy szinte hálózatos szerkezet figyelhető meg (16. ábra). Az NCR335 peptiddel kezelt sejtek felszínén sok esetben kitüremkedések láthatóak (16.C ábra), amik

esetleg a sejttartalom kiáramlásának kezdeti szakaszának felelhetnek meg. Az NCR247 peptiddel kezelt sejteket sok esetben a felszínről "leszakadó", hálózattá alakuló struktúra köti össze (16.B ábra). Elképzelhető, hogy a peptid a sejtfelszíni (extracelluláris és kapszuláris) poliszacharidokat részben leválasztja a sejtfelszínről, s esetleg keresztkötések indukálásával, létrehozásával kialakítja a hálózatos szerkezetet. Érdekesség, hogy a ciklikus pentakationos Polymyxin B szintén a sejtek aggregációját idézte elő, bár a hálózatos szerkezet nem alakult ki. A sejtek középső része viszont nagymértékben felduzzadt (16.D ábra).

Az atomerő-mikroszkópos vizsgálatokhoz a baktériumokat rögzítettük egy kezelt felszínhez, így elvben egy adott sejtet a kezelés előtt és után is lehet vizsgálni. Az NC335 peptid azonban – valószínűleg az erős pozitív töltése vagy a sejtfelszínen okozott változások miatt – megszüntette a sejt és a felszín közötti kölcsönhatást, aminek következtében a sejtek felúsztak, így nem tudtunk képeket készíteni a kezelt sejtekről.

Az atomerő-mikroszkóp magasságprofil (17. ábra B) képein jól látható, hogy a baktérium sejtek átlagos magassága 500-600 nm körüli. A magasság (17. ábra A) és az amplitúdó (17. ábra C) képeken megfigyelhető, hogy a 25 µg/ml koncentrációjú NCR247 peptiddel történő kezelés hatására a sejtek magassága nem változik, viszont a sejtek felszínében változás történt. A kezeletlen sejtek felszíne sima és ívelt, míg egy órával az NCR247 peptiddel történő kezelést követően a sejtek felszíne sokkal laposabb és durvább lett. Elképzelhető, hogy a pásztázó elektron-mikroszkópos képeken megfigyelhető felszín "leszakadás" megy végbe ezen esetben is, s a felszíni "hiány"-t detektálja a mikroszkóp. Mivel a sejtek a felszínhez rögzítettek, így a leszakadt részek elúsznak, s a hálózat nem tud kialakulni.



**17. ábra** Az NCR247 peptid membránkárosító hatásának kimutatása atomerő-mikroszóp segítségével.

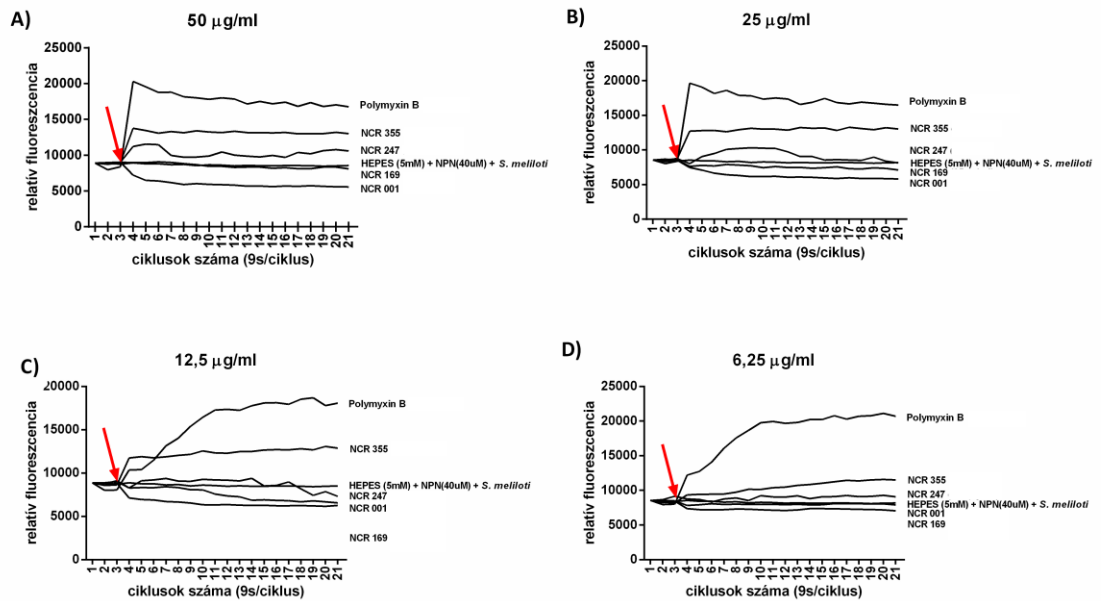
Atomerő – mikroszkóp magasság (A), magasságprofil (B), amplitúdó (C), és 3D (D) képei a kezeletlen és NCR247 (25 μg/ml) peptiddel kezelt *S. meliloti* sejtekről.



#### 4.1.2.b A kationos NCR peptidek kis mértékben megbontják a külső membrán szerkezetét

A mikroszkópos vizsgálataink, illetve a szakirodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy a kationos, antimikrobiális hatású peptidek első célpontja a baktériumok negatív töltésű külső felszíne. Gram - baktériumok esetén ezt az anionos foszfolipidek, valamint a lipopoliszaccharidok foszfát csoportja, a Gram + baktériumoknál pedig a teichonsavak biztosítják. A kationos peptidek a negatív töltésű felszínhez elektrosztatikus kölcsönhatás révén kapcsolódnak és egyrészt kiszoríthatják a külső membrán stabilitásáért felelős kétértékű ionokat ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), másrészt hidrofób felszínükkel beágyazódhatnak a membránba, s így megbontják annak szerkezetét és destabilizálják azt (Nikaido 1979; Brogden 2005).

A külső membrán állapotában a kationos peptidek hatására bekövetkező változások kimutatására az 1-N-phenylnaphthylamine (NPN) fluoreszcens festéket választottuk. Ez egy neutrális, hidrofób tulajdonságokkal rendelkező festék, mely nem képes az intakt külső membránon átjutni, illetve abba beépülni, azonban külső membrán sérülések hatására a festék képes integrálódni a külső membrán megrongálódott szerkezeti elemei közé. A festék oldott állapotban elenyésző mértékben fluoreszkál, azonban a membránba történő integrálódását követően a fluoreszcencia szintje megsokszorozódik (18.ábra) (Brito és Vaz 1986).



**18. ábra** A kationos peptidek koncentrációjuktól függő mértékben a külső membrán szerkezetét megbontva elősegítik a fluoreszcens festék beépülését és ezzel a fluoreszcencia szint megemelkedését.

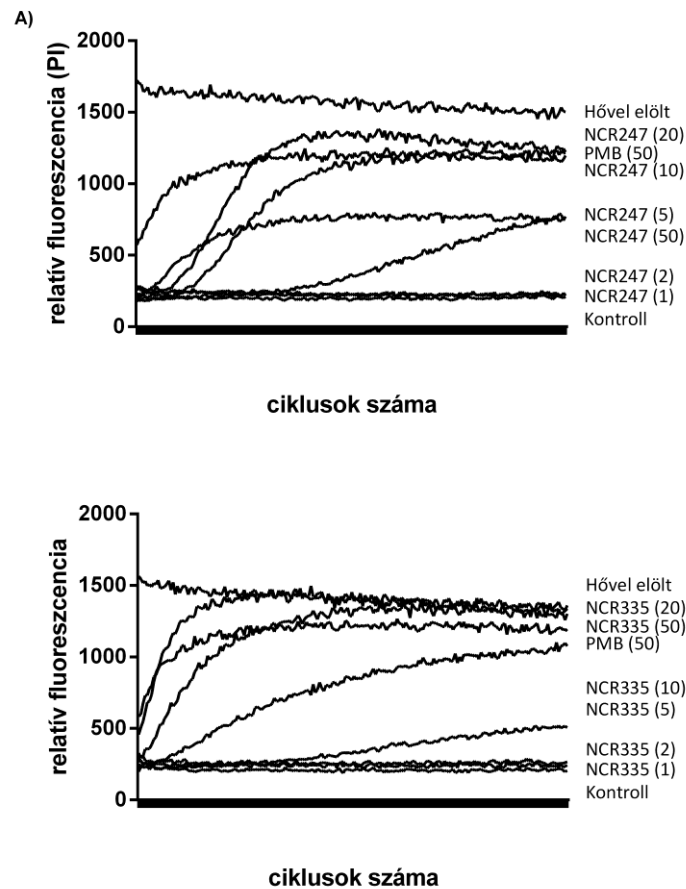
A peptideket a nyíllal jelzett időpontban adtuk a mintákhoz.

A pozitív kontrollként használt Polymyxin B, mely kationos aminosavai révén destabilizálja a külső membránt, gyors és magas intenzitású fluoreszcenciát okozott. Ezzel szemben a vizsgált peptidek közül a kationos NCR335 ( $pI=11,22$ ), s kisebb mértékben az NCR247 ( $pI=10,15$ ) hatására tudtuk a fluoreszcencia gyors emelkedését megfigyelni, aminek az intenzitása azonban soha nem érte el a Polymyxin B által kiváltott szintet. Ebből arra következtethetünk, hogy a kationos peptidek valóban megbontják kis mértékben a sejtek külső membránját, ez a hatás nagyon gyors, de valószínűleg nem ez az elsődleges oka a sejtek pusztulásának. Az anionos illetve gyengén kationos (neutrális) peptidekkel történő kezelés során a minták fluoreszcencia szintje nem emelkedett meg, így elmondható, hogy ezek a peptidek nem rendelkeznek membránkárosító hatással (18. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a kationos NCR peptidek kötődése a negatív töltésű

lipopoliszaccharid réteghez okozhatja a külső membrán permeabilitásának megemelkedését.

#### 4.1.2.c A kationos NCR peptidek megszüntetik a belső membrán integritását

Miután kimutattuk, hogy a kationos NCR peptidek a baktériumok külső membránját károsítják, megvizsgáltuk, hogy milyen hatással vannak a belső membrán integritására. A belső membrán permeabilizációjának kimutatására, a károsodás mértékének esetleges meghatározására kétféle módszert alkalmaztunk: Egyrészt tanulmányoztuk, hogy peptid kezelés hatására a membrán-impermeabilis DNS-kötő festék, a propídiium-jodid képes-e bejutni a sejtekbe (19. ábra). Másrészt kihasználtuk azt, hogy a  $\beta$ -galaktozidáz enzim aktivitását egy mesterséges, sejtekbe bejutni képtelen szubsztrát, az ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) segítségével szokták mérni oly módon, hogy a sejtek membránját detergenssek (pl. kloroform és SDS együttes) adásával roncsolják, hogy az enzim kiszabaduljon a sejtekből és szubsztrátjával egy térbe kerüljön. Ezen alapulva vizsgáltuk, hogy a peptidek átjárhatóvá teszik-e a bakteriális membránokat a szubsztrát és/vagy az enzim számára.

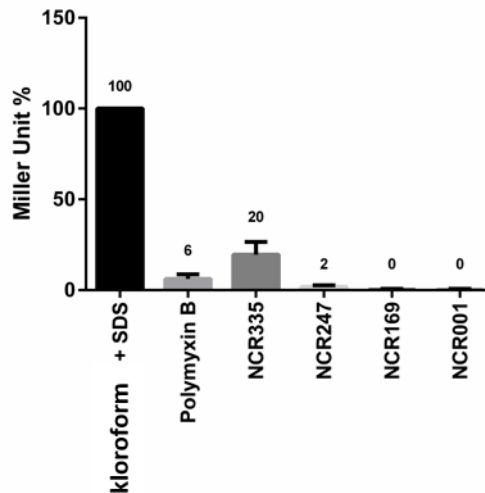


### 19. ábra Kationos peptidek membrán károsításának vizsgálata propidium-jodid festéssel

A) Az NCR247 peptid koncentrációjától (1, 2, 5, 10, 20, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) függően teszi lehetővé a PI bejutását a sejtekbe. B) Az NCR335 peptid esetében szintén megfigyelhető a koncentrációtól függő fluoreszcencia szint emelkedés. ((PMB: Polymyxin B).

A kationos peptidek hatására a kezelt baktériumok membránintegritása oly mértékben megváltozik, hogy a PI festék képes a baktériumba bejutni és azok DNS-éhez kötődve fluoreszcencia szint emelkedést előidézni. Sok esetben ez olyan mértékű, melyet a hővel előlt, membránjuk integritását teljesen elvesztő sejtek esetén figyeltünk meg. A két peptid hatásmechanizmusa nagy valószínűséggel eltér egymástól, hisz az NCR247 peptid esetében a legmagasabb koncentrációt alkalmazva a fluoreszcencia szint emelkedése nem éri el a maximális fluoreszcencia szintet (19. ábra). Ebből következően nem tudtuk megbecsülni, hogy a peptidek

milyen mértékű membránkárosodást okoztak, ezért egy a  $\beta$ -galaktozidáz enzimet konstitutívan expresszáló *S. meliloti* törzs alkalmazásával azt tanulmányoztuk, hogy a peptidek képesek-e a membránok olyan károsodását okozni, hogy az enzim kiszabaduljon illetve a szubsztrát bejusson a sejtekbe (20. ábra).



**20. ábra** A kationos peptidek membrán permeabilizáló hatásának kimutatása  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás mérésével (n=5).

A kísérlet során alkalmazott peptidek koncentrációja 50  $\mu$ g/ml volt. A méréseket ötször végeztem el, az ábrákon a szórás értékeket is feltüntettem (SD).

Kísérleteink során (20. ábra) referenciaként a baktérium sejteket kloroformmal és 0,1% SDS-sel kezeltük, mely kezelés hatására a bakteriális membránok teljes mértékben feloldódtak, az összes sejt lizált, s az enzimreakció sebességét csak az enzim mennyisége limitálta. A külső membrán károsodásának vizsgálatokor pozitív kontrollként használt Polymyxin B-ről ismert, hogy zsírsav oldalláncának köszönhetően a belső membrán integritását is csökkenti, ezért ezekben a vizsgálatokban is használhattuk kontrollként (Galizzi, Siccardi és mtsai. 1975; Schindler és Teuber 1975; Storm, Rosenthal és mtsai. 1977; Scholar és Pratt 2000). A Polymyxin B-vel kezelt sejtek esetén a maximális  $\beta$ -galaktozidáz aktivitásnak mindössze  $6\pm 3$  százalékát tudtuk mérni, ami arra utal, hogy a Polymyxin B hatására

a sejtek membránja nem esik szét, de bizonyos mértékű enzim kiáramlás és/vagy szubsztrát beáramlás a károsodott membránokon keresztül megtörténhet. Hasonlóképp, a vizsgált peptidek közül a legmagasabb izoelektromos ponttal rendelkező NCR335 hatására is csak a maximális aktivitás  $20 \pm 7$  százaléka volt mérhető, míg a szintén magas antibakteriális aktivitással bíró NCR247 esetén ez az érték mindössze  $2 \pm 1$  százalék volt. Az antimikrobiális aktivitást nem mutató gyengén kationos NCR169 és az anionos NCR001 peptidekkel kezelt sejtekből a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitását - a kezeletlen sejtekhez hasonlóan - nem tudtuk kimutatni. Mindez arra utal, hogy bár mindkét vizsgált kationos peptid megszünteti a belső membrán integritását, csak az NCR335 peptid roncsolja viszonylag nagy mértékben a baktériumok belső membránját, míg a szintén kationos NCR247 peptid okozta membránkárosodás kismértékű. Ezzel szemben a semleges és anionos peptidek egyáltalán nem okoznak membránkárosodást.

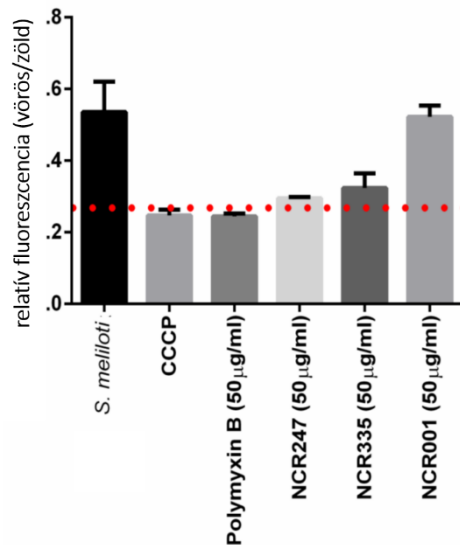
4.1.2.d A kationos NCR peptidek a *S. meliloti* baktérium membránpotenciálját eliminálják

Az ép bakteriális belső membrán két oldala között az elektron-transzport láncok és a terminális oxidázok működése következtében egy elektrokémiai gradiens jön létre, melynek elektromos komponense a membrán két oldala közötti töltéskülönbségből adódik, kémiai részét pedig az ionoknak, pl. protonoknak, a membrán két oldalán kialakuló eltérő koncentrációja biztosítja. Ennek az ún. membránpotenciálnak a megléte vagy hiánya a baktériumok életképességének egyik indikátora. A megfelelő membránpotenciálhoz köthető több, a baktériumok fennmaradásához nélkülözhetetlen folyamat, mint például a membrán két oldala között létrehozott pH gradienshez kapcsolódó ATP képződés, számos tápanyag illetve ion transzportja, vagy például a sejt osztódásában szerepet játszó fehérjék (pl. MinD, FtsA) megfelelő lokalizációja (Strahl és Hamoen 2010). Az ebben a munkában ismertetett vizsgálatok, illetve a csoportunk által a *S. meliloti* sejtekben peptid-kezelések hatására bekövetkező transzkripciós változások (Tiricz, Szucs és mtsai. 2013) is arra

utaltak, hogy a kationos peptidek hatására a sejtek elvesztik membránpotenciáljukat, ami végül a pusztulásukhoz vezet.

A baktériumok membránpotenciáljában bekövetkező változásokat a BacLight™ Bacterial Membrane Potential Kit (Lifetechnologies) segítségével követtük nyomon. A felhasznált fluoreszcens festék (DiOC<sub>2</sub>(3): 3,3'-diethyloxa-carbocyanine iodide) kezdetben alacsony koncentrációban van jelen a sejtekben, ekkor zöld fluoreszcenciát mutat, azonban idővel, a koncentrációja megemelkedik az egészséges sejtekben, ahol a membránpotenciál állandó. A megemelkedett citoszolikus festék koncentráció hatására, a festék molekulák egymással asszociálódnak, aminek következtében fluoreszcenciája a vörös felé tolódik el. A membránpotenciálban bekövetkező változásokat a vörös és zöld fluoreszcencia értékek hányadosának meghatározásával adhatjuk meg.

Kontrollként a proton ionofór CCCP-t (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) és a Polymyxin B-t használtuk. A CCCP a proton grádiens megszüntetésével eliminálja a membránpotenciált (21. ábra) és öli meg a sejteket (Novo, Perlmutter és mtsai. 1999; Novo, Perlmutter és mtsai. 2000). A Polymyxin B-ről az ismert, hogy alacsonyabb koncentrációban (2-20 µg/ml) alkalmazva a kálium-ionok kiáramlását, ill. a külső membrán permeabilitásának megemelkedését okozza, azonban a membrán potenciálra nincs hatással. Magasabb koncentrációban azonban a citoplazma membrán depolarizációját, valamint ion áteresztő csatornák megjelenését okozza (21. ábra) (Daugelavičius, Bakiene és mtsai. 2000).



**21. ábra** Az NCR peptidek hatása a membrán potenciálra.

A peptideket illetve a Polymyxin B-t 50 µg/ml koncentrációban alkalmaztuk 30 percen keresztül. A CCCP és az NCR247 ill. NCR335 hatása között nem szignifikáns az eltérés ( $P < 0,05$ ). A méréseket háromszor végeztem el, az ábrákon a szórás értékeket is feltüntettem (SD).

Kísérletünk során - ahogy vártuk - azt tapasztaltuk (21. ábra), hogy a kationos NCR peptidek is depolarizálják a baktériumok membránját. A folyamat sebessége eltérő a peptidek között. Míg az NCR335 peptid membrán depolarizáló hatása, a kezelést (30 perces inkubáció) követően, a baktérium populáció 100%-án megfigyelhető, addig az NCR247 peptid esetén ez a hatás időben elnyúltabbnak bizonyult. Ahogy az várható volt, az NCR001 peptid nem volt hatással a baktérium membránpotenciáljára.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a szimbiotikus gyökérgümő kialakulása során a bakteroidok terminális differenciációját irányító gümő-specifikus peptidek közül a kationos NCR peptidek baktericid hatásúak a szimbionta baktériumokkal szemben. Ezt a hatást elsősorban a baktériumok külső és belső membránintegritásának megbontásával, a sejt membránpotenciáljának megszüntetésével érik el, bár egyéb vizsgálatok alapján, sejten belüli célpontok megléte (Van de Velde, Zehirov és mtsai. 2010; Farkas, Maroti és mtsai. 2014) sem kizárható.



Bár az NCR peptidek az IRLC csoportba tartozó pillangósokban valószínűleg ciszteinben gazdag antimikrobiális peptidekből fejlődtek a baktériumok fejlődésének irányítására, s a kationos peptidek megtartották antimikrobiális hatásukat, a gümőben mégsem pusztítják el a vad típusú baktériumokat. Mi lehet ennek az ellentmondásnak a magyarázata? Az NCR peptidek erősebb hatása *ex planta* az *in vitro* kísérletekben használt magas koncentrációval magyarázható. Erre utalhat, hogy a BacA fehérje hiányában a *Sinorhizobium* sejtek érzékenyebbé válnak az NCR peptidekkel szemben, aminek következtében elpusztulnak, miután kiszabadulnak a növényi sejtek citoplazmájába, ahol a peptidek célpontjaivá válnak. Emellett a bakteroidok a gümő sejtjeiben a kationos és anionos peptidek keverékével találkoznak, melyek együttes jelenléte és összehangolt működése befolyásolja a membránok szerkezetét. Lehetséges, hogy a kationos és anionos peptidek egyidejű jelenléte a baktériumok felszínén enyhíti a membránkárosodást, a töltésen alapuló kölcsönhatások gyengítésével. Mindezek mellett, a membránok enyhébb károsodása elősegítheti az anionos peptidek bejutását a baktérium citoplazmájába is. Összességében elmondható, hogy további széleskörű kísérletek szükségesek ahhoz, hogy a gümő kialakulásának különböző fejlődési szakaszaiban szerepet játszó peptidek egyedi és összehangolt hatását jobban megérthessük.

#### **4.2. Új, az élesztő két-hibrid rendszerre átalakított, *S. meliloti*1021 ORFeome könyvtár létrehozása**

Ahogy az előző fejezet végén kifejtettük, a (kationos) NCR peptidek elsődleges szerepe a gümőben valószínűleg nem a baktériumok elpusztítása, hanem differenciálódásuk irányítása. Éppen ezért szükség van olyan eszköztárak fejlesztésére és használatára, melyek segítségével a peptidek bakteriális célpontjai, valamint a peptidekkel kölcsönható fehérjék azonosíthatóak.

#### 4.2.1. Az új ORFeome könyvtár létrehozása

Az előre mutató genetikai technikák, valamint a transzkriptom analízisek lehetőséget biztosítanak egyedi gének/fehérjék szerepének vizsgálatára adott körülmények között, azonban egyedi fehérjék ritkán fejtik ki hatásukat önmagukban, általában mint egy multiprotein komplex tagjaként vesznek részt a biológiai folyamatokban. Az általuk, más fehérjékkel kialakított kölcsönhatások fontosak lehetnek szignál transzdukciós, vagy metabolikus folyamatokban, stb. így pontos funkciójuk meghatározása, csak a más fehérjékkel kialakított kölcsönhatásuk kontextusában értelmezhető, határozható meg.

Számos biokémiai és genetikai technikát fejlesztettek már ki a fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálatára, melyek közül néhány automatizálható és nagy áteresztőképességű (high throughput) vizsgálatok során is alkalmazható (Wetie, Sokolowska és mtsai. 2013). Célunk egy olyan új módszer kidolgozása volt, mely felhasználva a felhalmozott genom információkat és az élesztő két-hibrid rendszer előnyeit, segítséget jelent a nitrogénfixáló kölcsönhatás során kialakult fehérje-fehérje kölcsönhatások meghatározásában.

Az új „préda” könyvtár kialakítása során a már létező *S. meliloti*1021 ORFeome könyvtárat használtuk fel (<https://apps.vetmed.wsu.edu/kahn/>). Ez a könyvtár, a *S. meliloti* 1021 genom mind a 6317 prediktált génjét tartalmazza egyesével klónozva (Schroeder, House és mtsai. 2005). A plazmidokat általában 96-osával csoportosítva (3 csoport kevesebb klónt tartalmaz) 67 csoportban (pool) bocsátották a rendelkezésünkre. Ahhoz, hogy az ORFeome könyvtár alkalmas legyen az élesztő két-hibrid rendszerben történő felhasználásra, ahhoz az összes ORF-et, melyek a pMK2010 „entry” vektorban találhatóak, át kellett vinni az általunk újonnan létrehozott pGADT7GW-AD „destination”vektorba.

Az alkalmazott GATEWAY® LR reakció hatékonyságát a kapott telepek számának meghatározásával, valamint IonTorrent szekvenálással ellenőriztük. Mivel a pool-onként végrehajtott LR reakcióból a kapott telepek száma elérte a 300-at, a reakciót

hatékonyak tekinthetjük, hisz ez pool-onként több mint háromszoros lefedettségnek minősül. Az újonnan létrehozott ORFeome pool-ok közül ötöt választottunk ki az Illumina MiSeq asztali szekvenálón történő *en masse* szekvenálásra. Minden pool esetén legalább 90 ORF-et lehetett azonosítani, mely alapján megfelelőnek tekinthető az *en masse* rekombináció és a transzformáció hatékonysága.

Az új ORFeome „préda” könyvtár létrehozása során a kódoló szekvenciáknak a GAL4 fehérje aktiváló doménjével egy leolvasási keretbe (frame) helyezése sokkal hatékonyabbnak és kiszámíthatóbbnak bizonyult, mintha a könyvtárat random genomikus DNS fragmentekből állítottuk volna elő, ahol a kódoló szekvenciáknak csak kis hányada lett volna használható (Shimoda, Shinpo és mtsai. 2008).

#### 4.2.2. Az új élesztő két-hibrid könyvtár tesztelése - kontroll konstrukciók létrehozása

Az általunk újonnan létrehozott *S. meliloti* ORFeome könyvtár alkalmasságának tesztelésére kontrollnak olyan fehérjéket választottunk ki, melyeknek ismertek, vagy feltételezhetőek a kölcsönható partnereik.

**HfQ** (host factor required for phage Q $\beta$  RNA replication) egy homohexamer struktúra kialakítására képes *S. meliloti* fehérje, mely előszeretettel kapcsolódik A/U gazdag RNS-ekhez (Barra-Bily, Pandey és mtsai. 2010). Képessége, hogy önmagával összekapcsolódva egy komplexebb struktúrát hoz létre, alkalmassá tette számunkra, hogy pozitív kontrollként használhassuk az új élesztő két-hibrid könyvtár tesztelése során, csakúgy, mint a *S. meliloti* 16-3 fág C represszor fehérjéjének dimerizációs doménjeit, mely forgásszimmetrikus flexibilis fehérje homodimer kialakítására képes (Dallmann, Marincs és mtsai. 1991; Papp, Nagy és mtsai. 2002; Ferenczi, Orosz és mtsai. 2006).

Ezek az önmagukkal kapcsolódni képes fehérjéken kívül, kiválasztottunk olyan fehérjéket is, melyek között a kölcsönhatás nem teljesen tisztázott. A **FixA** (feltételezett elektron transzfer flavoprotein béta lánc) és a **FixB** (feltételezett

elektron transzfer flavopotein alfa lánc) *S. meliloti* fehérjék feltehetőleg együtt termelődnek, ugyanis a *fixABCX* operon génjei által termelt FixA és FixB fehérjék a feltételezések szerint egy olyan elektron transzport flavoprotein  $\alpha$  és  $\beta$  láncát képezik, melyek fontos szerepet játszanak a nitrogénáz enzimhez történő elektron transzportban. Ezekből kifolyólag feltételezhető, hogy a FixA és FixB fehérjék egymással kölcsönhatnak (Dusha, Kovalenko és mtsai. 1987; Gubler, Zurcher és mtsai. 1989). Kísérletünk során a FixB fehérjét, mint „csali” fehérje, a FixA fehérjét, mint „préda” fehérje alkalmaztuk.

csali	pBD-GAL4Cam::HfQ	pBD-GAL4Cam::16-3clts	pBD-GAL4Cam::FixB
préda	pGADT7-AD::HfQ	pGADT7-AD::16-3clts	pGADT7-AD::FixA
	47. pool	46. pool	5. pool
	22. pool	22. pool	22. pool
	45. pool	45. pool	45. pool
	üres pGADT7-AD	üres pGADT7-AD	üres pGADT7-AD

### 3. táblázat Az élesztő két-hibrid rendszer tesztelésére használt kontroll összeállítások.

Megvizsgáltuk, hogy a kiválasztott fehérjék valóban képesek-e kölcsönható partnerként viselkedni, illetve kiválasztottuk azokat a pool-okat az új könyvtárunkból, melyekben a vizsgált fehérjék, ill. kölcsönható partnerek megtalálhatóak. A kísérletben negatív kontrollként szerepelnek olyan könyvtárak, melyekben nem várunk kölcsönható partner jelenlétét, valamint az üres „préda” vektort, kizárólag a vektorok közötti kölcsönhatás lehetőségét.

Előzetes elképzeléseinket tisztázandó, vizsgáltuk az általunk kiválasztott fehérjék közötti direkt kölcsönhatásokat, valamint kiválasztottuk azokat a pool-okat az általunk létrehozott ORFeome könyvtárból, melyekben a vizsgált fehérjék feltételezett kölcsönható partnerei megtalálhatóak, és olyanokat is (22. és 45. pool) melyek esetén nem várunk kölcsönhatást (3. táblázat). A *S. meliloti* HfQ fehérje a 47. poolban található, míg a FixB fehérjével feltételezeten kölcsönható FixA fehérje az 5. pool-ban. Ezen felül vizsgáltuk, hogy a 16-3clts fehérje mutat-e kölcsönhatást a 46. pool-ban található RNS polimeráz alegységek valamelyikével (SMc01317 – rpoB DNS függő RNS polimeráz béta alegység, SMc01316 – rpoC DNS függő RNS

polimeráz béta' alegység, SMC01285 – rpoA DNS függő RNS polimeráz alfa alegység) (Dallmann, Marincs és mtsai. 1991; Papp, Nagy és mtsai. 2002; Ferenczi, Orosz és mtsai. 2006). Ezen felül vizsgáltuk az üres vektorokkal történő kölcsönhatás lehetőségét is, kizárva ezzel a lehetséges fals kölcsönhatásokat, illetve az autoaktivációt.

#### 4.2.3. Élesztő transzformációs protokoll optimalizálása

A kísérletek megtervezése után a legfontosabb lépés az élesztő transzformációs protokoll optimalizálása volt. A kétlépéses transzformálás helyett, mely sok mutációs esemény kialakulásához vezethet, egy általunk optimalizált ko-transzformációs protokollt használtunk. A transzformációs hatékonyságot a kapott telepek számával határoztuk meg. A transzformációs hatékonyságot megfelelőnek tekintettük abban az esetben, ha a kapott telepek száma elérte a 400-at, ezzel elérve a pool-onkénti négyszeres lefedettséget (a pool-okban 96 plazmid található)(4. táblázat).

Csali	Préda	transzformációs hatékonyság (CFU/1 µg DNS)
pBD-GAL4Cam::HfQ	pGAD-T7::HfQ	547
	pool 47	805
	pool 22	635
	pool45	643
	üres pGAD-T7	753
pBD-GAL4Cam::16-3cl	pGAD-T7::16-3cl	1530
	pool 46	922
	pool 22	773
	pool 45	615
	üres pGAD-T7	1052
pBD-GAL4Cam::FixB	pGAD-T7::FixA	628
	pool 5	723
	pool 22	407
	pool 45	542
	üres pGAD-T7	642

#### 4. táblázat A módosított ko-transzformációs protokoll hatékonynak bizonyult.

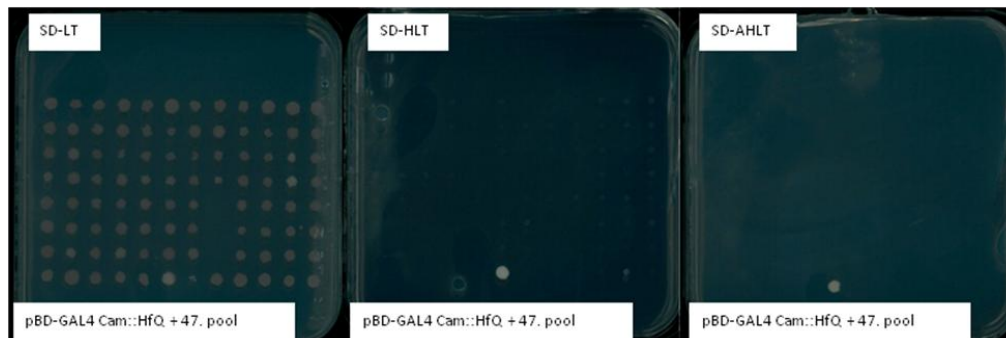
A ko-transzformációs hatékonyság a transzformációt követően SD-LT táptalajon megjelenő telepek számával határoztuk meg 1 µg felhasznált DNS-re vonatkoztatva.

Az új rendszerünkben a transzformációs hatékonyság minden esetben elérte a legalább négyszeres lefedettségi szintet (407 és 1530 közötti volt a kapott transzformánsok száma 1  $\mu\text{g}$  DNS-re vonatkoztatva) (4. táblázat), mely elengedhetetlen a fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatásához. Poisson eloszlás alapján annak az esélye, hogy egy individuális klón is hiányozzon kevesebb, mint 2% az előbbi esetben, és kevesebb, mint  $10^{-6}$  az utóbbiban.

Ezek alapján elmondható, hogy az új rendszerhez kidolgozott transzformációs protokoll hatékony, így a munkánk során a továbbiakban is használható.

#### 4.2.4. A kontrollként használt fehérjék és pool-ok közötti kölcsönhatások kimutatása, ill. további lehetséges kölcsönható partnerek azonosítása

A kapott transzformáns sejtekkel történő munka megkönnyítésére egy ún. „replica – plate” technikát vezettünk be (22. ábra). Minden kísérleti összeállítás esetén közel 300 telepet vittünk át különböző szelektív táptalajokra (SD-LT, SD-HLT és SD-AHLT), hogy kiderítsük a transzformáns sejtek hordoznak-e kölcsönható fehérjét, illetve, hogy a kölcsönhatás milyen erősségű.



**22. ábra** A Hfq fehérje kölcsönható partnerének kimutatása a 47. pool-ból a „replica – plate” technika segítségével.

A szelektív SD táptalajon növekvő telepekből, melyek a lehetséges kölcsönható fehérjét hordozzák, a „préda” fehérjét kódoló gén azonosítása élesztő kolónia PCR

segítségével történt. A folyamat során keletkezett termékeket a „préda” vektorra tervezett specifikus primerekkel szekvenáltuk.

Minden „pair wise” összehasonlítás (plazmid a plazmiddal) esetén az erős kölcsönhatást mutató kolóniák közül véletlenszerűen választottunk ki 5-5 telepet, hogy teszteljük, vajon a megfelelő konstrukciót tartalmazza-e az élesztő sejt, ezzel kizárva a fals interakciók lehetőségét. Minden esetben azt tapasztaltuk, hogy a kolóniák a megfelelő, az általunk bevitt plazmidot tartalmazzák.

Csali	Préda	a különböző táptalajokon megjelenő kolóniák százalékos aránya		
		SD-LT	SD-HLT	SD-AHLT
pBD-GAL4Cam::HfQ	pGAD-T7::HfQ	100	80	77
	pool 47	100	0,3	0,3
	pool 22	100	0	0
	pool45	100	0	0
	üres pGAD-T7	100	0	0
pBD-GAL4Cam::16-3cl	pGAD-T7::16-3cl	100	97	96
	pool 46	100	0	0
	pool 22	100	0	0
	pool 45	100	2	0
	üres pGAD-T7	100	0	0
pBD-GAL4Cam::FixB	pGAD-T7::FixA	100	49	1
	pool 5	100	6	0
	pool 22	100	12	0
	pool 45	100	4	0
	üres pGAD-T7	100	3	0

##### 5. táblázat. A szűrés (screen) eredménye a vizsgált fehérjék és pool-ok esetében.

A számok százalékban vannak megadva, ahol a 100% a kolóniák száma az SD-LT szelektív táptalajon.

A HfQ fehérje esetében a valószínűség, hogy megtaláljuk a kölcsönható partnerét a 47. pool-ból 1,041 % volt ( $1/96 \times 100$ ), azonban mégis csak a telepek 0,347 %-a

hordozta a megfelelő klónt, rávilágítva a magas transzformációs hatékonyság szükségességére.

Annak ellenére, hogy kevés esélyünk volt a Hfq fehérjével kölcsönható fehérjét azonosítsuk a 47. pool-ból, mégis a kapott egy telepből amplifikált fragment szekvenálása után bebizonyosodott, hogy az a *hfq* gént tartalmazó plazmidot hordozza.

A 16-3 bakteriofág cI fehérjéjének dimer-formálóképessége az élesztő két-hibrid rendszerben is beigazolódott, mivel a legszelektívebb táptalajon (SD-AHLT) nagyon sok telepet kaptunk és a vizsgált kolóniák minden esetben a *16-3cIts* gént tartalmazták. Azonban a 46. pool-al végzett transzformációt követően elmondhatjuk, hogy az abban található RNS polimeráz alegységekkel, nagy valószínűséggel nem hat kölcsön a fehérje (5. táblázat).

A FixA és FixB fehérjéről a 5. táblázat alapján elmondható, hogy közöttük csak gyenge kölcsönhatás lehetséges, ha van egyáltalán. Emellett a 22. és a 45. poolban is lehetnek kölcsönható partnerek, bár a FixB fehérje minimális fals kölcsönhatást is mutat az üres „préda” vektorral (self-activation) (5. táblázat).

Génazonosító	Géntermék
SMa0822	FixA
SMa0811	FdxN
SMa0736	hipotetikus fehérje
SMa0739	hipotetikus fehérje
SMa0763	hipotetikus fehérje
SMa0771	hipotetikus fehérje
SMa5003	hipotetikus fehérje
SMa5036	hipotetikus fehérje
SMa0789	GntR transzkripció regulátor

6. táblázat. A FixB fehérjével kölcsönható fehérjék azonosítása az 5. poolból.



Mivel a célunk a rendszer tesztelése volt, így csak az 5. pool-ból származó telepeket vizsgáltuk, amelyből sikerült a FixA fehérjét kódoló gént azonosítani (6. táblázat). Így a rendszerünk tesztelése mellett még a FixA és FixB fehérjék közötti interakciós kapcsolat meglétére is kaptunk indikációt, melyről eddig még nem jelent meg publikáció. A magasabb számú lehetséges kölcsönható partner megjelenésének oka néhány esetben a funkcionális redundancia is lehet – Sma0763 a FixI flavoprotein oxidoreduktázra, míg az Sma5036 a dioxigenázra hasonlít, amelyek a FixABCX fehérjékkel részt vehetnek az elektron transzportban. Valamint azonosítottuk a FdxN gént, ami hasonlóságot mutat a FixABCX operonban kódolt FixX ferredoxinnal.

Mint már utaltunk rá, a *fixB* gént tartalmazó plazmid az üres „préda” vektorral kis mértékben aktiválta a riporter rendszert. Megvizsgálva ezeket a telepeket, arra a következtetésre jutottunk, hogy ezek egy részében, valamilyen mutációs esemény történhetett, mivel plazmidot nem tudtunk belőlük izolálni.

Továbbá, találtunk olyan telepeket, melyekben elméletileg az egymással kölcsönható fehérjéket tartalmazó plazmidok találhatóak, mégsem nőttek a szelektív SD táptalajokon. Szerettük volna kideríteni ennek a jelenségnek a genetikai hátterét kolónia PCR segítségével, de nem jártunk sikerrel. A „préda” vektorra specifikus primerek nem működtek. Ebből arra következtettünk, hogy valamilyen mutációs esemény történhetett, ami nem teszi lehetővé a PCR reakciót. Ennek a feltevésnek a tisztázására további PCR reakciókat állítottunk össze a plazmid különböző régióira, de egyik esetben sem jártunk sikerrel. Ezek után számos plazmid tisztító protokollt kipróbáltunk, de egyik esetben sem jártunk sikerrel. Ezekből a sikertelen kísérletekből arra következtettünk, hogy vagy a szelekciós marker valamilyen módon az élesztő genomba integrálódott, vagy a sejtek mutációja revertálódott, mivel képesek voltak a szelektív táptalajokon növekedni.

Összességében elmondhatjuk, hogy az új rendszerünk képes a megfelelően magas számú élesztő sejt alkalmazásával, a mutációs eseményekből fakadó fals pozitív események ellenére, a kialakuló fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatására. A

„replica plate” technika segítségével pedig könnyen kezelhetővé válik a nagyszámú élesztő sejtekkel a munka.

#### 4.2.5. Az új rendszer hatékonyságának ellenőrzése a HfQ kölcsönható partnereinek meghatározásával a teljes könyvtár használatával (full screen)

Az általunk újonnan létrehozott ORFeome könyvtár, a módosított ko-transzformációs protokoll és a kölcsönhatás kimutatására kialakított kondíciók további tesztelésére, új körülmények között vizsgáltuk a HfQ fehérje kölcsönható partnereit, ahol a reakcióban mind a 67 pool részt vett (full screen). Bár a ko-transzformációkat minden csoporttal külön-külön végeztük el, de költségcsökkentés céljából 6-6 (egy esetben 7) pool-ból szuperpool-okat képeztünk, s együtt szélesztettük ki őket szelektív lemezekre. Az átlagos transzformációs hatékonyság a vizsgálat során 698 telep lett 1  $\mu$ g DNS-re vonatkoztatva, mely azt jelenti, hogy egy egyedi gén hiányának valószínűsége kevesebb, mint 1%. A legszelektívebb táptalajon (SD-AHLT), ahol csak az erős kölcsönható partnereket tartalmazó kolóniák képesek életben maradni, összesen 35 telep nőtt ki, melyek mindegyike a *hfq* gént hordozta a „prey” vektorban. Három kolónia esetében az élesztők két „prey” plazmidot hordoztak. Ez a jelenség gyakran megfigyelhető élesztők transzformálása során, mivel az élesztő sejtek több plazmid felvételére is képesek. Ezt igazolja az a tény is, hogy mind a három fehérje ugyanabból a pool-ból származik, mint a HfQ fehérje.

Korábban más módszerekkel több direkt és indirekt kölcsönható partnerét is azonosították a HfQ fehérjének (Butland, Peregrin-Alvarez és mtsai. 2005), melyeket azonban vizsgálatunk során nem tudtunk azonosítani. Erre több magyarázat is lehetséges: az élesztő két-hibrid rendszer csak direkt kölcsönható partnerek azonosítására alkalmas, így az indirekt partnerek kimutatása nem lehetséges. Abban az esetben sem mutatható ki a kölcsönhatás, ha a lehetséges kölcsönható partner esetleg káros hatással van a gazdaszervezetre. Ráadásul, az élesztő két-hibrid rendszerünkben a fehérjék a sejtmagban, mint fúziós fehérjék fordulnak elő, mely

konformációja nem minden esetben segíti elő a kölcsönhatás kialakulását a csali és a préda fehérje között.

Konklúzióként elmondható, hogy létrehoztunk egy, a szolubilis fehérjék közötti kölcsönhatások kimutatására alkalmas, klasszikus élesztő két-hibrid rendszerre alkalmazható, GATEWAY® kompatibilis *S. meliloti* ORFeome könyvtárát. Ezen felül optimalizáltuk a könyvtár létrehozása során a GATEWAY® LR reakció egy költséghatékony verzióját.

Úgy véljük, hogy a módosított ko-transzformációs protokoll, az új ORFeome könyvtár, a „replica plate” technika ilyen módon történő alkalmazása elősegíti a *S. meliloti* fehérjék könnyebb, gyorsabb és hatékonyabb fehérje-fehérje kölcsönhatásainak meghatározását.

Munkánk során bebizonyítottuk, hogy a megfelelő mennyiségű élesztő kolónia felhasználásával, még az olyan kölcsönhatások is kimutathatók, melyek meghatározására kevés az esély.

A rendszerünk tesztelése során a FixA és FixB fehérjék közötti gyenge kölcsönhatás lehetőségére is fény derült, melyről eddig nem található információ a szakirodalomban.

### **4.3. Az NCR247 peptid kölcsönható partnereinek meghatározása az új *S. meliloti* ORFeome könyvtár segítségével**

A rendszer hatékonyságának tesztelése után, egy a csoportunkban már vizsgált gümő specifikus peptid (NCR247) kölcsönható partnereit is szeretnénk volna meghatározni. A peptidről korábban kimutatták, hogy a bakteroidok differenciálódásával egy időben termelődik, s valószínűleg több, a bakteroidok differenciálódásában, illetve sejtosztódásban szerepet játszó fehérje aktivitását

befolyásolja. A csali vektor létrehozása során az NCR247 peptid érett változatát (a szignál peptid nélkül) alkalmaztuk.

#### 4.3.1. NCR247 peptid kölcsönható partnereinek meghatározása a teljes *S. meliloti* ORFeome könyvtár használatával (full screen)

A Hfq kölcsönható partnereinek meghatározásához hasonlóan 11 szuper-pool-t alkalmaztunk a ko-transzformáció során. A ko-transzformációs hatékonyság 789 cfu volt 1 µg DNS-re vonatkoztatva, mely alapján a valószínűsége, hogy egy egyedi gén kimaradjon a vizsgálatból  $2,72 \times 10^{-4}$ . A lehetséges (erős és gyenge) kölcsönható partnerek azonosítása céljából a sejteket az erős és a gyengébb szelekciós táptalajokra (SD- AHLT és SD-HLT) is kiszélesztettük. A legszelektívebb táptalajon (SD-AHLT) megjelenő kolóniák mindegyikében meglepő módon ugyanazt a fragmentet detektáltuk. Ez az SMC04012 gén volt, mely az oligopeptidáz F (PepF) fehérjét kódolja. A kevésbé szelektív táptalajokon további 201 lehetséges kölcsönható fehérjét azonosítottunk, melyeket a Függelékben található táblázatban foglaltunk össze.

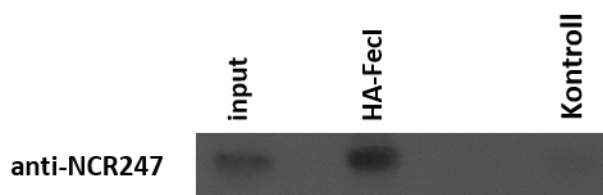
A vizsgált gének közel fele (98) hipotetikus, vagy ismeretlen funkciójú fehérjéket kódol. Ezek mellett találtunk a különböző vegyületek metabolizmusában és transzportjában, redox reakciókban és az elektron transzport folyamatokban szerepet játszó fehérjéket kódoló géneket. Ezen felül riboszómális fehérjéket, transzkripciószregulátorokat, valamint proteázokat kódoló géneket is azonosítottunk.

#### 4.3.2. NCR247 peptid kölcsönható partnereinek megerősítése más biokémiai technikák alkalmazásával (pull-down, immunprecipitáció)

Az élesztő két-hibrid rendszer alkalmas a fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatására, de előfordulhat, hogy félrevezető eredményeket ad. Éppen ezért érdemes a kapott eredményeket más biokémiai technikák segítségével is megerősíteni.

Ehhez immunprecipitációs kísérleteket végeztünk a gyenge kölcsönható partnerek közül, az SMc04203 gén által kódolt, az extra-citoplazmatikus funkcióval (ECF) rendelkező RNS polimeráz szigma faktorok közé tartozó FecI fehérjével. A további vizsgálatok céljára azért választottuk ezt a fehérjét, mert ismert, hogy a fehérjét kódoló gén, illetve a feltételezhetően a szabályozása alatt álló sziderofórok és más stressz helyzethez történő sejtszintű adaptációban szerepet játszó gének expressziója NCR247 peptid kezelés hatására megemelkedik (Tiricz, Szűcs és mtsai. 2013; Penterman, Abo és mtsai. 2014).

Az élesztő két-hibrid rendszerben kapott eredményeknek megfelelően immunprecipitációs technika segítségével vizsgáltuk a kölcsönhatást az NCR247 peptid és a FecI fehérje között. A *fecI* gént saját promóterével és egy HA fúziós taggal együtt, mint fúziós fehérjét termeltettük *S. meliloti* sejtekben. A FecI-HA fúziós fehérjét Anti-HA mágneses gyöngyökhöz kötve tisztítottuk, majd vizsgáltuk, hogy a hozzá adott szintetikus NCR247 peptid képes-e kötődni a FecI fehérjéhez. A gyöngyről származó eluátumot, poliklonális anti-HA, és anti-NCR247 ellenanyag segítségével, Western analízissel vizsgáltuk. Sikeresen kimutattuk mindkét komponens jelenlétét, mellyel igazoltuk, hogy a FecI fehérje és az NCR247 peptid képes kölcsönhatásba lépni egymással.

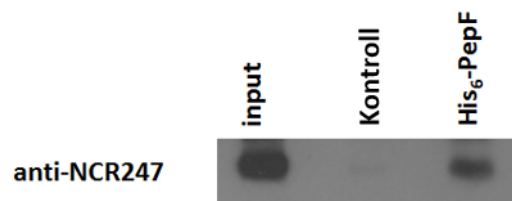


**23. ábra** *S. meliloti* RNS polimeráz szigma faktor FecI fehérjéje valóban kölcsönható partnere az NCR247 peptidnek.

Input: A rendszerhez adott NCR247 peptid; HA-FecI: Anti-HA mágneses gyöngyökhöz kötött HA-FecI fehérjéhez adtuk az NCR247 peptidet; Kontroll: üres Anti-HA mágneses gyöngyökhöz adtuk az NCR247 peptidet.

Az NCR247 peptid egyetlen erős kölcsönható partnere az oligopeptidáz F (PepF) fehérje, mely a peptidázok M3 családjába sorolható. Az ehhez a családhoz tartozó peptidázok általános jellemzője, hogy endopeptidáz aktivitásuk csak alacsony molekulásúlyú szubsztrátokra korlátozódik, vagyis kizárólag a 19 aminosavnál rövidebb szubsztrátokat képesek hasítani.

Az élesztő két-hibrid rendszerben tapasztalt kölcsönhatás megerősítésére hisztidin pull-down kísérleteket végeztünk, ahol a PepF fehérjét 6xHis tag-gel fuzionáltattuk. A PepF-6xHis fúziós fehérjét arabinóz indukció segítségével *E. coli* sejtekben termeltettük. A fúziós fehérjénket His-Select® nikkell mágneses agaróz gyöngyök segítségével tisztítottuk, majd a PepF fehérjének megfelelő reakció puffer jelenlétében a rendszerhez adtuk a szintetikus NCR247 peptidet. Az eluátum anti-hisztidin és anti-NCR247 ellenanyag segítségével, Western analízissel vizsgáltuk. Az ellenanyagok segítségével képesek voltunk kimutatni mind a PepF-6xHis, mind az NCR247 peptid jelenlétét, mellyel igazolni tudtuk a köztük lévő kölcsönhatást (25. ábra).



**25. ábra** *S. meliloti* oligopeptidáz F (PepF) fehérje és az NCR247 peptid kölcsönható partnerek.

Input: A rendszerhez adott NCR247 peptid; Kontroll: His-Select® nikkell mágneses agaróz gyöngyökhöz adtuk az NCR247 peptidet; His<sub>6</sub>-PepF: His-Select® nikkell mágneses agaróz gyöngyökhöz kötött His<sub>6</sub>-PepF fehérjéhez adtuk az NCR247 peptidet;

Csoportunkban korábban már vizsgálták a szintetikus StrepII- és FLAG-toldalékkal ellátott NCR247 peptid lehetséges kölcsönható partnereit „pull-down” kísérletek segítségével. A két rendszer (pull-down, Y2H) segítségével kapott kölcsönható

fehérjék között csak két esetben tapasztaltunk átfedést: ezek a riboszómális S18 és L23 fehérjék (Farkas, Maroti és mtsai. 2014). A két módszer eredményei között tapasztalható eltérések nagy valószínűséggel a kísérlet során alkalmazott peptidek eltérő konformációs tulajdonságaival magyarázhatók. A „pull-down” kísérletek során alkalmazott szintetikus peptidekben molekulán belüli, ill. molekulák között diszulfid hidak alakulhatnak ki, míg a klasszikus két-hibrid rendszer esetén, a sejtmagi körülmények között, a diszulfid hidak kialakulása kevésbé valószínű, valamint a peptid, mint fúziós fehérje jelenik meg a rendszerben, ahol a fúziós partner sokkal nagyobb a peptidnél. Így a két technikát egymás kiegészítő partnereinek kell tekinteni. Azonban elmondható, hogy sem a „pull-down” kísérletben, sem a két-hibrid rendszerben kialakuló peptid konformáció nem felel meg a gümőben, természetes körülmények között tapasztalható, érett NCR247 szerkezetnek.

Mindezek ellenére a lehetséges kölcsönható partnerek meghatározása elősegítheti a további célzott kísérleteket, melyek azonosíthatják azokat a folyamatokat, melyekre az NCR247 peptid hatással van. Részben már ismert, hogy az NCR247 gátolja a Z-gyűrű kialakulását a baktériumokban, mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között, azáltal, hogy az adott riboszómális alegységekkel, valamint az FtsZ monomerekkel kölcsönhatásba lép (Farkas, Maroti és mtsai. 2014). A további kutatási célpontok közé tartozhatnak még egyrészt az elektron transzportlánc folyamatok, mivel több elektron transzport fehérjét (négy ferredoxin fehérje) is azonosítottunk, mint lehetséges kölcsönható partner, a különböző proteázok aktivitásában bekövetkező változások (lásd később), valamint a transzkripciós regulátorok is. Korábban már kimutatták, hogy az NCR247 peptid hatással van a *S. meliloti* több mint 800 génjének expressziójára, melyek közé tartoznak a riboszómális alegységeket kódoló gének mindegyike (Tiricz, Szucs és mtsai. 2013; Penterman, Abo és mtsai. 2014). Mindezek mellett a lehetséges kölcsönható partnerek között találtunk öt olyan transzkripciós regulátort, melyek közül kettőről már bebizonyították, hogy az NCR247 peptid szabályozása alatt áll. Habár az NCR247 peptid által kiváltott transzkripciós változások nagy részét, mint a peptidkezelés hatására bekövetkező stressz válasznak tekintik, előfordulhat, hogy a

transzkripció regulátorok aktivitása a peptidekkel való kölcsönhatás hatására megváltozhat.



## 5. Összefoglalás

Napjainkban a gyakori és nem mindig megfelelően alkalmazott antibiotikum kezelések hatására számos úgynevezett multidrog rezisztens mikroorganizmus jelent meg. Ezek ellen a védekezés sokkal nehezebb, hosszabb kezelések szükségesek, melyek komoly problémákat okoznak a gyógyászatban. Így egyre sürgetőbb feladatot jelent újabb, a rezisztens kórokozók ellen hatásos antimikrobiális szerek felfedezése.

Az antimikrobiális peptidek (AMP), mint új generációs antibiotikumok, új, hatékony megoldást nyújthatnak e problémára. AMP-k termelésére szinte minden élőlény képes, növényekben illetve gerinctelen és gerinces állatokban, mint vele született immunitás effektor molekulái jelennek meg. Ezek a peptidek gyors gátló, ill. ölő hatásuk miatt alkalmassá válhatnak a gyógyászatban már hatástalan antibiotikumok helyettesítésére.

Az antimikrobiális peptideknek rendkívül gazdag forrásai a növények, melyek minden egyes részéből, úgymint a szárból, a levélből, a virágból és a termésekből, tudtak már izolálni ilyen molekulákat. Csoportunkban azonosították a defenzin típusú AMP-khez nagyon hasonló, specifikusan csak a szimbiotikus gyökérgümő rhizóbiumok által fertőzött sejtjeiben termelődő gümő-specifikus, ciszteinben gazdag peptideket (NCR: nodule-specific cysteine-rich peptides). Az NCR gének rövid, 25 – 60 aminosav hosszú, szekretált peptideket kódolnak, melyek érett formái négy vagy hat ciszteint tartalmaznak konzervált pozíciókban. A *Medicago truncatula* genomában azonosított közel 600 peptid elsődleges szekvenciáját tekintve gyenge homológiát mutat egymáshoz, és jelentős eltérések figyelhetők meg izoelektromos pontjukban és expressziós mintázatukban. Kiderítettük, hogy a peptidek elsődleges szerepe valószínűleg a szimbionta partner terminális differenciációjának irányítása. A defenzinekhez való hasonlóságuk miatt korábban megvizsgáltuk van-e antimikrobiális tulajdonságuk, s kimutattuk, hogy a magasabb izoelektromos ponttal rendelkező, kationos NCR peptidek mind Gram negatív, mind Gram pozitív baktériumokkal szemben, illetve számos élesztőszerűen növény és fonalas gombával szemben is nagyfokú aktivitást mutattak.

Munkám során az antimikrobiális tulajdonságokkal rendelkező kationos NCR peptidek hatásmechanizmusának pontosabb megismerése érdekében tanulmányoztuk, hogy miképp változik a baktériumok morfológiája, külső- és belső membránjuk átjárhatósága, illetve membránpotenciálja. A peptidek baktériumok morfológiájára kifejtett hatását atomerő ill. szkennig elektron mikroszkópos felvételekkel vizsgáltuk, melyek során a peptidek hatásmechanizmusának különbségei is felfedezhetőek voltak. Bizonyos peptidek a bakteriális sejtek aggregációját és a sejtfelszíni képletek rongálódása révén sejtek közötti hálózatos szerkezet megjelenését indukálták, mások pedig a baktérium sejtek kiürülését okozták. A kationos peptidek külső membránra kifejtett koncentrációfüggő membránkárosító hatását olyan neutrális, hidrofób festék (1-N-phenylnaphthylamine) segítségével mutattuk ki, mely csak a külső membrán megrongálódott szerkezeti elemei közé képes integrálódni. A belső membrán integritásának vizsgálata során kihasználtuk, hogy az intracelluláris  $\beta$ -galaktozidáz enzim szubsztrátja nem képes átjutni az intakt membránokon, így a peptidkezelést követő enzimaktivitás mérésével kimutattuk, hogy a kationos peptidek a külső membrán mellett a belső membránt is képesek károsítani. Kijelenthetjük, hogy a kationos peptidek antimikrobiális hatásának elsődleges oka a baktériumok membránpotenciáljának eliminálása, melyet a fluoreszcens festék (DiOC<sub>2</sub>(3)) alkalmazásával is tudtunk bizonyítani. Mindazonáltal nem zárhatjuk ki, hogy egyes peptideknek sejten belüli célpontjai is lehetnek, ami a szimbiotikus kapcsolat kialakításában játszott szerepük alapján is feltételezhető.

A peptidek sejten belüli kölcsönható partnereinek, célpontjainak azonosítására az egyik lehetőséget az élesztő kettős-hibrid technológia biztosítja. Munkám során a *Sinorhizobium meliloti* 1021-es törzsének összes prediktált ORF-jét tartalmazó ORFeome könyvtárat juttattam be egy általunk készített préda-vektorba, mely kompatibilis a klasszikus élesztő két-hibrid rendszerrel. A rendszer létrehozása és tesztelése során költséghatékony Gateway (LR) rekombinációs protokollt, illetve hatékonyabb élesztő transzformációs eljárást dolgoztunk ki, valamint igazolni tudtuk rendszerünk hatékonyságát, olyan fehérjék használatával, melyeknek ismertek a kölcsönható partnerei. A rendszer beállítása után megkezdtük az eddig legjobban ismert peptid, az NCR247 kölcsönható partnereinek azonosítását, melynek során képesek

voltunk erős illetve gyenge kölcsönható partnerek meghatározására is. Az azonosított feltételezett kölcsönható partnerek közül kiválasztott néhány fehérje és a vizsgált kationos peptid közötti kapcsolatot más biokémiai technikák (immunprecipitáció, pull-down analízis) segítségével is sikerült bizonyítani. Az élesztő két-hibrid rendszer segítségével azonosított lehetséges kölcsönható partnerek azonban nagyrészt nem fednek át a már korábban affinitás kromatográfiával azonosítottakkal, melyből arra következtethetünk, hogy a rendszerünk nem helyettesíti, hanem kiegészíti a már megszerzett ismereteket.

## 6. Summary

The frequent and not always properly performed antibiotics treatments have resulted in the spreading of multidrug resistance among microorganisms. The defense against them is more complicated and requires prolonged therapy. The development of novel drugs effective against these resistant microbes is becoming a more and more urgent task.

Antimicrobial peptides (AMPs) as a new generation of antibiotics can be the efficient solution for this problem. AMPs are produced by the majority of the living organisms. In plants as well as in invertebrate and vertebrate animals, these peptides are the effector molecules of the innate immune system. Due to their strong inhibiting and killing activity they might replace the antibiotics that became ineffective.

Plants are appeared to be extremely rich sources of AMPs. These peptides can be isolated from most plant organs such as stem, leaf, flower or seed. Our group identified nodule specific cysteine rich (NCR) peptides - resembling the defensin-like AMPs - that are produced specifically in the infected cells of the symbiotic nodules. The *NCR* genes are coding for short, 25-60 amino acid long, secreted peptides, which in mature forms contain four or six cysteine in conserved positions. The primary structure of the approx. 600 peptides identified in the *Medicago truncatula* genome shows weak homology to each other and significant differences were found in their isoelectric point and expression pattern. We revealed that their primary function in the symbiosis is probably to govern the terminal bacteroid differentiation of the endosymbiotic bacteria. Due to their similarities to the defensins we examined their antimicrobial features. We found that the cationic NCR peptides with higher isoelectric point have strong activity against Gram negative and Gram positive bacteria as well as yeast-like growing and filamentous fungi.

In order to reveal the mode of action of the cationic peptides with antimicrobial activity, we investigated how peptide treatments affect the morphology, the integrity of the outer and inner membrane as well as the membrane potential of bacteria. The changes induced by the cationic peptides in the surface and the shape of the bacteria were determined by atomic force and scanning electron microscopic studies, which revealed differences in the mode of action of the examined cationic peptides, too. Some of these peptides caused the aggregation of the bacterial cells and the formation of thread-like structures that seem to be formed by materials released from destabilized cell surfaces, and some others cause the excretion of the content of the bacterial cells. The dose-dependent membrane disruptive effect of the cationic peptides on the outer membrane (OM) was measured with the hydrophobic fluorescent probe 1-N-phenylnaphthylamine (NPN), which cannot enter the intact OM, but can pass the destabilized one and by entering the phospholipid layer gives rise to strong fluorescence. To investigate the possible damage of the inner membrane (IM) due to the cationic peptides, we took advantage of the fact that the IM is not permeable for the artificial substrate of the cytoplasmic  $\beta$ -galactosidase enzyme, thus, the enzyme activity can be measured only after the disruption of the membrane. The IM damage caused by the cationic peptides was further confirmed by measuring the membrane potential of the peptide treated cells using the fluorescent membrane-potential indicator dye, DiOC<sub>2</sub>(3), provided in the BacLight™ Bacterial Membrane Potential Kit. Thus we concluded that the primary reason for the antimicrobial activity of the cationic peptides is the elimination of the membrane potential. Additionally, the peptides may have intracellular targets with a role in the symbiotic relationship between the plants and their bacterial partners.

The yeast two-hybrid system provides an opportunity to identify the intracellular interacting partners, targets of the examined cationic peptides. During my work, we transferred the ORFeome library containing all the expressed genes of the *S. meliloti* bacteria into a newly created prey vector, which is compatible with the classic yeast two-hybrid system. During the construction and testing of the new system we established a cost-efficient Gateway (LR) recombination protocol and a more effective yeast transformation method. To verify the efficiency of the system, we used proteins

with known interaction partners. After setting up the new system, we initiated the identification of the targets of the most investigated NCR247 peptide and could isolate strong and weak interacting partners. The interaction between the peptide and a few putative interactors were proved by other biochemical techniques, such as immunoprecipitation and pull-down analysis. However, the set of proteins identified by using the yeast two-hybrid system showed almost no overlap with the set identified by affinity chromatography, which suggests that our system does not substitute, but rather complements the previous experiments.

## 7.Függelék

KATEGÓRIA/GÉN	FELTÉTELEZETT FUNKCIÓ
<b>Gének, melyek a szén metabolizmusban szerepet játszó fehérjéket kódolnak</b>	
SMc03103	szén monoxid dehidrogenáz közepes alegysége, transzmembrán fehérje
SMc02524	formát dehidrogenáz gamma alegység
<i>SMc01270</i>	<i>S-(hidroximetill) glutation dehidrogenáz / alkohol dehidrogenáz</i>
SMc03929	zink-típusú alkohol dehidrogenáz transzmembrán protein
SM_b20170	glutation-függő formaldehid dehidrogenáz
SMc00105	feltételezett oxidoreduktáz transzmembrán protein
SMc02466	szukcinát dehidrogenáz vas-kénalegység
SMa1491	izoquinolin 1-oxidoreduktáz, alfa alegység
SM_b20343	feltételezett izoquinolin 1-oxidoreduktáz
<b>Gének, melyek a nitrogén metabolizmusban szerepet játszó fehérjéket kódolnak</b>	
SM_b20986	nitrát reduktáz, nagy alegység protein
<i>SMc03806</i>	<i>nitrogén szabályozó protein PII 2</i>
SMc01832	járulékos ureáz protein UreE
SMc01837	ureázalfa alegység
SMc01941	ureázgamma alegység
<b>Gének, melyek az aminosavak metabolizmusában szerepet játszó fehérjéket kódolnak</b>	
SMc00673	N-formimino-L-glutamát deamináz
SMc03932	szarkozin oxidázdelta alegység
SMc03858	korizmát mutáz
SMc00155	DAHP szintáz protein
<b>Gének, melyek a kofaktorok és vitaminok metabolizmusában szerepet játszó fehérjéket kódolnak</b>	
SMc03191	preckrin-2 C(20)-metiltranszferáz
SM_b21179	FAD-függő glicerol-3-foszfát dehidrogenáz
SMc02723	7-ciano-7-deazoguanin reduktáz
SMc00144	molibdenum kofaktor bioszintézis protein A
SMc01777	6,7-dimetil-8-ribityllumazinsintáz
SMc03939	NAD(P) transzhydrogenázalfa alegység
<b>Gének, melyek a purin/pirimidin metabolizmusában szerepet játszó fehérjéket kódolnak</b>	
SMc02166	dihidroorotáz
SMc02698	adenin foszforiboziltranszferáz
SM_b21558	aldehidvagy xantin dehidrogenáz, vas-kénalegység protein
SM_b21011	xantindehidrogenáz
SMa2349	xantindehidrogenáz , vas-kén -kötőalegység
<b>Gének, melyek a szénhidrátok metabolizmusában szerepet játszó fehérjéket kódolnak</b>	
SMc01992	D-xilulóz reduktáz
SMc04460	glikogén foszforiláz
SMa0868	NodB kitoooligosaccharid deacetiláz
<b>Gének, melyek a sejtfal bioszintézisben/módosításban szerepet játszó fehérjéket kódolnak</b>	
SMc01335	N-acetilmuramoil-L-alanin amidáz AMIC prekursor transzmembrán protein

SMc02942	peptidoglükán-asszociált lipoprotein
SMc01846	lizozim-szerűfeltételezethidrolázglikozidáz protein
SM_b20577	feltételezett protokatekuát3,4-dioxigenáz béta lánc protein
<b>Gének, melyek a kis szubsztituenssel rendelkező komplex molekulák modifikálásában szerepet játszó fehérjéket kódolnak</b>	
SM_b21243	szulfotranszferáz
SMc03094	aminoglikozid 3'-foszfortranszferázfehérje család
SM_b21213	szeryin/treonin protein foszfatáz 1
<b>Gének, melyek a sejtek motilitásában szerepet játszó fehérjéket kódolnak</b>	
SMc03032	flagellum bazális test P-gyűrű fehérje
<b>Gének, melyek a redox folyamatokban szerepet játszó fehérjéket kódolnak</b>	
SM_b20252	koenzim F420 hidrogenáz/dehidrogenáz domént tartalmazó fehérje
SMc02282	réz-tartalmúoxidoreduktáz
SMA2073	FMNH <sub>2</sub> -függő acil-CoA kettes típusú dehidrogenáz
SMc01754	feltételezett réz-tartalmú oxidoreduktáz
SM_b21129	FAD-függő oxidoreduktáz
SMc02469	NAD(P)-függő oxidoreduktáz
SMA1735	FAD-függő oxidoreduktáz
SM_b20403	vas-kénklasterttartalmazó oxidoreduktáz protein
<b>Gének, melyek fehérje degradációban szerepet játszó fehérjéket kódolnak</b>	
SMc02694	ATP-függő Clp proteáz adaptor
SMc02720	ATP-függő Clp proteázproteolitikus alegysége
SMc04012	oligoendopeptidáz F protein
SMc03782	Membrán-kötöttfém-tartalmú-peptidáz M23/M37 család
SMc04031	prolin iminopeptidáz
<b>Gének, melyek az elektron transzportban szerepet játszó fehérjéket kódolnak</b>	
SMA0834	FdxB ferredoxin III
SMc02347	ferredoxin ASFB vas-kén protein
SMA0816	FixX ferredoxin-szerű protein
SM_b20819	ferredoxin
SMA1891	tioeredoxin reduktáz
<u>SMc02443</u>	<u>glutaredoxin 3</u>
SMA1523	NuoG2 NADH:quinone oxidoreduktázalegység (G lánc)
SMA1544	NuoK2 NADH:quinone oxidoreduktázalegység (K lánc)
SM_b20174	citokrom c protein
SMc01981	citokrom C transzmembrán protein
<b>Gének, melyek a membrán transzportban szerepet játszó fehérjéket kódolnak</b>	
SMc00713	ChaC kation transzport protein
SMc02281	külső membrán efflux protein, TolC-szerű
SMc04017	külső membrán lipoprotein
SMc00172	fő facilitátor szupercsalád transzporter
SMA0298	ABC transzporter ATP-kötő protein
SMA0199	ABC transzporter ATP-kötő protein
SMc03850	hem exporter D (citokrom C-típusúbiogenezis protein) transzmembrane
SMc03183	monovalens kation/H <sup>+</sup> antiporter alegység F
SMc02344	periplazmatikus kötő protein
SMA0576	periplazmatikus odott anyag(solute) (Leu/Val/Ile) kötő protein, egy ABC transzporter komponense, <i>R.leguminosarum</i> ? BraC ortológja
SMc03182	pH adaptációskálium efflux rendszer E transzmembrán protein



SM_b21707	feltételezett elágazó láncú aminosav felvevő ABC transzporter ATP-kötő fehérje
SMc03135	feltételezett aminosav szállító rendszer, ATP-kötő ABC transzporter fehérje
SM_b20712	rhizopine felvevő ABC transzporter szubsztrát-kötő protein prekursor
SM_b21345	cukor felvevő ABC transzporter szubsztrát-kötő protein prekursor
<b>Gének, melyek a DNS replikációban és javításban szerepet játszó fehérjéket kódolnak</b>	
SMc03966	Holliday junction DNA helikáz RuvA
SMc03764	DNA mismatch endonukleáz, patch repair protein
SMc02077	exodeoxiribonukleáz III protein
<b>Gének, melyek a transzkripció szabályozásában szerepet játszó fehérjéket kódolnak</b>	
SMc01585	hideg sokk transzkripció szabályozó protein
SMA0181	CspA5 hideg sokk protein transzkripció regulátor
SMc00182	feltételezett transzkripció regulátor protein
SM_b20592	RNSpolimeráz szigma faktor
<u>SMc04203</u>	<u>RNS polimeráz szigma faktor FECl protein</u>
SMc03896	LuxR családtranszkripció regulátor
SM_b20626	AraC családtranszkripció regulátor
SMc05011	bakteriofág DNS-kötőtranszkripció regulátor
SMc00681	Lrp/AsnC családtranszkripció regulátor
SMc00720	feltételezett 2-komponensű felvevő (receiver) domén protein
<u>SMc03949</u>	<u>NtrP antitoxin</u>
SMc04408	MazE antitoxin, virulencia-asszociált protein
<b>Gének, melyek riboszómális fehérjéket, és a transzkripció gépezet biogenezisében szerepet játszó fehérjéket kódolnak</b>	
SMc02799	16S rRNS metiltranszferáz GidB
<u>SMc00567</u>	<u>30S riboszómális protein S18</u>
SMc03934	30S riboszómális protein S21
<u>SMc01299</u>	<u>50S riboszómális protein L14</u>
<u>SMc03770</u>	<u>50S riboszómális protein L21</u>
<u>SMc01304</u>	<u>50S riboszómális protein L22</u>
<u>SMc01307</u>	<u>50S riboszómális protein L23</u>
<u>SMc03772</u>	<u>50S riboszómális protein L27</u>
<u>SMc00704</u>	<u>50S riboszómális protein L28</u>
<u>SMc03990</u>	<u>50S riboszómális protein L31</u>
<u>SMc04003</u>	<u>50S riboszómális protein L36</u>
SMc01353	aszpartil/glutamil-tRNS amidotranszferáz C alegység
<b>Gének, melyek hipotetikus fehérjéket vagy ismeretlen funkciójú fehérjéket kódolnak</b>	
SMc00167	ismeretlen funkciójú fehérje
SMc00664	ismeretlen funkciójú fehérje
SMc05008	ismeretlen funkciójú fehérje
SMc03936	ismeretlen funkciójú fehérje
SMc02485	ismeretlen funkciójú fehérje
SM_b21569	ismeretlen funkciójú fehérje
SMA0900	ismeretlen funkciójú fehérje
SMc00692	hipotetikus fehérje
SM_b20808	hipotetikus fehérje
SMc05014	hipotetikus fehérje
SMc04290	hipotetikus fehérje

SMc02631	hipotetikus fehérje
SMc02286	hipotetikus fehérje
SMa1455	hipotetikus fehérje
SMc03144	hipotetikus fehérje
SMa5032	hipotetikus fehérje
SM_b21642	hipotetikus fehérje
SMc00134	hipotetikus fehérje
SMc01995	hipotetikus fehérje
SMc04457	hipotetikus fehérje
SMc03935	hipotetikus fehérje
SMa0310	hipotetikus fehérje
SMc01459	hipotetikus fehérje
SM_b21358	hipotetikus fehérje
SM_b21267	hipotetikus fehérje
SMa2275	hipotetikus fehérje
SMc04313	hipotetikus fehérje
SMc02052	hipotetikus fehérje
SMc03989	hipotetikus fehérje
SMc04289	hipotetikus fehérje
SMc04030	hipotetikus fehérje
SMc03941	hipotetikus fehérje
SM_b20464	hipotetikus fehérje
SMc00655	hipotetikus fehérje
SMc01405	hipotetikus fehérje
SMc02795	hipotetikus fehérje
SMc04092	hipotetikus fehérje
SMc00688	hipotetikus fehérje
SMc01505	hipotetikus fehérje
SM_b20401	hipotetikus fehérje
SM_b21330	hipotetikus fehérje
SMc05013	hipotetikus fehérje
SMc04022	hipotetikus fehérje
SMc03284	hipotetikus fehérje
SMc00686	hipotetikus fehérje
SMc02803	hipotetikus fehérje
SMc03844	hipotetikus fehérje
SM_b21667	hipotetikus fehérje
SMc01940	hipotetikus fehérje
SMc01748	hipotetikus fehérje
SMc02716	hipotetikus fehérje
SMc01989	hipotetikus fehérje
SM_b21329	hipotetikus fehérje
SMc01194	hipotetikus fehérje
SMc03977	hipotetikus fehérje
SMc02989	hipotetikus fehérje
SMa1767	hipotetikus fehérje
SMc01833	hipotetikus fehérje
SMc03244	hipotetikus fehérje
SMc03976	hipotetikus fehérje

SMc04025	hipotetikus fehérje
SMc03960	hipotetikus fehérje
SM_b20411	hipotetikus fehérje
SMc03289	hipotetikus fehérje
SMc02447	hipotetikus fehérje
SM_b22021	hipotetikus fehérje
SM_b20811	hipotetikus fehérje
SMc03794	hipotetikus fehérje
SMc01549	hipotetikus fehérje
SMc01519	hipotetikus fehérje
SMc00732	hipotetikus fehérje
SMc03746	hipotetikus fehérje
SM_b21173	hipotetikus fehérje
SMA1808	hipotetikus fehérje
SMc03999	hipotetikus fehérje
SMc02351	hipotetikus fehérje
SMc02709	hipotetikus fehérje
SMc02497	hipotetikus fehérje
SMc03751	hipotetikus fehérje
SM_b20454	hipotetikus fehérje
SM_b20471	hipotetikus fehérje
SMc03263	hipotetikus fehérje
SMc04094	hipotetikus fehérje
SMc00656	hipotetikus fehérje
SM_b22012	hipotetikus fehérje
SM_b21154	hipotetikus fehérje
SMc03288	hipotetikus fehérje
SMc04437	hipotetikus fehérje
SMc04329	hipotetikus fehérje
SMc00665	hipotetikus fehérje
SMA0728	hipotetikus fehérje
SMA0992	hipotetikus fehérje
SMA1095	hipotetikus fehérje
SMA1394	hipotetikus fehérje
SM_b21554	hipotetikus fehérje
SM_b20542	ISRM14 hipotetikus fehérje
SMc03279	ISRM28 2-es számútranszpozázszekvencia inszerció

\* Pull-down technikával azonosított géntermékek vastaggal vannak kiemelve. Az aláhúzott és dőlttel jelölt gének expressziója *in vitro* körülmények között az NCR peptidek által szabályozott.

## 8. Irodalomjegyzék

- Agerberth, B., J. Y. Lee, T. Bergman, M. Carlquist, H. G. Boman, V. Mutt és H. Jornvall (1991). "Amino-Acid-Sequence of Pr-39 - Isolation from Pig Intestine of a New Member of the Family of Proline-Arginine-Rich Antibacterial Peptides." *European Journal of Biochemistry* 202(3): 849-854.
- Alunni, B., Z. Kevei, M. Redondo-Nieto, A. Kondorosi, P. Mergaert és E. Kondorosi (2007). "Genomic organization and evolutionary insights on GRP and NCR genes, two large nodule-specific gene families in *Medicago truncatula*." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20(9): 1138-1148.
- Auerbach, D., S. Thaminy, M. O. Hottiger és I. Stagljar (2002). "The post-genomic era of interactive proteomics: Facts and perspectives." *Proteomics* 2(6): 611-623.
- Barra-Bily, L., S. P. Pandey, A. Trautwetter, C. Blanco és G. C. Walker (2010). "The Sinorhizobium meliloti RNA Chaperone Hfq Mediates Symbiosis of *S. meliloti* and Alfalfa." *Journal of Bacteriology* 192(6): 1710-1718.
- Bechinger, B. és K. Lohner (2006). "Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides." *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1758(9): 1529-1539.
- Becker, A., H. Berges, E. Krol, C. Bruand, S. Ruberg, D. Capela, E. Lauber, E. Meilhoc, F. Ampe, F. J. de Bruijn, J. Fourment, A. Francez-Charlot, D. Kahn, H. Kuster, C. Liebe, A. Puhler, S. Weidner és J. Batut (2004). "Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions." *Mol Plant Microbe Interact* 17(3): 292-303.
- Bisseling, T., R. C. Vandenbos, A. Vankammen, M. Vanderploeg, P. Vanduijn és A. Houwers (1977). "Cytofluorometrical Determination of DNA Contents of Bacteroids and Corresponding Broth-Cultured Rhizobium Bacteria." *Journal of General Microbiology* 101(Jul): 79-84.
- Brewin, N. J. (2004). "Plant cell wall remodelling in the rhizobium-legume symbiosis." *Critical Reviews in Plant Sciences* 23(4): 293-316.
- Brito, R. M. és W. L. Vaz (1986). "Determination of the critical micelle concentration of surfactants using the fluorescent probe N-phenyl-1-naphthylamine." *Anal Biochem* 152(2): 250-255.
- Brogden, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" *Nature Reviews Microbiology* 3(3): 238-250.
- Butland, G., J. M. Peregrin-Alvarez, J. Li, W. H. Yang, X. C. Yang, V. Canadien, A. Starostine, D. Richards, B. Beattie, N. Krogan, M. Davey, J. Parkinson, J. Greenblatt és A. Emili (2005). "Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*." *Nature* 433(7025): 531-537.
- Butt, H. J. és M. Jaszke (1995). "Calculation of Thermal Noise in Atomic-Force Microscopy." *Nanotechnology* 6(1): 1-7.
- Catalano, C. M., K. J. Czymmek, J. G. Gann és D. J. Sherrier (2007). "*Medicago truncatula* syntaxin SYP132 defines the symbiosome membrane and infection droplet membrane in root nodules." *Planta* 225(3): 541-550.

- Catalano, C. M., W. S. Lane és D. J. Sherrier (2004). "Biochemical characterization of symbiosome membrane proteins from *Medicago truncatula* root nodules." *Electrophoresis* 25(3): 519-531.
- Cermola, M., E. Fedorova, R. Tate, A. Riccio, R. Favre és E. J. Patriarca (2000). "Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli* *Phaseolus vulgaris* symbiosis." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(7): 733-741.
- Chen, X. J., F. Niyonsaba, H. Ushio, D. Okuda, I. Nagaoka, S. Ikeda, K. Okumura és H. Ogawa (2005). "Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*." *Journal of Dermatological Science* 40(2): 123-132.
- Cheng, J. J., C. D. Sibley, R. Zaheer és T. M. Finan (2007). "A *Sinorhizobium meliloti* minE mutant has an altered morphology and exhibits defects in legume symbiosis." *Microbiology-Sgm* 153: 375-387.
- Chien, C. T., P. L. Bartel, R. Sternglanz és S. Fields (1991). "The 2-Hybrid System - a Method to Identify and Clone Genes for Proteins That Interact with a Protein of Interest." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(21): 9578-9582.
- Coque, L., P. Neogi, C. Pislariu, K. A. Wilson, C. Catalano, M. Avadhani, D. J. Sherrier és R. Dickstein (2008). "Transcription of ENOD8 in *Medicago truncatula* nodules directs ENOD8 esterase to developing and mature symbiosomes." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(4): 404-410.
- Crespi, M. és F. Frugier (2008). "De Novo Organ Formation from Differentiated Cells: Root Nodule Organogenesis." *Science Signaling* 1(49).
- Crespi, M. és S. Galvez (2000). "Molecular mechanisms in root nodule development." *Journal of Plant Growth Regulation* 19(2): 155-166.
- Czernic, P., D. Gully, F. Cartieaux, L. Moulin, I. Guefrachi, D. Patrel, O. Pierre, J. Fardoux, C. Chaintreuil, P. Nguyen, F. Gressent, C. Da Silva, J. Poulain, P. Wincker, V. Rofidal, S. Hem, Q. Barriere, J. F. Arrighi, P. Mergaert és E. Giraud (2015). "Convergent Evolution of Endosymbiont Differentiation in Dalbergioid and Inverted Repeat-Lacking Clade Legumes Mediated by Nodule-Specific Cysteine-Rich Peptides." *Plant Physiology* 169(2): 1254-1265.
- Dallmann, G., F. Marincs, P. Papp, M. Gaszner és L. Orosz (1991). "The Isolated N-Terminal DNA-Binding Domain of the C-Repressor of Bacteriophage-16-3 Is Functional in DNA-Binding In vivo and In vitro." *Molecular & General Genetics* 227(1): 106-112.
- Daugelavičius, R., E. Bakiene és D. H. Bamford (2000). "Stages of Polymyxin B Interaction with the *Escherichia coli* Cell Envelope." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44(11): 2969-2978.
- Djordjevic, M. A. (2004). "*Sinorhizobium meliloti* metabolism in the root nodule: A proteomic perspective." *Proteomics* 4(7): 1859-1872.
- Durgo, H., E. Klement, E. Hunyadi-Gulyas, A. Szucs, A. Kereszt, K. F. Medzihradzsky és E. Kondorosi (2015). "Identification of nodule-specific cysteine-rich plant peptides in endosymbiotic bacteria." *Proteomics* 15(13): 2291-2295.
- Dusha, I., S. Kovalenko, Z. Banfalvi és A. Kondorosi (1987). "*Rhizobium-Meliloti* Insertion Element Isrm2 and Its Use for Identification of the Fixx Gene." *Journal of Bacteriology* 169(4): 1403-1409.
- Farkas, A., G. Maroti, H. Durgo, Z. Gyorgypal, R. M. Lima, K. F. Medzihradzsky, A. Kereszt, P. Mergaert és E. Kondorosi (2014). "*Medicago truncatula* symbiotic peptide NCR247 contributes to bacteroid differentiation through multiple mechanisms." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(14): 5183-5188.
- Fedorova, M., J. van de Mortel, P. A. Matsumoto, J. Cho, C. D. Town, K. A. VandenBosch, J. S. Gantt és C. P. Vance (2002). "Genome-wide identification of nodule-specific

- transcripts in the model legume *Medicago truncatula*." *Plant Physiology* 130(2): 519-537.
- Ferenczi, S., L. Orosz és P. P. Papp (2006). "Repressor of phage 16-3 with altered binding specificity indicates spatial differences in repressor-operator complexes." *Journal of Bacteriology* 188(4): 1663-1666.
- Ferguson, G. P., A. Datta, R. W. Carlson és G. C. Walker (2005). "Importance of unusually modified lipid A in *Sinorhizobium* stress resistance and legume symbiosis." *Molecular Microbiology* 56(1): 68-80.
- Fields, S. és O. K. Song (1989). "A Novel Genetic System to Detect Protein Protein Interactions." *Nature* 340(6230): 245-246.
- Florin, E. L., M. Rief, H. Lehmann, M. Ludwig, C. Dornmair, V. T. Moy és H. E. Gaub (1995). "Sensing Specific Molecular-Interactions with the Atomic-Force Microscope." *Biosensors & Bioelectronics* 10(9-10): 895-901.
- Galizzi, A., A. G. Siccardi és G. Mazza (1975). "Mode of Action of Polymyxin-B - Physiological Studies with a *Bacillus-Subtilis*-Resistant Mutant." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 8(3): 366-369.
- Gazit, E., A. Boman, H. G. Boman és Y. Shai (1995). "Interaction of the Mammalian Antibacterial Peptide Cecropin P1 with Phospholipid-Vesicles." *Biochemistry* 34(36): 11479-11488.
- Gibson, K. E., H. Kobayashi és G. C. Walker (2008). "Molecular determinants of a symbiotic chronic infection." *Annu Rev Genet* 42: 413-441.
- Glazebrook, J., A. Ichige és G. C. Walker (1993). "A *Rhizobium-Meliloti* Homolog of the *Escherichia-Coli* Peptide Antibiotic Transport Protein *Sbma* Is Essential for Bacteroid Development." *Genes & Development* 7(8): 1485-1497.
- Govezensky, D., T. Greener, G. Segal és A. Zamir (1991). "Involvement of *GroEL* in *Nif* Gene-Regulation and Nitrogenase Assembly." *Journal of Bacteriology* 173(20): 6339-6346.
- Gubler, M., T. Zurcher és H. Hennecke (1989). "The *Bradyrhizobium japonicum* *fixBCX* operon: identification of *fixX* and of a 5' mRNA region affecting the level of the *fixBCX* transcript." *Mol Microbiol* 3(2): 141-148.
- Guefrachi, I., O. Pierre, T. Timchenko, B. Alunni, Q. Barriere, P. Czernic, J. A. Villaecija-Aguilar, C. Verly, M. Bourge, J. Fardoux, M. Mars, E. Kondorosi, E. Giraud és P. Mergaert (2015). "*Bradyrhizobium BclA* Is a Peptide Transporter Required for Bacterial Differentiation in Symbiosis with *Aeschynomene* Legumes." *Mol Plant Microbe Interact* 28(11): 1155-1166.
- Guo, D., M. L. Rajamaki és J. Valkonen (2008). "Protein-protein interactions: the yeast two-hybrid system." *Methods Mol Biol* 451: 421-439.
- Haag, A. F., M. Baloban, M. Sani, B. Kerscher, O. Pierre, A. Farkas, R. Longhi, E. Boncompagni, D. Herouart, S. Dall'angelo, E. Kondorosi, M. Zanda, P. Mergaert és G. P. Ferguson (2011). "Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis." *PLoS Biol* 9(10): e1001169.
- Haag, A. F., M. Baloban, M. Sani, B. Kerscher, O. Pierre, A. Farkas, R. Longhi, E. Boncompagni, D. Héroutart és S. Dall'Angelo (2011). "Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis." *PLoS biology* 9(10): e1001169.
- Hale, J. D. és R. E. Hancock (2007). "Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria." *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 5(6): 951-959.
- Hancock, R. E. és A. Patrzykat (2002). "Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics." *Curr Drug Targets Infect Disord* 2(1): 79-83.
- Hancock, R. E. W. (1997). "Peptide antibiotics." *Lancet* 349(9049): 418-422.

- Held, M., M. S. Hossain, K. Yokota, P. Bonfante, J. Stougaard és K. Szczyglowski (2010). "Common and not so common symbiotic entry." *Trends Plant Sci* 15(10): 540-545.
- Holm, C. (1993). "A functional approach to identifying yeast homologs of genes from other species. ." *In Methods: A Companion to Methods in Enzymology*(5): 102–109.
- Horvath, B., A. Domonkos, A. Kereszt, A. Szucs, E. Abraham, F. Ayaydin, K. Boka, Y. Chen, R. Chen, J. D. Murray, M. K. Udvardi, E. Kondorosi és P. Kalo (2015). "Loss of the nodule-specific cysteine rich peptide, NCR169, abolishes symbiotic nitrogen fixation in the *Medicago truncatula* dnf7 mutant." *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(49): 15232-15237.
- House, B. L., M. W. Mortimer és M. L. Kahn (2004). "New recombination methods for *Sinorhizobium meliloti* genetics." *Applied and Environmental Microbiology* 70(5): 2806-2815.
- Humann, J. L., B. K. Schroeder, M. W. Mortimer, B. L. House, S. N. Yurgel, S. C. Maloney, K. L. Ward, H. M. Fallquist, H. T. Ziemkiewicz és M. L. Kahn (2008). "Construction and Expression of Sugar Kinase Transcriptional Gene Fusions by Using the *Sinorhizobium meliloti* ORFeome." *Applied and Environmental Microbiology* 74(21): 6756-6765.
- Hutter, J. L. és J. Bechhoefer (1993). "Calibration of Atomic-Force Microscope Tips." *Review of Scientific Instruments* 64(7): 1868-1873.
- Ishihara, H., H. Koriyama, A. Osawa, G. Zehirov, M. Yamaura, K. Kucho, M. Abe, S. Higashi, E. Kondorosi, P. Mergaert és T. Uchiumi (2011). "Characteristics of Bacteroids in Indeterminate Nodules of the Leguminous Tree *Leucaena glauca*." *Microbes and Environments* 26(2): 156-159.
- Ito, T., T. Chiba, R. Ozawa, M. Yoshida, M. Hattori és Y. Sakaki (2001). "A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(8): 4569-4574.
- Ito, T., T. Chiba és M. Yoshida (2001). "Exploring the protein interactome using comprehensive two-hybrid projects." *Trends in Biotechnology* 19(10): S23-S27.
- Jenssen, H., P. Hamill és R. E. W. Hancock (2006). "Peptide antimicrobial agents." *Clinical Microbiology Reviews* 19(3): 491-+.
- Jones, K. M., H. Kobayashi, B. W. Davies, M. E. Taga és G. C. Walker (2007). "How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model." *Nat Rev Microbiol* 5(8): 619-633.
- Kaiser, B. N., S. Moreau, J. Castelli, R. Thomson, A. Lambert, S. Bogliolo, A. Puppo és D. A. Day (2003). "The soybean NRAMP homologue, GmDMT1, is a symbiotic divalent metal transporter capable of ferrous iron transport." *Plant J* 35(3): 295-304.
- Kardailsky, I. V., D. J. Sherrier és N. J. Brewin (1996). "Identification of a new pea gene, PsNlec1, encoding a lectin-like glycoprotein isolated from the symbiosomes of root nodules." *Plant Physiology* 111(1): 49-60.
- Kereszt, A., P. Mergaert és E. Kondorosi (2011). "Bacteroid Development in Legume Nodules: Evolution of Mutual Benefit or of Sacrificial Victims?" *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(11): 1300-1309.
- Kereszt, A., P. Mergaert, G. Maroti és E. Kondorosi (2011). "Innate immunity effectors and virulence factors in symbiosis." *Current Opinion in Microbiology* 14(1): 76-81.
- Kim, M., Y. Chen, J. Xi, C. Waters, R. Chen és D. Wang (2015). "An antimicrobial peptide essential for bacterial survival in the nitrogen-fixing symbiosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(49): 15238-15243.
- Krusell, L., K. Krause, T. Ott, G. Desbrosses, U. Kramer, S. Sato, Y. Nakamura, S. Tabata, E. K. James, N. Sandal, J. Stougaard, M. Kawaguchi, A. Miyamoto, N. Suganuma és M. K. Udvardi (2005). "The sulfate transporter SST1 is crucial for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* root nodules." *Plant Cell* 17(5): 1625-1636.

- Latch, J. N. és W. Margolin (1997). "Generation of buds, swellings, and branches instead of filaments after blocking the cell cycle of *Rhizobium meliloti*." *Journal of Bacteriology* 179(7): 2373-2381.
- Leong, S. A., P. H. Williams és G. S. Ditta (1985). "Analysis of the 5' Regulatory Region of the Gene for Delta-Aminolevulinic-Acid Synthetase of *Rhizobium-Meliloti*." *Nucleic Acids Research* 13(16): 5965-5976.
- Limpens, E., S. Ivanov, W. van Esse, G. Voets, E. Fedorova és T. Bisseling (2009). "Medicago N<sub>2</sub>-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity." *Plant Cell* 21(9): 2811-2828.
- Liu, J. Q., S. S. Miller, M. Graham, B. Bucciarelli, C. M. Catalano, D. J. Sherrier, D. A. Samac, S. Ivashuta, M. Fedorova, P. Matsumoto, J. S. Gantt és C. P. Vance (2006). "Recruitment of novel calcium-binding proteins for root nodule symbiosis in *Medicago truncatula*." *Plant Physiology* 141(1): 167-177.
- Madsen, L. H., L. Tirichine, A. Jurkiewicz, J. T. Sullivan, A. B. Heckmann, A. S. Bek, C. W. Ronson, E. K. James és J. Stougaard (2010). "The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*." *Nat Commun* 1: 10.
- Marchetti, M., O. Catrice, J. Batut és C. Masson-Boivin (2011). "Cupriavidus taiwanensis Bacteroids in *Mimosa pudica* Indeterminate Nodules Are Not Terminally Differentiated." *Applied and Environmental Microbiology* 77(6): 2161-2164.
- Maroti, G., A. Kereszt, E. Kondorosi és P. Mergaert (2011). "Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals." *Research in Microbiology* 162(4): 363-374.
- Matsuzaki, K., O. Murase, N. Fujii és K. Miyajima (1996). "An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation." *Biochemistry* 35(35): 11361-11368.
- Maunoury, N., M. Redondo-Nieto, M. Bourcy, W. Van de Velde, B. Alunni, P. Laporte, P. Durand, N. Agier, L. Marisa, D. Vaubert, H. Delacroix, G. Duc, P. Ratet, L. Aggerbeck, E. Kondorosi és P. Mergaert (2010). "Differentiation of Symbiotic Cells and Endosymbionts in *Medicago truncatula* Nodulation Are Coupled to Two Transcriptome-Switches." *Plos One* 5(3).
- Meade, H. M., S. R. Long, G. B. Ruvkun, S. E. Brown és F. M. Ausubel (1982). "Physical and Genetic-Characterization of Symbiotic and Auxotrophic Mutants of *Rhizobium-Meliloti* Induced by Transposon Tn5 Mutagenesis." *Journal of Bacteriology* 149(1): 114-122.
- Mergaert, P., K. Nikovics, Z. Kelemen, N. Maunoury, D. Vaubert, A. Kondorosi és E. Kondorosi (2003). "A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs." *Plant Physiology* 132(1): 161-173.
- Mergaert, P., T. Uchiumi, B. Alunni, G. Evanno, A. Cheron, O. Catrice, A. E. Mausset, F. Barloy-Hubler, F. Galibert, A. Kondorosi és E. Kondorosi (2006). "Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium-legume* symbiosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(13): 5230-5235.
- Miller, J. H. (1972). "Experiments in molecular genetics."
- Milona, P., C. L. Townes, R. M. Bevan és J. Hall (2007). "The chicken host peptides, gallinacins 4, 7, and 9 have antimicrobial activity against *Salmonella* serovars." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356(1): 169-174.
- Mogi, T. és K. Kita (2009). "Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics." *Cellular and Molecular Life Sciences* 66(23): 3821-3826.
- Moreau, S., R. M. Thomson, B. N. Kaiser, B. Trevaskis, M. L. Guerinot, M. K. Udvardi, A. Puppo és D. A. Day (2002). "GmZIP1 encodes a symbiosis-specific zinc transporter in soybean." *J Biol Chem* 277(7): 4738-4746.



- Nikaido, H. (1979). "Nonspecific transport through the outer membrane." *Bacterial outer membranes*. John Wiley & Sons, Inc., New York: 361-407.
- Novo, D., N. G. Perlmutter, R. H. Hunt és H. M. Shapiro (1999). "Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxycarbocyanine and a ratiometric technique." *Cytometry* 35(1): 55-63.
- Novo, D. J., N. G. Perlmutter, R. H. Hunt és H. M. Shapiro (2000). "Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(4): 827-834.
- Oke, V. és S. R. Long (1999). "Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis." *Current Opinion in Microbiology* 2(6): 641-646.
- Oldroyd, G. E. és J. A. Downie (2008). "Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes." *Annu Rev Plant Biol* 59: 519-546.
- Oono, R., I. Schmitt, J. I. Sprent és R. F. Denison (2010). "Multiple evolutionary origins of legume traits leading to extreme rhizobial differentiation." *New Phytologist* 187(2): 508-520.
- Ordogh, L., A. Voros, I. Nagy, E. Kondorosi és A. Kereszt (2014). "Symbiotic Plant Peptides Eliminate *Candida albicans* Both In Vitro and in an Epithelial Infection Model and Inhibit the Proliferation of Immortalized Human Cells." *Biomed Research International*.
- Otvos, L., I. O. M. E. Rogers, P. J. Consolvo, B. A. Condie, S. Lovas, P. Bulet és M. Blaszczyk-Thurin (2000). "Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides." *Biochemistry* 39(46): 14150-14159.
- Ou Yang, L. J., M. K. Udvardi és D. A. Day (1990). "Specificity and regulation of the dicarboxylate carrier on the peribacteroid membrane of soybean nodules." *Planta* 182(3): 437-444.
- Paau, A. S., J. Oro és J. R. Cowles (1979). "DNA Content of Free Living *Rhizobia* and Bacteroids of Various *Rhizobium*-Legume Associations." *Plant Physiology* 63(2): 402-405.
- Panter, S., R. Thomson, G. de Bruxelles, D. Laver, B. Trevaskis és M. Udvardi (2000). "Identification with proteomics of novel proteins associated with the peribacteroid membrane of soybean root nodules." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(3): 325-333.
- Papp, P. P., T. Nagy, S. Ferenczi, P. Elo, Z. Csiszovszki, Z. Buzas, A. Patthy és L. Orosz (2002). "Binding sites of different geometries for the 16-3 phage repressor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(13): 8790-8795.
- Park, C. B., M. S. Kim és S. C. Kim (1996). "A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*." *Biochem Biophys Res Commun* 218(1): 408-413.
- Penterman, J., R. P. Abo, N. J. De Nisco, M. F. F. Arnold, R. Longhi, M. Zanda és G. C. Walker (2014). "Host plant peptides elicit a transcriptional response to control the *Sinorhizobium meliloti* cell cycle during symbiosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(9): 3561-3566.
- Peschel, A. és H. G. Sahl (2006). "The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance." *Nature Reviews Microbiology* 4(7): 529-536.
- Pickering, B. S., H. Yudistira és I. J. Oresnik (2012). "Characterization of the Twin-Arginine Transport Secretome in *Sinorhizobium meliloti* and Evidence for Host-Dependent Phenotypes." *Applied and Environmental Microbiology* 78(19): 7141-7144.
- Pobigaylo, N., D. Wetter, S. Szymczak, U. Schiller, S. Kurtz, F. Meyer, T. W. Nattkemper és A. Becker (2006). "Construction of a large signature-tagged mini-Tn5 transposon library and its application to mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti*." *Applied and Environmental Microbiology* 72(6): 4329-4337.

- Popp, C. és T. Ott (2011). "Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis." *Current Opinion in Plant Biology* 14(4): 458-467.
- Powers, J. P. és R. E. Hancock (2003). "The relationship between peptide structure and antibacterial activity." *Peptides* 24(11): 1681-1691.
- Rivers, R. L., R. M. Dean, G. Chandy, J. E. Hall, D. M. Roberts és M. L. Zeidel (1997). "Functional analysis of nodulin 26, an aquaporin in soybean root nodule symbiosomes." *J Biol Chem* 272(26): 16256-16261.
- Roth, L. E. és G. Stacey (1989). "Bacterium Release into Host-Cells of Nitrogen-Fixing Soybean Nodules - the Symbiosome Membrane Comes from 3 Sources." *European Journal of Cell Biology* 49(1): 13-23.
- Roux, B., N. Rodde, M. F. Jardinaud, T. Timmers, L. Sauviac, L. Cottret, S. Carrere, E. Sallet, E. Courcelle, S. Moreau, F. Debelle, D. Capela, F. de Carvalho-Niebel, J. Gouzy, C. Bruand és P. Gamas (2014). "An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing." *Plant Journal* 77(6): 817-837.
- Saalbach, G., P. Erik és S. Wienkoop (2002). "Characterisation by proteomics of peribacteroid space and peribacteroid membrane preparations from pea (*Pisum sativum*) symbiosomes." *Proteomics* 2(3): 325-337.
- Salomon, R. A. és R. N. Farias (1992). "Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 174(22): 7428-7435.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch és T. Maniatis (1989). *Molecular cloning*, Cold spring harbor laboratory press New York.
- Schindler, P. R. és M. Teuber (1975). "Action of polymyxin B on bacterial membranes: morphological changes in the cytoplasm and in the outer membrane of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* B." *Antimicrob Agents Chemother* 8(1): 95-104.
- Scholar, E. és W. Pratt (2000). "Antibiotics that affect membrane permeability. Polymyxin B, colistin, Gramicidin A." *The antibacterial drugs. Oxford University Press, New York*: 234-241.
- Schroeder, B. K., B. L. House, M. W. Mortimer, S. N. Yurgel, S. C. Maloney, K. L. Ward és M. L. Kahn (2005). "Development of a functional genomics platform for *Sinorhizobium meliloti*: Construction of an ORFeome." *Applied and Environmental Microbiology* 71(10): 5858-5864.
- Sen, D., R. W. Weaver és A. K. Bal (1986). "Structure and Organization of Effective Peanut and Cowpea Root-Nodules Induced by Rhizobial Strain 32h1." *Journal of Experimental Botany* 37(176): 356-363.
- Shi, J. S., C. R. Ross, M. M. Chengappa és F. Blecha (1994). "Identification of a Proline-Arginine-Rich Antibacterial Peptide from Neutrophils That Is Analogous to Pr-39, an Antibacterial Peptide from the Small-Intestine." *Journal of Leukocyte Biology* 56(6): 807-811.
- Shimoda, Y., S. Shinpo, M. Kohara, Y. Nakamura, S. Tabata és S. Sato (2008). "A large scale analysis of protein-protein interactions in the nitrogen-fixing bacterium *Mesorhizobium loti*." *DNA Research* 15(1): 13-23.
- Sibley, C. D., S. R. MacLellan és T. Finan (2006). "The *Sinorhizobium meliloti* chromosomal origin of replication." *Microbiology-Sgm* 152: 443-455.
- Sprent, J. I. (2007). "Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation." *New Phytol* 174(1): 11-25.
- Stagljar, D. A. a. I. (2005). *Proteomics and Protein-Protein Interaction: Bology, Chemistry, Bioinformatics, and Drug Design*. New York, Springer.
- Storm, D. R., K. S. Rosenthal és P. E. Swanson (1977). "Polymyxin and related peptide antibiotics." *Annu Rev Biochem* 46: 723-763.

- Strahl, H. és L. W. Hamoen (2010). "Membrane potential is important for bacterial cell division." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(27): 12281-12286.
- Straus, S. K. és R. E. Hancock (2006). "Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides." *Biochim Biophys Acta* 1758(9): 1215-1223.
- Subbalakshmi, C. és N. Sitaram (1998). "Mechanism of antimicrobial action of indolicidin." *FEMS Microbiol Lett* 160(1): 91-96.
- Suganuma, N., Y. Nakamura, M. Yamamoto, T. Ohta, H. Koiwa, S. Akao és M. Kawaguchi (2003). "The Lotus japonicus Sen1 gene controls rhizobial differentiation into nitrogen-fixing bacteroids in nodules." *Molecular Genetics and Genomics* 269(3): 312-320.
- Sutton, W. D. és A. D. Paterson (1980). "Effects of the Plant Host on the Detergent Sensitivity and Viability of Rhizobium Bacteroids." *Planta* 148(3): 287-292.
- Szczyglowski, K., R. S. Shaw, J. Wopereis, S. Copeland, D. Hamburger, B. Kasiborski, F. B. Dazzo és F. J. de Bruijn (1998). "Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model legume Lotus japonicus." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11(7): 684-697.
- Tiricz, H., A. Szucs, A. Farkas, B. Pap, R. M. Lima, G. Maroti, E. Kondorosi és A. Kereszt (2013). "Antimicrobial Nodule-Specific Cysteine-Rich Peptides Induce Membrane Depolarization-Associated Changes in the Transcriptome of Sinorhizobium meliloti." *Applied and Environmental Microbiology* 79(21): 6737-6746.
- Tiricz, H., A. Szűcs, A. Farkas, B. Pap, R. M. Lima, G. Maróti, É. Kondorosi és A. Kereszt (2013). "Antimicrobial nodule-specific cysteine-rich peptides induce membrane depolarization associated changes in the transcriptome of Sinorhizobium meliloti." *Applied and environmental microbiology: AEM*. 01791-01713.
- Tyerman, S. D., L. F. Whitehead és D. A. Day (1995). "A Channel-Like Transporter for  $NH_4^+$  on the Symbiotic Interface of N-2-Fixing Plants." *Nature* 378(6557): 629-632.
- Udvardi, M. K. és D. A. Day (1997). "Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 493-523.
- Van de Velde, W., G. Zehirov, A. Szatmari, M. Debreczeny, H. Ishihara, Z. Kevei, A. Farkas, K. Mikulass, A. Nagy, H. Tiricz, B. Satiat-Jeunemaitre, B. Alunni, M. Bourge, K. Kucho, M. Abe, A. Kereszt, G. Maroti, T. Uchiumi, E. Kondorosi és P. Mergaert (2010). "Plant Peptides Govern Terminal Differentiation of Bacteria in Symbiosis." *Science* 327(5969): 1122-1126.
- Vasse, J., F. de Billy, S. Camut és G. Truchet (1990). "Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules." *J Bacteriol* 172(8): 4295-4306.
- Vincill, E. D., K. Szczyglowski és D. M. Roberts (2005). "GmN70 and LjN70. Anion transporters of the symbiosome membrane of nodules with a transport preference for nitrate." *Plant Physiol* 137(4): 1435-1444.
- Wang, D., J. Griffiths, C. Starker, E. Fedorova, E. Limpens, S. Ivanov, T. Bisseling és S. R. Long (2010). "A Nodule-Specific Protein Secretory Pathway Required for Nitrogen-Fixing Symbiosis." *Science* 327(5969): 1126-1129.
- Wetie, A. G. N., I. Sokolowska, A. G. Woods, U. Roy, J. A. Loo és C. C. Darie (2013). "Investigation of stable and transient protein-protein interactions: Past, present, and future." *Proteomics* 13(3-4): 538-557.
- White, J., J. Prell, E. K. James és P. Poole (2007). "Nutrient sharing between symbionts." *Plant Physiology* 144(2): 604-614.
- Wienkoop, S. és G. Saalbach (2003). "Proteome analysis. Novel proteins identified at the peribacteroid membrane from Lotus japonicus root nodules." *Plant Physiology* 131(3): 1080-1090.

- Wojciechowski, M. F., M. Lavin és M. J. Sanderson (2004). "A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analyses of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family." *American Journal of Botany* 91(11): 1846-1862.
- Wright, R., C. Stephens és L. Shapiro (1997). "The CcrM DNA methyltransferase is widespread in the alpha subdivision of proteobacteria, and its essential functions are conserved in *Rhizobium meliloti* and *Caulobacter crescentus*." *Journal of Bacteriology* 179(18): 5869-5877.
- Wu, M. H., E. Maier, R. Benz és R. E. W. Hancock (1999). "Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*." *Biochemistry* 38(22): 7235-7242.
- Yan, H. és R. E. W. Hancock (2001). "Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(5): 1558-1560.
- Yang, L., T. A. Harroun, W. T. Heller, T. M. Weiss és H. W. Huang (1998). "Neutron off-plane scattering of aligned membranes. I. Method of measurement." *Biophysical Journal* 75(2): 641-645.
- Zhang, L., P. Dhillon, H. Yan, S. Farmer és R. E. Hancock (2000). "Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* 44(12): 3317-3321.
- Zhou, J. C., Y. T. Tchan és J. M. Vincent (1985). "Reproductive capacity of bacteroids in nodules of *Trifolium repens* L. and *Glycine max* (L.) Merr." *Planta* 163(4): 473-482.

## 9. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Kereszt Attilának, hogy lehetőségem volt vezetése alatt számos molekuláris biológiai és mikrobiológiai technikátelsajátítani. Hálás vagyok türelméért, tanácsaiért, mellyel önálló kutatómunkára ösztönzött! Köszönöm lelkiismeretes munkáját, mellyel hozzájárult dolgozatom elkészítéséhez!

Köszönöm Prof. Dr. Kondorosi Évának, hogy lehetővé tette számomra, hogy részt vegyek a kutatótevékenységében, valamint észrevételeivel segítette munkámat!

Köszönet illeti Dr. Nagy Krisztinát az atomerő mikroszkópos kísérletekben nyújtott segítségéért!

Köszönöm Dr. Bogos Balázsnak a membránpotenciál mérésben nyújtott segítségét!

Köszönettel tartozom Dr. Ábrahám Editnek, hogy hihetetlen türelemmel vezetett be a fehérje munkák rejtelseibe!

Köszönöm Dr. Kovács Etelkának és Farkas Attilának, hogy segítségemre voltak a peptidek hatásmechanizmusának vizsgálatával kapcsolatos munkákban.

Köszönöm Dr. Tiricz Hildának és Dr. Ábrahám Editnek az élesztő két-hibrid rendszerrel kapcsolatos munkákban nyújtott segítségüket!

Hálával tartozom Dr. Kevei Zoltánnak és Dr. Dorjgotov Dulguunnak, hogy számos hasznos tanáccsal láttak el, mikor elakadtam a munkában!

Hálásan köszönöm Dr. Nagy Istvánnak és Vörös Andreának a sok tanácsot és biztatást!

Köszönöm Vincze Kontár Katalinnak és Dr. Nagy Andreának önzetlen segítségüket, és hogy mindig számíthattam rájuk!

Köszönettel tartozom Dr. Hunyadkürti Juditnak, Dr. Fábri-Ördögh Lillának és Dr. Boboescu Iuliannak a dolgozatírás során nyújtott technikai segítségükért és lelki támogatásukért!

Köszönöm munkatársaimnak, hogy a mindennapokban vidám hangulatot teremtettek a laboratóriumban!

Köszönöm a segítséget a volt Baygen Intézet valamennyi dolgozójának, valamint az új kollégáknak!

Valamint, nem utolsó sorban köszönettel tartozom családomnak a végtelen türelmükért, különösen gyermekeimnek, akik elfogadták szeszélyes viselkedésem a dolgozatírás folyamata során. Férjemnek és Édesanyámnak, akik az évek folyamán mindig bíztattak és hittek Bennem!

## 10. Publikációs lista

### A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Kata R. Mikuláss, Krisztina Nagy, Balázs Bogos, Zsolt Szegletes, Etelka Kovács, Attila Farkas, György Váró, Éva Kondorosi and Attila Kereszt (2016) „**Antimicrobial nodule-specific cysteine-rich peptides disturb the integrity of bacterial outer and inner membranes and cause loss of membrane potential**” *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 15:43

IP<sub>2015</sub>:2,083

### EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Van de Velde, W., G. Zehirov, A. Szatmari, M. Debreczeny, H. Ishihara, Z. Kevei, A. Farkas, K. Mikulass, A. Nagy, H. Tiricz, B. Satiat-Jeunemaitre, B. Alunni, M. Bourge, K. Kucho, M. Abe, A. Kereszt, G. Maroti, T. Uchiumi, E. Kondorosi és P. Mergaert (2010). "Plant Peptides Govern Terminal Differentiation of Bacteria in Symbiosis." *Science* 327(5969): 1122-1126.

IP<sub>2010</sub>: 31.364

Nagy K, Mikuláss KR, Végh AG, Kereszt A, Kondorosi É, Váró G, Szegletes Z (2015). „**Interaction of cysteine-rich cationic antimicrobial peptides with intact bacteria and model membranes.**” *Gen Physiol Biophys.* 34(2):135-44

IP<sub>2015</sub>: 0,875