

# **PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM**

Biológia Doktori Iskola

## **A kapszuláris poliszacharid bioszintézis és a 16-3 bakteriofág receptor *Sinorhizobium meliloti* 41 baktériumban**

**Ph.D. értekezés**

**Pálvölgyi Adrienn**

Témavezető:  
**Dr. Putnoky Péter**  
egyetemi tanár

**PÉCS, 2009**

# Tartalomjegyzék

	Oldalszám
<b>1. Bevezető</b>	5
<b>2. Irodalmi áttekintés</b>	7
2.1. A nitrogénkötés jelentősége	7
2.2. A szimbiózis kialakulása	8
2.3. A <i>Sinorhizobium meliloti</i> genomja	9
2.4. Sejtfelszíni poliszacharidok és a bioszintézisben fontos gének	12
2.4.1. Az exopoliszacharidok	13
2.4.2. A lipopoliszacharidok	14
2.4.3. A kapszuláris poliszacharidok	15
2.5. Bakteriofág receptorok	20
2.6. Rhizobium fágok	21
<b>3. A munka előzményei</b>	23
3.1. Az <i>rkpY</i> gén azonosítása és jellemzése az <i>rkp-3</i> régióban	24
3.2. A <i>I6-3</i> rhizobiofág receptorának azonosítása	24
<b>4. Célkitűzések</b>	26
<b>5. Anyagok és módszerek</b>	27
5.1. Baktériumok, bakteriofágok, plazmidok	27
5.2. Baktériumok növesztése	30
5.3. Fágok szaporítása	30
5.4. A baktériumok keresztezése	30
5.5. Fágérzékenységi teszt	31
5.6. Összes DNS izolálás	31
5.7. Plazmid DNS izolálás	31
5.8. Polimeráz láncreakció (PCR)	32
5.9. Fragmentizolálás	33
5.10. DNS szekvencia meghatározás	33
5.11. Restrikciós emésztés, kettős emésztés, tompa vég létrehozása	33
5.12. Gélelektroforézis	34
5.13. Kompetens sejt készítés	34
5.14. Ligálás	35
5.15. Transzformálás	35
5.16. <i>In vitro</i> transzpozíciós mutagenézis	36
5.17. KPS-LPS preparálás	36
5.18. DOC poliakrilamid gélelektroforézis (DOC-PAGE)	36
5.19. Szimbiotikus növényi teszt	37
5.20. Bioinformatikai módszerek	37
5.21. A kísérletek során felhasznált vegyszerek, enzimek	38

<b>6.</b>	<b>Kutatási eredmények</b>	39
6.1.	Receptorhibás baktérium mutánsok azonosítása	39
6.2.	Az <i>rkp-4046</i> mutáció helyének meghatározása	39
6.3.	A <i>I6-3</i> bakteriofág receptor kialakításában részt vesz az RkpM fehérje	42
6.4.	Az <i>rkpM<sub>4046</sub></i> allélban egy missense mutáció található	43
6.5.	A <i>I6-3</i> fágreceptornak több alkotója van	44
6.6.	Az RkpY fehérje fontos a fágfertőzésben	45
6.7.	Az <i>rkpY</i> régió bázissorrendjének meghatározása és elemzése	46
6.8.	Az <i>rkpY</i> régió genetikai elemzése	49
6.9.	Az <i>rkpZ</i> gén részt vesz az LMW poliszacharid termelésében	53
6.10.	Az RkpY gátolja a polyKDO termelést <i>S. meliloti</i> 1021 törzsben	55
6.11.	Az <i>rkpLMNOPQ</i> géncsoport előfordulása más baktériumokban	56
<b>7.</b>	<b>Eredmények megvitatása</b>	59
7.1.	A <i>I6-3</i> fágreceptor azonosítása <i>S. meliloti</i> 41 baktériumban	59
7.2.	A <i>S. meliloti</i> 41 baktérium kétféle kapszuláris poliszacharidot termel	63
7.3.	A bioinformatikai elemzések konklúziója	68
<b>8.</b>	<b>Összefoglalás</b>	71
<b>9.</b>	<b>Summary</b>	72
<b>10.</b>	<b>Melléklet</b>	73
10.1.	A különböző <i>S. meliloti rkp</i> mutánsok KPS fenotípusa	73
10.2.	Az <i>rkpL-Q</i> ortológ gének előfordulása más baktériumokban	74
10.3.	Az RkpL-Q fehérjék és homológjainak többszörös illesztése	75
10.3.1.	Az RkpL és a homológ fehérjék illesztése	75
10.3.2.	Az RkpM és a homológ fehérjék illesztése	76
10.3.3.	Az RkpN és a homológ fehérjék illesztése	78
10.3.4.	Az RkpO és a homológ fehérjék illesztése	79
10.3.5.	Az RkpP és a homológ fehérjék illesztése	80
10.3.6.	Az RkpQ és a homológ fehérjék illesztése	81
10.4.	A pszeudaminsav szintézis modellje	83
<b>11.</b>	<b>Irodalmi hivatkozások</b>	84
<b>12.</b>	<b>Publikációk</b>	95
<b>13.</b>	<b>Köszönetnyilvánítás</b>	96

## Rövidítések jegyzéke:

AC	accession number
Amp	ampicillin
bp	bázispár
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
DOC	deoxikólsav (Deoxycholic acid)
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EPS	exopoliszacharid
HMW	nagy molekula tömegű (High Molecular Mass)
kb	kilobázispár
Km	kanamicin
Kdo	keto-deoxy-oktozulonsav
KPS	kapszuláris poliszacharid
LMW	alacsony molekula tömegű (Low Molecular Mass)
LPS	lipopoliszacharid
Mb	megabázispár
nt	nukleotid
ORF	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
PAGE	poliakrilamid-gélelektroforézis
PCR	polimeráz láncreakció
polyKDO	keto-deoxy-oktozulonsav polimer (KDO homopolimer)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát (Sodium Dodecyl Sulphate)
Spc	spectinomycin
Str	streptomycin
Tc	tetraciklin
TEMED	N,N,N'N' tetrametilén-diamin
Tris	tris-(hidroxi-metil)-amino-metán

## 1. Bevezető

Az elmúlt közel száz évben a természettudományok gyors elméleti és technikai fejlődésének köszönhetően számos biológiai rendszer működését tárhattuk fel. Több organizmus vált úgynevezett modellszervezetté, melyek segítségével kezdetben alapvető, majd később finomabb biológiai jelenségeket, szabályokat és összefüggéseket tanulmányozhattunk és ismerhetünk meg ma is. Bár „egyszerű” szervezeteknek tűnnek, de a baktériumokon és - az élőlényeknek nem tekinthető - bakteriofágokon végzett kísérletek fontos alapjait teremtették meg a genetika tudományának, melyek tapasztalatai kiterjeszthetők a magasabbrendű eukarióta szervezetekre. Mindamellettt lehetővé tették a ma már igen elterjedt rekombináns DNS technológia kialakulását. Az 1940-es évekre is visszanyúló kutatásoknak köszönhetően az eddig legjobban ismert baktérium az *Escherichia coli*, mely ma már nem csak egy tanulmányozott objektum, hanem a molekuláris genetika fontos eszköze. Továbbá genomjának teljes DNS szekvenciája ismert. Az *E. coli* mellett számos más baktérium vizsgálata vált fontossá nemcsak az alapvető ismeretek szempontjából, hanem orvosi és mezőgazdasági vonatkozásban is. Ilyen organizmus a továbbiakban részletesen bemutatni kívánt szimbiotikus nitrogénkötésre képes *Sinorhizobium meliloti* baktérium, mely nem elhanyagolhatóan, részben magyar kutatók munkájának köszönhetően vált a növény-mikróba kapcsolat és nitrogénkötő szimbiózis egyik fontos modelljévé. Az elmúlt évtizedekben az *E. coli* baktérium tanulmányozása során felhalmozott tudás ellenére érdemes megfontolni, hogy ezen a modellszervezeten kívül milyen változatos a baktériumok világa és mennyivel több egyéb ismeretet is szerezhetünk általuk. Ahogy a későbbiekből is kiderül – talán az elfogultság ellenére is – erre igen jó példa a *Sinorhizobium meliloti*. Más rhizobiumokhoz hasonlóan génjeinek vizsgálata világossá teheti egyebek mellett, a már említett nitrogénkötő szimbiotikus partnerséget a rhizobiumok és pillangósvirágúak között, valamint a bakteriális patogenezishez kapcsolódó molekuláris folyamatokat. Ez azért is fontos, mert a rhizobiumok és pillangósvirágúak közötti szimbiózis létrejöttének mechanizmusa hasonló a patogén baktériumok és az eukarióta sejtek kapcsolódásához. Ezen kívül a szintén igen régóta tanulmányozott baktérium-bakteriofág kapcsolatról is további ismereteket szerezhetünk.

Csoportunk 2000-ben kezdte meg munkáját a Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Karának, Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszékén, Dr. Putnoky Péter vezetésével. Azon szerencsések közé tartozom, akik elsőként csatlakoztak diákkörös hallgatóként a kutatócsoport munkájához és kezdhették el tanszékünkön a genetikai munkát, a már régóta tanulmányozott és Magyarországon izolált *Sinorhizobium meliloti* 41 baktériumon.

A szimbiózis kialakítását igen sok tényező befolyásolhatja, egyik ilyen tényező a baktérium felszínén lévő kapszuláris poliszacharid is. Ez a poliszacharid nemcsak a növény általi felismerésben segíti a baktériumot, hanem a környezeti tényezőkhöz való alkalmazkodásban, valamint a bakteriofágok elleni védekezés egyik „fegyvere” is. A szimbiózisban betöltött szerepén túlmutatva, jelentősége a patogenitásban is megmutatkozik, hisz számos baktérium patogenitását határozza meg a poliszacharid erős antigén tulajdonságából adódóan. A *Sinorhizobium meliloti* 41 egy olyan poliszacharidot termel, mely analóg bizonyos patogén *Escherichia coli* törzsek által termelt K-antigénnel. Végeredményben ezek a vegyületszármazékok, melyek bioszintézise hasonló módon történik, változatos szerepet tölthetnek be baktériumokban: egyik esetben (*S. meliloti*) elősegítenek egyfajta kölcsönös együttélést (szimbiózist) a növényvel, másik esetben (*E. coli*) akár az ember számára veszélyes tulajdonsággal ruházza fel a baktériumot, komoly betegségeket okozva.

Jelen dolgozatom a csoportban töltött idő alatt végzett munka eredményeit öleli fel, mely a kapszuláris poliszacharid szimbiózisban, illetve a baktérium-fág felismerésben nyújtott szerepének vizsgálatára irányult.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A nitrogénkötés jelentősége

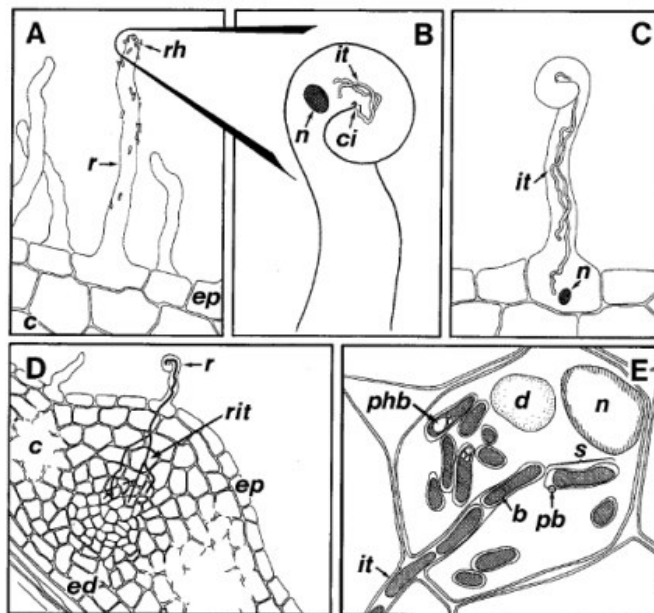
A növényekkel szimbiózist kialakító diazotróf baktériumok a légköri nitrogéngázt redukálják ammóniává, mely a növények egyik alapvető tápanyagforrása és amit eredendően a talajból kötött formában veszik fel. A kölcsönös együttélés egy szinte kimeríthetetlen nitrogén utánpótlást biztosít a gazdanövények számára (Burns and Hardy, 1975; Gage, 2004). A rhizobiumok a *Rhizobiaceae* családba tartozó Gram-negatív talajbaktériumok (*Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium*), melyek a gyökérgümő indukálásával endoszimbiózist tudnak kialakítani a pillangósvirágú (*Fabaceae*) növényekkel (Dénarié et al., 1992), illetve a nem pillangósvirágú *Parasponia* fajokkal (Becking, 1992).

A vizsgálatunk tárgyát képező *Sinorhizobium meliloti* (régőbbi nevén *Rhizobium meliloti*), endoszimbiotikus kapcsolatot képes kialakítani a lucerna (*Medicago*), lepkeszeg (*Trigonella*) és a somkóró (*Melilotus*) fajokkal (Dénarié et al., 1992). Az endoszimbiotikus nitrogénkötés partnerspecifikus módon jön létre. Ebben az esetben egy kölcsönösen hasznos együttéléstről van szó. A baktérium biológiailag hasznos, redukált nitrogénforrással látja el a növényt, míg a gazdanövény tápanyagot, illetve a nitrogénkötéshez szükséges energiát biztosít a baktérium számára (Allen and Allen, 1981).

A növényi kórokozók mellett, a szimbiotikus nitrogénkötésre képes baktériumok mezőgazdasági szempontból is jelentősek a növényekkel fennálló kapcsolataik szempontjából. Az összes biológiai úton történő nitrogénkötés 50%-át a rhizobiumok végzik, ezért igen fontos szerepük van a tápanyag körforgásában. A növények fejlődésére és életképességére irányuló pozitív hatásuk miatt hozzájárulhatnak egy fenntartható mezőgazdaság kialakításához is (Capela et al., 2001). Mindamelllett a növekvő nemzetközi környezetvédelmi igények miatt előtérbe kerültek a megújuló források, ezért a jövőben a biológiai nitrogénkötés fontos nitrogén forrás lehet a mezőgazdasági területen (Dixon and Wheeler 1986; Peoples et al., 1995). Ez a megoldás ökológiai szempontból előnyösebb, hisz a műtrágyázással szemben nem áll fenn a vízkészletek szennyezése vagy az élővizek eutrofizációja (Al-Sherif 1998). További előnyökkel szolgálhat a fosszilis üzemanyagok visszaszorításában, az újraerdősítésben és a nem használt területek produktivitásának visszaállításában (Burris, 1994; Sprent and Sprent 1990; Zahran, 1999).

## 2.2. A szimbiózis kialakulása

A szimbiózis kialakulása igen összetett folyamat, mely komplex molekuláris jelcserén alapszik. A gazdanövény különféle fajspecifikus, flavonoid típusú vegyületeket bocsájt ki a talajba (Redmond et al., 1986). Ez pozitív kemotaxist vált ki a baktériumokban, minek következményeként számuk megnövekedik a növény rhizoszférájában (Currier and Strobel, 1974). A flavonoidok aktiválják a baktériumsejtekben található ún. nodulációs (*nod*) gének expresszióját, aminek következtében a baktérium kiválaszt egy növényi inducert a Nod-faktort (Schultze et al., 1994). A szintén gazdaspecifikus Nod-faktornak, mely meghatározza, hogy a baktérium milyen növényt képes megfertőzni, fontos szerepe van a szimbiotikus gümő kifejlődésében. Különféle növényi választ, fejlődési változást indít el, mint a gümőmerisztéma kialakítása vagy az infekciós fonal növekedése (Dudley et al., 1987).



**1. ábra:** A gümő inváziója (Perret et al., 2000)

(A) A rhizobiumok kolonizálják a rhizoszférát (rh) és a gyökérszőrköz (r) tapadnak. (B) A Nod-faktor indukálja a gyökérszőrköz meggörbülését és lehetővé válik a baktériumok behatolása az infekciós központba (ci). A növényi sejtmag (n) megelőzi az infekciós fonalat (it). (C) A sejtmag (n) követi az infekciós fonal (it) növekedését a gyökérszőr alapjáig. (D) A kiépült infekciós fonal elágazik (rit) az osztódó kéreg sejtek által formált gümő primordium mellett. (E) A bakteroidok (b) kikerülnek az infekciós fonalból (it) és szimbiosómát hoznak létre (s) a gyökérszövetekben. A peribakteroid membránnal határolt bakteroidok poly- $\beta$  hidroxibutarát granulumokat (phb) akkumulálnak. c: kéreg, d: emésztő vakuolum, ep: epidermisz, ed: endodermisz.

A *Sinorhizobium meliloti* indeterminált gümőképződést indukál, melyre a belső kéregsejtek állandó merisztematikus aktivitása jellemző (Gage and Margolin, 2000). A nodulációt követően a fertőzési folyamat során a baktériumok a gyökérszőrközöz tapadnak



(Hirsch, 1992), melyet a növény által kiválasztott lektinek biztosítanak (Mills and Bauer, 1985). Ezután történik a gyökérszőrök meggömbülése, majd az infekciós fonál létrejötte (Diaz et al., 1989). Az invázió során a folyamatosan növekedő infekciós fonal segítségével jutnak el a baktériumok a gyökérszőrsejtekbe, majd végül a gümősejtek belsejébe (1. ábra). Az invázió egy újabb felismerési folyamatot jelent a növény számára, melyben fontos szerep jut a későbbiekben tárgyalt különféle sejtfelszíni poliszacharidoknak. Mialatt a növény gyökerén kialakul a külön növényi szervként funkcionáló gümő (Robertson and Lyttleton, 1982), a baktériumok fiziológiai és morfológiai változásokon mennek keresztül. A növényi gazdasejt citoplazmájába endocitózissal lépnek be, sejtorganellummá, ún. bakteroidokká alakulnak, melyek peribakteroid membránnal határoltak (Dudley et al., 1987).

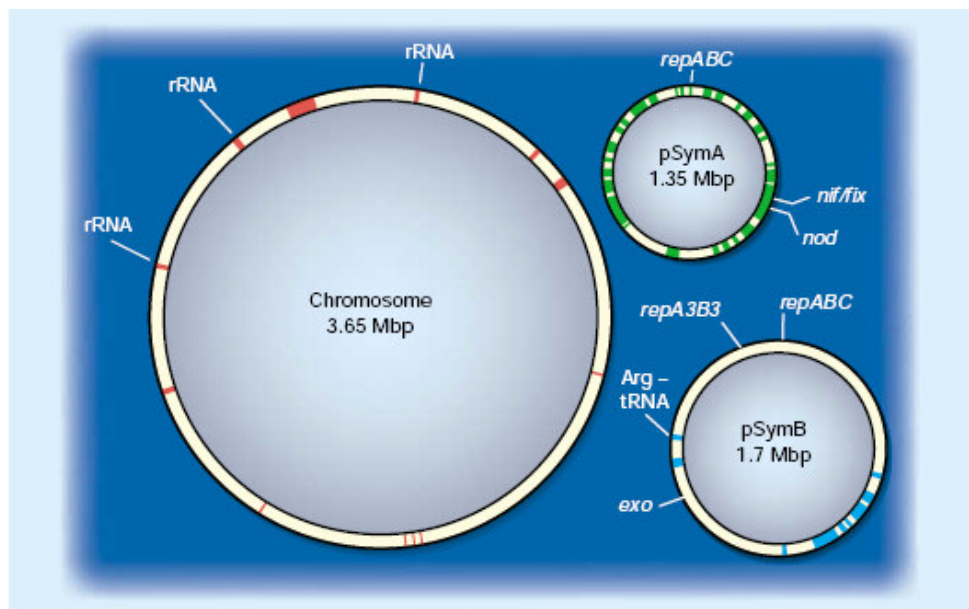
Miután megtörtént a baktériumok differenciálódása, megindul a nitrogénáz enzimkomplexet kódoló gének expressziója, így a szimbiotikus gümő alkalmassá válik a légköri nitrogén redukálására. A nitrogénkötés megfelelő működéséhez szükséges mikroaerob környezetet a növényi citoszolban lokalizálódó leghemoglobinnal biztosítja. A késői bakteriális gének közé tartoznak a *nif* és bizonyos *fix* gének, melyek a nitrogénkötést végző nitrogénáz enzimkomplex részeit, illetve a folyamathoz szükséges további fehérjéket kódolják (Mellor and Werner, 1987). Egyes *nif* gének mellett a nitrogénfixálás szabályozásában van fontos szerepe a *fixLJ*, illetve *fixK* géneknek melyek az alacsony oxigénszintet érzékelik és ennek megfelelően irányítják az enzimkomplexet alkotó fehérjék átíródását (Fischer, 1994). A nitrogénáz enzim segítségével a légköri nitrogéngáz ammóniává alakul a bakteroidban, majd a növény citoplazmájába jutva a glutamin-glutaminsav bioszintézisen keresztül épül be a szerves vegyületekbe, biztosítva a megfelelő nitrogénforrást a növény számára. A kölcsönös együttélésnek megfelelően a bakteroid részesül a növényi fotoszintézisből származó szacharózból, mely többek között a nitrogénkötéshez szükséges jelentős energiaigényt biztosítja.

### **2.3. A *Sinorhizobium meliloti* genomja**

A *Sinorhizobium meliloti* széles körben ismert 1021-es törzsének teljes genomi szekvenciája 2001-ben vált ismertté több kutatócsoport munkája nyomán. A baktérium teljes genomja egy 3,65 Mb nagyságú kromozómából (Capela et al., 2001) és két ún. megaplazmidból áll: az 1,35 Mb méretű pSymA (Barnett et al., 2001) és az 1,7 Mbp nagyságú pSymB plazmidből (Finan et al., 2001) (2. ábra). A három genomi komponens szekvenciájának részletes elemzéséből kirajzolódott annak génösszetétele, aminek eredményeként különböző összefüggések vonhatók le. Az összehasonlító genomika segítségével 6204 fehérjekódoló gént

azonosítottak a genomban. Továbbá a GC tartalom alapján „idegen eredetű”, utólagosan beépült régiókat lehet elkülöníteni, mivel egyes szakaszok az alap háztartási génektől eltérő GC tartalommal és kodonhasználattal rendelkeznek (Galibert et al., 2001).

A *S. meliloti* kromoszómája főként az ún. esszenciális háztartási géneket tartalmazza, melyek elengedhetetlenek a sejt működéséhez, a sejt osztódásához. Példaként említhető a különféle rRNS és tRNS molekulák létrehozása, valamint a nukleinsav és fehérje metabolizmus elemeinek kódolásához szükséges gének. Ezen kívül számos olyan genetikai információt is tartalmaz, melyek a környezeti adaptációhoz szükségesek, mint a mobilitás vagy a stressz válaszok. A GC tartalom vizsgálata alapján hat, valószínűleg idegen eredetű régiót azonosítottak. Ezek a teljes genom 2,2%-át kitevő inszerciós és bakteriofág elemek, valamint a horizontális géntranszfer során utólagosan beépült génrégiók, mint az ún. szimbiotikus szigetek (Capela et al., 2001).



**2. ábra:** A *S. meliloti* 1021 genomjának sematikus rajza (Downie and Young 2001)

Ellentétben a kromoszómával, a pSymA plazmid nem tartalmaz esszenciális géneket, hiányában a baktérium életképes. Ahogyan az elnevezése is utal rá, főként a szimbiózis kialakításához szükséges géneket tartalmazza, mint a *nod*, *nif*, *fix* gének, ezen kívül a környezeti adaptációhoz szükséges géneket (Barnett et al., 2001). A többi rhizobiumra jellemzően az inszerciós és bakteriofág elemek ezen a plazmidon találhatóak a legnagyobb arányban, a szimbiotikus régiók környékén. A jelenség bizonyítja, hogy ezen régiók hajlamosak a DNS átrendeződésre (Kaneko et al., 2000; Freiberg et al., 1997; Gottfert et al., 2001). Mindkét megaplazmid rendelkezik a plazmidoknál előforduló replikációs origóval és a *rep-ABC*

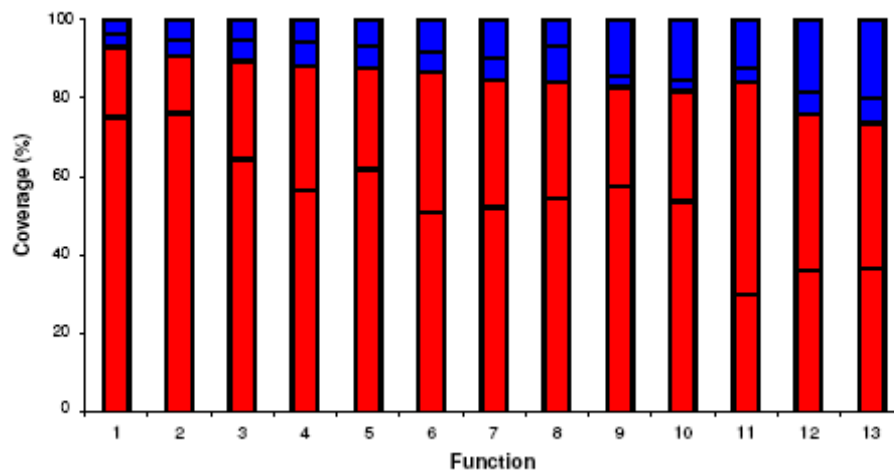
génekkkel, valamint a pSymA plazmid tartalmazza a konjugatív transzferért felelős géneket (*traACDG*) is.

A pSymB megaplazmidon találhatunk esszenciális géneket, mint például az arginin tRNS-t kódoló gént, a sejtosztódásért felelős *minCDE* és az aszparagin szintézisében fontos géneket. Már korábban is ismert volt, a *thiCOSGE* és *thiD* génekről, hogy hibájuk thiaminauxotrófiát okoz, ezért valóban esszenciálisak (Finan et al.; 1986). A gének sűrűsége hasonló a kromoszómához vagy a többi bakteriális genomhoz. A teljes genom 12%-át a transzport rendszert kódoló gének teszik ki, amelyek főként olyan fehérjéket kódolnak, melyek ATP kötő doménnel rendelkeznek (ABC-transzporterek). Az említett transzporter fehérjék a pSymB megaplazmidon is nagy arányban fordulnak elő. Számos olyan gént is tartalmaz, amely segíti a baktérium életben maradását a talajban, a rhizoszférában, és az endoszimbionta körülmények között, valamint hozzájárul, hogy a baktérium természetes élőhelyén versenyképes legyen. Ilyenek például a különböző sejtfelszíni poliszacharidok szintéziséért felelős géncsoportok (Finan et al., 2001; Galibert et al., 2001).

A két megaplazmid mérete alapján feltételezhetnénk, hogy külön-külön olyan ősi baktériumoktól származnak, melyeknek egyetlen kromoszómájuk volt. Amennyiben önmagában nézzük a kromoszóma összetételét, egy tipikus aerob heterotróf baktérium rajzolódik ki. A két megaplazmid lehetővé teszi, hogy a baktérium növelje metabolikus kapacitását és környezeti adaptációját. A pSymB plazmid megléte biztosítja, hogy a baktérium különböző vegyületeket tudjon metabolizálni a talajban és a rhizoszférában. Emellett a pSymA génjei által kolonizálódhat az alacsony oxigén tartalmú gümőben (Galibert et al., 2001). A gének számának szemszögéből nézve a genom mérete nagyobb, mint amire általánosan egy baktériumnak szüksége van, például az eukarióta élesztő hasonló számú génnel rendelkezik (Downie and Young 2001).

Guerrero és munkatársai evolúciós, strukturális és funkcionális összefüggések tekintetében, genomi összehasonlító elemzéseket végeztek a *Rhizobiales* rend fajai között, a *Sinorhizobium meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Mesorhizobium loti*, *Brucella melitensis* baktériumok genomi szekvenciájának segítségével. Azt a kérdést vetették fel, vajon van-e biológiai értelme a gének elrendeződésének a baktérium kromoszómáján? Elsősorban a szinténia jelenségét vizsgálták vagyis olyan géneket, géncsoportokat, melyek elrendeződése párhuzamos a különböző genomokban (Guerrero et al., 2005). Feltételezhető, hogy a fiziológiailag fontos géncsoportok pozitívan szelektálódnak és a szinténia megléte feltárhatja a gének funkcionális tulajdonságait (Tamames 2001). Azonban a rekombináció és a transzpozonok feldarabolják a szinténikus csoportokat, valamint a horizontális géntranszfer is megváltoztatja a gének

elrendezését (Doolittle 1999; Ochman et al., 2000). Az elemzések alapján, a szinténia konzervált egy relatív kromoszómális elrendezést, ami jellemző az *Enterobacteriales* rendre is (3. ábra). Ez általában igaz a létfontosságú génekre, ezzel ellentétben a nem létfontosságú géneknél ez a jelleg felbomlott és egy részük valószínű, hogy horizontális transzferrel került be a rhizobiumok genomjába, melyek a faj ökológiai niche-éhez való alkalmazkodást segítik elő (Guerrero et al., 2005). Ezek a tények is bizonyítják, hogy a baktérium sokoldalúságának köszönhetően képes többféle komplex környezetben élni.



**3. ábra:** A *S. meliloti*-*A. tumefaciens* szinténias és nem szinténias gének összehasonlításából származó funkciós csoportok kiterjedése (Guerrero et al., 2005)

X tengely: funkciós csoportok: 1) Transzkripció, 2) Transzláció, 3) Zsír- és foszfolipid metabolizmus, 4) Sejt burkok, 5) Kofaktorok, proszretikus csoportok és szállító molekulák szintézise, 6) Purin, pirimidin, nukleozid és nukleotid metabolizmus, 7) DNS metabolizmus, 8) Aminosav metabolizmus, 9) Sejt folyamatok, 10) Energia metabolizmus, 11) Transzport és ATP kötő fehérjék, 12) Szabályozó funkciók, 13) Központi közvetítő molekulák metabolizmusa. Az oszlopok piros, alsó része: szinténias gének a négy rhizobiumban; felső rész: szinténias gének a *S. meliloti*-*A. tumefaciens* összehasonlításban. Az oszlopok kék alsó része: nem szinténias gének a négy rhizobiumban; felső rész nem szinténias gének a *S. meliloti*-*A. tumefaciens* összehasonlításban. Y tengely: terjedelem %-ban.

#### 2.4. Sejtfelszíni poliszacharidok és a bioszintézisben fontos gének

A rhizobiumok sejtfelszíni poliszacharidjai kulcsszerepet játszanak a szimbiózis kialakulásának lépéseiben: az infekciós fonal növekedésében, a gümő inváziójában, és a gazdaspecificitásban, megvédik a baktériumot a környezeti ártalmakkal szemben (David et al., 1988). Továbbá az antimikrobiális anyagok termelésének gátlásával növényi védekezési mechanizmusokat is akadályozhatnak (Niehaus et al., 1997). A poliszacharidok jelentősége abban is megmutatkozik, hogy a bioszintézis gének közel 17%-át teszik ki a pSymB megaplazmidon található géneknek. Hasonló szerkezetű sejtfelszíni struktúrákat a patogén

baktériumoknál is találunk (Reuhs et al., 1998). Számos Gram-negatív baktériumhoz hasonlóan a *S. meliloti* különféle mucoid sejtfelszíni poliszacharidokat termel. Az exopoliszacharid (EPS) a külső környezetbe szekretálódik, elfojtja a növényi védelmi választ. A lipopoliszacharid (LPS) az infekció későbbi szakaszában lehet fontos, például az infekciós fonal növekedését segíti a gyökér kortikális sejtekig. A sejtmembrán körül található kapszuláris poliszacharid (KPS, K-antigén) a szimbiotikus felismerés korai szakaszában lényeges (Reuhs et al., 1993). A poliszacharidok szimbiózisban betöltött szerepére különböző infekcióban hibás (Inf<sup>-</sup>) baktérium mutáns vizsgálatával derítettek fényt. Ilyen mutánsok a gümő inváziójára képtelen baktériumok, melyek el tudják indítani a gümőfejlődést, de nem képesek bejutni annak belsejébe, “üres” gümők keletkeznek, illetve némely Fix<sup>-</sup> fenotípusú mutáns, mely a normális nitrogénkötésre alkalmatlan. A következőekben az EPS, LPS, de legfőképpen a KPS bioszintézisét, szerkezetét, funkcióját mutatom be.

#### 2.4.1. Az exopoliszacharidok

A *Rhizobium* fajok által termelt exopoliszacharidok (EPS) a sejt felszínén akkumulálódnak, majd a sejt környezetébe szekretálódnak. Három típusát ismerjük. Az egyik típus az EPS-I (másnéven savas EPS) (Kannenberg and Brewin, 1994), amely 7-9 hexóz származékból álló ismétlődő alegységek heteropolimere. Az alegységeken szukcinil, acetil és piruvil módosításokat tartalmaz. Savas jellegét az uronsav, szukcinát, piruvát elemek jelenlétének köszönheti. A *S. meliloti* által termelt savas exopoliszacharid (EPS-I) a szukcinoglikán, hét glükóz és egy galaktóz molekulát tartalmazó, ismétlődő alegységekből épül fel (Fraysse et al., 2003). Molekula tömeg alapján két fajtája ismert: az alacsony molekulatömegű (LMW) és nagy molekulatömegű (HMW) EPS (Reinhold et al., 1994). A szukcinoglikán poliszacharid szintézise négy lépésből áll, melyért a pSymB megaplazmidon elhelyezkedő *exo* gének felelősek. Első lépésként, az UDP-glükóz és UDP-galaktóz szintézise történik (pl. *exoB,C,N,Y*), majd egy sejtmembránba ágyazott lipid hordozó felszínén zajlik az ismétlődő oktoszacharid alegység szintézise nukleotid-cukorból (*exoF,J,A,L,M,N,O,U*). Következő lépésben az alegységek módosítása (szukcinil – *exoH*, acetil – *exoZ*, piruvil – *exoV*), majd legvégül az oktoszacharid alegységek polimerizációja, és a sejtfelszínre való szállítása történik (*exoP,T,Q*) (Reuber and Walker, 1993). Az exopoliszacharidnak alapvetően a nitrogén kötő gümő létrejöttében, az infekciós fonal kialakulásában van meghatározó szerepe (Leigh and Walker, 1994). A determinált gümő létrehozásában nem meghatározó, de az indeterminált gümő esetében létfontosságú, melyre a belső kéregsejtek állandó merisztematikus aktivitása jellemző (Gray et al., 1991).

Számos exopoliszacharid termelésében hibás *S. meliloti* törzs nem képes a növény inváziójára (Exo<sup>-</sup>, Inf<sup>-</sup> fenotípus), mert az infekciós fonalak abortálódnak a fejlődő gümő belsejében (Cheng and Walker, 1998; Gonzáles et al., 1998). A galaktozil-1-P transzferáz szintéziséért felelős *exoY* génben mutáns baktériumok vizsgálata rávilágított arra, hogy a szukcinoglükán nem fontos a gyökérszőr meggörbülésében és az infekciós fonal iniciációjában, de létfontosságú a fonal növekedésében. Az EPS-t termelő, de azon acetyl csoporttal nem rendelkező *exoZ*<sup>-</sup> és szukcinil csoport nélküli *exoH*<sup>-</sup> mutánsok vizsgálata is hasonló eredményre vezetett (Cheng and Walker, 1998). A másik, az EPS-II néven ismert poliszacharid a glükózt és galaktózt tartalmazó, diszacharid egységekből felépülő galaktoglükán. A bizonyos szerkezetű kapszuláris poliszacharidhoz hasonlóan képes helyettesíteni az EPS-I funkcióját, de kevésbé hatékonyan (Glazebrook and Walker, 1989; Petrovics et al., 1993; Putnoky et al., 1990).

Létezik egy harmadik exopoliszacharid csoport, melyet újabban különválasztanak az említett EPS-I és EPS-II poliszacharidoktól. A periplazmatikus térben található ciklikus  $\beta$ -glükánoknak, egyrészt a baktérium gyökérszőrökhöz való kapcsolódásában van szerepe, másrészt a növényi védekezési válaszok blokkolásában (Breedveld and Miller, 1994; Bhagwat et al., 1999). Szerkezetük  $\beta$ -1,2-glükán származék neutrális homopolimerje, melyen foszfoglicerol, foszfokolin és szukcinil módosítás van. Szintézisükért egyes *ndv* gének felelősek. Az *ndvB* a poliszacharid szintézisében, míg az *ndvA* a transzportban vesz részt. Az *ndv* mutánsok vizsgálata alapján kiderítették, hogy a szimbiózis kialakulásában valójában nem a poliszacharidnak van fő szerepe, hanem baktériumsejtek hipoozmotikus adaptációs képességének, melyet az említett gének biztosítanak (Dylan et al., 1990).

#### **2.4.2. A lipopoliszacharidok**

A lipopoliszacharidok (LPS) a Gram-negatív baktériumok sejtfelszínének fontos alkotóelemei, melyek a legfőbb védekező mechanizmust biztosítják a külső környezeti tényezőkkel szemben (Campbell et al., 2002). Mind a szimbiotikus rhizobiumok, mind a velük rokon baktériumok, mint az emlős sejteket fertőző patogén *Brucella* fajok esetében, a gazdasejtben való túléléshez lényeges az LPS megléte (LaVier et al., 2000; Ferguson et al., 2004). Szerkezetileg három egységre bonthatók. A külső foszfolipid membránba egy ún. horgonyzó molekulával, a lipidA egység segítségével rögzülnek, mely általában 2,3-diaminoglükóz egységből áll. Elsősorban 4-6  $\alpha$ -hidroxizsírsavat hordoz a glükózamin-diszacharid. Ehhez kapcsolódik Kdo (keto-deoxi-oktulonsav) szerkezetű molekulán keresztül egy konzerválódott "core" oligoszacharid, melyhez a törzsspecifikus, immunogén aktivitással rendelkező O-antigén kötődik. Az O-antigén uronsavat, heptózokat tartalmazhat, de általában

igen gazdag deoxi- és/vagy metildeoxi-cukor származékokban. A lipidA és a „core” oligoszacharid egységeket közösen tartalmazó LPS-t „rough” (R-LPS) formának nevezzük. Az O-antigén egységet is tartalmazó formát „smooth” LPS-nek (S-LPS) hívjuk.

A rhizobiumok által termelt LPS több tulajdonságban is eltérhet. A horgonyzó molekula különböző szerkezetű lehet és igen hosszú zsírsavlánccal rendelkezhet (Müller et al., 1988). A *Rhizobium sp.* NGR234-es törzsnél megfigyelték, hogy a szabadon élő forma főként R-LPS-el rendelkezik, mely nem tartalmazza a variabilitást okozó O-antigén, míg a S-LPS szintézise jelentősebb a flavonoid indukció során és a bakteriod formában (Reuhs et al., 2005). A baktériumot körülvevő környezet befolyásolhatja, hogy melyik forma jelenik meg a sejt felszínén.

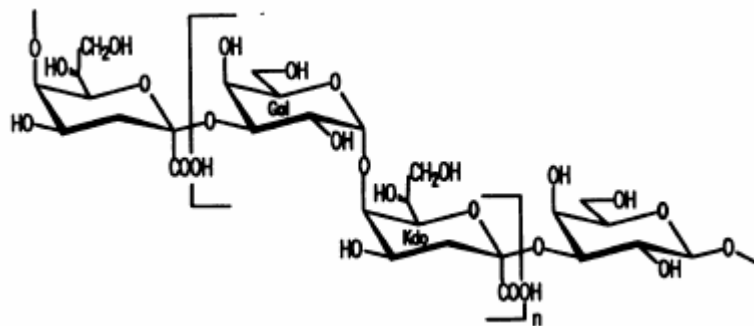
A *S. meliloti* LPS mutánsok szimbiózisra képesek a gazdanövénnyel, de a szimbiotikus kapcsolat lassabban alakul ki, mint a vad típusú baktériumok esetében (Kannenberg and Brewin, 1994). A megfelelő mutáns baktériumok hiánya miatt még nem teljesen ismert a lipopoliszacharid általános és szimbiotikus funkciója, bioszintézis génjei. A megfelelő ismeretek hiányának oka az is, hogy nem minden baktérium-növény kapcsolatnál fontos, inkább a partnerspecifikusságot határozza meg. Az *lpsB* génben mutáns baktériumok (Fix-fenotípus) esetében ilyen gazdaspecifikus funkciót mutattak ki. A mutánsok normál szimbiózist alakítanak ki a *M. sativa* növényvel, míg *M. truncatula* fajjal nem képesek (Lagares et al., 2001). Léteznek olyan baktérium törzsek is, mint például a *S. meliloti* 41 törzs, melyeknél az LPS nem játszik fontos szerepet a fertőzésben, vagy más struktúra veszi át a szerepét. Itt az R-LPS forma hiányozhat. Más rhizobium fajoknál azonban sok esetben előfordul, hogy csak az LPS bizonyul lényeges tényezőnek, míg a többi poliszacharid nem (Lagares et al., 1992).

*Rhizobium etli* baktériumban eddig három régiót azonosítottak, melyeknek szerepe van az LPS bioszintézisében. Az  $\alpha$  és  $\gamma$  régiók ( $\alpha$ -lps,  $\gamma$ -lps) a kromoszómán, a  $\beta$  régió ( $\beta$ -lps) plazmidon helyezkednek el (Noel, 1992). Az  $\alpha$ -lps az O-antigén és core oligoszacharid, a  $\beta$ -lps pedig csak a core oligoszacharid szintéziséért felelős (Cava et al., 1989). A lipidA molekula prekursora az UDP-N-acetil-glükózamin (UDP-GlcNA), melyet az *Escherichia coli* génjeihez hasonló gének alakítanak át Kdo<sub>2</sub>-lipid IV<sub>A</sub> molekulává, majd ebből alakul ki a rhizobiumokra jellemző szerkezetű lipidA (Price et al., 1995).

### 2.4.3. A kapszuláris poliszacharidok

Léteznek olyan rhizobiumok, melyek nem termelik egyik formájú exopoliszacharidot sem, mégis szimbiózist tudnak kialakítani a gazdanövénnyel. Ennek oka az, hogy ezek a baktériumok olyan kapszuláris poliszacharidot (KPS vagy K-antigén) termelnek, amely átveszi

az exopoliszacharid szerepét a szimbiózis kialakításában. Ilyen baktérium a *S. meliloti* 41 törzs *exoB* mutánsa (más néven AK631) (Putnoky et al., 1990). A K-antigén kiváltja a gazdanövény izoflavonoid bioszintézis génjeinek gyors indukcióját, beindítva a növényi felismerési folyamatokat (Becquart-de Kozak et al., 1997). A KPS, mint egy kapszula veszi körül a baktériumot, amely rezisztenciát biztosít egyes bakteriofágokkal szemben, védi a különféle abiotikus tényezőktől, mint a kiszáradás, valamint igen jelentős a szimbiotikus felismerés korai szakaszában (Petrovics et al., 1993; Putnoky et al., 1990). A lipopoliszacharid egy konzerválódott szerkezetű poliszacharid, ezzel ellentétben a KPS törzsspecifikus, sok variánsa fordul elő (Whitfield and Roberts 1999). A KPS szorosan kapcsolódik a baktérium felszínéhez és rendelkezik alacsony (LMW) és nagy (HMW) molekulatömegű típusal. Az említett *exoB* mutáció esetében a HMW KPS tudja helyettesíteni az EPS-t. A KPS szintézise során egy 8-15 egységből álló oligoszacharid szintetizálódik, majd polimerizálódik a HMW típus és exportálódik a sejtmembránon keresztül. A LMW KPS viszont membránhoz kötött poliszacharid (Reuhs et al., 1995).



**4. ábra:** A *S. fredii* USDA205 törzs  $K_{R1}$  antigén ismétlődő egységének (Kdops) elsődleges szerkezete (Reuhs et al., 1993)

A K-antigén széleskörben elterjedt a talajbaktériumokban. Rhizobiumokban először a *Sinorhizobium fredii* USDA205 törzsben izolálták (4. ábra) és kiderült, hogy strukturálisan analóg a különböző *E. coli* törzsek által termelt II-es típusú K-antigénekkal, amelyeknek a patogenitásban van szerepük (Forsberg and Reuhs, 1997; Reuhs, 1997). A hasonlóság a KPS magas Kdo tartalmára is utal. A II-es típusú K-antigének szintéziséért három gén régió felelős *E. coli* baktériumban. A törzsspecifikus alegységek szintéziséért felelős 2-es régió határozza meg a poliszacharid szerotípusát, glikoziltranszferázokat, speciális cukor nukleotid szintetázokat kódol (Roberts, 1996; Whitfield and Roberts, 1999). A másik két régió konzerválódott géneket tartalmaz: az 1-es régió a polimer exportjáért és transzlokációjáért felelős fehérje komplex elemeit kódolja (*kpsF*, *kpsE*, *kpsD*, *kpsU*, *kpsC*), míg a 3-as régió ABC transzportereket



tartalmaz (kpsT, kpsM). A polimer ABC-transzporter komplex segítségével jut át a sejtmembránon, majd  $\alpha$ -glicerofoszfát molekulákon keresztül ágyazódik a külső membránba (Silver et al., 2001).

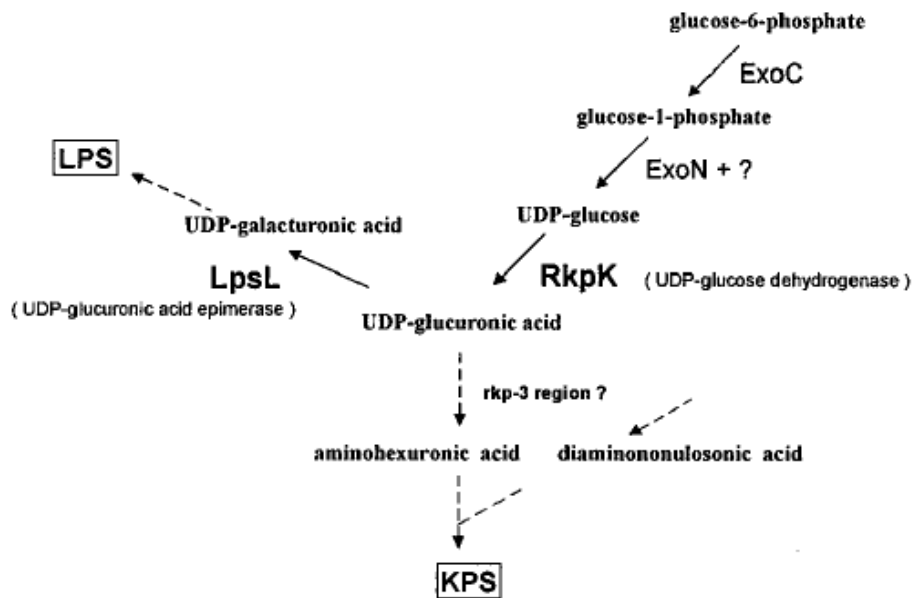
Az *E. coli* termelte KPS alkotóeleme a szialsav, mely a 9 szén atomot tartalmazó 2-keto-3-deoxi cukrok családjába tartozó vegyületek közé sorolható (Schauer et al., 1995). Ebbe a csoportba tartozik a rhizobiumok által termelt pszeudaminsav (Pse5,7Ac) vagy a 3-deoxi-D-manno-2-oktulozonsav (Kdo). A rhizobiumok kapszuláris poliszacharidjai tartalmaznak megegyező és eltérő egységeket, közös elemek a hexóz és 1-karboxi-2-keto-3-deoxi cukrokból álló ismétlődő egységek, különböznek a glikozil alegységek elrendezésében, a térszerkezetükben, a kapcsolódó oldalláncok mintázatában, molekula méretben (Reuhs et al., 1993; Reuhs et al., 1998; Reuhs et al., 1997). Számos Gram-negatív faj sejt felszíni struktúrájában találtak pszeudaminsavat, úgymint az LPS, KPS, flagellum és pilus alkotójaként.

A *S. meliloti* 41 törzse egy  $K_{R5}$  antigén néven ismert kapszuláris poliszacharidot termel, mely szimbiotikusan aktív. A  $K_{R5}$  antigén diszacharid alegységekből épül fel. Az alegység egy glükuronsavból és egy 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeoxi nonulozonsavból áll (pszeudaminsav, Pse), melyen 7-N-acetil és 5-N- $\beta$ -hidroxibutiril módosítások is találhatóak, rövidítve: [(5-OHBut, 7-NAcPse)-GlcA] (Reuhs et al., 1998; Rosenow et al., 1995). Az elmúlt évek kutatásai során három géncsoportot azonosítottak a *S. meliloti* 41 törzsben, melyek a KPS bioszintéziséért felelősek: ezek az *rkp-1*, *rkp-2*, és *rkp-3* régiók.

A kromoszómális *rkp-1* régióban (régebbi nevén *fix-23*) 10 gén található (*rkpA-J*). Az első tanulmány szerint a gének nagy része olyan fehérjéket kódol, melyek hasonlóak a különböző zsírsavszintézisben részt vevő enzimekkel, ezek a fehérjék a lipofil molekulák módosításában és szállításában játszanak szerepet (Petrovics et al., 1993). Az említett gének feladata - a feltételezések szerint - , hogy a K-antigén bioszintéziséhez szükséges lipid hordozót létrehozzák. Az RkpF esetében kísérletesen is bizonyították, hogy egy acil csoport szállító fehérje (Acyl carrier protein) (Epple et al., 1998). Az RkpJ fehérjének a kapszuláris poliszacharid transzportjában lehet szerepe, mivel az *E. coli* KpsS fehérjéjével homológ, melyet már részletesebben tanulmányoztak (Whitfield and Roberts 1999). Ha mutáció történik az említett génekben, akkor a KPS nem jelenik meg a baktérium felszínén, viszont a régióban nincsenek olyan gének, melyeknek a cukoralegységek bioszintézisében vagy a KPS polimerizációjában lenne szerepük (Petrovics et al., 1993; Kiss et al., 1997).

A kromoszómán található *rkp-2* régió két olyan génnel rendelkezik, melyek a vad típusú LPS kialakításához szükségesek. A bioinformatikai elemzések alapján az *lpsL* gén által kódolt fehérje egy UDP-glükuronsav epimeráz, mely a lipopoliszacharid bioszintézisében lehet fontos.

A másik fehérje, az RkpK valószínű, hogy egy UDP-glükóz dehidrogenáz, amely az UDP-glükóz UDP-glükuronsavvá oxidálását katalizálja. Az RkpK fehérje az LPS és a KPS bioszintézisében is fontos (Kereszt et al., 1998). A KPS illetve LPS bioszintézis útvonalban betöltött helyüket az 5. ábra szemlélteti.

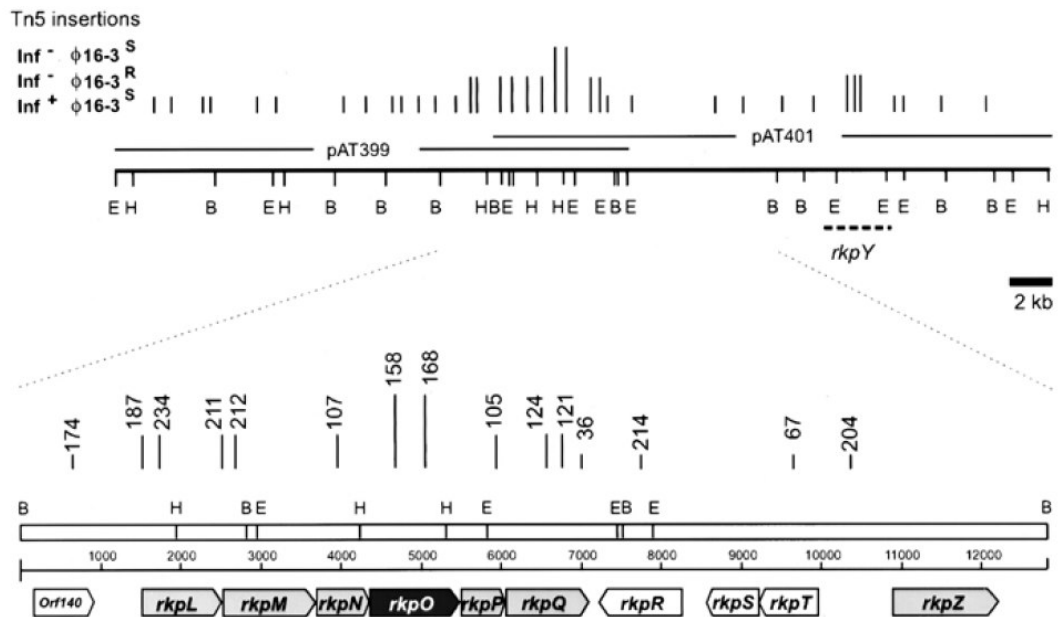


**5. ábra:** Az RkpK és LpsL fehérjék szerepe a lipopoliszacharid és kapszuláris poliszacharid szintézisében (Kereszt et al., 1998)

A pSymB megaplazmidon található *rkp-3* régióban eddig 10 gént (*rkpLMNOPQ*, *rkpRST*, *rkpZ*) azonosítottak, melyek pontos funkciója homológiák alapján feltételezett, még kísérletesen nem teljesen bizonyított. Az *rkp-1* és *rkp-2* régióban található gének általánosan előfordulnak a *Sinorhizobium* genusban, ezzel szemben az *rkp-3* régiót eddig csak a *S. meliloti* 41 törzsben azonosították (Kiss et al., 2001; 6. ábra). Az említett gének a KPS bioszintéziséért, és a sejtfelszínre való exportálásáért, valamint ezáltal a növény infekciójáért felelősek. A *S. meliloti* 41 törzsben feltételezhetően az egy poliszacharid operont alkotó *rkpL-Q* gének között vannak olyan gének, melyek homológiát mutatnak különféle transzferáz enzimet kódoló génekkel (például: *rkpM*, *rkpO*, *rkpP*).

Az *rkpLMNOPQ* gének feltételezett funkciója a cukor prekursorok bioszintézise a KPS polimer számára. Az *rkpLMNQ* gének feltehetően a pszeudaminav szintézisét végzik, az *rkpO* valószínűleg a pszeudaminav transzportjáért felelős. Külön csoportot alkotnak az *rkpR*, *rkpT*, *rkpS* génektől. A fehérje homológia vizsgálatok alapján a három gén feladata lehet az, hogy a KPS polimert transzportálják a citoplazmából a sejtfelszínre. Az *rkpT* és *rkpS* olyan szekvencia

motívummal rendelkeznek, mely specifikus az ABC transzporterek családjában. A régió utolsó génje a polimerizáció szabályozását biztosító *rkpZ*, melyet korábban *lpsZ* génként azonosítottak. Az RkpZ fehérje homológ az *E. coli* KpsC fehérjéjével, melyről tudjuk, hogy befolyása van a termelt KPS méretére és exportjára (Brzoska and Signer, 1991). Ez a gén lehetővé teszi, hogy a KPS LMW formája is termelődjön és ezzel biztosítsa a megfelelő szimbiotikus kapcsolat létrehozását (Reuhs et al., 1995).



**6. ábra:** A *S. meliloti* 41 *rkp-3* régiójának fizikai és genetikai térképe (Kiss et al., 2001)

Az ábra felső részében a két komplementáló kozmid klón (pAT399 és pAT401) látható, függőleges vonallal a Tn5 inszerciók vannak jelölve, a vonalak hosszúsága a fenotípust jelzi. Az ábra alsó felén az azonosított gének elhelyezkedése van feltüntetve.

Az előzőekben ismertetett poliszacharidok fontos feladatot tölthetnek be a baktérium-növény szimbiózis kialakulásában, a baktérium külső környezeti tényezők elleni védelmében, ahogyan a bakteriofágok elleni védekezésben is. Az EPS és KPS szerkezete nagymértékben különbözik, mégis azonos szerepük lehet a szimbiózisban. A *S. meliloti* AK631 törzsnél az EPS feladatát a kapszuláris poliszacharid veszi át. Ismeretes, hogy a baktérium és a gazdanövény közötti kapcsolat igen specifikus a poliszacharidok tekintetében is. Az, hogy alapvetően eltérő szerkezetű poliszacharidok helyettesíteni képesek egymást az invázió folyamatában arra utal, hogy a növény több független mechanizmussal is felismerheti a baktériumot.

A sejtfelszíni struktúrák tanulmányozásában, a bioszintézis gének azonosításában fontos eszközök lehetnek a törzsspecifikus bakteriofágok. A K<sub>R5</sub> antigén esetében a *I6-3* bakteriofág fontos szerepet játszott a bioszintézis gének feltérképezésében. Ezért a továbbiakban áttekintem

a fágfertőzéssel és fágreceptorokkal kapcsolatos eddigi kutatások eredményeit és azokból felállított elméleteket.

## 2.5. Bakteriofág receptorok

Ahogy a bevezetőben is említettük a baktériumok és bakteriofágok fontos modelljei, illetve eszközei a genetikai kutatásoknak. A baktériumok vírusai a bakteriofágok vagy röviden fágok a bioszféra legnépesebb tagjai (Brüssow and Hendrix, 2002). A legtöbb ismert fág ikozaéder alakú feji résszel és ehhez kapcsolódó farkirosttal rendelkezik (Caudovirales). Egyfajta nanomolekuláris gépezetek, melyek felismerik a gazdasejt felszínét és bejuttatják genomjukat a baktérium citoplazmájába, majd átprogramozzák a sejtet, hogy sokszorozza meg azt. A bakteriofágok a külső membránon található komponensekhez kapcsolódnak a fertőzési folyamat elején (Charbit and Hofnung, 1985; Hashemolhosseini et al., 1994a; Hashemolhosseini et al., 1994b; Wang et al., 2000). Például a különböző *E. coli* baktériumon izolált és leginkább tanulmányozott fágok közül a Mu (Sandulache et al., 1984) és  $\Phi$ X174 (Incardona et al., 1985) fág a lipopoliszacharidhoz kapcsolódik, míg a  $\lambda$  fág (Szmelcman és Hofnung, 1975), T6 (Schneider et al., 1993), és TLS (German és Misra 2001) fágok a LamB, Tsx, TolC külső membránfehérjékhez. A T2 (Lenski 1984) és T4 (Silverman és Benson 1987; Yu és Mizushima 1982) fágok lipopoliszacharidhoz és fehérjéhez is kötődhetnek. A fehérjék porin típusúak, fémionok felvételéért felelősek, fágok, toxinok, antibiotikumok receptorai (Nikaido 1994; Nieweg és Bremer 1997.).

Ismeretes, hogy egyes fágok specifikusan képesek felismerni bizonyos kapszuláris poliszacharidokat. Példaként említve a különböző K antigénnel rendelkező *E. coli* törzseken izolált K fágok (KPS specifikus, kapszula specifikus fágok), mint a K1 (Gross et al., 1977) vagy K5 kolifágok (Gupta et al., 1983). A fág farki részén lévő fehérjének enzimatis aktivitása van, mely degradálja a kapszuláris poliszacharidot, miáltal a fág kapcsolódhat a külső membránon lévő másodlagos receptorhoz. Endoglikozidáz vagy poliszacharid liáz segítségével bontják a KPS molekulákat (Hanfling et al., 1996). Ezen fehérjék kulcsfontosságúak a gazdaspecificitás tekintetében. A KPS nemcsak receptorként, hanem védelemként is szolgál más fágokkal szemben, melyek a kapszula alatti struktúrákat ismernék fel, viszont a kapszula egy fizikai akadályt jelent számukra, ahogyan ez a K1 poliszacharid esetében is fennáll. A T7 fág egy olyan farkirost fehérjét kódol, amely specifikusan képes felismerni és kötődni az LPS-hez, viszont a K1 poliszacharid blokkolja adszorbciját a baktériumhoz (Steven et al., 1988). Hasonló esetet leírtak más *E. coli* törzseben is ahol az LPS O-antigén láncá véd a fágreceptorként szolgáló külső membrán fehérjét (van der Ley et al., 1986) míg a

*Staphylococcus aureus* és *Streptococcus pneumoniae* kapszuláris poliszacharidja a fágfertőzést gátolja (Bernheimer és Tiraby et al., 1976; Wilkinson és Holmes 1978). Valószínűsíthető, hogy a természetben élő baktériumok kapszuláris poliszacharidjának fennmaradása nagyban köszönhető annak, hogy képes megvédeni a sejtet a fágoktól. A KPS sokfélesége és az ezt lebontani képes bakteriofágok diverzitása a baktériumok és fágok közötti „fegyverkezési verseny” eredménye lehet. Ez azt feltételezi, hogy a kapszula specifikus fágok kifejlesztették a depolimerizáció képességét, hogy ezáltal felülkerekedjenek a KPS fizikai akadályán. Sajnos azonban még kevés olyan tanulmány van, ahol kiderítették, hogy a KPS direkt módon blokkolja a fágadszorbcíót (Bernheimer és Tiraby et al., 1976; Ley et al., 1986; Wilkinson és Holmes 1978).

A bakteriofágok vizsgálata nem csak a patogenitás és a baktérium-fág felismerési folyamatok szempontjából jelentősek. A bakteriofágok fontos eszközei a különböző baktérium fajok közötti horizontális géncserének és részben megmagyarázzák az egy fajba tartozó baktérium törzsek közötti genetikai különbségeket is (Desiere et al., 2001; Lawrence et al., 2001).

## **2.6. Rhizobium fágok**

Számos alkalommal izoláltak már rhizobium fágokat vagyis ún. rhizobiofágokat talajból és szimbiotikus gümőből. A kísérletek kimutatták, hogy hatással vannak a gazdabaktériumok populációjának méretére és természetére, befolyásolják a rhizobium törzsek versengését a noduláció során és elősegítik a fágrezisztens szimbioták szelekcióját. A fágrezisztensé válás gyakran együtt jár az infekciós és szimbiotikus képességek elvesztésével. A talajban hasonló szelekciós aktivitás a teljes szántóföldi gyökér-gümő baktériumok populációjának nitrogénkötését csökkenti, így befolyásolják a pillangósvirágú gazdanövények növekedését is (Lawson et al., 1987).

A különböző kolifágokhoz hasonlóan, sejt felszíni poliszacharidot depolimerizáló fehérjéket találtak rhizobium fágoknál is, melyek feladata, hogy lebontsa a poliszacharidot mielőtt a fág kötődik a receptorhoz a sejt felszínén (Barnet and Humprey 1975; Higashi and Abe 1978).

A *Sinorhizobium meliloti* 41 törzs temperált, speciális transzdukáló fágja a 16-3 rhizobiofág, melyet Szende és Ördögh izolált Balatonberény környékén (Szende and Ordogh, 1960). A rhizobiumok fágjai közül részleteiben a legismertebb. Molekuláris tulajdonságaiban hasonlít a  $\lambda$  fágra. Meghatározták már fizikai és genetika térképét, részletesen tanulmányozták több gén és kromoszómális régió funkcióját (Orosz et al., 1973; Dallman et al., 1979; Dorgai et

al., 1981; Dorgai et al., 1983). A kutatások eredményeiből megismerhetjük a lizogenitásért felelős fő *c* represszort, valamint ennek operonját (Dallmann et al., 1987; Dallmann et al., 1991; Papp et al., 2002), a helyspecifikus rekombináció elemeit az *int*, *xis* géneket (Semsey et al., 1999), a fág DNS integrációjában szerepet játszó *attP* és *attB* régiókat, a homoimmun fágok ellen védettséget adó *immX* régiót (Csiszovszki et al., 2003). Egy ún. "host-range" mutáció izolálása és térképezése lehetőséget adhat arra is, hogy azonosítsuk a fágreceptort és tanulmányozhassuk a baktérium-fág felismerési folyamatot (Orosz and Sik, 1970).

### 3. A munka előzményei

Számos kutatócsoport jellemezte már a szimbiózis kialakulásában szerepet játszó növényi, illetve bakteriális géneket. A növény inváziójához szükséges bakteriális gének funkciójáról viszonylag még kevés ismerettel rendelkezünk, ezért az említett folyamat pontosabb megismerése érdekében, jónéhány infekcióban hibás (Inf<sup>-</sup>) *S. meliloti* mutánst izoláltak és jellemeztek már (Putnoky et al., 1988). Segítségükkel sikerült kimutatni, hogy a baktérium különböző poliszacharidjainak fontos szerepük van a szimbiózis kialakulásának inváziós szakaszában. Mindemellett leírták, hogy az EPS vagy bizonyos szerkezetű KPS jelenléte elengedhetetlen a funkcionális gümő kialakulásához (Putnoky et al., 1990; Petrovics et al., 1993; Kereszt et al., 1998).

Ahogy a bevezetőben is említettük a *S. meliloti* AK631 törzs nem termel exopoliszacharidot, mégis képes szimbiózist kialakítani a gazdanövényeivel, mivel a törzs által termelt KPS helyettesíteni tudja az exopoliszacharidot a gümőfejlődés során (Putnoky et al., 1990; Petrovics et al., 1993). Bizonyos vizsgálatok, melyeket több *S. meliloti* törzsen végeztek arra utalnak, hogy a kapszuláris poliszacharidoknak akár elsődleges szerepük is lehet az infekciós folyamatban, szerkezetük meghatározhatja a gazdaspecificitást (B. Reuhs személyes közlés).

A K<sub>R</sub>5-antigén bioszintézis génjeinek feltérképezésénél számos Tn5 inszerciós mutánst izoláltak az *rkp* régiókban, AK631 genetikai háttérben (Putnoky et al., 1990; Kiss and Kondorosi, 1997; Kereszt et al., 1998; Kiss et al., 2001). A legtöbb mutáns invázióra képtelen volt, az infekciós fonal abortálódott, minek folytán üres gümők keletkeztek. A mutánsok *I6-3* bakteriofággal szemben rezisztenciát mutattak és a poliszacharid mintázatának vizsgálatára alkalmas DOC-PAGE elemzések alapján a KPS részlegesen vagy teljesen eltűnt. Néhány gén esetén mint az *rkpR*, *rkpT*, a mutáció nem okozott változást ezen tulajdonságokban, míg az *rkpO* vagy *rkpH* esetén Inf<sup>-</sup> fenotípus és vad típustól eltérő mintázatú KPS mellett a *I6-3* fág irányában a szenzitivitás megmaradt. Gyanítani lehetett, hogy az Inf<sup>-</sup> fenotípusú törzsek fággal szemben mutatott rezisztenciáját is a KPS hiányának vagy hibájának köszönhetik. Következésképpen, a poliszacharid bioszintézise és a fágreceptor jelenléte nagy valószínűséggel összefügg. Ezen információkból kiindulva feltételezték azt, hogy a KPS molekula egyúttal receptorként szolgálhat a *I6-3* fág számára (Petrovics et al., 1993; Putnoky et al., 1990).

### 3.1. Az *rkpY* gén azonosítása és jellemzése az *rkp-3* régióban

Előző munkák során az *rkp-3* régió még ismeretlen szekvenciájú jobb oldalán olyan Tn5 inszerciós *rkp* mutánsokat izoláltak, melyek képtelenek voltak a növény inváziójára és a *I6-3* vad típusú fággal szemben rezisztenciát mutattak (Kereszt et al., 1998; Kiss et al., 2001; 6. ábra). A kapszuláris poliszacharid DOC-PAGE elemzése alapján a mutánsok alacsony molekulatömegű (LMW) poliszacharidot termeltek nagy mennyiségben. A jellegzetes mintázatú poliszacharidot a KPS prekursorának vélték. A mutációkat hordozó feltételezett gént *rkpY* génnek nevezték el. A Tn5 inszerciók segítségével izoláltak egy körülbelül 6 kb nagyságú *Bam*HI fragmentet. Meghatározták a DNS-szekvenciáját (AJ249130), melyen egy 1024 aminosavat kódoló ORF-et azonosítottak. Megállapították a Tn5 inszerciók pontos helyzetét (Putnoky Péter munkája) és komplementációs kísérletekkel bizonyították, hogy a leírt fenotípust az azonosított ORF mutációja okozza. Meglepő módon nem találtak az *rkpY* termékével semmilyen homológ fehérjét az adatbázisokban, vagyis egy teljesen új poliszacharid szintézis gént sikerült azonosítaniuk.

Ahogy minden más *rkp* mutáns baktérium esetében, úgy az *rkpY* mutánsok esetében is a vad típusú *I6-3* fág képtelen kötődni a sejtfelszínhez. Az *rkpY* mutánsokra jellemző *I6-3* fágrezisztenciát kihasználva az *rkpY* génben spontán mutáns baktériumot izoláltak (EN3222 törzs, Nagy Enikő munkája), mely az *rkpY* mutánsokra jellemző jellegzetes mintázatú poliszacharidot termelte. Ez a törzs a további genetikai munka fontos eszköze lett.

### 3.2. A *I6-3* rhizobiofág receptorának azonosítása

A kapszuláris poliszacharid fágfertőzésben mutatott szerepe lehetőséget adhat további KPS bioszintézis gének és a fágreceptor alkotóinak megismerésére. Erre alkalmas a receptorhibás baktériumok és a host-range fágmutációk azonosítására kidolgozott mutánsizolálási módszer (Orosz and Sik, 1970).

Első megközelítésként olyan baktérium mutánsokra volt szükség, melyek felszínén a KPS módosult formában van jelen, vagyis „finom” szerkezeti változásokat szerettünk volna vizsgálni, melyek egyben hatással vannak a szimbiózis kialakulására és a fágérzékenységre. Ennek érdekében csoportunkban olyan mutánsizolálási eljárást alkalmaztunk, melynek során a *S. meliloti* 41 (RM41) törzsre specifikus *I6-3* bakteriofágot használtuk szelekciós eszközként. Az RM41 törzsből izolált mutációk azonosítása az ún. host-range jelenség segítségével történt. A gazdaspecificitási vagy host-range mutáció a fág baktériumfelszín felismerő fehérjéjét kódoló gén mutációja révén alakult ki. Ha egy fagra rezisztenssé vált baktérium mutánson lehetséges volt host-range fágmutánst izolálni, ez azt jelentette, hogy a receptor a mutáció



következtében csak kisebb szerkezeti változást szenvedett, de megtalálható volt a felszínen. A fág egy speciális mutáció (host-range) révén képes volt alkalmazkodni ehhez a változáshoz.

Több szempontot kellett figyelembe vennünk a spontán receptor mutáns baktériumok és host-range fágok azonosításánál, mivel a vad típusú fág fertőzésének elmaradását a következő tényezők okozhatják: i) a fág nem képes kötődni a receptorhoz vagy akár a fágreceptor nincs is jelen a baktérium felszínén, ii) a baktériumok lizogéniája, iii) a fág szaporodásához szükséges bakteriális gének hibája. A fág kötésére képtelen baktérium mutánsok között azokat kerestük, melyek felszínén a receptor nem tűnt el, csak módosult vagyis host-range fágot tudunk izolálni rajta. Természetesen ez akkor valósulhatott meg, ha a fág populációban történt olyan mutáció a baktériumfelszínt felismerő farki rost fehérjét kódoló génben, mely által a fág képes volt kötődni a megváltozott fágreceptorhoz.

## 4. Célkitűzések

Munkánk elsődleges célja az volt, hogy újabb kapszuláris poliszacharid bioszintézis géneket azonosítsunk illetve, hogy további ismereteket szerezzünk a bioszintézis folyamatáról. A KPS bioszintézis és a fágreceptor feltételezett összefüggése alapján kíváncsiak voltunk, hogy a KPS valóban fágreceptor szerepet is betölthet, vagy valamilyen más struktúra látja el a feladatot, mely kapcsolatban van annak génjeivel. Amennyiben a fágreceptor a KPS, úgy még ismeretlen bioszintézis gének azonosítására is lehetőség nyílhat. Ezáltal a KPS, invázió során fennálló gazdaspecificitási tulajdonságának mibenlétére is fény derülhet, vagyis a KPS bioszintézisében van-e olyan lépés, szerkezetbeli módosítás ami ezt meghatározza. Emellett, a fágreceptor alkotóinak azonosítását terveztük, illetve tudni szerettük volna, milyen módon épül fel a receptor.

További célunk volt, az *rkpY* régió szekvenciájának kiterjesztése és összeillesztése a már ismert *rkp-3* régió szekvenciájával. Különösképpen a KPS poliszacharid bioszintézis tekintetében szerettünk volna továbbra is újabb géneket azonosítani és jellemezni az újonnan meghatározott DNS szakaszon. Annak kiderítésére, hogy az *rkpY* mutánsok által termelt ismeretlen szerkezetű LMW poliszacharid bioszintézisében mely, már ismert, illetve általunk azonosított *rkp* gén vehet részt, ún. kettős mutáns baktériumok létrehozását terveztük. A vizsgálatokkal azt szerettük volna kideríteni, hogy az LMW poliszacharid milyen kapcsolatban áll az *rkp* génekkel, a KPS bioszintézisével, valamint az eredmények tükrében, milyen funkciót tölthet be az RkpY fehérje?

Összefoglalva a következő feladatokat tűztük ki:

- Receptorhibás baktériumok és host-range fágok izolálása és jellemzése.
- Az *rkpY* régió szekvenciájának kibővítése és bioinformatikai elemzése.
- Az újonnan meghatározott szekvencián található gének jellemzése genetikai kísérletekkel.

## 5. Anyagok és módszerek

### 5.1. Baktériumok, bakteriofágok, plazmidok

A munkánk során használt baktérium és bakteriofág törzsek, valamint plazmidok jellemzőit az 1. táblázat tartalmazza.

#### 1. táblázat: Felhasznált baktérium és bakteriofág törzsek, plazmidok

ELNEVEZÉS	JELLEMZŐK	REFERENCIA
<b>I. Baktérium törzsek, bakteriofágok, plazmidok, transzpozonok:</b>		
<b><i>Escherichia coli</i> törzsek</b>		
XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lacZΔM15</i> Tc <sup>R</sup>	Bullock et al., 1987
DH5α	<i>supE44, ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1</i> <i>gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan 1983
JF1754	met leu his hsr <sup>-</sup> hsm <sup>+</sup>	Friesen, J
PP211	JF1754 (pRK2013) Km <sup>R</sup>	Putnoky Péter
PP2843	pAT401 Tc <sup>R</sup>	Putnoky et al., 1990
PP4166	pAT613 Amp <sup>R</sup>	Kereszt Attila
PP4170	pAT617 Amp <sup>R</sup>	Kereszt Attila
<b><i>Sinorhizobium meliloti</i> törzsek</b>		
RM41	<i>S. meliloti</i> vad típusú (Exo <sup>+</sup> , Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup> )	Szende és Ördögh 1960
AK631	RM41 <i>exoB631</i> (Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> )	Banfálvi et al., 1981
GH4046	RM41 <i>16-3</i> fágra rezisztens, spontán mutáns	Putnoky et al., 2004
GH4178	RM41 <i>16-3</i> fágra rezisztens, spontán mutáns	Putnoky et al., 2004
GH4180	RM41 <i>16-3</i> fágra rezisztens, spontán mutáns	Putnoky et al., 2004
AT212	AK631 <i>rkpM::Tn5(212)</i> Km <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup>	Kiss et al., 2001
EN3222	AK631 <i>rkpY</i> pont mutáns Sm <sup>R</sup>	Nagy Enikő
PP4073	AK631 <i>rkpY</i> pont mutáns Sm <sup>R</sup>	Putnoky Péter
AT212	AK631 <i>rkpM::Tn5(212)</i> Km <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup>	Kiss et al., 2001
<b>Bakteriofágok</b>		
<i>16-3</i>	<i>S. meliloti</i> 41 törzs vad típusú fágja	Orosz László
<i>16-3 h<sub>5</sub></i>	<i>S. meliloti</i> GH4046 törzsön izolált host-range mutáns	Putnoky et al., 2004
<i>16-3 h<sub>γ2</sub></i>	<i>S. meliloti</i> PP4073 törzsön izolált host-range mutáns	Ez a munka
<i>16-3 h<sub>γ3</sub></i>	<i>S. meliloti</i> PP4073 törzsön izolált host-range mutáns	Deák Veronika
M1	<i>S. meliloti</i> SU47 baktériumon izolált bakteriofág	Finan et al., 1984

## Plazmidok

pBluescript SK II (+/-)	Amp <sup>R</sup>	Stratagen, USA
pCU101	Cm <sup>R</sup>	Thatte <i>et al.</i> , 1985
pBBR1-MCS2	széles gazdaspecificitású klónozó vektor Km <sup>R</sup>	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBBR1-MCS5	széles gazdaspecificitású klónozó vektor Gm <sup>R</sup>	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pRK2013	Helper plazmid keresztezéshez Km <sup>R</sup>	Orosz and Sik, 1970
pPP428	<i>rkp-1</i> régiót hordozó kozmid klón	Putnoky <i>et al.</i> , 1990
pAT330	<i>rkp-2</i> régiót hordozó kozmid klón	Kereszt <i>et al.</i> , 1998
pAT399	<i>rkp-3</i> régió bal oldalát tartalmazó kozmid klón	Kereszt <i>et al.</i> , 1998
pAT401	<i>rkp-3</i> régió jobb oldalát tartalmazó kozmid klón	Kereszt <i>et al.</i> , 1998
pPP4054	pAT399 <i>orf140</i> ::Tn5(174)	Kiss <i>et al.</i> , 2001
pPP4055	pAT399 <i>rkpL</i> ::Tn5(187)	-,-
pPP4056	pAT399 <i>rkpM</i> ::Tn5(212)	-,-
pPP4049	pAT399 <i>rkpN</i> ::Tn5(107)	-,-
pPP4053	pAT399 <i>rkpO</i> ::Tn5(168)	-,-
pPP4048	pAT399 <i>rkpP</i> ::Tn5(105)	-,-
pPP4051	pAT399 <i>rkpQ</i> ::Tn5(124)	-,-
pPAG160	pSEM155 származék Sp <sup>R</sup> /Str <sup>R</sup>	Ganyu <i>et al.</i> , 2005
pCU101	helper plazmid - pPAG160 Cm <sup>R</sup>	Thatte <i>et al.</i> , 1985
pPP2543	pUC <i>Bam</i> HI::B2 frag. <i>rkp-3</i> Amp <sup>R</sup>	Putnoky Péter
pAT401	pVK102 <i>Hind</i> III frg. <i>rkp-3</i> Tc <sup>R</sup>	Kereszt <i>et al.</i> , 1998
pAT613	pUC <i>Eco</i> RI::E1 frag. <i>rkp-3</i> Amp <sup>R</sup>	Kereszt Attila
pAT617	pUC <i>Eco</i> RI::E4 frag. <i>rkp-3</i> Amp <sup>R</sup>	Kereszt Attila
pEN3265	pBBR1-MCS2 <i>Bam</i> HI:: <i>rkpY</i> 6 kb frag. Km <sup>R</sup>	Nagy Enikő
pAV579	pBBR1-MCS5 <i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I:: <i>rkpY</i> 1097 bp <i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I frag. Km <sup>R</sup>	Deák Veronika

## Transzpozonok

ET-KanR-3 Mu Entranceposon KanR-3 (F779), TGS-II kit

FINNZYMES

## II. A munka során létrehozott baktérium törzsek, plazmidok:

### Plazmidok

pAV409	pPP4166 <i>rkpZ</i> ::ET-KanR-3 (11222) Amp <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>
pAV410	pPP4166 <i>rkpT</i> ::ET-KanR-3 (9821) Amp <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>
pAV411	pPP4166 <i>rkpS</i> ::ET-KanR-3 (9091) Amp <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>
pAV413	pPP2543 <i>orf8077</i> ::ET-KanR-3 (21174) Amp <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>
pAV414	pPP2543 <i>rkpY</i> ::ET-KanR-3 (18387) Amp <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>
pAV415	pPP2543 <i>orf8077</i> ::ET-KanR-3 (21840) Amp <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>
pAV416	pPP2543 <i>rkpY</i> ::ET-KanR-3 (17298) Amp <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>
pAV417	pPP4170 <i>orf8077</i> ::ET-KanR-3 (22183) Amp <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>
pAV418	pPP4170 <i>rkpT2</i> ::ET-KanR-3 (23345) Amp <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>
pAV421	pPP4170 <i>rkpT2</i> ::ET-KanR-3 (23731) Amp <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>
pAV423	pPP2543 <i>orf7343</i> ::ET-KanR-3 (20447) Amp <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>
pAV426	pPAG160 <i>Pvu</i> II:: pAV414 <i>Pst</i> I frag::ET-KanR-3 (18387) Spc <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>
pAV427	pPAG160 <i>Pvu</i> II:: pAV414 <i>Pst</i> I frag::ET-KanR-3 (18387) Spc <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>

pAV428 pPAG160 *PvuII*:: pAV415 *Sall* frag.:ET-KanR-3 (21840) Spc<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 pAV429 pPAG160 *PvuII*:: pAV417 *PstI* frag.:ET-KanR-3 (22183) Spc<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 pAV430 pPAG160 *PvuII*:: pAV417 *PstI* frag.:ET-KanR-3 (22183) Spc<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 pAV431 pPAG160 *PvuII*:: pAV410 *SacI* frag.:ET-KanR-3 (9821) Spc<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 pAV432 pPAG160 *PvuII*:: pAV410 *SacI* frag.:ET-KanR-3 (9821) Spc<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 pAV433 pBs *EcoRV*:: pPP2843 *NcoI* frag.  
 pAV435 pPAG160 *PvuII*:: pAV409 *Sall* frag.:ET-KanR-3 (11222) Spc<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 pAV436 pPAG160 *PvuII*:: pAV411 *Sall* frag.:ET-KanR-3 (9091) Spc<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 pAV438 pPAG160 *PvuII*:: pAV413 *Sall* frag.:ET-KanR-3 (21174) Spc<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 pAV439 pPAG160 *EcoRI*:: pAV416 *EcoRI* frag.:ET-KanR-3 (17298) Spc<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 pAV440 pPAG160 *PvuII*:: pAV418 *PstI* frag.:ET-KanR-3 (23345) Spc<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 pAV441 pPAG160 *PvuII*:: pAV421 *PstI* frag.:ET-KanR-3 (23731) Spc<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 pAV442 pPAG160 *PvuII*:: pAV424 *PstI* frag.:ET-KanR-3 (20447) Spc<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 pAV444 pAV433 *rkpR*::ET-KanR-3 (7591) Amp<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 pAV445 pAV433 *rkpR*::ET-KanR-3 (7416) Amp<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 pAV451 pPAG160 *PvuII*:: pAV444 *EheI* frag.:ET-KanR-3 (7591) Spc<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 pAV452 pPAG160 *PvuII*:: pAV445 *EheI* frag.:ET-KanR-3 (7416) Spc<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 pAV568 pBBR1-MCS2 *Sall*:: *rkpY* 1720 bp *Sall* fragment  
 pAV571 pBBR1-MCS2 *Sall*:: *rkpY* 1318 bp *Sall* fragment

### ***Sinorhizobium meliloti* törzsek**

AV457 AK631 *orf8077*::ET-KanR-3 (21174) Km<sup>R</sup>  
 AV458 AK631 *rkpY*::ET-KanR-3 (18387) Km<sup>R</sup>  
 AV459 AK631 *rkpY*::ET-KanR-3 (17298) Km<sup>R</sup>  
 AV460 AK631 *orf8077*::ET-KanR-3 (22183) Km<sup>R</sup>  
 AV461 AK631 *rkpT*::ET-KanR-3 (9821) Km<sup>R</sup>  
 AV462 AK631 *orf8077*::ET-KanR-3 (21840) Km<sup>R</sup>  
 AV463 PP3222 *rkpT*::ET-KanR-3 (9821) Sm<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 AV475 AK631 *rkpZ*::ET-KanR-3 (11222) Km<sup>R</sup>  
 AV476 PP3222 *rkpZ*::ET-KanR-3 (11222) Sm<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 AV477 PP3222 *rkpS*::ET-KanR-3 (9091) Sm<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 AV478 PP3222 *rkpR*::ET-KanR-3 (7591) Sm<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 AV479 PP3222 *rkpR*::ET-KanR-3 (7416) Sm<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 AV483 PP3222 *orf8077*::ET-KanR-3 (21174) Sm<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 AV484 PP3222 *orf8077*::ET-KanR-3 (21840) Sm<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 AV485 PP3222 *orf8077*::ET-KanR-3 (22183) Sm<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 AV486 AK631 *rkpS*:: ET-KanR-3 (9091) Km<sup>R</sup>  
 AV488 PP3222 *rkpR*::ET-KanR-3 (7591) Sm<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 AV489 AK631 *rkpR*::ET-KanR-3 (7416) Km<sup>R</sup>  
 AV490 AK631 *rkpT2*::ET-KanR-3 (23345) Km<sup>R</sup>  
 AV491 PP3222 *rkpT2*::ET-KanR-3 (23345) Sm<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 AV493 AK631 *orf7343*::ET-KanR-3 (20447) Km<sup>R</sup>  
 AV494 PP3222 *orf7343*::ET-KanR-3 (20447) Sm<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>  
 AV518 PP4180 *rkpY*::ET-KanR-3 (18387) Km<sup>R</sup>

## 5.2. Baktériumok növesztése

A *S. meliloti* törzseket komplett TA (1,5 % agar) (Ditta et al., 1980) vagy GTS (minimál) (Orosz et al., 1973) szilárd táptalajokon, 28°C -on illetve TA tápfolyadékban 32°C-on, az *E. coli* törzseket pedig LB (Sambrook and Maniatis 1989) tápközegben 37°C-on valamint plazmid DNS izoláláshoz LB tápfolyadékban növesztettük. A táptalajok a megfelelő antibiotikumot a 2. táblázatban feltüntetett végkoncentrációban tartalmazták.

**2. táblázat:** Az antibiotikumok végkoncentrációja (µg/ml)

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>S. meliloti</i>
Tetraciklin	15	15
Kanamicin	30	200
Spektinomycin	50	--
Streptomycin	--	100
Kloramfenikol	20	5
Ampicillin	200	--

## 5.3. Fágok szaporítása

A felszaporítani kívánt *I6-3* fág egy tarfoltját 15 ml TA folyadékba tettük, és 0.2 ml éjszakán át felnövesztett baktériumtörzs hozzáadása után a lombikot 32°C-on, 12-24 órán át rázattuk. A fágizátumhoz 0.1 térfogat kloroformot adtunk, majd meghatároztuk a fágyszámot (titerét) úgy, hogy 0.1 ml megfelelően hígított fágot, 0.1 ml éjszakán át felnövesztett baktériumot és 4 ml TA fedőagart (0,8 % agar) összekeverve TA lemez tetejére rétegeztünk. A lemezeket 12-24 órán át 28°C-on történő inkubálás után értékeltük ki. A fágizátumok általában  $10^8$ - $10^{10}$  részecskét tartalmaztak milliliterenként.

## 5.4. A baktériumok keresztezése

A keresztezni kívánt baktériumokat és a "helper" törzseket (pRK származékokhoz a pRK2013-as plazmidot, a mutáns törzsek létrehozásánál a pCU101 plazmidot hordozó „helper” törzset) felnövesztettük a megfelelő antibiotikumokat tartalmazó komplett táptalajon. A keresztezést 0.9%-os NaCl-oldatban felfuszpendált baktériumokkal végeztük, TA lemezen összecséppentve őket. 16-24 órás 37°C-on történő inkubálás után a felnőtt baktériumokat

felszuszpendáltuk, és a megfelelő antibiotikumot tartalmazó GTS szelektív lemezre kentük különböző hígításban.

### **5.5. Fágérzékenységi teszt**

A baktériumok fágérzékenységét az adott kísérletnek megfelelően különböző *I6-3* és *M1*, *M5*, *M9* bakteriofág törzsekkel szemben vizsgáltuk. A baktériumot tartalmazó TA fedőagar felszínére 5 µl, körülbelül  $10^8$ - $10^{10}$  darab fágot tartalmazó lizátumot cseppentettünk, és 24 órás, 28°C-os inkubálás után vizsgáltuk, hogy bekövetkezett-e a lízis, vagyis megjelentek-e az erre utaló plakkok a cseppentés helyén.

### **5.6. Összes DNS izolálás**

1.5 ml, éjszakán át növesztett, baktériumkultúrából a sejteket centrifugálással üleptítettük és 300 µl TE oldatban (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH=8,0) szuszpendáltuk. 100 µl 5% SDS-t tartalmazó TE oldatot és 100 µl pronáz oldatot (2.5 mg/ml pronáz TE oldatban) adtunk hozzá. 1-3 órás 37°C-os inkubálás után 500 µl fenollal ráztuk össze, majd centrifugálás után a felülúszót újabb eppendorf csőbe pipettáztuk át. 500 µl fenol:kloroform oldattal (25 térfogat fenol:24 térfogat kloroform:1 térfogat izoamil-alkohol) ráztuk össze. Centrifugálás után a felülúszóhoz 500 µl kloroform oldatot (24 térfogat kloroform:1 térfogat izoamil-alkohol) adtunk, összeráztuk és centrifugáltuk. A vizes fázist 1000 µl etanollal kicsaptuk. A kocsonyás csapadékot új, 500 µl 70%-os etanol tartalmú, eppendorf csőbe tettük át pipettahegy segítségével. Centrifugálás után a felülúszót leöntve, szárítást követően, a DNS csapadékot 100 µl steril desztillált vízben oldottuk fel (Sambrook and Maniatis, 1989).

### **5.7. Plazmid DNS izolálás**

A plazmid vagy kozmid DNS-t *E. coli* esetén 3-3 ml LB tápfolyadékban, *S. meliloti* esetén pedig TA tápfolyadékban, a megfelelő antibiotikum jelenlétében éjszakán át növesztett sejtekből Ish-Horowicz és Burke (Meade et al., 1982) szerint alkalikus lízissel preparáltuk. 1.5 ml kultúrát eppendorf csőbe tettünk és a sejteket centrifugálással üleptítettük. A sejteket 100 µl TEG oldatban (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM glükóz pH=8,0) szuszpendáltuk fel. A feltárást óvatos keverés mellett 200 µl NS oldat (0.2 N NaOH, 1% SDS) hozzáadásával végeztük. A mintákat 5 percig 0°C -on inkubáltuk, majd erős rázással 160 µl jéghideg Na-acetát oldatot (3 M, pH=4.8) adtunk hozzájuk. 5 perces 0°C-os inkubáció után 5 percig centrifugáltuk, és a felülúszóból 320 µl izopropanollal kicsaptuk a plazmid DNS-t. 20 perces (vagy egy

éjszakára) -20°C-os inkubáció után a csapadékot lecentrifugáltuk és szárítottuk. A csapadékot 100 µl Tris-pufferben (50 mM Tris-HCL, 100 mM Na-acetát, pH=8.0) oldottuk fel, majd 200 µl etanollal ismét kicsaptuk. 10 perc 0°C-os inkubáció után a csapadékot centrifugáltuk, szárítottuk, majd 30-50 µl RNáz-os tridesztillált vízben (100 µl/ml RNázA) oldottuk fel.

A szekvenáláshoz és a transzpozíciós *in vitro* reakcióhoz készített preparátumoknál további tisztítási lépést iktattunk be. A plazmid DNS izolálása végén 50 µl RNáz-os desztillált vízben vettük fel a csapadékot, majd 0.1 térfogat 10% SDS és 1 térfogat 7.5 M NH<sub>4</sub>-acetát után 15 percig inkubáltuk jégen. Ezután centrifugáltuk 5 percig és a felülúszót új csőbe pipettáztuk, ehhez 0.6 térfogat izopropanolt adtunk és -20°C-ra tettük 20 percig vagy egy éjszakára. Az inkubálás után 400 µl 70%-os etanolos mosás, és szárítás következett. A csapadékot 40 µl steril desztillált vízbe vettük fel.

### 5.8. Polimeráz láncreakció (PCR)

Az *rkpM* gént magába foglaló, illetve ennek egy részét tartalmazó DNS-szakaszt sokszoroztuk meg polimeráz láncreakció segítségével. A felhasznált oligonukleotidokat az 3. táblázat tartalmazza. DNS szekvencia meghatározáshoz az *rkpM*<sub>41</sub> *rkpM*<sub>4046</sub>, illetve *rkpM*<sub>4178</sub> allélt magába foglaló DNS szakaszt az RM-15 és RM-13 primerekkel, valamint az alábbiakban részletezett RKP-M program alkalmazásával amplifikáltuk (1625 bp).

A transzpozíciós mutációk különböző *S. meliloti* törzsekbe juttatásánál a helytelen rekombinációs események következtében létrejött, kointegrált beépülések szelekciójára a pPAG plazmid pCU101 origójára (pag51, pag31) és a Str/Spc rezisztencia génjére (omga51, omga31) terveztünk PCR primer párokat. A pozitív kontroll reakció a pPAG160 plazmid DNS pag illetve omga primerekkel történő amplifikálása volt. Azt, hogy az amplifikálni kívánt DNS valóban a recipiens rhizobiumból származik és nem a donor *E. coliból*, az *rkpM* génre tervezett RM-15 és RM-33 primerek segítségével ellenőriztük. A reakciókat a PAG160 programmal végeztük.

Az *rkpY*<sub>4073</sub> allél szekvencia meghatározásához kívánt DNS szakaszt a Y-Bam734U és Y-Bam2163L primerekkel sokszoroztuk fel, az RKP-Y programmal.

Az alábbi PCR-programokat alkalmaztuk:

RKP-M	PAG160	RKP-Y
1. 1 min. 94°C	1. 1 min. 94°C	1. 1 min. 94°C
2. 30 sec. 94°C	2. 30 sec. 94°C	2. 30 sec. 94°C
3. 30 sec. 62°C	3. 30 sec. 50°C	3. 30 sec. 51°C
4. 1 min. 72°C	4. 1 min. 72°C	4. 1 min. 72°C
5. 34× GO TO 2	5. 33× GO TO 2	5. 33× GO TO 2
6. End	6. End	6. End



### 3. táblázat: A PCR reakciókhoz használt oligonukleotidok

Primer	Nukleotid szekvencia (5'-3')	Számított Tm (°C)	PCR termék
RM-15	GCATTAGGCCCGGGGAGAAGC	62.4	1625 bp
RM-13	CAGGCCGAAGGAACGGAACCTC	62.0	
RM-15	GCATTAGGCCCGGGGAGAAGC	62.4	659 bp
RM-33	AGCGAAATGCACGAGCACAA	59.0	
pag51	GCTTGCAGGGGTGCTACTTA	52.4	1076 bp
pag31	CGGTTACGAGATCCATTTGCT	51.3	
omega51	GCGCGATTTTGCCGGTTACT	58.8	655 bp
omega31	GATGTTACGCAGCAGGGCAGTC	58.4	
Y-Bam734U	AGCGAAATAGCGGGATGTTC	53.5	1429 bp
Y-Bam2163L	GCCGGAATCCGTTTCTGA	53.2	

### 5.9. Fragmentizálás

A PCR reakcióval és restrikciós emésztéssel előállított DNS fragmenteket agaróz gélelektroforézis segítségével tisztítottuk. 2-3 órás elválasztást követően az izolálni kívánt fragment elé a gélbe Whatman DE 81 papírt tettünk és 20 perces 60V feszültség melletti elektroforézis után az izolálandó fragment a papírra került. A papírt eppendorf csőbe tettük, és a DNS-t 100 µl 1M NaCl oldattal mostuk le, kétszer egymás után. A DNS kicsapása 20 µl 3M Na-acetát oldattal (pH=7.0) és 120 µl izo-propanollal történt. 20 perces -20°C-os inkubálás után lecentrifugáltuk, szárítottuk és 10-20 µl steril desztillált vízben oldottuk fel a csapadékot.

### 5.10. DNS szekvencia meghatározás

Az izolált PCR fragmentek és a mutagenizált plazmidok DNS szekvenciáját megfelelő oligonuklotidok segítségével (4. táblázat) az MTA Szegedi Biológiai Központ DNS Szekvenáló Laboratóriumában határozták meg, illetve az általunk tervezett oligonukleotidok szintetizálása is itt történt. A részszekvenciákat a Chromas Pro program segítségével ellenőriztük, javítottuk ([www.technelysium.com.au/ChromasPro.html](http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html)) és a Lasergene (DNASar Inc.) program segítségével illesztettük össze.

### 5.11. Restrikciós emésztés, kettős emésztés, tompa vég létrehozása

A DNS minták restrikciós emésztését Sambrook és mtsai szerint és a Fermentas cég termékeit használva végeztük. (Sambrook *et al.*, 1989). A kettős emésztés esetén, az első

enzimreakció után a minta DNS tartalmát kicsaptuk 0.1 térfogat 3 M Na-acetát (pH=7) és 2 térfogat EtOH (96%) hozzáadásával, és min. 20 percig vagy éjszakán át inkubáltuk -20°C-on, majd 5 perc centrifugálás és 70% EtOH mosás, szárítás után 30 µl steril desztillált vízben oldottuk fel. Ezután végeztük el a második enzymreakciót.

A transzpozíciós mutációkat tartalmazó ragadós végű fragmenteket pPAG160 plazmidba történő beépítése előtt bizonyos esetekben T4 DNS polimeráz reakcióval tompa végűvé alakítottuk a megadott protokoll alapján (Fermentas).

#### 4. táblázat: A különböző szekvenálásokhoz felhasznált oligonukleotidok

Oligonukleotid	Nukleotid szekvencia (5'-3')	Számított Tm (°C)
Rm-15	GCATTAGGCCCGGGGAGAAGC	62.4
Rm-13	CAGGCCGAAGGAACGGAACCTC	62.0
Rm-25	GGAGCCAAGGTGGACTTCGTT	59.4
Rm-23	CAGGCCGGAATAGCTGTCAGG	59.5
Rm-35	CTGGCTCGGCGATATGATAAG	54.9
Rm-33	AGCGAAATGCACGAGCACAAC	59.0
SeqE	CGACACACTCCAATCTTTCC	59.1
SeqW	CTGGCTCGGCGATATGATAAG	58.1
Y-Bam734U	AGCGAAATAGCGGGATGTTC	53.5
Y-Bam1375U	TTGCTAGCCGCTCCCGA	55.1
Y-Bam1531L	CCTGGAGGGGCTGGTCTTT	55.2
Y-Bam2163L	GCCGGAATCCGTTTCTGA	53.2

#### 5.12. Gélelektroforézis

A fragmentek elválasztására az adott igényeknek megfelelően 0.6-1.2%-os agaróz gélt és TBE puffert használtunk (Sambrook and Maniatis 1989). Az elválasztásra szánt DNS mintához, az alábbiakban leírt összetételű STOP-oldatot adtunk (5xSTOP:). A gélelektroforézist minigél esetében 60 V-on, fragmentizolálásnál 40 V-on, valamint nagyobb gél esetében pedig 120-130 V-on végeztük. Kontrollként, *PstI* enzimmel emésztett λ DNS-t vagy 100 bp Ladder DNS-t (Fermentas) alkalmaztunk.

A géleket UVP BioDoc-It System készülékkel fotóztuk le.

#### 5.13. Kompetens sejt készítés

Kompetens sejtek készítéséhez XL1-Blue *E. coli* törzset használtunk, melyet 3 ml LB tápfolyadékban a megfelelő antibiotikumok mellett egy éjszakán át 32°C -on növesztettük. 200 ml SOB táptalajban (2% Bacto trypton, 0.5% Yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl,

pH=7.0) higítottuk a baktérium kultúrát ( $OD_{590}= 0.05-0.1$ ) majd éjszakán át  $22^{\circ}\text{C}$ -on növesztettük tovább ( $OD_{590}= 0.5-0.6$ -ig), ezután 10 percre jégre tettünk. A 10 perces centrifugálással összegyűjtött sejteket 80 ml hideg TB pufferben (10 mM PIPES, 15 mM  $\text{CaCl}_2$ , 250 mM KCl, pH=6,7) szuszpendáltuk. 10 percig jégen inkubáltuk, majd centrifugálással összegyűjtöttük a sejteket, és 20 ml jéghideg TB pufferben szuszpendáltuk. A szuszpenzióhoz 1.5 ml DMSO-t adtunk, a sejteket Eppendorf-csövekbe szétosztva  $-80^{\circ}\text{C}$ -os hűtőben fagyasztottuk és tároltuk transzformációig (Ish-Horovicz and Burke, 1981).

Azonnali felhasználásra úgynevezett gyors kompetens sejteket készítettünk. A DH5 $\alpha$  *E. coli* sejteket 3 ml LB tápfolyadékban a megfelelő antibiotikumok mellett éjszakán át  $32^{\circ}\text{C}$  -on növesztettük, majd 10 ml SOB folyadékban higítottuk ( $OD_{590}= 0.05$ ) és növesztettük tovább 3-4 órát  $37^{\circ}\text{C}$ -on ( $OD_{590}= 0.5-0.6$ -ig), majd 10 percig jégre tettük. Transzformálásonként 1.5 ml kultúrából centrifugálással (12000 rpm, 1 perc) gyűjtöttük össze a sejteket, majd 400  $\mu\text{l}$   $0^{\circ}\text{C}$ -os TBE pufferben szuszpendáltuk. Újabb centrifugálást követően a sejteket 100  $\mu\text{l}$  szintén TBE pufferben vettük fel, majd 7  $\mu\text{l}$  DMSO-t adtunk hozzá. A sejteket azonnal transzformáltuk.

#### **5.14. Ligálás**

A ligálási elegyet vektor DNS oldat, fragment DNS oldat, ligáz puffer (5 $\times$ koncentráció: 200 mM TrisHCL, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM dithiotreitol (DTT) 2,5 mM ATP, pH=7.8) és steril desztillált víz felhasználásával készítettük. A fragment mennyisége tízszeres volt a vektor mennyiségéhez képest. A reakcióhoz T4 DNS ligázt használtunk, és az elegyet legalább 2 óráig szobahőmérsékleten, illetve tompa végű DNS fragmentek ligálásánál  $4^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk.

#### **5.15. Transzformálás**

Egy transzformáláshoz 100 vagy 200  $\mu\text{l}$  kompetens sejtet használtunk fel. Először a sejteket  $-20^{\circ}\text{C}$ -ról jégre tettük, és 15 perc elteltével hozzáadtuk a transzformációhoz használt DNS-t. 20 percig jégen inkubáltuk, majd 3 perces  $37^{\circ}\text{C}$ -os hőshokot alkalmaztunk. A hőshok után 100  $\mu\text{l}$  sejt esetében 400  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$  sejt esetében 800  $\mu\text{l}$  LB tápfolyadékot adtunk. 1-3 óra  $37^{\circ}\text{C}$ -os inkubáció után a sejteket szelektív táptalajra tettük. pBluescript használata esetén a táptalajba 40  $\mu\text{l}$  IPTG (100 mM) és 40  $\mu\text{l}$  Xgal oldatot (2%, dimetil-formamidban) tettünk, és a transzformánsokat kék-fehér screen segítségével detektáltuk. (Inoue et al., 1990). A transzpozíciós mutagenézissel előállított klónoknál antibiotikumot használtunk szelektációs eszközként (Km, Spc).

### **5.16. *In vitro* transzpozíciós mutagenézis**

Az *rkp-3* régió vizsgálni kívánt génjeinek transzpozonos mutagenézisét a TGS II Kit (Template Generation System™ II, TGS™ II, F-702, Finnzymes) alapján végeztük el. Kanamicin rezisztencia gént juttattunk be az adott génekbe, ezzel mutációt létrehozva. Plazmid DNS tisztítás után megmértük a minta DNS koncentrációját. A reakcióhoz szükséges DNS mennyiséget a target DNS hossza alapján (40 ng DNS/kb) határoztuk meg. A reakciókat a leírás alapján állítottuk össze. A mintát 1 órán át 30°C-on inkubáltuk, ezután 10 percig 75°C-on inaktiváltuk, majd XL1 Blue kompetens sejtekbe juttattuk be transzformálás módszerével. A sejteket antibiotikumot (Km, Amp) tartalmazó lemezekben szelektáltuk, majd plazmid DNS izolálás után fizikai térképezéssel és DNS szekvenálással határoztuk meg az inszerciók helyét (ld. 5.10. fejezet).

### **5.17. KPS-LPS preparálás**

A sejt felszíni poliszacharidok tisztítása forró fenolos extrakcióval, és ezt követően dialízissel történt (Kiss and Kondorosi, 1997). Az egy éjszakán át növesztett baktérium kultúrából 1.5 ml-t ülepítettünk centrifugálással, majd a sejteket 500 µl steril desztillált vízben felfuszpendáltuk. 500 µl fenol hozzáadása után a mintákat összeráztuk és 15 percig 65°C-on inkubáltuk, miközben 5 percenként megkevertük őket. A centrifugálást követően a vizes fázist dializáló csőbe mértük, és kétszer hat órán keresztül csapvízben, majd hat órán át desztillált vízben dializáltuk tovább. Ezt követően a mintákat liofilizálással beszáritottuk, végül a preparátumokat felvettük 100 µl steril desztillált vízben.

### **5.18. DOC poliakrilamid gélelektroforézis (DOC-PAGE)**

A futtatáshoz 10 µl tisztított KPS-LPS mintát és 10 µl, 2x Sample puffer és futtató puffer 2:1 arányú keverékéből készített minta puffert mértünk össze, melyből 3-5 µl vittünk fel gélre. (2x Sample puffer: 100mM Tris (pH=6.8), 20 % glicerol, 2 % DOC, 2 mM EDTA, 10 % merkaptóetanol, 0.002 % Bromphenol Blue.) A mintákat 18 %-os DOC-poliakrilamid gélen futtattuk és az analízist BioRad Miniprotean II készüléken végeztük. A gélhez a következő törzsoldatokat készítettük el: (A oldat) 40 w/v % akrilamid, 0.8 w/v % biszakrilamid; (B oldat) 22,1 g TRIS/100 ml desztillált víz pH=8.8; (C oldat) 7.69 g TRIS/100 ml desztillált víz pH=6.8; (D oldat) 2.5 w/v % dezoxikolsav (DOC). A szeparáló gél 4.5 ml „A”, 2 ml „B”, 2 ml „D” oldatot és 1.5 ml desztillált vizet tartalmazott. A polimerizációt 17.5 µl 10 %-os ammónium-perszulfát (APS), és 8.75 µl N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin (TEMED) hozzáadásával indítottuk el. A tömörítő gél 0.25 ml „A”, 0.5 ml „C” oldatot és 1.75 ml desztillált vizet

tartalmazott. Ez esetben a polimerizáció elindítása 12.5 µl 10 %-os APS és 6.25 µl TEMED hozzáadásával történt. A futtató puffer 21.7 g glicint, 4.5 g TRIS-t és 2.5 g DOC-ot tartalmazott 1000 ml desztillált vízben. A géleket a mintafelvétel előtt 15 mA/gél áramerősséggel 10 percig előfuttattuk, majd szintén ezen az áramerősségen választottuk el a mintákat 80-90 perc alatt.

A minták előhívása alciánkék-ezüst festéssel történt. A géleket egy éjszakán keresztül 0.005 w/v %-os alciánkék oldatban áztattuk (25 mg alciánkék/ 500 ml 40 %-os etanol, 5 %-os ecetsav oldat), amit hatszor öt perces desztillált vizes mosás követett. Majd 0.1 w/v %-os AgNO<sub>3</sub> oldattal 25 percig festettük a géleket. Rövid desztillált vizes, majd 0.3 w/v % NaCO<sub>3</sub> oldattal történő mosás következett. A mintázat előhívását formaldehidet tartalmazó 3 w/v % NaCO<sub>3</sub> oldattal végeztük (500 µl 32 %-os formaldehid/1000 ml) (Kiss et al., 2001).

A géleket UVP BioDoc-It System készülékkel fotóztuk le.

### **5.19. Szimbiotikus növényi teszt**

A különböző *S. meliloti* mutáns baktériumok szimbiotikus képességét növényi teszttel ellenőriztük, melyhez *Medicago sativa* L. Nagyszénási növényeket használtunk. Nitrogénmentes növényi táptalajon (GIBSON) steril lucerna csíranövényeket fertőztünk a kiválasztott baktérium törzsekkel. Az invázióra és nitrogénkötésre képes törzsek esetében a növényeken rózsaszín szimbiotikus gümők jelentek meg (2-3 hét). Ezek a növények 4-8 hét elteltével megfelelően fejlettek és sötétzöldek voltak, szemben a sárgás színű és a nitrogénéhezés jeleit mutató, fertőzetlen vagy ineffektív gümöket hordozó növényekkel. (Putnoky et al., 1988)

### **5.20. Bioinformatikai módszerek**

A különböző szekvencia elemzésekre, homológok keresésére az NCBI honlapon elérhető BLAST, főként BLASTP programot használtuk (Haapa et al., 1999); <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), valamint az NCBI adatbázist (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A homológ funkcionális doménekről a PROSITE (Altschul et al., 1990; [www.expasy.org/prosite](http://www.expasy.org/prosite)) és Pfam ([www.sanger.ac.uk/Software/Pfam](http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam)) adatbázisokból gyűjtöttünk információkat. A feltételezett transzmembrán domének elemzését a TopPred programmal végeztük (Claros and Heijne, 1994; <http://www.sbc.su.se/~erikw/toppred2/>). A fehérjék többszörös illesztése az EBI honlapján elérhető ClustalW2 programmal (Larkin et al., 2007, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), az illesztés szerkesztése a GeneDoc (Nicholas and Nicholas, 1997) programmal történt.

### **5.21. A kísérletek során felhasznált vegyszerek**

A felhasznált vegyszereket a SIGMA, FLUKA, REANAL cégektől szereztük be. A dializáló membrán a SPECTRA Millipore cégtől származott. A különböző restrikciós, T4 DNS ligáz és T4 DNS polimeráz enzimeket az MBI Fermentas cégtől vásároltuk. A különböző kitek az előzőekben leírt cégektől származtak.

## 6. Kutatási eredmények

### 6.1. Receptorhibás baktérium mutánsok azonosítása

Munkánk első lépéseként az előzményekben (3.2. fejezet) említett mutánsizolálási eljárással és feltételekkel sikerült olyan spontán mutáns baktériumokat izolálni a vad típusú *S.meliloti* 41 (RM41) törzsből, melyek a vad típusú *I6-3* fággal szemben rezisztensek voltak (Putnoky Péter, Hoffmann Gyula munkája). Az eredmény feltételezhetően azt jelentette, hogy a receptor a mutáció következtében csak kisebb szerkezeti változást szenvedett, de megtalálható volt a felszínen. A fág egy speciális mutáció (host-range) révén képes volt alkalmazkodni a változáshoz. A következő baktérium törzseket izoláltuk: GH4046, GH4178, GH4180 és PP4073. A továbbiakban az volt a feladatunk, hogy i) azonosítsuk a mutációt szenvedett gént az egyes törzsekben, illetve az abban történt szekvencia szintű eltérést, ii) kiderítsük milyen sejt felszíni változásokat okozott a mutáció, iii) a kísérleti eredmények alapján következtetéseket levonni a gén funkcióját illetően.

Az Inf- fenotípusú törzseken végzett megfigyelésekből sejteni lehetett, hogy a KPS bioszintézis és a fágreceptor megléte között összefüggés van. Azt feltételeztük, hogy a változás valamelyik KPS bioszintézisért felelős génben van, ezért a receptorhibás baktériumok vizsgálata lehetőséget adott arra, hogy újabb bioszintézis géneket azonosítsunk. Az említett baktérium törzseken sikerült host-range fágokat izolálnunk, ezért ebben az irányban is folytattuk munkánkat, hogy kiderítsük milyen változás tette lehetővé a fágok alkalmazkodását a módosult fágreceptorhoz.

### 6.2. Az *rkp-4046* mutáció helyének meghatározása

A mutánsizolálás eredményeként rendelkezésünkre állt a GH4046 spontán mutáns baktérium, mely rezisztens a *I6-3* vad típusú bakteriofággal szemben, viszont az izolált *I6-3 h<sub>5</sub>* host-range fág fertőzni képes.

Ezek alapján azt feltételeztük, hogy a baktérium felszínén a fágreceptor módosult formában jelen van. A következőkben a baktériumban történt mutáció azonosítását végeztük. Először azt kellett megállapítanunk, hogy az *rkp-4046* mutáció egy már azonosított vagy egy ismeretlen KPS bioszintézisért felelős génben (*rkp* gén) történt-e. Ennek kiderítésére genetikai komplementációs kísérleteket végeztünk.

A GH4046 törzsbe, konjugáció segítségével egyenként bejuttattuk az *rkp-1* (pPP428), *rkp-2* (pAT330), *rkp-3* (pAT399, pAT401) régiókat hordozó kozmid klónokat, és azt

vizsgáltuk, hogy képes-e valamelyik komplementálni a mutációt. A fágérzékenység helyreállítását vad típusú *I6-3* fággal teszteltük. A *I6-3* fág nem tud szaporodni a GH4046 törzsön, komplementáció esetén viszont képes lesz rá, ha a bejutott vad allél expressziójával az „eredeti” fágreceptor jelenik meg a baktérium felszínén. Kontrollként a *I6-3 h<sub>5</sub>* fágot alkalmaztuk, mely a GH4046 és az RM41 törzset is képes felismerni. Az eredményeket az 5. táblázat foglalja össze. A kísérlet alapján megállapítottuk, hogy az *rkp-4046* mutáció az *rkp-3* régió bal oldali szakaszán (pAT399) található. Az *rkp-3* régiót két átfedő kozmid klón tartalmazza (pAT399, pAT401; 7. ábra), ezért ezeket külön kellett vizsgálni. A kísérletben az *rkp-1* és *rkp-2* régiók bejuttatásával nem tudtuk helyreállítani a vad fenotípust.

**5. táblázat:** Az *rkp-1*, *rkp-2*, *rkp-3* régiók komplementációs kísérleteinek eredményei

Bejuttatott kozmid	transzkonjugáns fenotípus (fágfertőzés)		komplementáció
	<i>I6-3</i> (vad típus)	<i>I6-3 h<sub>5</sub></i>	
—	R	S	nincs
pPP428 ( <i>rkp-1</i> )	R	S	nincs
pAT330 ( <i>rkp-2</i> )	R	S	nincs
pAT399 ( <i>rkp-3</i> bal oldala)	S	S	<b>van</b>
pAT401 ( <i>rkp-3</i> jobb oldala)	R	S	nincs

A táblázatban jelöltük a GH4046 törzsbe juttatott kozmidokat, a fenotípust fágfertőzés tekintetében (R: rezisztens, S: szenitív), valamint a komplementáció meglétét.

A következő komplementációs kísérlettel arra kerestük a választ, hogy az *rkp-4046* allél mely *rkp-3* régióban lévő gén mutációjával alakult ki. A régióban előforduló gének elhelyezkedése és teljes nukleotidszekvenciája már ismert volt (Kiss et al., 2001). Az eredmények alapján, a régiót számos - a kapszuláris poliszacharid bioszintézisben részt vevő - *rkp* gén alkotja (7. ábra).

Ezúttal olyan kozmid klónokat juttattunk be a GH4046 törzsbe, melyek egy-egy érintett *rkp* génben ( *orf140*, *rkpL*, *rkpM*, *rkpN*, *rkpO*, *rkpP*, *rkpQ* ) ismert pozíciójú Tn5 transzpozon inszerciót hordoztak (7.ábra, Kiss et al., 2001). A komplementáció hiányát vagy megtörténtét ismét fágteszt segítségével állapítottuk meg.

Ha a bejuttatott kozmid klónban a transzpozon nem ugyanazt a gént érinti, mint a GH4046 törzsben lévő *rkp-4046* mutáció, akkor minden bioszintézis gén legalább egy hibátlan kópiája jelen van a sejtben. Ennek eredményeként a vad típusú fágreceptor megjelenik a felszínen, s ezt a *I6-3* vad típusú fág képes felismerni. Mindezt a baktériumpázsit feltisztulása jelzi a fágfertőzési tesztben. Ha viszont a Tn5 mutációt azon gén tartalmazza a kozmid klónban,



mely a GH4046 törzsben is sérült, akkor a gén vad típusú allélja hiányában, nem történik komplementáció. Ez esetben a *I6-3* fág továbbra sem képes felismerni a bakteriális sejtfelszínt, a fágfertőzési tesztben tarfolt nem keletkezik. A kísérlet eredményeit a 6. táblázat foglalja össze.

Eredményeink szerint, csak a pAT399::*rkpM*::Tn5(212) klón nem tudta helyreállítani a vad fenotípust, a többi kozmid klón viszont komplementált. Ez azt jelentette, hogy az *rkp-4046* mutáció az *rkpM* génben van, tehát a GH4046 baktériumtörzs az *rkpM* egy mutáns allélját hordozta. Ezt *rkpM*<sub>4046</sub> allélnak neveztük el.

**6. táblázat:** Az *rkp-3* gének komplementációs kísérleteinek eredményei

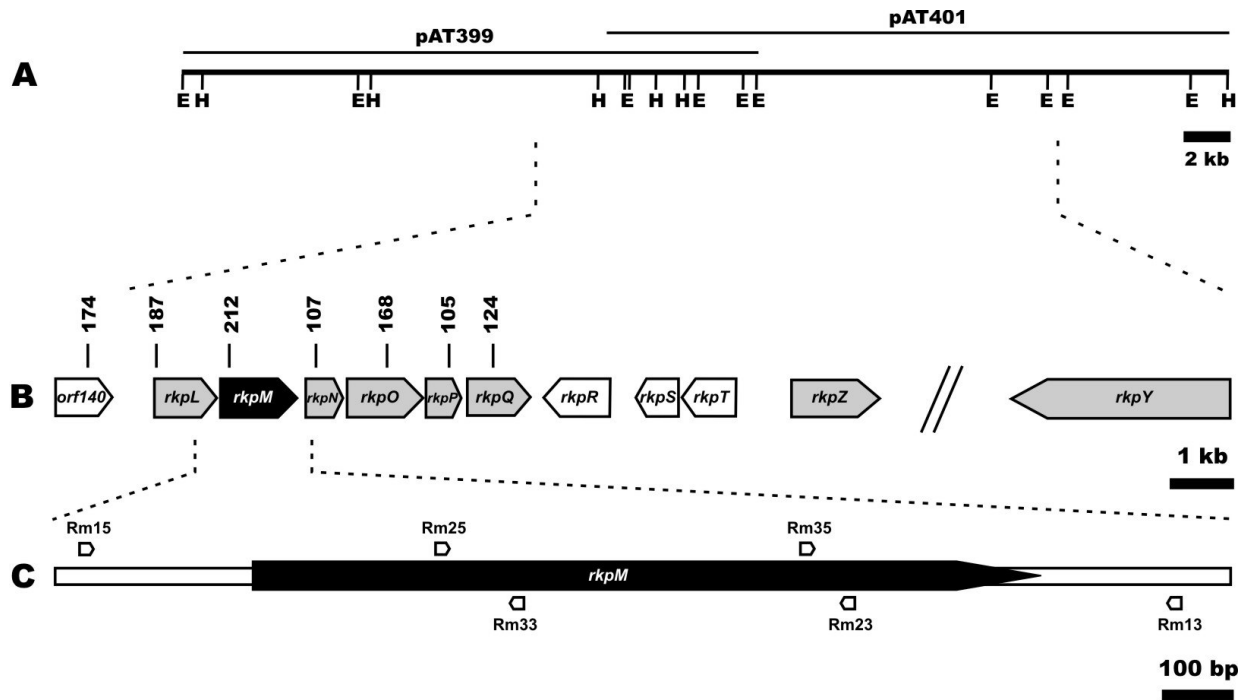
a GH4046 törzsbe bejuttatott kozmid	transzkonjugáns fenotípus (fágfertőzés)		komplementáció
	<i>I6-3</i> (vad típus)	<i>I6-3 h<sub>5</sub></i>	
—	R	S	nincs
pAT399 (vad típus)	S	S	van
pAT399 <i>orf140</i> ::Tn5 (174)	S	S	van
pAT399 <i>rkpL</i> ::Tn5 (187)	S	S	van
pAT399 <i>rkpM</i> ::Tn5 (212)	<b>R</b>	S	<b>nincs</b>
pAT399 <i>rkpN</i> ::Tn5 (107)	S	S	van
pAT399 <i>rkpO</i> ::Tn5 (168)	S	S	van
pAT399 <i>rkpP</i> ::Tn5 (105)	S	S	van
pAT399 <i>rkpQ</i> ::Tn5 (124)	S	S	van

A táblázatban jelöltük a GH4046 törzsbe juttatott kozmidokat, a fenotípust fágfertőzés tekintetében (R: rezisztens, S: szenitív), valamint a komplementáció meglétét.

A komplementációs kísérletek némileg meglepő eredményt hoztak. A régió nukleotidszekvenciájának és a gének elhelyezkedésének ismeretében ugyanis valószínűsíthető volt, hogy az érintett *rkpL–Q* gének egy promoterről íródnak át. Ennek alapján várható volt, hogy érvényesül a transzpozon beépülésének poláris hatása, azaz a tőle 3' végen elhelyezkedő összes gén átíródásának blokkolása. Ez esetben, ha a transzpozon a bejuttatott kozmidokban a keresett gén területére (*rkpM*), illetve tőle 5' irányban lévő génekbe esik (*rkpL*), akkor nem áll helyre a vad fenotípus. A keresett géntől 3' irányban lévő inszerció viszont nem befolyásolja annak transzkripcióját, vagyis ekkor a vad típusú allél komplementál.

A 6. táblázatban összefoglal eredmények mutatják, hogy a Tn5 transzpozon poláris hatása ebben az esetben nem érvényesült. Feltehetően a beépült Tn5 transzpozonon van olyan promóter-szerű szekvencia, mely elegendő az inszerció után elhelyezkedő gének

expressziójához, ahogyan az irodalomban találunk erre példát (Berg et al., 1980), vagy eleve az *rkp-3* régió tartalmaz ilyen szekvenciákat.



**7. ábra:** A *S. meliloti* 41 *rkp-3* régiójának fizikai és genetikai térképe, az *rkpM*<sub>4046</sub> nukleotid szekvenciájának meghatározása

**A:** A régió *Hind*III és *Eco*RI restrikciós helyei, valamint a komplementáló kozmid klónok (pAT399, pAT401). **B:** A régió eddig feltérképezett génei, feketével az *rkpM* gént jelöltük, mely a GH4046 törzsben hordoz mutációt; szürkével a KPS bioszintézist befolyásoló géneket tüntettük fel. A függőleges vonalak, a komplementációs kísérletben használt Tn5 inszerciók helyét jelölik (Kiss et al., 2001; 6. ábra). **C:** Az *rkpM* gén nagyított ábrája, melyen jelöltük a szekvenáláshoz használt oligonukleotidokat is.

### 6.3. A 16-3 bakteriofág receptor kialakításában részt vesz az RkpM fehérje

A csoportunkban végzett KPS mintázat elemzések (DOC-PAGE) alapján megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált GH4046 mutáns törzs egyáltalán nem termel kapszuláris poliszacharidot (14.B. ábra). Ez meglepő eredmény volt, hiszen azt vártuk, hogy a GH4046 mutáns termel KPS-t, csak más szerkezetű formában, és az elgondolások szerint a poliszacharid a 16-3 fágreceptora. Emellett az AT212 (*rkpM*::Tn5) mutáns törzs sem termel, ennek ellenére többszöri próbálkozásra sem lehetett rajta host-range fágot izolálni és az *rkpM* génben egy Tn5 transzpozont tartalmaz, így elrontva a gén működését. Ez arra utalt, hogy a 16-3 fág receptora valószínűleg nem a KPS, mint azt előzőleg feltételezték (Petrovics et al., 1993; Putnoky et al., 1990). Ha ez így lett volna, akkor minden *rkp* mutáns, de legalább az *rkpM*::Tn5(212) mutációt hordozó baktériumon lehetséges lett volna a host-range fágmutánsok izolálása. Ezt

több független kísérletben is megpróbáltuk, de minden alkalommal csak a kontrollként alkalmazott GH4046 törzsön kaptunk plakkokat.

Tehát közvetett bizonyíték mutatott arra, hogy a fágreceptor nem a KPS és, hogy az *rkpM<sub>4046</sub>* allél egy különleges mutációt hordoz, mely egy megváltozott szerkezetű fágreceptort eredményez. Kézenfekvő volt ezek után a feltételezés, hogy maga az RkpM fehérje szolgál fágreceptorként, és az *rkpM<sub>4046</sub>* allél valószínűleg csak egyetlen aminosavcserét eredményező (ún. missense) mutációt tartalmaz.

#### **6.4. Az *rkpM<sub>4046</sub>* allélban egy missense mutáció található**

A továbbiakban arra kerestünk választ, hogy az *rkpM<sub>4046</sub>* allélban DNS szekvencia szinten milyen változás történt. A kísérletekben vad típusként is alkalmazott AK631 törzs *rkp-3* régiójának pontos bázissorrendje már ismeretes volt (AC: AJ245666; Kiss et al., 2001), ezért megtervezhettük a mutáns gén izolálásához, illetve szekvencia meghatározásához szükséges oligonukleotidokat (Rm-15, Rm-13).

A GH4046 baktériumtörzs összes DNS preparátumából PCR segítségével a kívánt DNS-szakaszt megsokszoroztuk, majd izoláltuk. Mivel a PCR-fragment 1625 bázispár hosszúságú, míg a benne foglalt *rkpM* gén 1161 bázispárnyi, ezért a mutáns allél DNS-szekvenciájának meghatározásához – a PCR-primereken kívül – szükség volt még négy oligonukleotid tervezésére (Rm-25, Rm-23, Rm-35, Rm-33), hogy mindkét szálon lehetővé tegyék az egymással átfedő leolvasások a nukleotidsorrend biztonságos meghatározását (7. ábra).

Az izolált PCR-fragment nukleotid szekvenciáját a tervezett oligonukleotidok segítségével, szubklónozás nélkül, direkt úton határoztuk meg. A rész-szekvenciák összeillesztése után megállapítottuk, hogy az *rkpM<sub>4046</sub>* allél, meglepő módon, két missense mutációt is hordoz a gén 3' végének közelében. Ezek alapján nem tudtuk eldönteni, hogy mindkettő mutáció vagy csak az egyik felelős-e a megváltozott fágreceptor kialakulásáért. Az ellentmondás oka az is lehetett, hogy a vad típusú szekvencia meghatározása az AK631 törzsből történt, míg a GH4046 mutáns az RM41 törzsből származik. Feltételeztük, hogy az egyik mutáció csak a két vad típusú allél közötti neutrális mutáció. Ennek kiderítésére az *rkpM<sub>41</sub>* allél nukleotid sorrendjét is meghatároztuk, az előzőekhez hasonló módon. Így derült ki, hogy az AK631 és RM41 között is létezik egy eltérés. Ez semlegesnek bizonyult a fágreceptor kialakulása és a KPS bioszintézis szempontjából, mivel mindkettő ugyanolyan vad típusra jellemző KPS-t termel DOC-PAGE mintázat alapján és szenzitív a 16-3 fággal szemben. A különbség oka, hogy a gén 3' végének közelében lévő TTC triplet helyett az RM41 törzsben GTC található, mely translációkor *fenilalanin* (F<sub>315</sub>) helyett *valin* (V<sub>315</sub>) beépülést okoz a

fehérje adott pozíciójába (6.6. fejezet: 8. ábra). Ez a mutáció tekinthető a két törzs közötti polimorfizmusként. Az *rkpM<sub>41</sub>* vad típusú és *rkpM<sub>4046</sub>* mutáns allél közötti valódi eltérés egy aminosav cseréjét jelenti az általa kódolt fehérje C-terminális részén. A vad típusú allél leucint (Leu<sub>252</sub>) meghatározó kodonjának (TTG) egyik bázisa megváltozott (TTC), mely fenilalanin (Phe<sub>252</sub>) beépülését okozza az aminosavlánc adott pozíciójába (8. ábra).

Végeredményben, az a következtetés vonható le, hogy az RkpM fehérje a fágreceptor alkotóeleme, melynek C-terminális része (Leu<sub>252</sub>) valószínűleg a fággal való kapcsolat kialakításában közvetlen szerepet játszik. Mindezt alátámasztja a host-range fágok vizsgálata is, amelyekben a *h* génben történt missense mutáció lehetővé tette, hogy az RkpM<sub>4046</sub> fehérjét tartalmazó baktériumokon a host-range mutáns fág szaporodhasson. Tehát, egy baktérium fehérje egyetlen aminosavának megváltozása következtében megszűnt felismerési folyamatot a fág egy fehérjéjének egyetlen aminosavában bekövetkezett megváltozása helyre tudta állítani. Ez a két fehérje közvetlen kölcsönhatására utal.

### 6.5. A 16-3 fágreceptornak több alkotója van

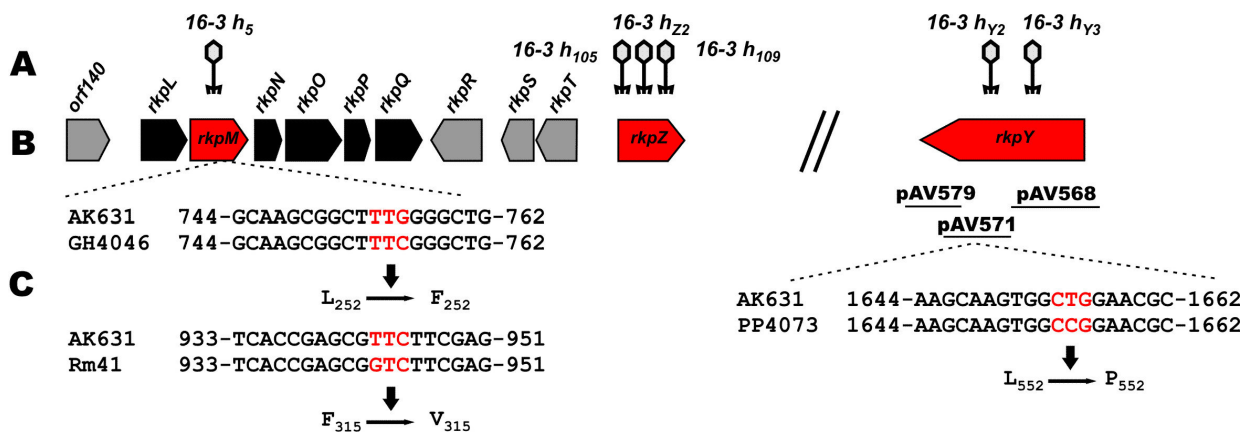
Kíváncsiak voltunk arra, hogy kizárólag csak az RkpM fehérje alkotja-e a fágreceptort, illetve annak mely részei vesznek részt a felismerésben. Hogy közelebb kerüljünk a válaszhoz, megkezdtük a további receptorhibás, *rkp-4178*, *rkp-4180* és az *rkp-4073* mutációkat hordozó baktériumok és az egyes baktériumokon izolált host-range fágok vizsgálatát is.

Az eddigi eredményekből kiindulva a GH4178 és GH4180 törzsből DNS-t izolálva, megsokszoroztuk az *rkpM* gént hordozó DNS szakaszt PCR reakció segítségével, és kimutattuk, hogy az *rkp-4178* mutáció teljesen megegyezik az előzőekben vizsgált *rkpM<sub>4046</sub>* mutációval.

Az *rkp-4180* mutáció elemzése azonban más eredményt hozott. Ebben az esetben az *rkpM* génben nem találtunk semmilyen mutációt a szekvenálási kísérlet alapján. A komplementációs eredmények szerint (Szabó Csilla munkája), a mutáció ez esetben az *rkp-3* régió *rkpZ* génjét érinti, ami arra enged következtetni, hogy az RkpM fehérjén kívül más alkotója is van a fágreceptornak. Az *rkpZ* mutánsok KPS fenotípusa eltér a vad típusú baktérium poliszacharid szerkezetétől (14.C. ábra), magasabb molekulatömegű (HMW) KPS-t termel. Azonban az *rkpZ* mutánsok esetében, a Tn5 inszerciót tartalmazó baktériumon is sikerült host-range fágot izolálni (16-3 *h<sub>22</sub>*), mely alapján feltételeztük, hogy a GH4180 törzs nem speciális mutációt hordoz. A GH4180 baktériumon izolált 16-3 *h<sub>105</sub>* és 16-3 *h<sub>109</sub>* bakteriofág mutációjának azonosítását is megkezdtük (Deák Veronika munkája).

## 6.6. Az RkpY fehérje fontos a fágfertőzésben

Az előző eredményeket figyelembe véve, a PP4073 törzs esetében először DOC-PAGE elemzést végeztünk, mely szerint a baktérium az *rkpY* mutánsokra jellemző mintázattal rendelkezik (14D. ábra). Ebből sejtettük, hogy a mutáció az *rkpY* génben található, ezért ahogyan az *rkp-4046* allél esetében, komplementációs kísérleteket végeztünk a mutáció helyének azonosítására. Konjugációval az *rkp-3* régiót lefedő két kozmidot (pAT399, pAT401, lsd. 7. ábra) és az *rkpY* gént tartalmazó 6 kb nagyságú *Bam*HI fragmentet juttattuk be a PP4073 törzsbe. A konjugánsok fágérzékenységét vizsgáltuk. Megfigyeltük, hogy az *S. meliloti* SU47 törzsön izolált M1 fág tömény lizátuma képes fertőzni a PP4073 törzset, viszont a vad típusú RM41-et nem. Ezt a jelenséget kihasználva, a konjugánsokat M1 és kontrollként vad típusú 16-3 fággal fertőztük és figyeltük helyre áll-e az M1 fággal szemben mutatott rezisztencia. Az eredmények igazolták feltételezésünket, mivel a pAT401 és az *rkpY* *Bam*HI fragment bejuttatásával visszaállt a rezisztencia, vagyis komplementáció történt, ami azt jelenti, hogy a mutáció az *rkpY* génben található.



## 8. ábra: Az *rkp-3* régióban izolált receptor hibás baktériumok mutációi

**A:** A receptor hibás baktériumokon izolált 16-3 fágmutánsok. **B:** A teljes *rkp-3* régió azonosított génjeit jelölik a nyilak; szürke: olyan géneket jelölnék, melyek funkciója még ismeretlen; fekete: a KPS szintézisében fontos gének; piros: a KPS bioszintézisében és a fágfertőzésben is szerepet játszó gének. **C:** Az adott génekben történt missense mutációk DNS szekvencia és aminosav szintű eltérései. Jelöltük az *rkpY* mutáció meghatározásához használt szubfragmenteket (pAV568, pAV571, pAV579).

A továbbiakban olyan kísérletet végeztünk, mellyel egy kisebb szakaszra szűkíthettük a mutáció lehetséges helyét a génen belül. A vad típusú *rkpY* gént három külön szubfragmentre osztottuk restriktív emésztéssel, melyeket konjugatív plazmidba építettünk (pAV568, pAV571, pAV579, 8. ábra). Az egyes plazmidokat a PP4073-as törzsbe konjugáltuk és azt figyeltük, hogy melyik DNS szakasz homológ rekombinációjával változik a gén vad típusúvá. A vad típusú homológ rekombinánsok megjelenését az M1 fágrezisztencia helyre állásán

keresztül vizsgáltuk. A gén középső szakaszát lefedő 1318 bp nagyságú *SalI* fragment (pAV571) eredményezett M1 fággal szembeni rezisztenciát, tehát az *rkpY*<sub>4073</sub> mutáció ezen a szakaszon volt található.

A következő lépés a mutáció szekvencia szintű meghatározása volt (8. ábra). Az 1318 bp nagyságú *SalI* DNS fragment (pAV571) megsokszorozásához PCR primer párt terveztünk (Y-Bam734U, Y-Bam2163L). A mutáns baktériumból nyert össz DNS preparátum felhasználásával felsokszoroztuk, majd izoláltuk a kívánt DNS szakaszt. A szekvencia meghatározásához további primer párt terveztünk (Y-Bam1375U, Y-Bam1531L). A szekvenálás eredményeként kapott rész-szekvenciákat összeillesztettük, majd elemeztük az így kapott teljes szekvenciát. Kiderült, hogy valóban a mutáció erre a szekvencia részre esik, pontosabban a PP4073-as törzs 1024 aminosav nagyságú RkpY fehérjéjének 552. aminosava leucinről (Leu<sub>552</sub>) prolinra (Pro<sub>552</sub>) változott, ami DNS szinten a CTG kodon CCG-re cseréjét jelenti (8. ábra). Tehát ebben az esetben is egy missense mutáció történt.

Ahogy az RkpM fehérje vizsgálatából következtettünk, miszerint részt vesz a fágreceptor kialakításában, úgy az RkpY fehérje esetében is ezt gondoltuk. A feltevésünk oka az volt, hogy egyetlen más *rkpY* mutáns sem sikerült host-range fágot izolálni, sem a spontán mutáns EN3222, sem az inszerciós mutáns AV458 baktériumon, csak a PP4073 törzsön (*16-3 h*<sub>Y2</sub> és *16-3 h*<sub>Y3</sub>). Szintén a baktérium, illetve a fehérje speciális mutációja tette lehetővé a *16-3* fág alkalmazkodását a módosult fágreceptorhoz. Azért is lehetséges ez, mivel a DOC-PAGE elválasztás alapján mindegyik *rkpY* mutáns ugyanazzal a mintázattal rendelkezik, tehát ez állandó tényező volt minden mutáns esetében.

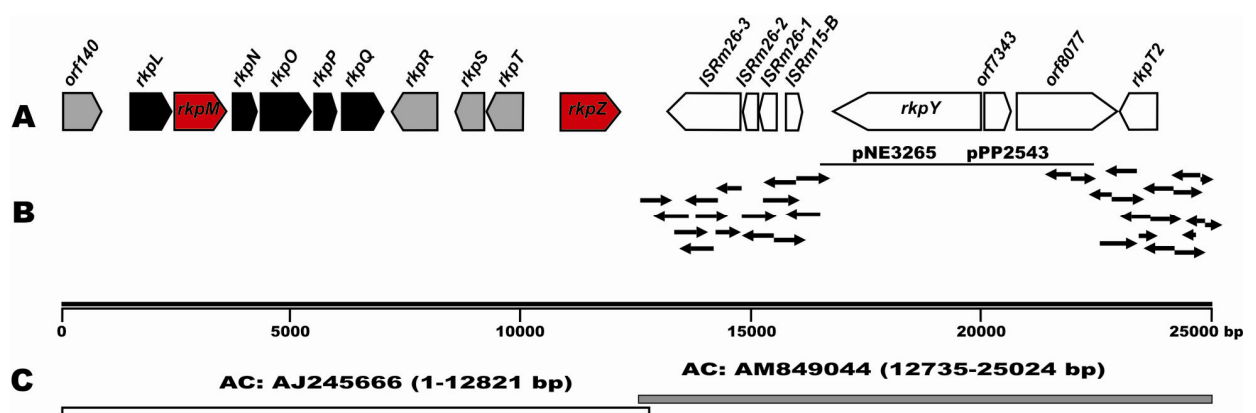
Az alkalmazott mutánsizolálási módszerrel nem azonosítottunk újabb KPS bioszintézis géneket, viszont a *16-3* fágreceptor alkotóit igen. A következőkben az *rkp-3* régió még ismeretlen szakaszának (*rkpY* régió/*rkpY* gén környezete) DNS-szekvencia meghatározásával és elemzésével új bioszintézis gének keresését kezdtük meg.

### **6.7. Az *rkpY* régió bázissorrendjének meghatározása és elemzése**

Az *rkp-3* régió szekvenciájának eddig egy 12821 bp (AC: AJ245666), illetve egy 5966 bp (AC: AJ249130) nagyságú szakasza volt ismert, melyek az *rkpLMNOPQ*, *rkpRST*, *rkpZ* és az *rkpY* géneket hordozzák (9. ábra). A régió teljes szekvenciájának, az itt kódolt gének megismerése érdekében befejeztük a szekvencia meghatározását (Nagy Tiborral közös munka, 9. ábra, AC: AM849044). Ezzel összesen egy 25024 bp hosszú nukleotid szekvenciává bővült a meghatározott szekvencia. A meghatározandó szakaszokat a pAT401 és pPP2543 kozmidok megfelelő szubfragmentjeinek klónozása révén nyertük. A restriktív emésztéssel nyert

szubfragmenteket plazmidba (pBluescript) építettük, majd a megfelelő primerekkel (T3, T7) történt a szekvenálás. A teljesség érdekében, hogy mindkét szálon átfedő szekvenciát kapjunk, az *in vitro* Mu entrancepon rendszerrel hívtuk segítségül (ld. 5.16. fejezet), mellyel véletlenszerűen kanamicin rezisztenciát tartalmazó transzpozont építettünk a meghatározni kívánt szakaszokba. A transzpozon két végére tervezett SeqE és SeqW primerekkel történt a szekvencia leolvasása. Az így előállt szekvenciárészeket számítógépes módszerrel illesztettük össze (9. ábra). A teljes *rkp-3* régióra értelmezve sikerült a 12821. bp utáni szekvencia meghatározása egészen a pAT401 kozmid által lefedett szakasz végéig (25024. bp), mely magában foglalja a 6 kb nagyságú *Bam*HI fragmentet is (pPP2543, pNE3265; 9. és 12. ábra).

Az *rkp-3* régió korábban közölt szekvenciájával már végeztek többféle bioinformatikai vizsgálatot, úgymint fehérje homológok keresése, GC tartalom meghatározás, a fehérjék funkciójának előrejelzésére (Kiss et al., 2001). Az újonnan meghatározott szakaszon is hasonló elemzéseket végeztünk, Nagy Tiborral közösen. Az *rkpY* géntől 3' irányban három további nyitott leolvasási keretet találtunk számítógépes módszerrel (*orf7343*, *orf8077*, *rkpT2*, 9. ábra). Az ezek által kódolt feltételezett fehérje szekvenciákat homológia vizsgálatoknak vetettük alá (BLASTP).

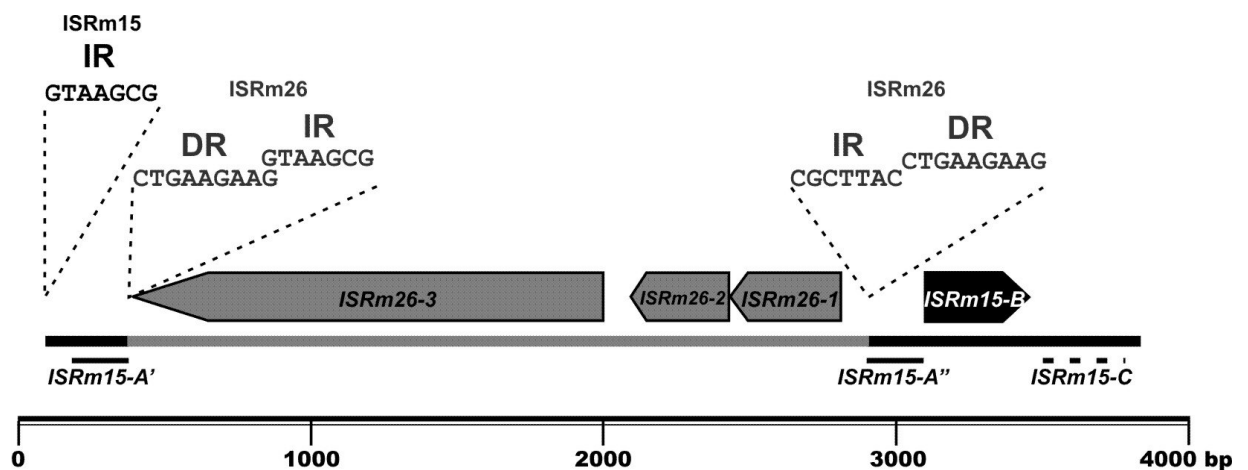


**9. ábra:** Az *rkp-3* régió szekvenciájának kiterjesztése

**A:** az *rkp-3* régió génjei, fehér: IS elemek; szürke: olyan gének, melyek funkciója még ismeretlen; fekete: a KPS szintézisében fontos gének; piros: a KPS bioszintézisében és a fágfertőzésben is szerepet játszó gének. **B:** A szekvencia meghatározások során kapott rész-szekvenciák. **C:** A vízszintes vonalak az adatbázisban lévő (EMBL) szekvenciákat jelölik.

Az *orf7343* által kódolt fehérje 72%-os azonosságot mutat a *Rhizobium* sp. NGR234 *rkp3\_012* ORF termékével és több metiltranszferázzal homológ, emellett feltehetően egy 12-es típusú metiltranszferáz doménnel (Pfam: PF08242) rendelkezik. Az *orf8077* által kódolt fehérjének nem találtunk homológiát az adatbázisban, viszont rendelkezik a fehérje kinázok ATP-kötő régiójának mintázatával (ProSite: PS00107). Az RkpT2 fehérje 58% azonosságot

mutat a *S. meliloti* 1021 RkpT1 fehérjével és az eredmények alapján funkcionálisan egy a sejt felszíni poliszacharid exportjáért felelős ABC-2 típusú transzporter lehet. A számítógépes előrejelzés ellenére, ahogyan az RkpT1 (RM41 törzsben) esetében sem, biológiai kísérlettel eddig nem tudtuk kimutatni, hogy a KPS bioszintéziséhez lehet köze a fehérjének. Az RkpY-nal kapcsolatos elemzések meglepő módon nem hoztak eredményt továbbra sem, a fehérje nem mutat hasonlóságot egyetlen adatbázisban szereplő fehérjével, mely alapján feltételezhetnénk funkcióját. A 73%-ban azonos *Rhizobium* sp NGR234 RkpY fehérjén kívül nem találtunk vele homológ fehérjéket.



**10. ábra:** Az *rkp-3* régióban, az *rkpZ* és *rkpY* gén között található inszerciós elemek. Feketével az ISRm15 elemből megmaradt szekvenciát: a teljes második ORF-et (ISRm15-B) jelöltük, valamint az ISRm15-A és ISRm15-C azonosított “csonka” szakaszait. Szürkével az ISRm26 szekvenciáját és ORF-jeit tüntettük fel. Az ábra felső részén mindkét IS elem inverted repeat (IR) és direkt repeat (DR) nukleotid sorrendje látható.

Az *rkpZ* és *rkpY* gén közötti szekvencia szakasz igen kiterjedt (9. ábra). A Kiss és munkatársai által végzett Tn5 transzpozíciós mutagenézis alapján nem találtak olyan inszerciót a két gén közötti területen, amely változást hozott volna a KPS szintézisében, ellentétben más *rkp* génnel. A számítógépes vizsgálat szerint több olyan ORF is található ezen a szakaszon melyek által kódolt fehérjék transzpozáz enzimekkel mutatnak homológiát. A részletes elemzés folyamán sikerült azonosítani a *S. meliloti*-ban előforduló és az IS66 családba tartozó teljes ISRm26 inszerciós elemet (IS) és annak 3 ORF-ét (ISRm26-1, ISRm26-2, ISRm26-3), az IS elem “inverted repeat” végét (IR) és a beépülés helyéül szolgáló célszekvencia “direct repeat” mintázatát (DR) (10. ábra). Meglepő módon az ISRm26 mellett egy másik IS elem teljes ORF-ét is azonosítottuk, az ISRm15 második ORF-ét az *orfB*-t, továbbá az ISRm26-ot közrefogó szekvenciából az tűnik ki, hogy valójában az ISRm26 az ISRm15 első ORF-ébe az *orfA*-ba ékelődött. A harmadik ORF, az *orfC* szekvenciáját is megtaláltuk részleges formában. Tehát az



*rkpZ* és *rkpY* gének közötti nagy távolság végeredményben a két inszerciós elemnek köszönhető, vagyis először az ISRM15 ékelődött a két gén közé, majd az ISRM26 integrálódott az előző IS elem *orfA* génjébe, megszakítva azt.

A régió szekvenciáját, - mely lényegében az *rkp3*-régió „jobb oldala” - a lehetséges ORF-ek bioinformatikai azonosítása után külön elküldtünk a nukleotid adatbázisba (AC: AM849044, ábra), mely szekvencia eleje 86 bp-ral megegyezik a már ismert *rkp-3* szekvencia végével (AC: AJ245666; 9. ábra).

Ezek után az újonnan azonosított gének (*orf7343*, *orf8077*, *rkpT2*) kísérletes analízisét kezdtük meg. Az eddigi tapasztalatok alapján feltételeztük, hogy ezen géneknek szintén a KPS szintézishez lehet köze, mivel a régióban található gének többsége hatással van a KPS termelésére. Emellett az *rkpY* mutáns által termelt LMW poliszacharid bioszintézis génjeit is kerestük a régióban, illetve az eddig ismert *rkp* gének között. A kísérletek alapján kíváncsiak voltunk arra, hogy van-e olyan gén, mely mindkét poliszacharid szintéziséért felelős, illetve azok az *rkp* gének (*rkpR*, *rkpS*, *rkpT*) melyek az eddigi eredmények alapján nem hozhatók kapcsolatra a KPS szintézisével, befolyással lehetnek-e az ismeretlen szerkezetű poliszacharidra. Ennek kiderítésére különböző *S. meliloti* 41 mutánsokat hoztunk létre. Ezt a munkát mutatják be a következő fejezetek.

## **6.8. Az *rkpY* régió genetikai elemzése**

A régió újonnan azonosított génjeiben (*orf7343*, *orf8077*, *rkpT2*), valamint az LMW poliszacharid termelés tekintetében nem vizsgált *rkpR*, *rkpS*, *rkpT*, *rkpZ* továbbá az *rkpY* génekben mutációt hoztunk létre AK631 baktérium (RM41 *exoB* mutánsa) háttérben. Az AK631 törzset praktikus okokból használtuk, mivel az exopoliszacharid hiánya miatt, könnyebben kezelhető, kompakt kolóniákat ad. Kísérleteinkben ezt a törzset alkalmaztuk vad típusként. A mutánsok előállítását transzpozíciós mutagenézissel végeztük, úgynevezett egyszeres (szimpla) mutánsokat létrehozva ezzel.

Az új gének vizsgálatával az volt az elsődleges cél, hogy megtudjuk mutációjuknak milyen hatása van a KPS szintézisére. Az említett gének közül az eddigi eredmények szerint csak az *rkpY* és *rkpZ* géneknek van hatása a KPS termelésre. A későbbiekben az LMW poliszacharid bioszintézisére irányuló esetleges befolyásukat is vizsgálni szeretnénk volna, úgynevezett kettős mutánsok létrehozásával, melyek az adott gén mellett az *rkpY* génben (*rkpY* mutáns háttérben) is hordoznak mutációt. A kísérlet kontrolljaként az egyszeres mutánsokat is létrehoztuk AK631 háttérben.

A teljes *rkp-3* régió szekvenciájának és fizikai térképének ismeretében, annak különböző szakaszait használtuk a mutagenézis során (pAV433, pPP4166, pPP2543, pPP4170). Az egyes plazmidokba épített fragmentek által lefedett szekvenciákat a 12. ábrán tüntettük fel.

A transzpozíciós mutagenézist a Anyagok és Módszerekben (5.16. fejezet) leírtak alapján végeztük, *in vitro* Mu entrancepозon rendszer segítségével. A kanamicin rezisztenciát hordozó transzpozon (ET-Kan<sup>R</sup>-3) véletlenszerűen épül be az adott plazmidba. Az inszerciók helyét először fizikai térképezéssel határoltuk be, majd a kiválasztott klónok esetében a pontos szekvencia szintű beépülést a transzpozonra tervezett SeqE és SeqW primerek segítségével állapítottuk meg (11. ábra). Terveinknek megfelelően minden egyes génben sikerült legalább egy mutációt létrehozni. A további kísérletekben csak egy inszerciót használtunk fel a mutációk létrehozására (12. ábra, 7. táblázat).

**7. táblázat:** Az egyes transzpozon inszerciók jellemzői

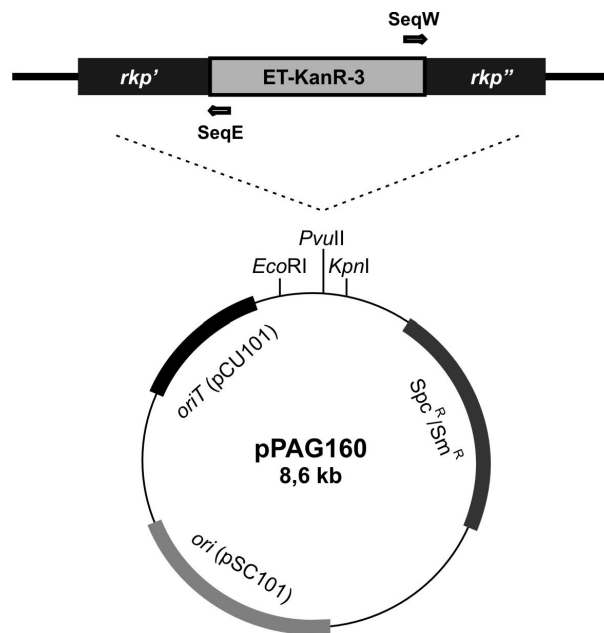
A klónozási információk mellett a KPS fenotípust és a szimbiózis sikerességét is feltüntettük.

Beépülés koordinátája (bp)	Érintett gén	Mutagenizált fragment	pPAG160-ba átépített frag.	K <sub>R5</sub> antigén fenotípus	Szimbiózis
7591	<i>rkpR</i>	pAV433	<i>EheI</i> fr. (2530 bp)	vad típus	Fix <sup>+</sup>
9091	<i>rkpS</i>	pPP4166	<i>SalI</i> (2900 bp)	vad típus	Fix <sup>+</sup>
9821	<i>rkpT</i>	pPP4166	<i>SacI</i> (4745 bp)	vad típus	Fix <sup>+</sup>
11222	<i>rkpZ</i>	pPP4166	<i>SalI</i> (3459 bp)	<i>rkpZ</i>	Fix <sup>-</sup>
18387	<i>rkpY</i>	pPP2543	<i>PstI</i> (2552 bp)	<i>rkpY</i>	Fix <sup>-</sup>
20447	<i>orf7343</i>	pPP2543	<i>PstI</i> (3401 bp)	vad típus	Fix <sup>+</sup>
21174	<i>orf8077</i>	pPP2543	<i>SalI</i> (3275 bp)	vad típus	Fix <sup>+</sup>
23345	<i>rkpT2</i>	pPP4170	<i>PstI</i> (3822 bp)	vad típus	Fix <sup>+</sup>

A beépülés koordinátája a teljes *rkp-3* régióra értendő (25024 bp).

A különböző mutagenizált *rkp-3* fragmenteket hordozó plazmidok (pUC19, pBS) nem juttathatók be konjugációval rhizobium baktériumba, ezért az inszerciós mutációkat tartalmazó génszakaszokat pPAG160 konjugatív plazmidba építettük át. A mutagenizált plazmidokból megfelelő restriktív enzimek segítségével kivágott fragmenteken tompa végeket hoztunk létre T4 polimeráz segítségével, majd *PvuII* enzimmal hasított pPAG160 vektorba építettük őket (11. ábra). A 7. táblázat összefoglalja, hogy a különböző mutációkat milyen formában vittük tovább.

A pPAG160 plazmid már egy „helper” plazmid segítségével átjuttatható rhizobiumba, de ott nem replikálódik. Mivel a mutációt okozó transzpozon kanamicin rezisztencia gént hordoz, ezért a konjugáció után ki lehet szelektálni azokat a baktériumokat, melyekben az adott mutagenizált DNS szakasz homológ rekombináció során beépül a recipiens genomjába. Csak a mutációt hordozó, homológ rekombináns lesz kanamicin rezisztens. A homológ rekombináció sikeressége érdekében a klónozott szakaszokat úgy választottuk meg, hogy a transzpozon két oldalát határoló *rkp-3* szekvencia egyenként minimum 300-400 bp hosszúságú legyen.

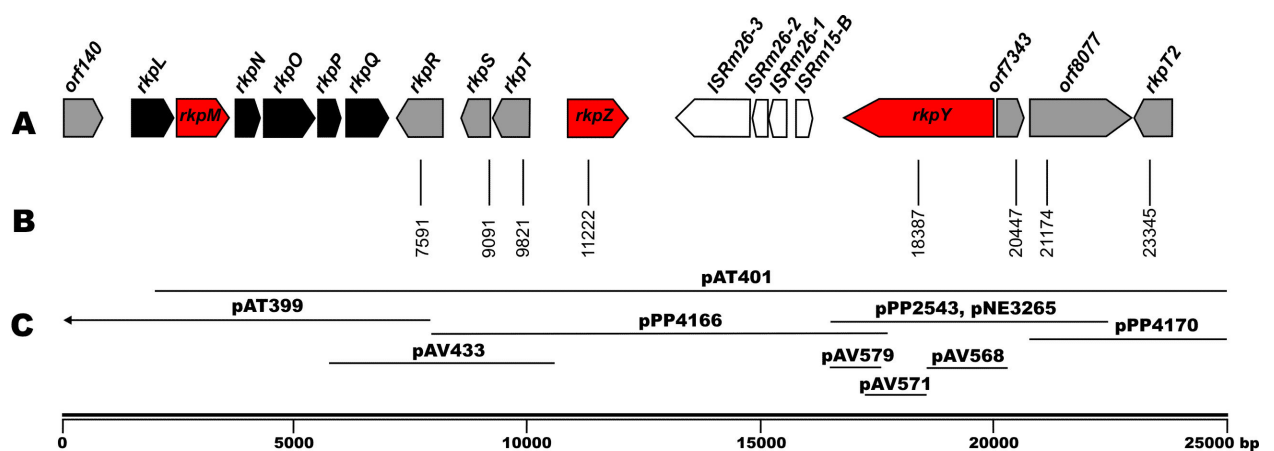


**11. ábra:** Az ET-KanR-3 mutációt hordozó *rkp-3* fragmentek beépítése a pPAG160 vektorba. A mutagenizált génszakasz beépítésének sematikus rajza látható. Jelöltük a vektor fontosabb régióit és restrikciós helyeit. oriT (pCU101): konjugációs transzfer origó; ori (pSC101) replikációs origó; Spc<sup>R</sup>/Sm<sup>R</sup>: spektinomycin és streptomycin rezisztencia gén. Az ábrán a transzpozíció helyének pontos meghatározásához használt SeqE és SeqW szekvenáló primereket is jelöltük.

Az általunk kiválasztott, adott *rkp-3* szakaszon mutációt hordozó pPAG160 konstrukciókat (12. ábra), a pCU101 helper plazmid segítségével vad típusú AK631 törzsbe juttattuk be. A mutánsokat kanamicint tartalmazó szelektív lemezekon kaptuk meg, amelyekben a mutáció beépült a recipiens törzs *rkp-3* régiót tartalmazó pRM41b megaplazmidjába. A folyamat során, amint tapasztaltuk is kétféleképpen játszódhat le az esemény. Az egyik esetben, kétszeres rekombinációnál a transzpozont közrefogó *rkp-3* homológ szekvencia révén csak az *rkp-3::ET-Kan<sup>R</sup>-3* mutáció épül be (vagyis a mutagenizált szakasz), a plazmid többi része nem, illetve elveszik az adott vad típusú *rkp-3* génszekvencia. Ezek a baktériumok tekinthetők tényleges mutánsoknak. A másik esetben csak egyszeres „crossing-over” történik, ekkor az egész plazmid beépülhet és a vad típusú szekvencia is megmarad, ezzel ún. kointegrát

képződik. A kointegrát beépülést a pPAG160 plazmid esetében streptomycin ellenszelekcióval vizsgálhatjuk, ha a teljes plazmid beépül, akkor streptomycinre lesz rezisztens a baktérium. Mivel az AK631 háttértörzs nem rendelkezik antibiotikum rezisztenciával, ezért a szelekció alkalmazható ezen mutánsok esetében.

A KPS-nek meghatározó szerepe van a fágfertőzésben és a szimbiotikus gümő kialakításában, ezért a mutánsokat fágrezisztencia és szimbiotikus aktivitás tekintetében is vizsgáltuk, a poliszacharid-mintázat jellemzése mellett. A konjugáció eredményeként nyert egyszeres baktérium mutánsokat (10.1. melléklet) fágérzékenységi tesztek és poliszacharid mintázat elemzésnek vetettük alá. A baktériumokat vad típusú *I6-3* fággal cseppentettük meg. Az *rkpZ* (AV475) és *rkpY* (AV458) mutáns kivételével az egyszeres mutánsok szenzitívek a fágra, ahogyan az AK631 törzs is. A KPS mintázat elemzésnél mutációnként több független baktérium mutánsból KPS preparátumot készítettünk, majd a mintákat DOC-PAGE módszerrel elválasztottuk és az alcián kék-ezüsttel festett géleket elemeztük. A kísérletből kiderült, hogy az újonnan azonosított gének közül egyik sem vesz részt a  $K_R5$  antigén szintézisében, mivel a poliszacharid mintázatában nem okoztak változást (10.1. melléklet). Az *rkpZ* (AV475) és *rkpY* (AV458) mutánsok a már megfigyelt mintázatot adták (14C. és 14D. ábra).



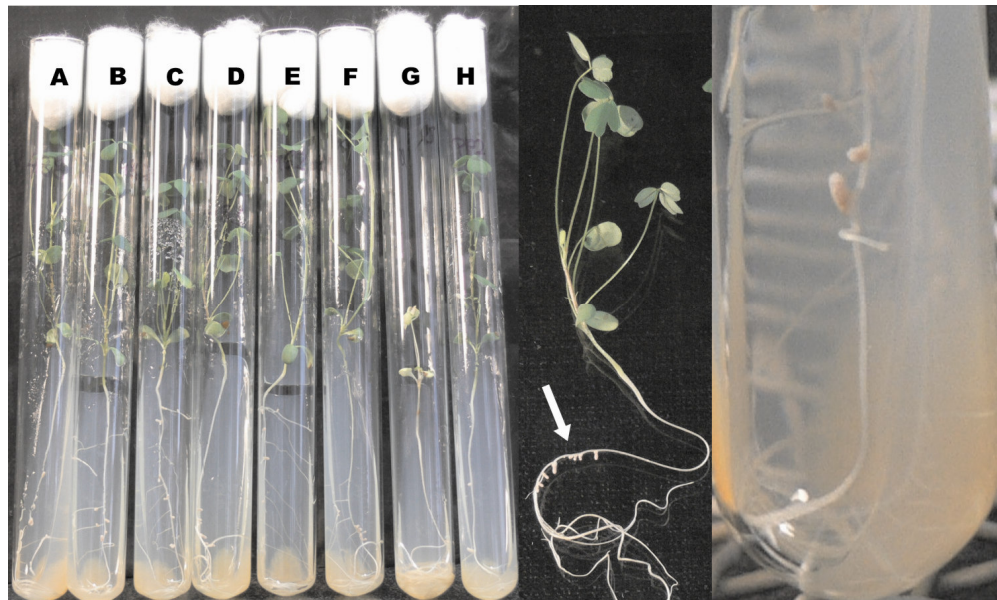
**12. ábra:** A teljes *rkp-3* régió géntérképe és a régióban végzett transzpozíciós mutagenézis kísérletek összefoglalása

**A:** A nyilak a teljes *rkp-3* régió azonosított génjeit jelölik, fehér: IS elemek; szürke: olyan gének, melyek funkciója még ismeretlen; fekete: a KPS szintézisében fontos gének; piros: a KPS bioszintézisében és a fágfertőzésben is szerepet játszó gének. **B:** A függőleges vonalakkal a transzpozonoz mutagenézis során létrehozott inszerciókat tüntettük fel, pozíciójukat megjelölve (bp). **C:** A munka során felhasznált plazmidok által lefedett *rkp-3* szekvenciák.

Azt már előzetesen tudtuk, hogy a spontán mutáns EN3222 törzs képtelen a növény inváziójára. Az *rkpR,S,T*, *orf7343*, *orf8077*, *rkpT2* génekben egyszeres mutáns baktériumok szimbiotikus aktivitását növényi teszttel ellenőriztük (13. ábra), amelyben *Medicago sativa*

növényeket fertőztünk. Pozitív kontrollként az AK631 baktériummal fertőzött, negatív kontrollként a fertőzetlen növényeket használtuk. 4-8 hét után az egyik esetben fejlett, sötétzöld növényeket kaptunk, megjelenő rózsaszín (nitrogénkötő) gümőkkel, míg a másik esetben a rhizobiumok hiánya miatt nitrogénkötésre képtelen, fejletlen, sárga növényeket. A baktérium mutánsokkal beoltottak a vad típusú rhizobiummal fertőzöttekhez hasonlóan megfelelően fejlődött, rózsaszín gümőkkel rendelkező zöld növények voltak.

A kísérleti eredmények alapján azt a következtetést vontuk le, hogy az *orf7343*, *orf8077*, *rkpT2* géneknek sem a KPS bioszintézisében, sem a fágfertőzésben, sem a szimbiózisban nincs szerepe. Ennek alapján azt reméltük, hogy az ismeretlen LMW poliszacharid szintézisében lehetnek fontosak, ezért kettős mutánsok létrehozása volt a cél a továbbiakban.



### 13. ábra: Szimbiotikus növényi teszt

Az egyes növényeket a következő *S. meliloti* baktériumokkal fertőztük: A: *rkpR* mutáns (AV488); B: *rkpS* mutáns (AV486); C: *rkpT* mutáns (AV461); D: *orf7343* mutáns (AV493); E: *orf8077* mutáns (AV462); F: *rkpT2* mutáns (AV490); G: fertőzetlen növény; H: vad típusú (AK631). Nyíllal a megjelent szimbiotikus gümöket jeleztük a középső képen egy példa növényen. A jobb oldalon pedig egy gümő felnagyított fotója látható. A G jelű csőben a beoltatlan növény nem fejlődött, elsárgult, ellentétben a különböző *S. meliloti* törzsekkel beoltott növényekkel, melyek megfelelően fejlődtek és megjelentek rajtuk a nitrogénkötésre utaló rózsaszín gyökérgümők.

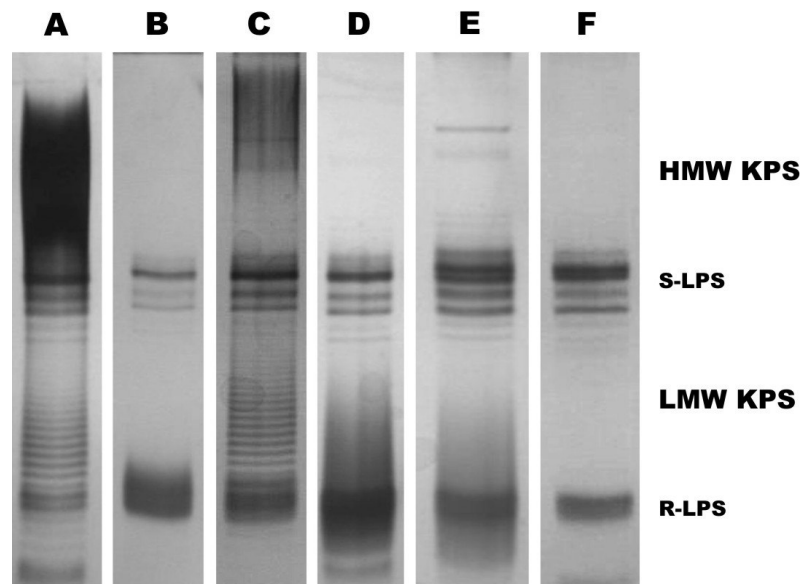
### 6.9. Az *rkpZ* gén részt vesz az LMW poliszacharid termelésében

Már rendelkezésre állt az *rkpY* génben spontán mutáns baktérium törzs (EN3222 törzs), mely LMW poliszacharidot termel és fágrezisztens (Nagy Enikő munkája). A vad típusú allél (pEN3265) bejuttatásával helyreállítható volt a 16-3 fág szenzitivitás és a KPS termelés, tehát a mutáció valóban az *rkpY* génben történt (PP3300, 10.1. melléklet). Annak kiderítésére, hogy az

LMW poliszacharid bioszintézisében mely eddig ismert *rkp* gén, illetve újonnan azonosított gén vehet részt, csoportunkban olyan *rkp-1*, *rkp-2*, és *rkp-3* régió génjeiben mutáns *S. meliloti* törzseket hoztunk létre, ahol a spontán mutáns EN3222 törzset recipiens baktériumként alkalmaztuk (10.1. melléklet), tehát *rkpY*<sub>3222</sub> genetikai háttérbe juttattunk be újabb *rkp* mutációt, ezzel ún. kettős mutánst létrehozva.

Az RM41 törzs által termelt K<sub>R</sub>5-antigén pszeudaminsav és glükuronsav heteropolimerje, melyek szintéziséért a már ismert *rkp* gének felelősek. Ezért a kettős mutánsok vizsgálata arra is fényt deríthet, hogy az LMW poliszacharid az említett komponensekből áll-e vagy más molekula polimerje lehet.

Az ismert *rkp* gének vizsgálatához az előzőleg izolált Tn5 inszerciókat használtuk (Putnoky et al., 1990; Kiss and Kondorosi, 1997; Kereszt et al., 1998; Kiss et al., 2001), melyek az *rkp-1* régióban az *rkpA*, *rkpB*, *rkpC* génekben; az *rkp-2* régióban az *rkpK*; az *rkp-3* régióban az *rkpL*, *rkpM*, *rkpQ* génekben helyezkedtek el. Az EN3222 donor baktériumba történő mutációk bejuttatása konjugációval történt, az *rkpM*<sub>4046</sub> allél azonosításánál leírtak alapján. Az *rkpZ*, *rkpR*, *rkpS*, *rkpT*, *orf7343*, *orf8077*, *rkpT2* gének vizsgálatához pedig az egyszeres mutánsok létrehozásánál alkalmazott pPAG160 konstrukciókat (7. táblázat, 12. ábra), a pCU101 helper plazmid segítségével juttattuk be a spontán mutáns *rkpY*<sub>3222</sub> háttérbe.



**14. ábra:** DOC-PAGE gélkép az egyes baktérium mutánsok KPS mintázatáról

A: vad típusú mintázat (AK631). B: *rkpM* mutáns fenotípus (GH4046). C: *rkpZ* mutáns fenotípus (GH4180). D: *rkpY* mutáns fenotípus (EN3222). E: *rkpY* fenotípus egy reprezentatív *rkp-rkpY* kettős mutánsnál (AV483). F: *rkpZ-rkpY* kettős mutáns fenotípus (AV476). Lásd még 10.1. melléklet. HMW KPS: magas molekula tömegű poliszacharid, LMW KPS: alacsony molekula tömegű poliszacharid, S-LPS: „smooth” LPS; R-LPS: „rough” LPS. A KPS és LPS poliszacharidokat eltérő festődésük alapján lehetett megkülönböztetni az eredeti gélen (barna festődés: LPS, szürke festődés: KPS).

A pPAG160 konstrukciók alkalmazásánál is szükség volt a kointegráltak szelekciójára, viszont itt nem végezhattünk streptomycin ellenszelekciót, mivel az EN3222 törzs már eleve spontán streptomycin rezisztens. Ezért a megfelelő mutánsok kiválogatásához a pPAG160 plazmid pCU101 origójára és  $\text{Sp}^{\text{R}}/\text{Str}^{\text{R}}$  génjére specifikus PCR primereket terveztünk és kolónia PCR segítségével ellenőriztük a kointegrát meglétét minden esetben (lsd. 5.8. fejezet).

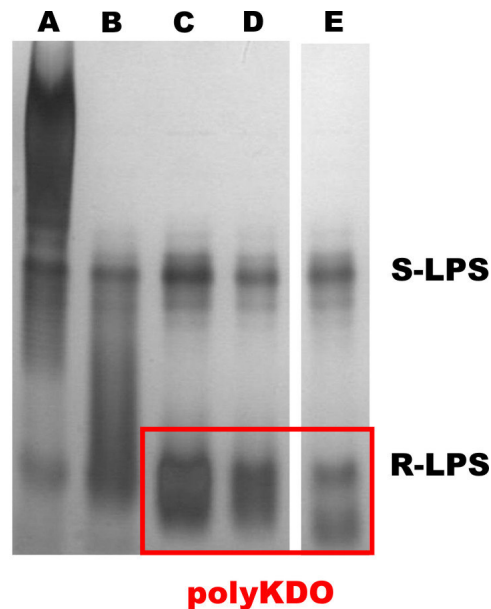
Az *rkpY*<sub>3222</sub> háttérben a különböző *rkp* mutációk LMW poliszacharid mintázatára gyakorolt hatását DOC-PAGE módszerrel ellenőriztük, melyet a 10.1. melléklet táblázata foglal össze. Az eredmények szerint csak az *rkpZ-rkpY* kettős mutáns (AV476) az, amely nem képes az LMW poliszacharidot termelni, nem jelent meg semmilyen KPS jellegű poliszacharid a DOC-PAGE gélen. A többi baktérium törzs az *rkpY* mutánsokra jellemző mintázatot adta (14E. és 14F. ábra). Az eredmény megerősítése végett az alábbiakban leírt módon létrehoztunk egy olyan *rkpZ-rkpY* mutánst, ahol a spontán *rkpZ* mutáns PP4180 baktériumba juttattunk be egy *rkpY::ET-Kan<sup>R</sup>-3* konstrukciót (AV518). A DOC-PAGE elemzés ugyanazt az eredményt hozta, mint az előző esetben, vagyis, hogy a két gén együttes mutációja eltünteti az LMW poliszacharidot, valamint a baktérium láthatóan nem termel semmilyen KPS jellegű poliszacharidot (14F. ábra). A fágérzékenységi tesztben a mutánsok ugyanúgy viselkedtek, mint az EN3222 törzs vagyis fágerezisztensek voltak a 16-3 vad típusú fággal szemben.

#### **6.10. Az RkpY gátolja a polyKDO termelést *S. meliloti* 1021 törzsben**

Az *rkpZ* gén K<sub>R5</sub>-antigénre gyakorolt hatását már leírták (Reuhs et al., 1995), miszerint mutációjakor nem szűnik meg a KPS termelése. A poliszacharid láncok hosszát befolyásolja, vagyis a polimerizációt szabályozhatja. Időközben további eredmények jelentek meg az irodalomban az *rkpZ* génnel kapcsolatban, melyek felkeltették érdeklődésünket. Sharypova és munkatársai *S. meliloti* 1021-ben vizsgálták az *rkpZ* gén mutációjának hatását (Sharypova et al., 2006). Ebben a rhizobium törzsben két példányban is előfordul a gén, viszont funkciójukban nem képesek helyettesíteni egymást. A *S. meliloti* 1021 törzs egy KDO homopolimerből álló poliszacharidot termel, melynek nincs szimbiotikus aktivitása. Eredményeik szerint az *rkpZ* gén paralógjai (*rkpZ*<sub>1</sub>, *rkpZ*<sub>2</sub>) a KDO homopolimer szintézisében fontosak, valamint igazolták, hogy az *rkpZ*<sub>41</sub> génnek szintén a KDO homopolimer termelésre van hatása. A gén Sm1021 törzsbe juttatásával a KDO homopolimer polimerizáltságának foka, illetve a lipidált polimerek aránya megnőtt a vad típusú baktériumhoz képest. Ezek alapján kézenfekvő volt az a feltételezés, hogy az *rkpY* mutánsok által termelt LMW poliszacharid valójában egy KDO homopolimer lehet, melynek termelését az *rkpZ* mutációja megszünteti. A működő *rkpY* gén hatással lehet a szintézisére, blokkolhatja azt a vad típusú baktériumban, mutációja esetén pedig nagy

mennyiségű LMW poliszacharid termelődik (14D. ábra), ahogyan a DOC-PAGE elemzésből kiderül.

Bizonyításként egy olyan kísérletet terveztünk, ahol az RkpY fehérje hatását vizsgálhattuk a KDO homopolimer szintézisére. Az *rkpY* gént tartalmazó konjugatív plazmidot (pNE3265) juttattuk be *S. meliloti* 1021 törzsbe. A konjugáció sikerességét kanamicin szelekcióval ellenőriztük. A Sm1021 genom szekvenálási adatok alapján a törzs nem rendelkezik *rkpY* génnel vagy annak homológjával, tehát a kísérletben azt vártuk, hogy az RkpY fehérje gátolni fogja a KDO homopolimer termelést, mely megváltozását DOC-PAGE módszerrel vizsgáltuk. Az eredmények szerint összehasonlítva a vad típusú Sm1021 törzset a Sm1021 (*rkpY*<sup>+</sup>) törzssel kitűnik, hogy a KDO homopolimer termelést jelentősen lecsökkenti az RkpY fehérje jelenléte (15E. ábra). Következésképpen azt feltételeztük, hogy az RkpY fehérje a KDO homopolimer szupresszora lehet, illetve hatással van annak termelődésére.



**15. ábra:** Az *rkpY* gén hatása *S. meliloti* 1021-ben

A: vad típusú *S. meliloti* 41 mintázat. B: *rkpY* mutáns (EN3222). C: *S. meliloti* 1021. D: a C mintához képest fele mennyiségű minta (*S. meliloti* 1021). E: *S. meliloti* 1021+*rkpY*<sub>41</sub> (pNE3265). S-LPS: „smooth” LPS; R-LPS: „rough” LPS. A KPS és LPS poliszacharidokat eltérő festődésük alapján lehetett megkülönböztetni az eredeti gélen (barna festődés: LPS, szürke festődés: KPS), piros kerettel a polyKDO-t jelöltük.

### 6.11. Az *rkpLMNOPQ* géncsoport előfordulása más baktériumokban

Munkánk megkezdése óta számos baktérium genom szekvenciájával bővültek az adatbázisok, ezért azt terveztük, hogy az *rkp-3* régió K<sub>R5</sub>-antigén szintézisének törzsspecifikus génjeit (*rkpL-Q* gének) homológia keresésnek vetjük alá. A régebbi kutatások szerint, a GC-



tartalom és a kodonhasználat elemzésével kiderült, hogy az *rkp-3* régió génjei valószínűleg horizontális transzfer segítségével, újonnan szerzett gének. Az egyes kódoló szekvenciák különböző kodonhasználattal rendelkeznek, valamint a régió génjeinek GC-tartalma alacsonyabb, mint az alap „háztartási” géneké (Kiss et al., 2001; Broughton et al., 1972). A Kiss és munkatársai által leírt *rkp-3* régió szekvenciája 55.2% GC tartalommal rendelkezik, ellentétben az *rkp-1* régió 63.4%-ával és az *rkp-2* régió 62.5%-ával melyek beleillenek a baktérium alap génjei által mutatott 62-64%-os GC-tartalom értékébe. Hasonló jelenséget már más, főleg patogén baktériumok K-antigén specifikus génjeinél is megfigyeltek.

### 8. táblázat: A Pse és Rkp fehérjék összehasonlítása

I	Fehérje funkció	II	Feltételezett funkció domének alapján	Azonosság/ Hasonlóság %	AC szám	Faj
<b>PseB</b>	NAD(P) függő dehidratáz/epimeráz	<b>RkpL</b>	NAD(P) függő dehidratáz/epimeráz	58/72%	AAO73065	<i>Campylobacter coli</i>
<b>PseC</b>	Piridoxál-foszfát függő aminosztransferáz	<b>RkpM</b>	Piridoxál-foszfát függő aminosztransferáz	40/58%	YP_892700	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> 82-40
<b>PseH</b>	N-acetiltransferáz	<b>RkpP</b>	Acetiltransferáz	25/50%	NP_207125	<i>Helicobacter pylori</i> 26695
<b>PseG</b>	Nukleotidáz	<b>RkpO</b>	Glikoziltransferáz	30/46%	ZP_003673 66	<i>Campylobacter coli</i> RM2228
<b>PseI</b>	Pszudaminsav szintetáz	<b>RkpQ</b>	Acetilneuraminsav szintetáz	44/61%	NP_206977	<i>Helicobacter pylori</i> 26695
<b>PseF</b>	CMP-pszudaminsav szintetáz	<b>RkpN</b>	Acetilneuraminsav szintetáz	33/54%	NP_207124	<i>Helicobacter pylori</i> 26695

**I:** Sorrendben a pszudaminsav szintézisért felelős fehérjék *Campylobacter jejuni* és *Helicobacter pylori* (Schoenhofen et al.; 2006). Feltüntettük funkciójukat is. **II:** A fehérjék lehetséges megfelelői *S.meliloti* 41-ben, a konzerválódott domén predikció alapján feltételezett funkciójuk jelölésével. Az Rkp fehérjék BLASTP elemzése során különböző *Campylobacter* és *Helicobacter* fajokban található homológok AC számát és az azonosság és hasonlóság mértékét is felsoroltuk.

Az RkpL-Q fehérjék homológia keresése során számos olyan baktériumot találtunk, ahol ez a gén csoport hasonló formába és sorrendben megtalálható. A *Rhizobium sp.* NGR234 is rendelkezik az *rkp-3* régióval, beleértve az *rkpL-Q* géneket és a kutatók kísérletesen bizonyították szerepüket a KPS, pontosabban annak egyik egységének a pszudaminsav szintézisében (LaQuere et al., 2006). Ezen kívül az *rkpL-Q* gének ortológjai megtalálhatóak szintén ilyen sorrendben a *Pseudomonas aeruginosa* 07, 08, 09 szerotípusában, ahol bizonyítottan az LPS alegységének, az O-antigént alkotó pszudaminsav szintézisében fontosak. A régió alacsony GC-tartalmát, itt is a horizontális géntranszferrel magyarázzák (Raymond et al., 2002). Számos olyan baktériumot is találtunk, ahol nincsenek még kísérletes adatok a gének, fehérjék funkcióját illetően, csak a genom szekvenálások során meghatározott

szekvenciák. A BLASTP elemzések eredményeit a 10.2. mellékletben foglaltuk össze. Az *rkpY* génre vonatkozólag továbbra sem találtunk homológokat a baktérium genomokban, kivételt képez a *Rhizobium sp.* NGR234 *rkpY* génje, mely szintén az *rkp-3* régióban található, viszont funkciója itt sem ismert még. A táblázatból feltűnik, hogy néhány baktérium esetében az RkpP fehérje homológja hiányzik vagy formil-transzferáz, illetve acetiltranszferáz helyettesíti. A táblázatban szereplő összetartozó homológ fehérjék szekvenciáival többszörös illesztést végeztünk, majd ennek segítségével jelöltük a szekvencia azonosságának mértéket, illetve a konszenzus szekvenciát (10.3. melléklet).

*Campylobacter jejuni* és *Helicobacter pylori* baktériumok esetében biokémiai és genetikai tekintetben részletesen elemezték a pszeudaminsav szintézisét (Schoenhofen et al 2006, Schirm et al., 2003, Guerry et al., 2006). Ezekben a baktériumokban a flagellum összetevőjeként fordul elő a pszeudaminsav, mely előállítását a *pseB*, *pseC*, *pseF*, *pseG*, *pseH*, *pseI* gének végzik. Az RkpL-RkpQ fehérje homológok között mindegyik esetben találtunk a *Campylobacter* és *Helicobacter* fajokban előforduló Pse szintézisben fontos fehérjét, viszont itt nem figyelhető meg a sorrendbeni összefüggés, nincs olyan faj vagy törzs ahol az Rkp fehérjék homológjai mind megtalálhatók. Ennek ellenére a funkciók alapján összevethetjük a PseBCFGHI és RkpLMNOPQ fehérjét és az adatok tükrében feltételezhetjük, hogy az Rkp fehérjék és azok ortológjai milyen szerepet töltenek be a Pse szintézis enzimeiként (8. táblázat).

## 7. Eredmények megvitatása

Az eddigi eredményeink alapján kutatómunkánkat két fő területre különíthetjük el. Az egyik, a kapszuláris poliszacharid (KPS, K<sub>R5</sub>-antigén) szimbiózisban betöltött szerepének, valamint bioszintézisének megismerése *S. meliloti* 41 baktériumban a folyamatban szerepet játszó gének vizsgálatával. A másik terület, a baktérium-fág felismerésben fontos alkotók (gének, fehérjék, KPS) feltárása genetikai munkával, mely segítségével tanulmányozható a felismerés molekuláris mechanizmusa. A két terület szorosan összefügg egymással, ahogyan az előzőekben láthattuk. Elsőként a baktérium-fág felismerésével kapcsolatos eredményeink következtetéseit ismertetem.

### 7.1. A 16-3 fágreceptor azonosítása *S. meliloti* 41 baktériumban

A kezdeti vizsgálatok szerint a K<sub>R5</sub>-antigénnek fontos szerep jut a szimbiózisban, és a fágfertőzésben, valamint azt feltételezték, hogy receptorként szolgál a 16-3 fág számára (Putnoky et al., 1990). A KPS bioszintézis génekben történt mutációk fágrezisztenciát okoznak a 16-3 vad típusú fággal szemben. Kísérleteinkben abból az elméletből indultunk ki, hogy ha egy fágrezisztens baktérium mutánson lehetséges ún. host-range fágmutánst izolálni, akkor a fágreceptor még a baktérium felszínén van, csak módosult formában. A vad típusú fág nem képes kötődni ehhez a receptorhoz, de alkalmazkodni tud egy a farkirost fehérjében történt mutációval (host-range mutáció). A jelenség lehetővé tette, hogy párhuzamosan a fágrezisztenciát okozó baktérium mutációkat és a host-range fágmutációkat azonosítsunk. A különböző mutánsok segítségével a KPS bioszintézis gének feltérképezését, illetve a fágreceptor kialakításában fontos gének vizsgálatát kezdtük meg. A host-range mutánsizolálási kísérlet alkalmazása során elsőként a fágreceptor hibás GH4046 törzset izoláltuk. A mutáns törzs megcáfolta eredeti elgondolásunkat, miszerint a KPS a 16-3 fág receptora lenne. Az eredmény azt támasztotta alá, hogy ebben az esetben a receptor nem maga a KPS, hanem az RkpM fehérje. Ahogyan az *rkpM::Tn5* inszerciós mutáció, úgy az *rkpM<sub>4046</sub>* allél is megszünteti a KPS termelődését, tehát a poliszacharid nem szolgálhat receptorként a host-range mutációval rendelkező fágok számára. Ennek ellenére, míg a Tn5 inszerciós mutánson nem lehetett, addig az *rkpM<sub>4046</sub>* allélt hordozó baktériumon sikerült host-range fágmutánst izolálnunk (16-3 *h<sub>5</sub>* fág). Az RkpM fehérjében történt kivételes aminosavcsere olyan módosulást okozott a fehérjében, mely lehetővé tette a 16-3 fág alkalmazkodását. Az *rkpM<sub>4046</sub>* mutáció kivételességét az is bizonyítja, hogy más független kísérletben is ezt a mutációt azonosítottuk a génben (PP4178 törzs). Az izolált 16-3 *h<sub>5</sub>* fág a *h* génben hordoz egy missense mutációt, mely a fehérje

C-terminálisán található. A *h* gén a feltételezések szerint a fág farkirost fehérjéjét kódolja, mely közvetlenül részt vesz a baktérium felismerésében, és az eredményeink szerint pedig közvetlen kapcsolatban állhat az RkpM fehérjével.

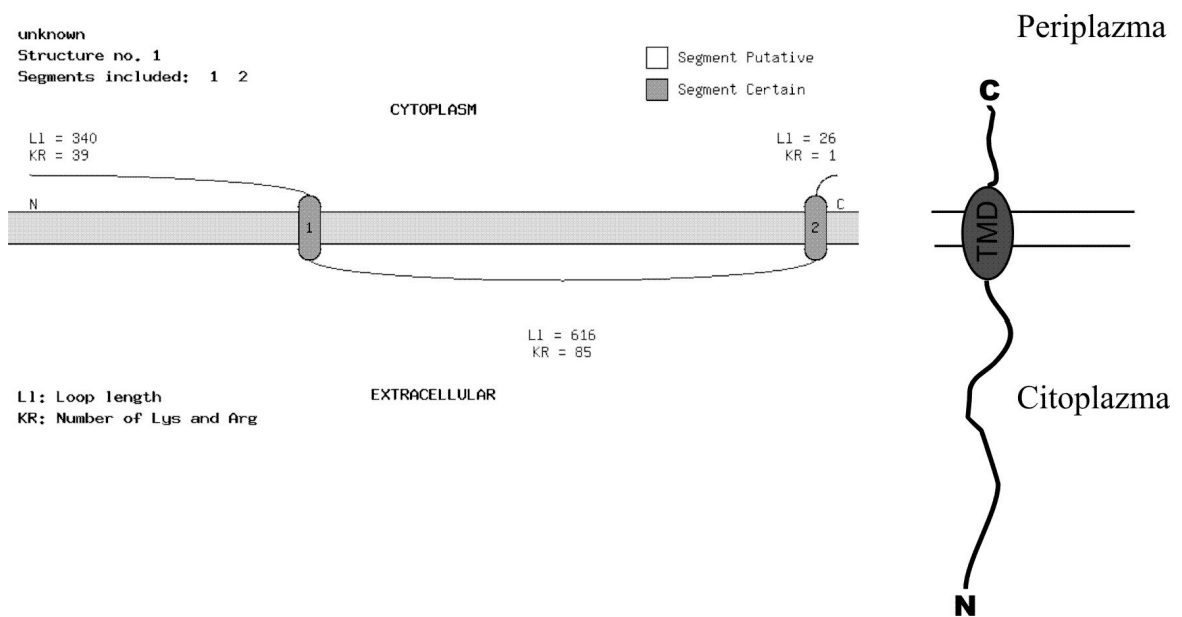
A baktérium és fág fehérjék konkrét összefüggését, fizikai kapcsolatát, már más rendszerekben is kimutatták. Példaként említve az *Escherichia coli* K-12 törzset és a  $\lambda$  fágot. A fág receptora a MalB, maltóz és maltodextrinek transzportjáért felelős külső membránfehérje. Ezzel közvetlen kölcsönhatásban a fág farkirost J fehérjéje áll. A *malB* génben történő pontmutációkra, melyek fágrezisztenciát eredményeznek, a host-range fágok szintén egy-egy missense mutációval alkalmazkodnak, melyek mind a *j* génnek a farkirost C-terminálisát kódoló részére estek. Ez a fertőzőképesség visszanyerését eredményezi (Werts et al., 1994; Wang et al., 1998).

Ahogy az előző példa mutatta, a fágreceptorként működő vagy fágreceptort alkotó fehérje minden bizonnyal a külső membránban helyezkedik el. A fehérjeszekvencia elemzések szerint az RkpM három transzmembrán doménnel rendelkezik és belső membránfehérje lehet. A C-terminálison lévő *rkpM*<sub>4046</sub> allél mutáció a periplazmatikus tér felé orientálódik. Mindezt alátámaszthatja, hogy sikerült *TnphoA* transzpozonos mutagenézis segítségével aktív PhoA fúziókat izolálni a fehérjében (Nagy Tibor munkája). A kísérleti módszer a belső membránfehérjék periplazmatikus szakaszának, illetve a periplazmatikus térbe exportálódó fehérjék vizsgálatára alkalmas (Manoil et al., 1990).

Az *E. coli*- $\lambda$  fág rendszerben mindkét partnernél több helyen bekövetkezhet a felismerést befolyásoló mutáció. Feltételeztük, hogy esetünkben is fennállhat ez a jelenség, ezért folytattuk mutánsizolálási kísérleteinket. A további munka során szintén egy már ismert KPS bioszintézis gént azonosítottunk. Az *rkpZ* mutáns GH4180 törzs egy megváltozott szerkezetű, nagyobb molekula tömegű (HMW) poliszacharidot termel. A GH4180 törzsön a *16-3 h*<sub>109</sub> és *16-3 h*<sub>105</sub> host-range mutációt hordozó fágokat izoláltuk, illetve az *rkpZ*::Tn5 inszerciós mutáns (AT313) a *16-3 h*<sub>22</sub> mutáns fágot. Az eredmények alapján itt nem egy speciális mutációról van szó, mivel minden *rkpZ* mutáns fenotípusa ugyanaz a fágfertőzésben. Ebből arra következtettünk, hogy az RkpZ fehérjének nincs olyan jellegű befolyása a receptorra, mint ahogyan az RkpM fehérje esetében láttuk. Azt is feltételeztük, hogy talán a poliszacharid eltérő szerkezete „engedte meg” a fág alkalmazkodását, vagy az RkpZ fehérje csak közvetve játszik szerepet a fágreceptorban. A szekvenálási kísérletek alapján a *16-3 h*<sub>105</sub> fágban a *h* gént, míg a másik két fágban (*16-3 h*<sub>109</sub> és *h*<sub>22</sub>) a *h* géntől 3' irányba eső p023 ORF-et érintette a host-range mutáció (Deák Veronika munkája). Ezen eredmények alapján azt feltételeztük, hogy mind a

baktérium, mind a fág oldaláról több fehérje is részt vehet közvetve vagy közvetlenül a felismerési mechanizmusban.

A PP4073 baktérium mutáns vizsgálata is hasonló eredményeket hozott. A baktérium az *rkpY* génben hordoz egy missense mutációt, mely ebben az esetben is speciálisnak bizonyult. Más *rkpY* mutáns nem volt alkalmas host-range fág izolálására annak ellenére, hogy egy megváltozott szerkezetű poliszacharidot termel a baktérium. Két fágmutánst izoláltunk kísérleteink során az *rkpY*<sub>4073</sub> allélt hordozó baktériumon. A szekvencia szintű vizsgálatok szerint a 16-3 *h*<sub>Y2</sub> a *h* génben hordoz mutációt, míg a 16-3 *h*<sub>Y3</sub> a p023 ORF-ben (Deák Veronika munkája).



**16. ábra:** Az RkpY fehérje lehetséges transzmembrán doménjei.

Az ábra bal oldalán a TopPred2 program által jósolt szerkezeti modell látható. Jobb oldalon a Split 4.0 program által megadott lehetséges fehérje szerkezetet ábrázoltuk.

A bioinformatikai elemzéseink szerint több transzmembrán domén található az RkpY fehérjében, azonban aktív translációs PhoA fúziót nem sikerült izolálnunk. A TopPred program predikciója szerint, két transzmembrán doménnel rendelkezik a fehérje és a közöttük lévő 616 aminosav nagyságú szakasz a periplazmatikus tér felé irányul (16. ábra). Egy ekkora hosszúságú periplazmatikus fehérje szakaszon már lehetséges nagy valószínűséggel aktív PhoA fúziót izolálni. Kísérleteinkben azonban ez többszöri próbálkozás során sem sikerült. A másik, Split 4.0 program szerint egy transzmembrán domén található az RkpY fehérje C terminálisán, és egy 26 aminosavból álló fehérje szakasz a periplazma felé orientálódik (16. ábra). Ha ez a lehetőség áll fenn, akkor valószínű, hogy random mutagenézissel szinte lehetetlen ilyen kis

szakaszon aktív fúziót izolálni. Ennek megoldására az adott szakaszra direkt úton történő fúzió létrehozása adna megoldást. Az izolált host-range fágmutánsok alapján azonban a fehérjének fontos része lehet a fágreceptor kialakításában. A speciális mutáció kialakulása az RkpY és a fág farkirost fehérje közötti közvetlen kapcsolatra utal. Ez a kapcsolat pedig azt feltételezi, hogy a fehérje a membránban helyezkedik el, ahogyan az RkpM is.

A mutánsizolálási kísérletekben több, már ismert KPS bioszintézis gént is azonosítottunk, melyek fontosak a receptor kialakításában (*rkpY*, *rkpM*, *rkpZ*). Feltételeztük, hogy a fehérjék között direkt kapcsolat is fennállhat, egy komplexet alkothatnak. Az eredmények szerint az RkpY és RkpM valószínűleg belső membránfehérjék lehetnek és speciális mutációjuk teszi lehetővé a mutáns fágok adszorbcóját. Az RkpZ fehérje esetében nem egyértelmű, hogy az eltérő szerkezetű poliszacharid az oka a fágmutánsok kötődésének vagy az RkpZ fehérje hiánya/módosulása. Ha feltételezzük, hogy a fágreceptor egy fehérje komplex és az RkpZ ennek a része, akkor az is lehetséges, hogy hiánya esetén az egész receptor „torzul” és ez teszi lehetővé a fágmutánsok kötődését. Ezek alapján azt is gondolhatjuk, hogy az RkpM és RkpY speciális mutációjuk szintén magával vonja az egész receptor módosulását, de a szerkezeti változás még megengedi a receptor komplex összeépülését.

A bakteriofágok, egy a baktérium felszínén lévő struktúrához kötődnek. A fág DNS bejuttatásához általában olyan apparátusra, csatornára van szükség, mely „átível” a külső membránon, periplazmatikus téren és a belső membránon. Ahogyan az *E. coli*-λ fág rendszeren láttuk ez egyetlen fehérje is lehet, viszont jónéhány fágreceptor van, amely több fehérjéből áll. Példaként említve az *E. coli* K12 törzsre specifikus C1 fág receptora. A fág DNS sikeres bejuttatásához szükséges a BtuB külső membránfehérje, a DcrB periplazmatikus és DcrA belső membránfehérje (Likhacheva et al., 1996). Ezek alapján esetünkben is rendelkeznie kell a fágreceptornak egy külső membránban elhelyezkedő alkotóval.

A következő fejezetekben szó lesz az egyes vizsgált fehérjék (RkpM, RkpZ, RkpY) KPS bioszintézisben betöltött funkciójáról. Mivel ugyanannak a bioszintézis folyamatnak az enzimei, ez tovább erősíti azt a feltételezést, hogy fizikai kapcsolat lehet a fehérjék között. A jövőben érdemes lehet pontosítani a három fehérje közötti kapcsolatot a fágreceptor tekintetében, lokalizálni helyüket a sejtben/sejtmembránban. Emellett azonosítani azt a komponenszt a fehérje komplexben, melyhez ténylegesen a fág kötődik és a külső membránban helyezkedik el.

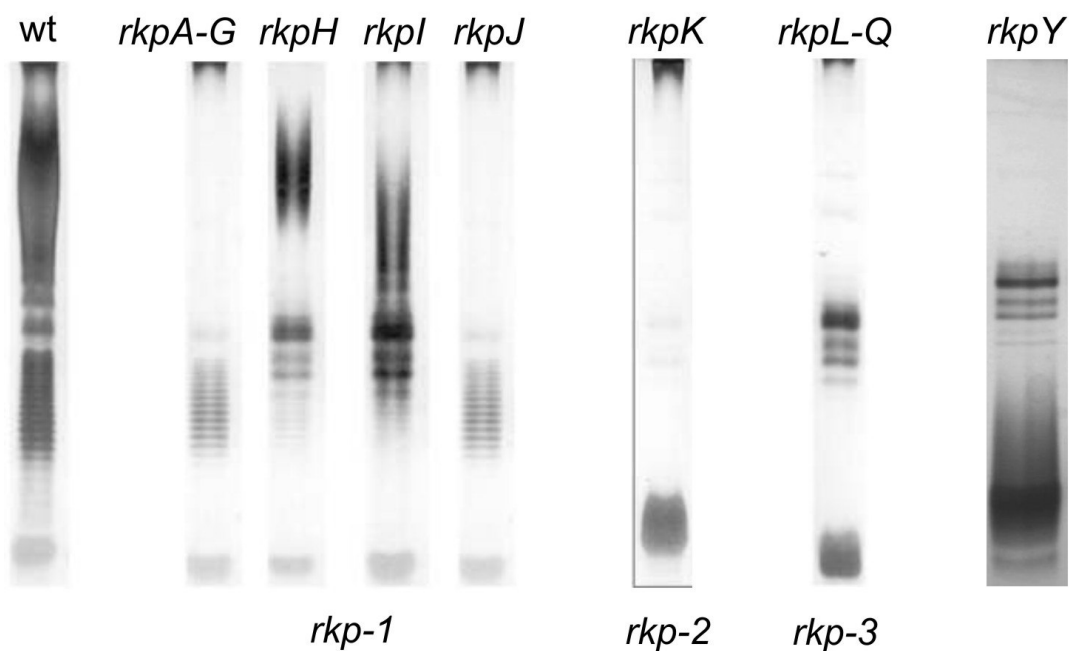
Az *E. coli* és a K fágok példája alapján, - ahogy az irodalmi bevezetőben is említettük - láthattuk, hogy a baktérium felszínét azonosító folyamat két lépésből állhat. A fág először a kapszuláris poliszacharidhoz kötődik, majd azt enzimikus úton lebontja, végül a DNS-e

bejuttatásául szolgáló bakteriális csatornafehérjét ismeri fel. Az eredmények tekintetében a *S. meliloti* 41 baktérium, valamint a *I6-3* fág esetében sem zárható ki ez a lehetőség. Ezek alapján a *I6-3* fág farkirost fehérjének rendelkeznie kellene a KPS polimer hasításához szükséges enzimikus funkcióval (liáz, endozialidáz). Az említett funkció meglétét bizonyítani lehetne a fág farkirost fehérje enzimikus képességének vizsgálatával. Ez tisztázná, hogy a fágfertőzés során történik-e poliszacharid lebontás és van-e a folyamatnak olyan lépése, melyben a sejtfelszíni poliszacharidot ismeri fel a fág.

## 7.2. A *S. meliloti* 41 baktérium kétféle kapszuláris poliszacharidot termel

Korábbi munkák során három régiót azonosítottak (*rkp-1*, *rkp-2*, *rkp-3*) *S. meliloti* 41 baktériumban, melyek a kapszuláris poliszacharid bioszintéziséért felelősek (Kiss et al., 1997; Petrovics et al., 1993; Kereszt et al., 1998; Kiss et al., 2001). A bioszintézis gének azonosítása Tn5 transzpozonos mutagenézis segítségével történt. A további gének feltérképezése során azonosították az *rkp-3* régió addig meghatározott szakaszán kívül eső *rkpY* gént is (Kiss et al., 2001). Az *rkpY* mutációt hordozó baktérium KPS fenotípusa eltért a vadtypustól, egy eddig ismeretlen mintázatú, alacsony molekula tömegű poliszacharidot termelt (LMW poliszacharid), valamint *I6-3* fágrezisztens volt. Az volt a célunk, hogy tisztázzuk az *rkpY* mutáns által termelt poliszacharid milyen összefüggésben van a K<sub>R5</sub>-antigénnel, illetve szintézisében milyen gének vesznek részt. További tervünk volt az *rkpY* gén környezetében újabb K<sub>R5</sub>-antigén bioszintézis gének feltérképezése. Első lépésként meghatároztuk az *rkpY* gén környezetének szekvenciáját, egy 12203 bázispárból álló szakaszt, mely a már eddig ismert *rkp-3* régió „jobb oldalát” képezi (AC: AM849044). A szekvencia számítógépes elemzése szerint három ORF található az *rkpY* gén után: *orf7343*, *orf8077*, *rkpT2* (18. ábra). Kíváncsiak voltunk arra, hogy az említett ORF-ek működő géneket kódolnak-e, valamint mi lehet a funkciójuk az általunk vizsgált folyamatokban. Azonban ebben a régióban az *rkpY*-on kívül nem találtunk egyetlen gént sem, mely a KPS vagy az LMW poliszacharid bioszintézisére, a baktérium szimbiotikus aktivitására vagy a fágfertőzésre hatással van. Annak ellenére, hogy az *rkpT2* gén által kódolt fehérje ABC-2 transzportert kódoló fehérjékkel homológ, az eredmények szerint nincs befolyása az említett poliszacharidokra. RkpT2 homológ fehérje példaként említve az *E. coli* KpsM fehérjéje, mely bizonyítottan a poliszacharid membránon át történő transzportját végzi (Pavelka et al., 1991; Whitfield 2006). Az *rkpT2* feltételezett paralógja (*rkpT*) és az *rkpR*, *rkpS* gének kapcsán is erre az eredményre jutottunk, jóllehet *E. coli* baktériumban a homológ gének (*kpsE*, *kpsT*, *kpsM*) esszenciálisak a KPS bioszintézisben (Whitfield 2006).

Kezdetben azt feltételeztük, hogy az *rkpY* mutánsok által termelt poliszacharid a K<sub>R5</sub>-antigén prekuzora lehet, glükuronsav és/vagy pszeudaminsav komponensekből áll. Ennek alapján léteznie kell egy olyan génnek, mely mindkettő szintézisében fontos, vagyis van olyan esszenciális KPS bioszintézis gén, mely az LMW poliszacharid termelését is befolyásolja. Az *rkp-1*, *rkp-2*, *rkp-3* régió általunk választott reprezentatív mutánsainak különféle KPS mintázata van (17. ábra). Az *rkp-rkpY* kettős mutánsok esetében viszont az *rkpZ-rkpY* mutáns kivételével mindegyik baktérium az *rkpY* mutáns által termelt poliszacharid mintázatával rendelkezett. Léteznek olyan *rkp-1*, *rkp-2*, *rkp-3* mutációk, melyek megszüntetik a KPS szintézist (*rkpK*, *rkpL*, *rkpM*), ennek ellenére a kettős mutánsok ugyanúgy termeltek LMW poliszacharidot (17. és 18. ábra). Ezek szerint olyan gének, melyek a glükuronsav (*rkpK*) és a pszeudaminsav (*rkpL-Q*) alegységek szintézisében fontosak, az LMW poliszacharid termelésére nincsenek hatással. Az eredmények bizonyítják, hogy az LMW poliszacharid nem a K<sub>R5</sub>-antigén prekuzora, nem glükuronsav és/vagy pszeudaminsav alegységekből áll.

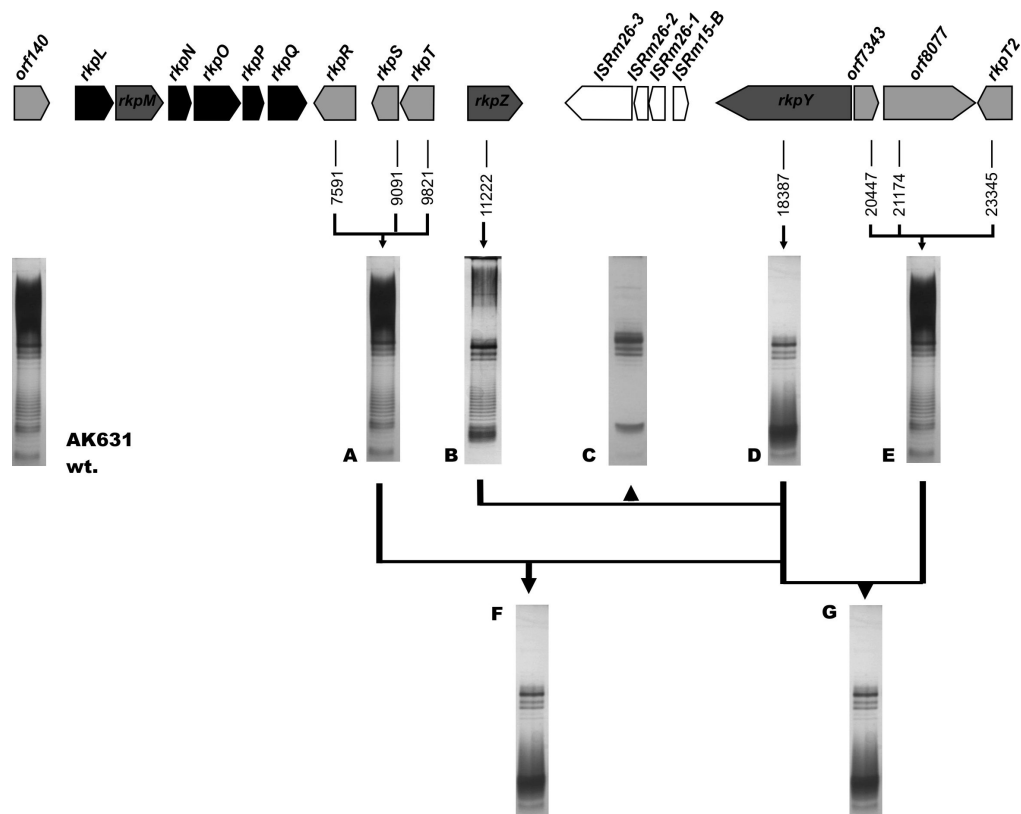


**17. ábra:** Különböző *rkp* mutánsok KPS mintázata (DOC-PAGE).

Az *rkpZ* gén funkciójának a KPS polimer lánc hosszúság meghatározását tulajdonítják, mutációjával a baktérium magasabb molekula tömegű poliszacharidot termel (Brzoska and Signer, 1991, Reuhs et al., 1995; 18B. ábra). Az *rkpY-rkpZ* mutáns szerint az LMW poliszacharid termelésben is nélkülözhetetlen. A gén hatással van a K<sub>R5</sub>-antigén szintézisére *S. meliloti* 41 törzsben, viszont a *S. meliloti* 1021 baktériumon végzett kísérletek alapján a KDO homopolimer termelésben meghatározó (Frayse et al., 2005; Sharypova et al., 2006). A *S.*



*meliloti* 1021 az analitikai vizsgálatok szerint KDO homopolimert termel, mint kapszuláris poliszacharid (9. táblázat). Ez szimbiotikusan nem aktív, nem képes helyettesíteni az EPS szerepét a növény inváziójában, ellentétben a K<sub>R</sub>5-antigénnel. A Sm1021 törzs két paralóg *rkpZ* génnel is rendelkezik (*rkpZ1* és *rkpZ2*), mutációjuk esetén nem termelődik polyKDO. A gének nem képesek funkcionálisan helyettesíteni egymást, viszont az RM41 törzsből származó *rkpZ<sub>41</sub>* gén képes átvenni a két gén szerepét. Az RkpZ fehérje által nagyobb molekula tömegű polyKDO termelődik és a lipid végekkel rendelkező polimer láncok aránya is megnövekedik a vadtypushoz képest. Mindemellett lehetővé teszi a baktérium szimbiotikus aktivitásának részleges meglétét (Sharypova et al., 2006). Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az *rkpZ<sub>41</sub>* funkcionálisan hatékonyabban működik, mint a két paralóg gén, és a Sharypova és munkatársai által végzett kísérletekből következik, hogy a KDO homopolimer szintézisében is szerepe van.



**18. ábra:** Az *rkpY* régió mutagenézisének összefoglaló ábrája.

Az ábrán jelöltük a teljes *rkp-3* régiót és annak génjeit. Függőleges vonalakkal a mutagenézis során létrehozott transzpozonos mutációk pozícióit ábrázoltuk. Az egyes és kettős mutánsok DOC-PAGE módszerrel vizsgált KPS mintázatai: A: *rkpR*, *rkpS*, *rkpT* mutáns fenotípusa; B: *rkpZ* mutáns fenotípusa; C: *rkpY-rkpZ* kettős mutáns fenotípusa; D: *rkpY* mutáns fenotípusa; E: *orf7343*; *orf8077*; *rkpT* mutáns fenotípusa; F és G: *rkpY-rkpZ* mutáns fenotípusa. Ezen kívül az AK631 wt.: a vadtypusú mintázatot jelöli (lásd még: 12. és 14. ábra).

Az irodalmi adatok alapján arra következtettünk, hogy ha az RkpZ<sub>41</sub> valóban a polyKDO termelést is befolyásolja, akkor lehetséges, hogy az *rkpY-rkpZ* mutánsokban ennek a termelése szűnt meg. Az *rkpY* mutánsok által termelt nagy mennyiségű LMW poliszacharid valójában KDO homopolimer lehet. A következtetésünket további eredmény erősítette meg. Chataigné és munkatársai analitikai módszerekkel kimutatták, hogy a *S. meliloti* 41 törzs a K<sub>R5</sub>-antigén mellett KDO homopolimert is termel kis mértékben, ahogyan más pszeudaminsav tartalmú KPS-t termelő rhizobium is (Chataigné et al., 2008; 9. táblázat). Ezek alapján azt gondoltuk, hogy ha az *rkpY* mutánsok által termelt nagy mennyiségű poliszacharid valóban polyKDO, akkor vad típusú baktériumban az RkpY fehérje ennek szintézisét gátolhatja, vagy legalábbis jelenlétében a KPS termelés kerül előtérbe, a polyKDO szintézissel szemben. Az RkpY szabályozó fehérje lehet. A feltevésünk igazolására a polyKDO-t termelő *S. meliloti* 1021 törzsbe juttattuk be az *rkpY* gént, majd vizsgáltuk a baktérium KPS mintázatának megváltozását DOC-PAGE módszerrel. A vad típus és az *rkpY*-t hordozó Sm1021 törzs összehasonlítása alapján az RkpY fehérje hatására a polyKDO termelése szignifikánsan lecsökkent, vagyis az RkpY fehérje blokkolta vagy „megzavarta” a polyKDO termelést Sm1021 baktériumban. Az eredmények igazolták feltételezésünket, viszont ténylegesen bizonyítani, hogy az *rkpY* mutáns polyKDO-t termel, illetve az milyen polimerizáltságú, analitikai vizsgálatok szükségesek. Érdekes lehetne megfigyelni, hogy *rkpY-rkpZ* kettős mutánsban (AV476, AV518) a Sm1021 törzsből származó RkpZ<sub>1021</sub> és RkpZ<sub>21021</sub> fehérje együttesen, illetve külön-külön milyen változást okozhat a polyKDO termelésben. Termelődik-e, illetve eltérő polimerizáltságú polyKDO termelődik-e a baktériumban, mint az *rkpY* mutánsban? Emellett az *rkpZ*<sub>4180</sub> mutáns háttérben a két fehérje befolyásolja-e a K<sub>R5</sub>-antigén szerkezetét?

Az RkpZ fehérje az *E. coli*-ban található KpsC fehérjével mutat homológiát, melyet részletesebben tanulmányoztak már (Pazzani et al., 1993; Steenbergen et al., 2008). A KpsC funkciója összefügg a KpsS fehérjéjével, szerepük van a poliszacharid exportjában és transzlokációjában, a belső membrán citoplazma felőli oldalához kötődnek. Mutációjuk a polimer akkumulációjával jár a citoplazmában. Kezdeti kutatásokban azt is feltételezték, hogy a lipid vég/lipidhorgony (diacilglicerolfoszfát-KDO) meglétét is befolyásolhatják, ahogyan az *rkpZ*<sub>1</sub> génről kimutatták *S. meliloti* 1021 baktériumban. Az újabb kutatások szerint, az intracellulárisan akkumulálódó polimer rendelkezik lipid véggel, tehát nincs szerepük annak kialakításában *E. coli* baktériumban (Whitfield 2006, Steenbergen 2008). A KpsC homológ RkpZ<sub>41</sub> fehérje, ha *S. meliloti*-ban is csak a KPS, illetve polyKDO exportjért és transzlokációjáért lenne felelős, akkor az extracellulárisan akkumulálódó poliszacharid megjelent volna az *rkpZ-rkpY* mutánsokban a KPS mintázat elemzés szerint (DOC-PAGE).

Valószínű, hogy *S. meliloti* baktériumban más funkcióval is rendelkezik az RkpZ fehérje vagy legalábbis összetettebb funkcióval.

Természetesen, feltételezéseinket az analitikai módszerekkel történő szerkezet vizsgálatok bizonyíthatják teljes mértékben. Poinso és munkatársai kidolgoztak egy olyan vizsgálati módszert, mely az eddigi elemzésektől pontosabb adatokat adnak a baktériumok által termelt poliszacharidok szerkezetéről és mennyiségéről (Fraysse et al., 2005; Sharypova et al., 2006; Chataigné et al., 2008; 9. táblázat). A módszer segítségével először sikerült kimutatni az eddigiekben csak feltételezett lipidhorgony (glicerofoszforilált KDO) meglétét a polimerek végén, illetve szabad formában. Leírták, hogy a pszeudaminsav tartalmú poliszacharidot termelő rhizobiumok is szintetizálnak KDO homopolimert bizonyos mértékben, mégpedig lipid véggel rendelkező polimereket. Ezen kívül a módszerrel lehetőségük volt különböző glükánok azonosítására. A rhizobium baktériumok normál és/vagy glicerofoszforilált glükánokat is termelnek az elemzések szerint. A *S. meliloti* 1021 törzs mindkét féle glükánt, az AK631 törzs pedig glicerofoszforilált glükánt termel nagy mennyiségben (Chataigné et al., 2008; 9. táblázat).

A *Sinorhizobium fredii* HH103 törzzsel kapcsolatos előző vizsgálatok szerint pszeudaminsav tartalmú homopolimert (polyPse) szintetizál a baktérium (Gil-Serrano et al., 1999). A részletesebb analitikai elemzések alapján a baktérium valóban termel homopolimer jellegű poliszacharidot, az említett polyPse-t (5NAc-7OHBut-Pse) és jelentős mennyiségű polyKDO-t. Ezen kívül nagy mennyiségben reguláris és glicerofoszforilált glükánokat is szintetizál (9. táblázat). Az említett törzsben még csak az *rkp-1* régió génjeit írták le, melyek feladata – a feltételezések szerint – az, hogy a K-antigén bioszintéziséhez szükséges lipid hordozót/horgonyt létrehozzák (Becker et al., 2005). A baktérium által termelt poliszacharidok alapján feltételezhetjük, hogy rendelkezik a KDO homopolimer termeléshez szükséges *rkpZ* génnel is, valamint a pszeudaminsav szintéziséért felelős *rkpLMNOPQ* géncsoporttal.

**9. táblázat:** A rhizobium baktériumokra jellemző poliszacharidok (Chataigné et al., 2008)

Baktérium törzs	polyKDO	polyPse (5NAc-7OHBut-Pse)	Reguláris glükánok	Glicerofoszforilált glükánok	GlcA-5NAc-7OHBut-Pse
<i>S. meliloti</i> 1021	+	+	+	+	-
<i>S. fredii</i> HH103	+	+	+	+	-
<i>S. meliloti</i> AK631	+	+	-	+	+
<i>R. sp.</i> NGR234	+	+	+	+	-

polyKDO: KDO homopolimer; polyPse: pszeudaminsav homopolimer

Időközben, Poinso és munkatársainak analitikai vizsgálatai nyomán bebizonyosodott, hogy az *rkpY* mutáns (EN3222) által termelt poliszacharid valóban polyKDO, ezen kívül a mutáns nem termel  $K_{R5}$ -antigén komponenseket. Az *rkpY-rkpZ* mutációval a KDO homopolimer termelés is megszűnik teljes mértékben, valamint Sm1021 törzsben az RkpY fehérje jelentősen megzavarja a baktériumban termelődő polyKDO-t (Pálvölgyi et al., In Press). Lényegében a genetikai megközelítésünk és feltételezéseink bizonyítást nyertek az elemzés segítségével. A szintézis folyamatok és génfunkciók pontos megértése további részletes tanulmányozást igényelnek. Az említett analitikai módszer alkalmazása több további kérdésünkre is választ adhatna, melyek összefoglalva a következők: Az *rkpZ<sub>4180</sub>* mutáns baktériumban termelődik-e KDO homopolimer, ha igen, akkor a lipidált és szabad polimer végek arányában van-e különbség a vad típusú polyKDO-hoz képest? Tulajdonképpen az RkpY fehérje milyen változást okozott a *S. meliloti* 1021 törzsben? Esetleg az RkpZ befolyásolja a glükánok glicerofoszforiláltságát is? Az eddigi kísérleti eredmények is mutatják, hogy az RkpY elengedhetetlen a  $K_{R5}$ -antigén megfelelő szintézisben, viszont azt csak feltételezhetjük, hogy a polyKDO termelést blokkolja, hiszen az *rkpY* mutánsokban a megnövekedett polyKDO mennyisége más folyamatok megléte/hiánya okán is bekövetkezhet. A különböző mutánsok poliszacharidjainak szerkezeti és mennyiségi összehasonlítása a feltételezések bizonyítása mellett, további következtetések megalkotására adna lehetőséget a fehérjék funkcióját illetően.

Az már kétségtelen, hogy konkrét bizonyításra a KPS mintázat elemzésre alkalmazott DOC-PAGE módszer nem megfelelő, kevés információval szolgál a termelt poliszacharidokról. Alkalmazásával például nem dönthető el, hogy extracellulárisan akkumulálódik vagy a sejtfelszínre exportálódott a poliszacharid. Az *rkpR*, *rkpS*, *rkpT* gének mutációja a DOC-PAGE vizsgálatban nem mutat eltérést a vad típusú baktérium mintázatához képest. Elképzelhető, hogy a mutációk olyan változást okoznak, mely eleve nem mutatható ki DOC-PAGE módszerrel, konkrétan a poliszacharid sejtfelszínre történő transzportjának elmaradását, ami akkumulációt okoz a citoplazmában. Azt is feltételezhetjük az említett génekkel kapcsolatban, hogy valójában nem a  $K_{R5}$ -antigén, hanem a KDO homopolimer szintézisében fontosak, ezért nem sikerült eddig bizonyítani funkciójukat a módszer hiányosságai miatt. A feltételezést szintén az analitikai vizsgálat tisztázná.

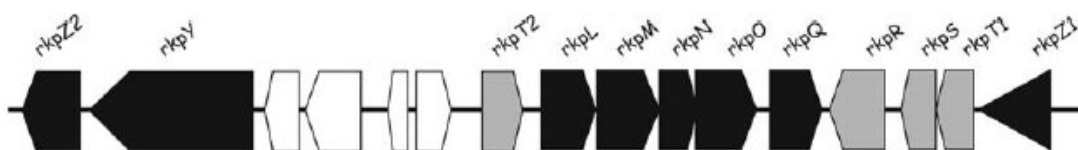
### **7.3. A bioinformatikai elemzések konklúziója**

A számítógépes elemzések jó kiindulási pontot jelenthetnek a további biológiai kísérletek megtervezésében, az információk gyűjtésében. Az előzőekben leírt kísérletekben is nagy

segítségünkre volt ez a tudományterület, viszont két esetben csak ezekre a vizsgálatokra hagyatkoztunk, biológiai kísérleteket nem végeztünk.

A kibővített *rkp-3* régió jobb oldali szakaszának szekvencia szintű vizsgálata szerint az *rkpZ* és *rkpY* gének között két transzpozont is találtunk, feltehetően egy régebbi integrációs eseménynek köszönhető ISRM15 transzpozon elemeit azonosítottuk, melybe egy későbbi esemény következtében az ISRM26 transzpozon épült be. Az ISRM26 inverted repeat és direkt repeat elemeit is megtaláltuk, amiből arra következtetünk, hogy még működő transzpozon lehet.

Az *rkpY* régióban található gének bioinformatikai elemzése egyelőre csak feltételezi azok funkcióját, viszont az *rkpLMNOPQ* gének homológia vizsgálata közelebb vitt a horizontális géntranszferrel történő beépülésük bizonyításához és a gének pszeudaminsav szintézisében betöltött szerepük megerősítéséhez. Számos baktérium fajban megtalálható a gének homológja ugyanolyan elrendezésben, mint az *S. meliloti* 41 törzsben. Ebből arra lehet következtetni, hogy eredetükben kapcsolat lehet (10.2. melléklet). A táblázatban felsorolt fehérjék többszörös illesztése alapján (10.3. melléklet) megfigyelhető, hogy a géncsoport elején lévő gének által kódolt fehérjék még nagyfokú azonosságot mutatnak, mely az RkpP fehérje felé haladva egyre csökken, majd az RkpQ fehérje homológok esetében ismét nagyfokú azonosság figyelhető meg. A jelenség magyarázata az lehet, hogy az *rkpL-Q* géncsoporttal rendelkező baktériumok között léteznek olyan törzsek, ahol az *rkpP* homológ gént formil-transzferázt kódoló gén helyettesít, tehát variábilis lehet ez a génszakasz. A *Pseudomonas aeruginosa* O7, O8, O9 szerotípusának összehasonlítása szerint a formil-transzferáz egy formil oldalláncot tesz a pszeudaminsav molekulára mely az O-antigén alkotója (Knirel and Kochetkov 1994; Raymond et al., 2002). A gének ilyenforma elrendezése nem törvényszerű, hiszen elemzéseink szerint léteznek olyan baktériumok, melyekben ez nem figyelhető meg. A *Campylobacter jejuni* és *Helicobacter pylori* baktériumokban a CMP-pszeudaminsav szintézisét részletesen vizsgálták a folyamatban részt vevő enzimek funkciója és az intermedierek tekintetében (Schoenhofen et al., 2006). Az egyes enzimfehérjék és az *rkpLMNOPQ* géncsoport által kódolt fehérjék homológiát mutatnak (8. táblázat), ami alapján valószínűsíthető az Rkp fehérjék funkciója, megalkotható a pszeudaminsav szintézisének modellje *S. meliloti*-ban, illetve a rhizobium baktériumokban (10.4. melléklet).



**19. ábra:** Az *rkp-3* régió szerkezete *Rhizobium* sp. NGR234-ben (LeQuere et al., 2006)

Az eddigi kutatások alapján a *S. meliloti* 41 *rkp-3* régiójához hasonló géncsoportot eddig csak a *Rhizobium* sp. NGR234 baktériumban írtak le (19. ábra). A régió hasonló felépítésű, rendelkezik az *rkpP* gén kivételével az *rkpL-Q* géncsoporttal, illetve az *rkpY* génnel is. A pszeudaminsav tartalmú KPS mellett kisebb mennyiségben KDO homopolimert is termel (Chataigné et al., 2008, 9. táblázat). A hasonlóság a KPS szerkezetében is megmutatkozik, viszont a vizsgálatok szerint *N*-3-hydroxybutyryl oldalláncal nem rendelkezik, ellentétben az RM41 törzssel. Ezt az *rkpP* gén hiányának tulajdonítják, miszerint az RkpP fehérje valószínűleg a pszeudaminsav 3-hydroxybutyryl acetilációját/szintézisét végzi (LeQuere et al., 2006).

A *Rhizobium* sp. NGR234 baktérium a Sm1021 törzshöz hasonlóan két paralóg *rkpZ* génnel rendelkezik (*rkpZ1* és *rkpZ2*). Érdemes lenne ezt a baktériumot is bevonni az *rkpZ* gén konkrét funkciójának feltárására szolgáló kísérletekben, melyet az előző fejezetben említettünk. Érdekes lenne megfigyelni, hogy az *rkpY* mutációjával milyen jellegű poliszacharid termelődik a *Rhizobium* sp. NGR234 törzsből. Az *rkpY* mutánsban melyik *rkpZ* paralóg mutációja okozza a poliszacharid termelés megszűnését? Mindezen kísérletek választ adhatnak az RkpZ fehérje pontos funkciójára illetve, hogy az RkpZ<sub>41</sub> fehérje funkcionálisan miben különbözhet a többi baktériumban lévő *rkpZ1* és *rkpZ2* génektől.

Összefoglalva a saját és az irodalmi adatokat, a következőt feltevéseket fogalmazhatjuk meg. Lehetséges, hogy a rhizobium baktériumok alapvetően egy KDO homopolimert termelnek/termeltek mint kapszuláris poliszacharid, és a baktériumok közötti horizontális géntranszfer révén egyes rhizobium törzsek már egy bonyolultabb szerkezetű, pszeudaminsav alegységekből felépülő KPS szintetizálására lettek képesek. Ez egyfajta előnyt biztosíthat a többi rhizobiummal szemben a szimbiózisban és a fágerezisztenciában. Ezt az előnyt feltehetően az *rkpL-Q* géncsoportnak és az *rkpY* gén meglétének köszönhetik.

## 8. Összefoglalás

A pillangósvirágúak és rhizobium baktériumok között fennálló nitrogénkötő szimbiózis kialakulásában meghatározó szerepe van a sejtfelszíni poliszacharidoknak. A bakteriális kapszuláris poliszacharid (KPS, K<sub>R5</sub>-antigén) főként a szimbiózis inváziós szakaszában fontos. A különböző invázióra képtelen *S. meliloti* 41 (RM41) mutánsainak tanulmányozása során az is kiderült, hogy a KPS termelésnek a 16-3 fágfertőzésre is hatása van. A kezdeti feltételezésék szerint maga a kapszuláris poliszacharid lehet a 16-3 fágreceptora. A két jelenség kapcsolata okán csoportunk kutatómunkájában a kapszuláris poliszacharid bioszintézisének és szerepének megismerését tűztük ki célul, valamint a 16-3 fágreceptor alkotóinak azonosítását. Bizonyítani szerettük volna, hogy a fágreceptor a KPS és/vagy más sejtfelszíni struktúra.

Munkánk eredményei alapján kiderült, hogy a fágreceptor nem csak maga a KPS lehet, hanem fehérje molekula is. Azonosítottunk olyan kapszuláris poliszacharid bioszintézis fehérjéket (RkpM, RkpZ, RkpY), melyek hatással vannak a fágfertőzésre. Bizonyítottuk, hogy az RkpM és RkpY fehérjékben egy különleges mutációja teszi lehetővé a változáshoz alkalmazkodott fágmutánsok kötődését és nem a poliszacharid. Az RkpZ esetében tisztáznunk kell, hogy a fehérje hiánya miatt a receptor módosulása vagy a poliszacharid szerkezeti változása miatt történt meg a fágmutánsok adszorpciója. Az eredmények alapján feltételezzük, hogy a fágreceptor egy fehérje komplex, melynek alkotói az RkpY, RkpM fehérje valamint erre közvetve hatással van az RkpZ fehérje is. Azt, hogy a K<sub>R5</sub>-antigénnek pontosan milyen feladata van a fágfertőzés során, további kísérletek elvégzése szükséges.

Előző munkák eredményeként izolálták az *rkpY* gént, mely mutációja esetén egy alacsony molekula tömegű (LMW) poliszacharidot termel a baktérium, a K<sub>R5</sub>-antigén helyett. A következőkben a fehérje funkciójának és az LMW poliszacharid termelésnek részletesebb vizsgálatát kezdtük meg genetikai módszerekkel. Elsőként meghatároztuk az *rkpY* gén környezetének szekvenciáját, melyen további lehetséges géneket azonosítottunk, viszont ezek az eredményeink szerint sem a KPS vagy LMW poliszacharid bioszintézisben, sem a szimbiózisban, sem a fágfertőzésben nem játszanak szerepet. Genetikai eszközökkel bizonyítottuk, hogy az LMW poliszacharid nem glükuronsav vagy pszeudaminsav alegységekből áll, valamint az *rkpZ* génnek befolyása van a szintézisére. Igazoltuk, hogy az RkpY fehérje gátolja a KDO homopolimer termelését *S. meliloti* 1021 törzsben. Az eredményeinkből arra következtetünk, hogy az RkpY fehérje lényeges a K<sub>R5</sub>-antigén szintézisében, valamint az *rkpY* mutáns egy polyKDO-t termelhet, melyhez elengedhetetlen az RkpZ fehérje. A feltételezéseinket ténylegesen a különböző baktérium mutánsok által termelt poliszacharidok szerkezetének analitikai vizsgálata bizonyítja.

## 9. Summary

Studies on nitrogen fixing symbiosis showed the importance of rhizobial capsular polysaccharides in plant invasion. The goal of our research was to understand the biosynthesis and function of the capsular polysaccharide (KPS, K<sub>R</sub>5-antigen) in *Sinorhizobium meliloti* 41. Previous analyses on different *S. meliloti* 41 mutants, which are unable to invade host plants, demonstrated that adsorption of bacteriophage *16-3* is related to K<sub>R</sub>5-antigen production. Moreover, it was suggested that the K<sub>R</sub>5-antigen serves as the receptor for the strain-specific bacteriophage *16-3*. We applied phage *16-3* as a selection tool to isolate bacterial mutants carrying an altered phage receptor, and then host-range phage mutants that are able to adapt to this change. Because of the connection between KPS production and phage adsorption, these mutants give a chance to investigate both phenomena. Our aim was to find out whether the KPS or other structure serves as bacteriophage receptor.

According to our results, and in contrast to the hypothesis, the receptor of phage *16-3* is probably a protein complex involved in the biosynthesis of the K<sub>R</sub>5-antigen, not the polysaccharide itself. We could identify three proteins involved in capsular polysaccharide synthesis (RkpM, RkpZ, RkpY) which influence *16-3* phage infection. We identified specific mutations in the RkpM and RkpY proteins which are needed for the adsorption of *16-3* mutants. In the case of RkpZ it remains to be answered whether the modification of the protein receptor or the different structure of the polysaccharide allows adsorption of the host-range phage mutants. We suggest that RkpM and RkpY are parts of a protein complex that serves as a phage receptor, and RkpZ may have an indirect effect on this complex and on phage adsorption. Hereafter, further studies are needed to identify the real function of KPS in phage infection.

Based on earlier studies, *rkpY* mutants show a unique phenotype, producing a low-molecular-weight polysaccharide (LMW). We continued our investigation to explore the function of *rkpY* and the LMW polysaccharide. We determined the sequence of the *rkpY* region, and found additional genes, but these novel genes had no effect on KPS or LMW polysaccharide production, on phage infection, or on symbiosis. In this region only the *rkpY* gene is essential for polysaccharide biosynthesis. We have genetic evidences that *rkpY* mutants produce a polysaccharide containing neither glucuronic acid nor pseudaminic acid components. Also, K<sub>R</sub>5-antigen synthesis is inhibited in the *rkpY* mutants of *S. meliloti* 41. We proved that RkpY can suppress KDO homopolymer production in *S. meliloti* 1021. Based on our results, we suggest that the *rkpY* mutant indeed produce a polyKDO, for which the *rkpZ* gene is essential. Moreover, RkpY directs KPS synthesis to produce K<sub>R</sub>5-antigen. The analytical analysis supports our hypothesis about the structure of the LMW polysaccharide.



## 10. Melléklet

### 10.1. melléklet: A különböző *S. meliloti* *rkp* mutánsok KPS fenotípusa

Törzs	Genotípus	KPS fenotípus
AK631	RM41 <i>exoB631</i> (Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> )	<i>vad típus</i>
EN3222	<i>rkpY</i> <sub>3222</sub>	<i>rkpY</i>
GH4180	<i>rkpZ</i> spontán mutáns	<i>rkpZ</i>
PP4141	<i>rkpY</i> <sub>3222</sub> + <i>rkpA</i> ::Tn5(666)	<i>rkpY</i>
PP4140	<i>rkpY</i> <sub>3222</sub> + <i>rkpB</i> ::Tn5(665)	<i>rkpY</i>
PP4139	<i>rkpY</i> <sub>3222</sub> + <i>rkpC</i> ::Tn5(644)	<i>rkpY</i>
PP4199	<i>rkpY</i> <sub>3222</sub> + <i>rkpK</i> ::Tn5(207)	<i>rkpY</i>
PP4201	<i>rkpY</i> <sub>3222</sub> + <i>rkpL</i> ::Tn5(187)	<i>rkpY</i>
PP4202	<i>rkpY</i> <sub>3222</sub> + <i>rkpM</i> ::Tn5(212)	<i>rkpY</i>
PP4200	<i>rkpY</i> <sub>3222</sub> + <i>rkpQ</i> ::Tn5(124)	<i>rkpY</i>
PP3300	<i>rkpY</i> <sub>3222</sub> + pBBR1-MCS2:: <i>rkpY</i>	<i>vad típus</i>
AV488	AK631 <i>rkpR</i> ::ET-KanR-3 (7591)	<i>vad típus</i>
AV486	AK631 <i>rkpS</i> :: ET-KanR-3 (9091)	<i>vad típus</i>
AV461	AK631 <i>rkpT</i> ::ET-KanR-3 (9821)	<i>vad típus</i>
AV475	AK631 <i>rkpZ</i> ::ET-KanR-3 (11222)	<i>rkpZ</i>
AV458	AK631 <i>rkpY</i> ::ET-KanR-3 (18387)	<i>rkpY</i>
AV493	AK631 orf7343::ET-KanR-3 (20447)	<i>vad típus</i>
AV457	AK631 orf8077::ET-KanR-3 (21174)	<i>vad típus</i>
AV490	AK631 <i>rkpT2</i> ::ET-KanR-3 (23345)	<i>vad típus</i>
AV463	<i>rkpY</i> <sub>3222</sub> + <i>rkpR</i> ::ET-KanR-3(7591)	<i>rkpY</i>
AV477	<i>rkpY</i> <sub>3222</sub> + <i>rkpS</i> :: ET-KanR-3(9091)	<i>rkpY</i>
AV479	<i>rkpY</i> <sub>3222</sub> + <i>rkpT</i> ::ET-KanR-3(9821)	<i>rkpY</i>
AV476	<i>rkpY</i> <sub>3222</sub> + <i>rkpZ</i> ::ET-KanR-3(11222)	nincs KPS
AV494	<i>rkpY</i> <sub>3222</sub> + orf7343::ET-KanR-3(20447)	<i>rkpY</i>
AV483	<i>rkpY</i> <sub>3222</sub> + orf8077::ET-KanR-3(21174)	<i>rkpY</i>
AV491	<i>rkpY</i> <sub>3222</sub> + <i>rkpT2</i> ::ET-KanR-3(23345)	<i>rkpY</i>
AV518	<i>rkpZ</i> <sub>4180</sub> + <i>rkpY</i> ::ET-KanR-3(18387)	nincs KPS

KPS fenotípusok: DOC-PAGE mintázat alapján. Vad típus (14A. ábra), *rkpZ* (14C. ábra), *rkpY* (14D. ábra), nincs KPS (14F. ábra).

**10.2. melléklet:** Az rkpL-Q ortológ (homológ) gének előfordulása más baktériumokban. A táblázatban feltüntetjük az RkpL-Q fehérjék prediktált konzerválódott doméinjait, a BLASTP elemzések alapján a homológok AC számát és az azonososság/hasonlóság százalékos arányát. Néhány baktériumban az rkpP homológ fehérje helyett formil-transzferáz vagy acetiltranszferáz található, melyet zárójelben jelöltünk.

<i>Sinorhizobium meliloti</i> 41	<b>RkpL</b> CAB62150	<b>RkpM</b> CAB62151	<b>RkpN</b> CAB62152	<b>RkpO</b> CAB62153	<b>RkpP</b> CAB62154	<b>RkpQ</b> CAB62155
Funkcionális domének	<u>Polysacc_synt_2</u> (pfam02719): Poliszacharid bioszintézis enzim <u>Epimerase</u> (pfam01370): NAD függő dehidratáz/ epimeráz	<u>WeeE</u> (COG0399):piridoxál- foszfát függő enzim <u>DegT_DnrJ_EryCI</u> (pfam01041): piridoxál- foszfát függő aminotranszferáz	<u>NeuA</u> (COG1083, PF02348): CMP-N- acetilneuraminsav szintetáz/ Cytidylyltranszferáz	<u>Glyco_tran_28_C</u> (pfam04101): glikoziltranszferáz család 28 C- terminális domén <u>spsG</u> (COG3980): glikoziltranszferáz	<u>RimL</u> (COG1670): acetiltranszferáz	<u>NeuB</u> (pfam03102): N- acetilneuraminsav szintáz <u>SAF</u> (pfam08666): különféle fehérjék tartoznak ide <u>SpsE</u> (COG2089): Sziálsav szintáz
<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	93/97% ABD15243	83/91% ABD15242	81/88% ABD15241	67/77% ABD15240	----	89/93% ABD15239
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>serotype 07</i>	81/90% AAM27834	67/80% AAM27835	60/75% AAM27836	44/62% AAM27837	(AAM27838 Formyl_transferase)	72/85% AAM27839
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>serotype 08</i>	81/90% AAM27854	67/80% AAM27855	60/75% AAM27856	44/62% AAM27857	(AAM27858 Formyl_transferase)	72/85% AAM27859
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>serotype 09</i>	83/91% AAM27872	69/82% AAM27873)	62/75% AAM27874	49/65% AAM27875	57/73% AAM27876	72/83% AAM27877
<i>Alkalilimnicola</i> <i>ehrlchei MLHE-1</i>	78/87% YP_743153	73/83% YP_743153	64/78% YP_743154	50/64 % YP_743155	39/57% YP_743156	77/87% YP_743157
<i>Bordetella petrii</i>	82/90% YP_001630913	71/83% YP_001630914	57/76% YP_001630915	49/62% YP_001630916	41/53% YP_001630917	77/87% YP_001630918
<i>Psychrobacter arcticus</i> <i>273-4</i>	80/89% YP_263946	68/83% YP_263947	60/77% YP_263949	46/62% YP_263950	32/52% YP_263951	56/70 % YP_263953
<i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>A1501</i>	81/91% YP_001174305	73/85% YP_001174304	63/78% YP_001174303	50/65% YP_001174302	56/71% YP_001174301	78/90% YP_001174300
<i>Roseobacter sp.</i> <i>SK209-2-6</i>	78/88% ZP_01756744	64/78% ZP_01756745	59/74% ZP_01756746	49/63% ZP_01756747	(ZP_01756748 Methionyl-tRNA formyltransferase)	69/82% ZP_01756749.1
<i>Marinobacter sp.</i> <i>ELB17</i>	78/89% ZP_01738897	67/81% ZP_01738898	60/76% ZP_01738899	50/64% ZP_01738900	(ZP_01738901 Acetyltransferases)	80/87% ZP_01738902

### 10.3. melléklet: Az RkpL-Q fehérjék és homológjainak többszörös illesztése

A homológ fehérjék többszörös illesztését az online elérhető ClustalW2 programmal végeztük BLOSUM62 mátrix beállításával. Az illesztések szerkesztése pedig a GeneDoc programmal történt. Az aminosavak színezése az azonosság mértékét jelenti. Fekete háttér: 100% azonosság; sötétszürke háttér: 80% azonosság; világosszürke háttér: 60% azonosság. A fehérjék AC számát adtuk meg azonosításként (lásd 10.2. melléklet táblázata).

#### 10.3.1. Az RkpL és a homológ fehérjék illesztése

```

                *           20           *           40           *           60
AAM27834/1 : ~MLSEKTIILVTGGTGSFGNTFVPMTLAKYNEKKIIFSRDEMKQWDMAKKFEQDPRVRFFIGDV : 63
AAM27854/1 : ~MLSEKTIILVTGGTGSFGNTFVPMTLAKYNEKKIIFSRDEMKQWDMAKKFEQDPRVRFFIGDV : 63
YP743152/1 : ~MFNDSSVILVTGGTGSFGHTFIPMLLERYNPRRVIIFSRDEMKQWEMAKKFEQDPRVRFFIGDV : 63
AAM27872/1 : ~MFKDKSILVTGGTGSFGNTFVPMTLAKYNEKRLIIFSRDEMKQWEMAKKFEQDPRVRFFIGDV : 63
ABD15243/1 : MVMISGSTIILVTGGTGSFGNAFVPMTLAKYNEAKIIFSRDEMKQWEMAKKYGDDSRVRFFIGDV : 65
CAB62150/1 : MIMISGGTIILVTGGTGSFGNAFVPMTLAKYNEAKIIFSRDEMKQWEMAKKYADDSRVRFFIGDV : 65
AAZ18512/1 : ~MLSNSTIILVTGGTGSFGNTFVPMVLEKYNPKKVIIFSRDEMKQWDMAKKFEQDPRVRFFIGDV : 63
EAZ98224/1 : ~MLRDSTIILVTGGTGSFGHGFIPMTLEKYNPKKIIFSRDEMKQWEMAKLFGQDRLRFFFIGDV : 63
ABP81463/1 : ~~~~~~MAKRFEGDKRVRFFFIGDV : 18
CAP42645/1 : ~MLREKTIILVTGGTGSFGNTFVPMTLAKYNEKKVIIFSRDEMKQWDMARKFHDDPRVRFFIGDV : 63
EBA14546/1 : ~MLSGSIIILVTGGTGSFGHAFVKMILERYNPKRIVILSRDEMKQWEMAKLFGQDPRVRFFIGDV : 63
m      il tggtgsgf f pm l ynp ii srdemkqw MAK f D RvRFFFIGDV

```

```

                *           80           *           100           *           120           *
AAM27834/1 : RDKDRLYRALDGVYVVHAAATKIVPTAEYNPFECIKTNINGAMNLIIDACIDKGVKRVVALSTDK : 128
AAM27854/1 : RDKDRLYRALDGVYVVHAAATKIVPTAEYNPFECIKTNINGAMNLIIDACIDKGVKRVVALSTDK : 128
YP743152/1 : RDRERVYRAFIDGVYVVHAAASKIVPTAEYNPFECIKTNTVIGAMNVIDAIDKGVKRVVALSTDK : 128
AAM27872/1 : RDRERLYRALDGVYVVHAAATKIVPTAEYNPFECVKTNINGAMNLIIDACIDKGVKRVVALSTDK : 128
ABD15243/1 : RDRERLYRALDGVYVVHAAATKIVPTAEYNPFECVKTNINGAMNLIIDACIDKGVKRVVALSTDK : 130
CAB62150/1 : RDRERLYRALDGVYVVHAAATKIVPTAEYNPFECVKTNINGAMNLIIDACIDKGVKRVVALSTDK : 130
AAZ18512/1 : RDKERLYRALDGVYVVHAAATKIVPTAEYNPFECVKTNINGAMNLIIDACIDKGVKRVVALSTDK : 128
EAZ98224/1 : RDKDRLYRALDGVYVVHAAATKIVPTAEYNPFECIKTNINGAMNLIIDACIDKGVKRVVALSTDK : 128
ABP81463/1 : RDKDRLYRALDGVYVVHAAATKIVPTAEYNPFECVKTNVIGAMNLIIDACIDKGVKRVVALSTDK : 83
CAP42645/1 : RDRERLYRALDGVYVVHAAATKIVPTAEYNPFECVKTNVIGAMNLIIDACIDKGVKRVVALSTDK : 128
EBA14546/1 : RDKDRLYRALDGVYVVHAAATKIVPTAEYNPFECIKTNINGAMNLIIDACIDKGVKRVVALSTDK : 128
RD RLYRALDGVYVVHAAATKIVPTAEYNPFEC KTN GAMNLIIDAcIDKgvK VVALSTDK

```

```

                140           *           160           *           180           *
AAM27834/1 : ASSPINLYGATKLASDKL FVAGNSYAGGHETRMVVRYGNVMGSRG SVIPFFMSI LKKGVEVPITD : 193
AAM27854/1 : ASSPINLYGATKLASDKL FVAGNSYAGGHETRMVVRYGNVMGSRG SVIPFFMSI LKKGVEVPITD : 193
YP743152/1 : ASSPINLYGATKLASDKL FVAGNSYAGGHETRMVVRYGNVMGSRG SVIPFFMSI LKKGVEVPITD : 193
AAM27872/1 : ASSPINLYGATKLASDKL FVAGNSYAGGHETRMVVRYGNVMGSRG SVIPFFMSI LKKGVEVPITD : 193
ABD15243/1 : ASSPINLYGATKLASDKL FVAGNSYAGGHETRMVVRYGNVMGSRG SVIPFFMSI LKKGVEVPITD : 195
CAB62150/1 : ASSPINLYGATKLASDKL FVAGNSYAGGHETRMVVRYGNVMGSRG SVIPFFMSI LKKGVEVPITD : 195
AAZ18512/1 : ASSPINLYGATKLASDKL FVAGNSYAGGHETRMVVRYGNVMGSRG SVIPFFMSI LKKGVEVPITD : 193
EAZ98224/1 : ASSPINLYGATKLASDKL FVAGNSYAGGHETRMVVRYGNVMGSRG SVIPFFMSI LKKGVEVPITD : 193
ABP81463/1 : ASSPINLYGATKLASDKL FVAGNSYAGGHETRMVVRYGNVMGSRG SVIPFFMSI LKKGVEVPITD : 148
CAP42645/1 : ASSPINLYGATKLASDKL FVAGNSYAGGHETRMVVRYGNVMGSRG SVIPFFMSI LKKGVEVPITD : 193
EBA14546/1 : ASSPINLYGATKLASDKL FVAGNSYAGGHETRMVVRYGNVMGSRG SVIPFFMSI LKKGVEVPITD : 193
ASSPiNLYGATKLASDKlFVAGNsY G h Trf VVRYGNVMGSRG SVIPFF Si kG lPITD

```

```

                200           *           220           *           240           *           260
AAM27834/1 : ERMTRFMI SLEEGVELVWHAFDMEGGEIYVKKIPSMKITDLARVVAPDAKQKIVGIRPGEKLHE : 258
AAM27854/1 : ERMTRFMI SLEEGVELVWHAFDMEGGEIYVKKIPSMKITDLARVVAPNAKQKIVGIRPGEKLHE : 258
YP743152/1 : DRMTRFMI SLEEGVELVWHAFDMEGGEIYVKKIPSMKVTDLARVIAPAARQIVGIRPGEKLHE : 258
AAM27872/1 : ERMTRFMI SLEEGVELVWHAFDMEGGEIYVKKIPSMKVTDLARVVAPDAKLEIVGIRPGEKLHE : 258
ABD15243/1 : ERMTRFMI SLEEGVELVWHAFDMEGGEIYVKKIPSMKVTDLARTIAPAEAKLEIVGIRPGEKLHE : 260
CAB62150/1 : ERMTRFMI SLEEGVELVWHAFDMEGGEIYVKKIPSMKVTDLARTIAPAEAEIVGIRPGEKLHE : 260
AAZ18512/1 : DRMTRFMI SLEEGVELVWHAFDMVGGGEIYVKKIPSMKMTDLARVVAPEAKQEVIGIRPGEKLHE : 258
EAZ98224/1 : ERMTRFMI SLEEGVELVWHAFDMVGGGEIYVKKIPSMKMTDLARVVAPEAKQEVIGIRPGEKLHE : 258
ABP81463/1 : ERMTRFMI SLEEGVELVWHAFDMEGGEIYVKKIPSMKVTDLARVVAPEAKQEVIGIRPGEKLHE : 213
CAP42645/1 : ERMTRFMI SLEEGVELVWHAFDMVGGGEIYVKKIPSMKVTDLARVVAPEARQEVIGIRPGEKLHE : 258
EBA14546/1 : ERMTRFMI SLEEGVELVWHAFDMVGGGEIYVKKIPSMKVTDLAKALAPNAKLEYIGIRPGEKLHE : 258
eRMTRFMI sLE EGvELVWhAF DM GGEIYVKKIPSMK TdLAr AP A e GiRPGEKLHE

```

```

          *           280           *           300           *           320
AAM27834/1 : QMISAEDAYYTYEYPEEHFKILPVIINDWANCTNR IKDGKRVAE GFVYSSDNNT EWM SDEALQSWIA : 323
AAM27854/1 : QMISAEDAYYTYEYPEEHFKILPVIINDWANCTNR IKDGKRVAE GFVYSSDNNT EWM SDEALQSWIA : 323
YP743152/1 : QMIGGEDAYYTYEYPEEHFKILPAINGWDRDANRIKDGKRVPE GFVYASDNNAEWMSEDELRAWID : 323
AAM27872/1 : QMISAEDAYYTYEYPEEHFKILPSINNWATCEKRIKNGIKVPE GFVYASDNNT EWM SDEMLQDWIE : 323
ABD15243/1 : QMIGEEDAFHTYEYEEHFKILPAIHNWTASEARIKDGKKVPPGF SYTSDNNRAWMTQEELQDWIA : 325
CAB62150/1 : QMIGEEDSFHTYEYEEHFKILPAIHNWTSSSEARIKNGKRVPTGF SYTSDNNTAWMTSAELRAWVA : 325
AAZ18512/1 : QMISVEDAYYTYEYPEEHFKILPTINKWANDPARIKDGKRVPE GFVYASDNNP EWM SDTDLDQEWID : 323
EAZ98224/1 : QMIGAEDSYFTYEYPEEHFKILPNIINNWGNCPRIKDGKKVEE GFVYASDSNTEWMADEDLQAWID : 323
ABP81463/1 : QMISAEDAYYTYEYPEEHFKILPTIHSWATCPKRIKDGKKVPE GFVYASDNNSEWMSDADLQAWID : 278
CAP42645/1 : QMIGAEDSFHTYEYPEHYKILPAINGWSTSPERI KDGKRVPE GFVYASDNNSD WMSDQQLQNWIE : 323
EBA14546/1 : QMIGPEDSLTTYEYDDYFKILPVIHEAASNPA MIKDGKRVAE GFHYTSDNNS EWM TSEELLSWVE : 323
QMI ED TYEY ehfKILP I w rIKdGk V eGF Y SDnN WM L Wi

```

```

          *
AAM27834/1 : RNQDKIGSI : 332
AAM27854/1 : RNQDKIGSI : 332
YP743152/1 : ANEGKIGAI : 332
AAM27872/1 : QNREKIGSI : 332
ABD15243/1 : ANAEKIGSL : 334
CAB62150/1 : ANADKIGSV : 334
AAZ18512/1 : TNRDKIGSI : 332
EAZ98224/1 : RNSSDIGKI : 332
ABP81463/1 : AHREKIGSI : 287
CAP42645/1 : VNREKIGSI : 332
EBA14546/1 : QNSKEIGKI : 332
n kIG i

```

### 10.3.2. Az Rkpm és a homológ fehérjék illesztése

```

          *           20           *           40           *           60
CAB62151/1 : MIPYGRQDITQADIDAVAEVLRSDFLTQGPVAVPRFENALVDYTGAKFALAANSATSALHVACLAL : 65
ABD15242/1 : MIPYGRQEIITQADIDAVAEVLRSDFLTQGPVPRFEEALAAYSDAKFAALAASSATSALHIACMAL : 65
ABI57663/1 : MIPYGRQDITRADIDTVVEVLESDFLTQGPVPRFEEQAVADYCGADHGVAVNSATSALHLACRAL : 65
AAM27835/1 : MIPYGRQDITQADIDAVVGVLRSDFLTQGPVPRFEEQAVAQHVGCASYALAVNSATSALHIACLAL : 65
AAM27855/1 : MIPYGRQDITQADIDAVVGVLRSDFLTQGPVPRFEEQAVAQHVGCASYALAVNSATSALHIACLAL : 65
AAM27873/1 : MIPYGRQEIITQADIDAVVEVLKSDFLTQGPVPRFEEQTVAEHVGARHAI AVNSATSALHIACLAL : 65
CAP42646/1 : MIPYGRQDITQADIDTVVGVLRSDFLTQGPVPRFEEQKLVAEHVGAEYAYAVNSATSALHIACLAL : 65
ABP81462/1 : MIPYGRQDITQADIDAVVAVLQSDFLTQGPVPRFEEQVAEHVGARHALAVNSATSALHIACLAL : 65
AAZ18513/1 : MIPYGRQDINQDIDAVVEVLKSDFLTQGPVPRFEEQAVKDACDAKYALAVNSATSALHIACLAL : 65
EAZ98225/1 : MIPYGRQDITQADIDAVVNVLQSDFLTQGPVPRFEEELVAHVDAKHAVAVNSATSALHIACMAL : 65
EBA14547/1 : MIPYGRQDITSTDDIEAVVEVLNSDFLTQGPVPRFEEAVAKASGAHAVAVNSATSALHIACMAL : 65
MIPYGrQdItqaDIaVv VL SDFLTQGP VP FE va A a AvnSATSALHiAc AL

```

```

          *           80           *           100           *           120           *
CAB62151/1 : GLGPGDWLWTSPIITTFVASANCLYCGAKVDFVDVDPRTYNLCPAKLERKLIVAEERDGTLPKIVVL : 130
ABD15242/1 : GLGPGDWLWTSPIITTFVASANCLYCGAKVDFVDVDPRTYNLSPVELERKLIVKAEERDGVLPKVVVP : 130
ABI57663/1 : GLGQGDWLWTSPIITTFVASANCLYCGARVDFVDIDPRNYNLCBRAL EAKLERAETENR LPKVVVP : 130
AAM27835/1 : GLGAGDCLWTFVITTFVASANCLYCGAEVDFVDIDPHTYNLCPEAFRRKLEQASLEGRLPKVLLV : 130
AAM27855/1 : GLGAGDCLWTFVITTFVASANCLYCGAEVDFVDIDPHTYNLCPEAFRRKLEQASLEGRLPKVLLV : 130
AAM27873/1 : GLGVDLWLTSPITTFVASANCLYCGAKVDFVDIDPATYNICPKALSEKLEVARKDGCVPKVLV : 130
CAP42646/1 : GLGPGDRLWTFVITTFVASANCLYCGAEVDFVDIDPHTYNISVEALKVKLEAARQAGRLPKVVVP : 130
ABP81462/1 : GLGPDYLWTFPIITTFVASANCLYCGAQVDFVDIDPHTYNLCPEALAHKLEQAEERDGLPKVVVA : 130
AAZ18513/1 : GLKKGDLWLTSPITTFVASANCLYCGAQVDFVDIDPKTYNLCPEALEKLVIAEKAGKLPKVVVP : 130
EAZ98225/1 : GLGEGDLWLTSPITTFVASANCLYCGAKVDFVDIDPKTYDLCPEVLEAKLQAKIDNRLPKVVVP : 130
EBA14547/1 : GLGPGDRVWTSPIITTFVASANSALYCGAEVDFVDIDARSYNMCEKALEAKLQAEASDQLPKVVVIP : 130
Glg gd lWT P TTFVASANc LYCGA VDFVD Dp tYn cp l KL A lPKv v

```

140 \* 160 \* 180 \*  
 CAB62151/1 : VHFAGQPCAIAEFHELGKRYGERTIEDASHAVGGRYRGEPIGNCRYSQVTVFSFHPVKIVTTAEG : 195  
 ABD15242/1 : VHLTGQPCAMAEIHELAKRYGFRVIEDASHAIGGKYRGEPIGNCRYSQVTVFSFHPVKIVTTAEG : 195  
 ABI57663/1 : VHLGQSCDMQAIHELARRRGGHVIEDASHAIGGKYRGEPIGNCRYSQVTVFSFHPVKIVTTAEG : 195  
 AAM27835/1 : VHLGQSPDMRSTHMLAKQYGVKIIEDASHAIGGKYRGEPIGNCRYSQVTVFSFHPVKIITTAEG : 195  
 AAM27855/1 : VHLGQSPDMRSTHMLAKQYGVKIIEDASHAIGGKYRGEPIGNCRYSQVTVFSFHPVKIITTAEG : 195  
 AAM27873/1 : VHLGQPCDMKAIIRDLADQYGFKIIEDASHAIGGKYRGEPIGNCRYSQVTVFSFHPVKIITTAEG : 195  
 CAP42646/1 : VHLGQPCDMAIHALGQYGFKIIEDASHAIGGKYRGEPIGNCRYSQVTVFSFHPVKIITTAEG : 195  
 ABP81462/1 : VHLGQPCDMHAHELARRRGGHVIEDASHAIGGKYRGEPIGNCRYSQVTVFSFHPVKIITTAEG : 195  
 AAZ18513/1 : VHFSGQPCDMEATYSLSKQYGFKIIEDASHAIGGKYRGEPIGNCRYSQVTVFSFHPVKIITTAEG : 195  
 EAZ98225/1 : VHLGQPCDMAIASKLAQYGFKIIEDASHAIGGKYRGEPIGNCRYSQVTVFSFHPVKIVTTAEG : 195  
 EBA14547/1 : VHLGQSCDMEATGKLLALRYGFVIEDASHAIGGAYQDQPVGSGRYSQVTVFSFHPVKIVTTAEG : 195  
 VHL GQpcdm i L ygf IEDASHAIGG Y ge iGn RYSQVTVFSFHPVKI TTAEG

200 \* 220 \* 240 \* 260  
 CAB62151/1 : GAALTNSKELAEERIALFRSHGITRDPVMTHEPDGFWYYQQVELGYNRYRLTDMQAALGLSOMVRL : 260  
 ABD15242/1 : GAALTNDKELADRMALLRSHGITRDPVMTREPDGFWYYQQVDLGYNYRMTDMQAALGLSOMARL : 260  
 ABI57663/1 : GMAVTNDAGLAERMSLLRSHGITRDPALMTHPEPDGFWYYQQIELGYNRYRMTDMQAALGLSOLQRL : 260  
 AAM27835/1 : GMVLTNDAELARKMELLRSHGITREPERMTHAPEGFWYYQQIELGFNYRMTTELQAALGLTQMORL : 260  
 AAM27855/1 : GMVLTNDAELARKMELLRSHGITREPERMTHAPEGFWYYQQIELGFNYRMTTELQAALGLTQMORL : 260  
 AAM27873/1 : GMALTNDGDLASRMVLLRSHGITRVPPEQMTSPDGFWYYQQVDLGFNYRMTTELQAALGLSOMSRL : 260  
 CAP42646/1 : GMALTNNKDLADAMALLRSHGITRDPALMTHVDPDGFWYYQQIELGFNYRMTTELQAALGVSQMORL : 260  
 ABP81462/1 : GMALTNDAELAVKMAALLRSHGITRDPALMTHDVPDGFWYYQQIDLGFNYRMTTELQAALGVTQMERL : 260  
 AAZ18513/1 : GMATTNSPELAQKLDLLRSHGITRDTDLMTKPTDGFWYYQQVDLGFNYRMTTELQAALGVSQMORL : 260  
 EAZ98225/1 : GMAMTNSADLAEKVNLHRSHGITRDPHLMTHAPDGFWYYQQIALGYNRYRMTTELQAALGVSQMORL : 260  
 EBA14547/1 : GMAVTNDAALAQKMLARSHGITRDPDLMVGESDGFWYYQQVDLGFNYRMTTELQAALGLSOMTRL : 260  
 G a TN LA m L RSHGITR p Mt dGpWYYQQ LG NYRmTe QAALG Qm RL

\* 280 \* 300 \* 320  
 CAB62151/1 : DEYVARRHTLARRYDKSLVELFVVTIPWQHPDYSGLHLYVIRLERTKISKSHRAFFEGRLRARGIG : 325  
 ABD15242/1 : DDYVERRHVLAKRYDEMLAHLPLITPWOHPDYSGLHLYVIRLRNRAKMKKTHRTVFEGLRARGIG : 325  
 ABI57663/1 : DDYVARRNELAERYDRELSDLFVVTIPWQHPDAYSARHLYVIRLRDEIRTSRRAFFESLREQGIG : 325  
 AAM27835/1 : DEYVEARHLLAQRYNQFLAHLPLITLPYQHEDSYSGFHLYVIRIQLEKISPTHROVFEESLREQGIG : 325  
 AAM27855/1 : DEYVEARHLLAQRYNQFLAHLPLITLPYQHEDSYSGFHLYVIRIQLEKISPTHROVFEESLREQGIG : 325  
 AAM27873/1 : NEYVERRHKLARYNQFLAHLPLITLPYQHEDSYSGFHLYVIRIQLEKISPTHROVFEESLREQGIG : 325  
 CAP42646/1 : DAYVARRHELARRYDELLAGLPLITPWOHPDYSGLHLYVIRIALGKIQATHROVFEESLREQGIG : 325  
 ABP81462/1 : DHYVARRHQLARRYDELLAGLPLITPWOHPDYSGLHLYVIRIQLEKIDKTHROVFEESLREQGIG : 325  
 AAZ18513/1 : EAFVAKRHELARQYDTLKDLFVVTIPWQHPDYSGLHLYVIRIQLEKIDKTHLEVFEESLREQGIG : 325  
 EAZ98225/1 : DAYVTRRHELAKRYDQLLADLPLITLPWQHPDYSGLHLYVIRIQLENTNLSHLDFEALREQGIG : 325  
 EBA14547/1 : EEFVSRRHVLAKRYNMLLADLPLITLPWQHPDYSGLHLYVQVDDRTCDLSRROVFEALRAAGIG : 325  
 yV Rh LA RY L Lp PwQh YSg HLYVirI h vFe lR G g

\* 340 \* 360 \* 380  
 CAB62151/1 : VNLHYIPVHTQPYYSKMGFRKGD-YPEAERYYEAIITLPLYPTMTEAQDQVVAALTAELAT~~ : 386  
 ABD15242/1 : VNLHYIPVHTQPHYSRMGFSSGD-FPEAERYYEAIITLPIYPTMSEAQDQVVSALTAELTT~~ : 386  
 ABI57663/1 : VNLHYIPVHTQPYRAMGFEPGD-YREAERYYEAIISLPMFPTMTEAQDQVIAAIRGAIRG~~ : 386  
 AAM27835/1 : VNLHYIPVHTQPYYSKMGFIEDD-FPNAMAYYEAIISLPIFQMSHEQDQVVAALTAELAIQS~~ : 386  
 AAM27855/1 : VNLHYIPVHTQPYYSKMGFIEDD-FPNAMAYYEAIISLPIFQMSHEQDQVVAALTAELAIQS~~ : 386  
 AAM27873/1 : VNLHYIPVHTQPYFERMGFVSGD-FPEAEAYYEAIISLPMYHTLSLEQDQVVAALTAELAIQS~~ : 386  
 CAP42646/1 : VNLHYIPVHTQPYYSKMGFKHGD-FVEAERYYEAIISLPMFQMTFAQDQVVAALTAELAIQS~~ : 386  
 ABP81462/1 : VNLHYIPVHTQPYYSKMGFQSGD-FPEAEAYYEAIISLPMFQMTFAQDQVVAALTAELAIQS~~ : 386  
 AAZ18513/1 : VNLHYIPVHTQPYYSKMGFKAGQ-FPEAEAYYEAIISLPMFQMTFAQDQVVAALTAELAIQS~~ : 385  
 EAZ98225/1 : VNLHYIPVHTQPYYSKMGFQSGD-FPEAEAYYEAIISLPMFQMTFAQDQVVAALTAELAIQS~~ : 388  
 EBA14547/1 : VNLHYIPVHTQPYYSKMGFKAGQ-FPEAEAYYEAIISLPMFQMTFAQDQVVAALTAELAIQS~~ : 386  
 VNLHYIPVHT QP y mgf d p a YY eAIsLP m QQ vv a

### 10.3.3. Az RkpN és a homológ fehérjék illesztése

```

          *           20           *           40           *           60
AAM27836/1 : ~~~~MKLAVIPARGGSKRIPRKNIKIFCGQPMIAWSIQAAALNSACFDRIIVSTDDAEIAEVAREL : 61
AAM27856/1 : ~~~~MKLAVIPARGGSKRIPRKNIKIFCGQPMIAWSIQAAALNSACFDRIIVSTDDAEIAEVAREL : 61
AAM27874/1 : ~~~~~~MIAWSIEAAIESGCFDKVMVSTDDAEIAAVARKY : 34
CAP42647/1 : ~~~~~~MIAWSVEAALHSGCFHSVVSTDDPEIASVAQAS : 34
ABP81461/1 : ~~~~MKVAVIPARGGSKRIPRKNIKSFCGKPMIARSIEAAALSGCFDRIVVSTDDAEIAEISRKH : 61
ABI57664/1 : ~~~~MKVAIIPARGGSKRIPRKNIRGFAGKPMIAWSIEAARASGCFDRIVVSTDDDEIAGVARQW : 61
AAZ18515/1 : ~~~~MKIAVIPARGGSKRIPRKNIKFCGKPMIAYSIEAALQSGCFDKIIVSTDDLEIAEVAKSY : 61
EAZ98226/1 : MTAGSRVAIIPARGGSKRIPRKNIREFCGKPMIAWSIEAALS SGCFDRIVVSTDDDEIAEVAKKY : 65
EBA14548/1 : ~~~~MAIAVIPARGGSKRIPRKNIKPFCGKPMIAWTIEAAAQSGCFDRIVVSTDDAEIAEVARDC : 61
ABD15241/1 : ~~~~MNLAVIPARGGSKRIPRKNIKSFLGRPMIAWSIGAADVSGCFDRILIVSTDDDEIAEISRQL : 61
CAB62152/1 : ~~~~MNLAIIPARGGSKRIPRKNIKQFAGRPMIDWSIRAAIESNRFDRILIVSTDDVEIAETVRRLL : 61
          a iparggskriprkni f g pMiaWSI AA S cFd VSTDD EIA

```

```

          *           80           *           100           *           120           *
AAM27836/1 : GAEVPFIRPHVLADDHTGTLPVIRHAIQACAMQGFHATQVCCYATAPFITTKDILQGLEISERS : 126
AAM27856/1 : GAEVPFIRPHVLADDHTGTLPVIRHAIQACAMQGFHATQVCCYATAPFITTKDILQGLEISERS : 126
AAM27874/1 : GADVPFMRPVLELADDHAGTLPVIRQAIEGYLEKGVFAEQVCCYATAPFVRPELDLYQGCTRLEES : 99
CAP42647/1 : GAFVPPFLRPADLSDDHTGTIPVVRHAIQWFLDQGESVEQVCCYATAPFVRAADLQHGLOVLLLET : 99
ABP81461/1 : GADVPFMRPPELSDDHTGTIPVIRHAI EWLTADGECPPQVCCYATAPFISGDELRRGLQVLGES : 126
ABI57664/1 : GAEVPFMRPAELADDHTGTIPVIRHAIIDWLNEHGETPDRVCCYATAPFVQAGLRRGLEALEER : 126
AAZ18515/1 : GAEVPFMRPELSDDYSGTIPVIRHAI EWLIKQCFDPELICCLYATAPFVTAEYLQGGFQQLKST : 126
EAZ98226/1 : GAEVPFVRSPELSDDHTGTIPVIRHAVDRLNQHGVLVEYACCLYATAPFIAVEDIQRGFRMQQQ : 130
EBA14548/1 : GAETPFVRSPELSDDHTGTIPVIRHAIQWLGQA CKAPDLACCLYATAPFLQAE D IRRGYEVIQEQ : 126
ABD15241/1 : GAEVPPFLRPAEELADDYATTSVIRHAI SWSAQNRRVPERVCCYATAPFLRADDI TRGFDDLLEDG : 126
CAB62152/1 : GAEVPPFLRPAEELADDYTGTGDVIRHAI RWMQNDRMPGRVCCYATAPFLRADDI IAKGCDLLEES : 126
          Ga vPF Rp L DD gT pVirhAi g CC YATAPF d G

```

```

          140           *           160           *           180           *
AAM27836/1 : GITYAFTATTYAFPIQRALKLHPAGGVEMFNPEHENIRSQDLEEVVHDAGQFYWGKVDSW MQEELP : 191
AAM27856/1 : GITYAFTATTYAFPIQRALKLHPAGGVEMFNPEHENIRSQDLEEVVHDAGQFYWGKVDSW MQEELP : 191
AAM27874/1 : GAAYAFSVTTFYAFPIQRAIRLKEGDRVEMFQPAYMASRSQDLEEA YHDAGQFYWG RSEAWLKEIP : 164
CAP42647/1 : GADYAFSVTSYAFPIQRALRMSEGGRVEMFSPEHETIRSQDLEEA FHDAGQFYWQ AESWLQGV : 164
ABP81461/1 : HCDYAFSVTSYAFPVQRAIRITREGRVEMFHPEHENIRSQDLEEA YHDAGQFYWGR TSAWLEKGP : 191
ABI57664/1 : QADYAFSATS YAFPIQRALRIDDGHVAMFQPEHEFATRSQDLEEA WHDAGQFYWG RAEAWRTGTP : 191
AAZ18515/1 : NAAYAFSTVTSYAFPIQRAIKLNPELGVEMFDRNENIRSQDLEEA WHDAGQFYWGRVD AWLTEKI : 191
EAZ98226/1 : SSDYAFSVTSYAFPIQRAICITPTDRIAMFSPEHENIRSQDLEEA WHDAGQFYWGTAEAWLQERA : 195
EBA14548/1 : GADYAFSVASAFYAFPIQRALYLTEAGRLAMFQPEHLATRSQDLEEA YHDAGQFYWGT AQAWCEERR : 191
ABD15241/1 : GADFVFSATS YAFPIQRAIRLTPAGRVEMLMPEQENIRSQDLEEVYHDAGQFYWGRSEAWLSGKP : 191
CAB62152/1 : GAEFVFSATS YAFPIQRAIRLTPERRVEMLMPEQENIRSQDLEEA YHDAGQFYWGRSEAWLSGKP : 191
          yAf t yAFPiQRA v Mf p f tRSQDL eE HDAGQFYWG W

```

```

          200           *           220           *           240
AAM27836/1 : FFTVNSCPVLLPRHRVQDIDTVE DWQRAEWLFKAMRSQ~~~~~ : 229
AAM27856/1 : FFTVNSCPVLLPRHRVQDIDTVE DWQRAEWLFKAMRSQ~~~~~ : 229
AAM27874/1 : IFAGNAVPI LPRHRVQDIDTPE DWVRAEWLFKALLSEADVSS-S : 208
CAP42647/1 : IFSPAAAPVLLPRHRVQDIDTPE DWTRAEWLF RAMREQER--W-A : 206
ABP81461/1 : IFGLHSAPVLLPRHRVQDIDTPE DWVRAEWLFKAMQEQTG----R : 232
ABI57664/1 : IFSERAVPVLLPRHRVQDIDTPE DWKRAEWLFRAWQAQEGESEGR : 236
AAZ18515/1 : IFGADSTPVLLPRHRVQDIDTSE DWDRAEWLFKALQG~~~~~ : 228
EAZ98226/1 : LFSEQAIPVKLPRHRVQDIDTPE DWSRAEWLFKAMQASKG--N-Q : 237
EBA14548/1 : LEDTGSIPVLLPRHRVQDIDVPE DWERAEWMLKAMQLQKA--N-A : 233
ABD15241/1 : IFSSAATALI LPRYRVQDIDTPE DDLRAELMFKVLHEFDA-AR-S : 234
CAB62152/1 : VFLSATALV LPRYRVQDIDTPE DDLRAELMFKALK~~~~~ : 227
          F p LPRhRVQDIDt eDW RAEw fka

```

### 10.3.4. Az RkpO és a homológ fehérjék illesztése

```

          *           20           *           40           *           60
CAB62153/1 : ~~~~MSLMPPRRYSVLFRTDASIQIGTGHVMRCLTLANMLAEAGFLCRFVCRAPGPNLTDLIRQ : 61
ABD15240/1 : ~~~~MNSMPPAHRHNVVFRVDASIDIIGTGHVMRCLTLADMLSQAGFECLFVCRPGFPGNLIGLIRS : 61
AAZ18516/1 : ~~~~~~MRCLTLADALVLKGAECYFICREHFGNLLLEVIRK : 34
ABP81460/1 : ~~~~~~MKVAIRVDASLQMGGTGHVMRCLTLADALVARGAACAFICRAHFGNLLDLIRS : 52
EBA14549/1 : ~~~~~~MKVAIRVDASIQIGSGHVMRCLTLAAVLRQAGAEVFLCRDFHFGHMGALITEN : 52
EAZ98227/1 : ~~~~~~MNIVFRVDGSIQMGGTGHVMRCLTLAEELQRLGHSCVFIICREHFGNLGFEITN : 52
ABI57665/1 : MAVAAQHRTTGTGMRVAFRVDASLAIIGSGHVMRCLTLAGALCEQGADCHFICREPOGHINSQIAE : 65
AAM27875/1 : ~~~~~~MKVAFRVDASLDIIGNHVMRCLTLASYLRELGGESLFIICREHFGNLISLISD : 52
CAP42648/1 : ~~~~~~MGMKVAFRVDASLSIQGTGHVMRCLTLARLLAAGGAQCRFICRPHDGHVLDVYIRA : 54
AAM27837/1 : ~~~~~~MRAVFRADASLQIGTGHVMRCLTLAREIAVRGGECIFICREHKGHLIRQIQD : 52
AAM27857/1 : ~~~~~~MRAVFRADASLQIGTGHVMRCLTLAREIAVRGGECIFICREHKGHLIRQIQD : 52
          r das g ghvmRCLtLA l G c F CR h G l I

```

```

          *           80           *           100           *           120           *
CAB62153/1 : RGFVATELPREVG-DRAET-----AYVGHTHWLGADWQTDACETASAIG-DARPDLL : 111
ABD15240/1 : RGFVAELPSAVAGVKAGD-----RDLAHSWLGVDWKTIDARQTMMAIA-DASPSWL : 112
AAZ18516/1 : RGHQAHSPLKDDVG-----KSIKGNIKLAHADWLGATQQEDAQYCIDLGG-LIKPDWL : 87
ABP81460/1 : KGHAHALPVTASVGSASSLAI---TAVGDELVPVHSHWLGATQADDAEACAPILA-EFQPDWL : 112
EBA14549/1 : QGFSLALLPATAAP--AGEGSD-----LAHAAWLGSSQMTDAEQCQAAQGGFRPDWL : 103
EAZ98227/1 : KGFVVHLLSTTSGVNFVEND-----TAHAEWLGVSWRIDAEQTLAALGG-SMEVDWL : 104
ABI57665/1 : RGFVHRLPAVEDGSITSPAGSGRSASVDDEPPQPKHAEWLQTTQATDARQSLETLR-ELAPDWL : 129
AAM27875/1 : KGFVNILPVEPFTPTSED-----GYESWLGATQERDSEVCKKILR-EFSPDWL : 100
CAP42648/1 : EGFVRSPLPVSIGKPSTLP-----ALAHAWLGSTQEDDAAQTCQLC-DFSADWL : 104
AAM27837/1 : LGFKVHTLPLEACLDSDTALP-----HARWLGSSQAKDAALCVELK-HIDAENM : 101
AAM27857/1 : LGFKVHTLPLEACLDSDTALP-----HARWLGSSQAKDAALCVELK-HIDAENM : 101
          Gf Lp h WLG Da l wl

```

```

          140           *           160           *           180           *
CAB62153/1 : IVDHYALDSRWFRSMR---PFCG--RLMVLDLADREHDCDLLLDQNLGRTASDYLLLVPANEM : 171
ABD15240/1 : IVDHYALDIRWQFLR---PSCG--YLMVVDLADREHDCDLLLDQNVGRTVGDYRLLVPPAPCQM : 172
AAZ18516/1 : VIDHYALDISWEKALH---PYCK--KLMVIDDLGDRHGLDLDLQNYGSTVEKYKLVKPKDKKI : 147
ABP81460/1 : IVDHYALDARWELLLR---PYCR--RLMVIDDLADRAHTCDLLDLQTFGRDAKDYHAWVSPDCQV : 172
EBA14549/1 : IVDHYALDARWQRLR---SEVG--RILVIDDLADRDHACDLLDQNLGREAGDYEGRVPAGCQV : 163
EAZ98227/1 : VVDHYALDARWERRLLA---KAAG--QIMVIDDLADRHACDLLDQNLGREITDYDHKVPHECTR : 164
ABI57665/1 : IVDHYALDAQWEARVR---EATPGMRVMVIDDLADRLHQADLLDQNLGRKAEDYRDLVPAHCRL : 191
AAM27875/1 : VVDHYGLDARWEISVKPFFK----YLFVIDDLANRPHVCDVLLDQNLGRKVCYDVLGLVPTGCRL : 160
CAP42648/1 : VVDHYGLDQEWERRLQS----SAARLLVIDDLADRHVCNLLDQTLGRNPDDYQSLVPAGCMV : 164
AAM27837/1 : VVDHYALDEQWEAFIKP----LVRNLFVIDDLDRKHDCNILLNQLAVEPNGYAMLVPADARI : 161
AAM27857/1 : VVDHYALDEQWEAFIKP----LVRNLFVIDDLDRKHDCNILLNQLAVEPNGYAMLVPADARI : 161
          vDHYald We ViDDL dR H c LLDQn g Y VP c

```

```

          200           *           220           *           240           *           260
CAB62153/1 : LIGASFALLRPEFALKRPPYSLARRRSASPPRRLLVTLGGIDKDNVTROVLDALERC-TLPPDMEI : 235
ABD15240/1 : LVGARFALLRPEFARERPHSLRRRHAAP-RRLVTLGGVDKDNVTERVLHTLERC-ELPNDAEV : 235
AAZ18516/1 : LAGTTFALLRPEFALWRDYSLKRRKDNREVKSILITLGGVDPDNYTGKILKYLAKT-ELDPKIVI : 211
ABP81460/1 : LCGSQYALLRPEFAALRAYSLQRR-ARPQLRQLITMGGVDKDNATGEVLTALRVC-PLPADCQI : 235
EBA14549/1 : LCGPHYALLRPEFAALREQSLQRRHRS--APRQVLIITLGGVDQDNVTGQVLSVQGC-NLPQDMQV : 225
EAZ98227/1 : LVGPNYALLRPEFARLREKSLKRRKMP-ELKRILISLGGVDRTNVTAQVLNVLND-QLSSETEL : 227
ABI57665/1 : LVGPKYALLRPEFAEWREWSLERRQENGPPVRRLLVSLGGVDRDNVTGQVLDALSEV-ELSKEMEI : 255
AAM27875/1 : LVGVRYALLRPEFPKLRDFSQRRRQP-CVNKLLVTMGGVDQPNATGLVLHALLGS-SLPEDCQV : 223
CAP42648/1 : LAGPKYALLRPEFAQARRDSLRRRTARAIGRVLVTLGGVDQHNATEAVLNVLDGEGALPDTCQI : 229
AAM27837/1 : LCGPAYALLRPEFHAARQESIRARQGR-PLKHLLVSLGGIDKDNITLRAIDAIKSL-DGCQFFDL : 224
AAM27857/1 : LCGPAYALLRPEFHAARQESIRARQGR-PLKHLLVSLGGIDKDNITLRAIDAIKSL-DGCQFFDL : 224
          L G ALLRPeF R Sl rr L lGG D N T l l l

```

```

          *           280           *           300           *           320
CAB62153/1 : TIVMGQHAPWAKSVREKAAQLPWNAGVVIVNDDMAGLMSGADLAI GAAGSTSWERCALGLPTVLM : 300
ABD15240/1 : TVVMGQHAPWLVSSVRESAAQMRWKTRVLSNVDDMASLMSEADLAI GAAGSTSWERCALGVPTIILM : 300
AAZ18516/1 : TVVMGVTAPHLQSVKHQAADMPVKTTVKVNVSNMAELMSNADLAI GAAGATTWERCCLGVPTIQL : 276
ABP81460/1 : TVVMGTTAPWLVSEVEQLARDMPWPTRVLVGVNDMARLMAESDLAI GAAGATSWERCCLGLPTAMF : 300
EBA14549/1 : TVIMGATAPHVEEVRQARTMVVFQCEVVVAVSDMAERMVQADLSTI GAAGSTTWERACLGLPSLIV : 290
EAZ98227/1 : DVIMGATAPHLNDIRTQVSHTRFRATVSVNVGDMARMCRADLAVGAAGSTSWERCCLGLPALIV : 292
ABI57665/1 : TVVMGASAPWLEAVRGRARQMPFCSTEVVVNVDDMARRMAEANLAI GAAGSTAWERCCLGLPTIVL : 320
AAM27875/1 : SVIMGANAPWLEKVKLEAARLPWQVEVSVNVDDMAQRMASDLTI GAAGSTSWERCCLGVPSILV : 288
CAP42648/1 : TVVMGAAAPWLDVAVKARASLMRRPTEVVLNVDRMARRMVDSDLAI GAAGSTSWERCCLGLPTALL : 294
AAM27837/1 : TVVMGPNAPWKNVHNAKLSFPGRAELRIGVSNMAELMVASDLAI GAAGSTSWERCCLGLPTLIL : 289
AAM27857/1 : TVVMGPNAPWKNVHNAKLSFPGRAELRIGVSNMAELMVASDLAI GAAGSTSWERCCLGLPTLIL : 289
tv MG AP v v V MA M dlaiGAAG T WERC LG P

```

```

          *           340           *           360           *           380           *
CAB62153/1 : VLAENQRSVARIIDTEGAAKLVELRPFVSVFRG--VVEGLVGNKDSVEAMFERAATICDGGKGVL : 363
ABD15240/1 : VLAENQREVAQKLTVEGAAQAVELGADFSTLES--LIESLIFDKLALAAMSERAAAICDGGEGGL : 363
AAZ18516/1 : VLAENQRQIAEYLDVAGVVKLIKDVNELTHLVIN--VKHWVLP-----IVIRAQSVADGLGAE : 332
ABP81460/1 : VLAENQKYAAWLDREKAVRMFQVDANLPNDLAN--FISAITDSDESLKRLGESASAIADGRGCG : 363
EBA14549/1 : VLAENQGTIAQAI SEAGAALYAGKAAEADFPKQLRRAVLQCLSEPGLLSRMGVRAAAIVDGVGAS : 355
EAZ98227/1 : VLADNOKSAHAHALSERGVAVVASSLT~~~~~ : 318
ABI57665/1 : VLAENQREIARSLHRAGVAHSLGAPDALFDLVG----QWPMITQPEYLKGLSRKASLVDDGRGAV : 381
AAM27875/1 : VLAENQRIAASALRDCGAVKLLDIKNDFEENLRM--ELRLLTDLESLKGLSAGSAAVTDGGGGGE : 351
CAP42648/1 : VLAENQQPSARALGEAGAVRLIGGPQDIAQRLPG---ILAEFSDMRVLHAASDMA SRVDCGAGAG : 356
AAM27837/1 : ILADNQLSIGRALQAE GAAQVIELEGLEHELPRQ---LALLMSRNDIREVMSQAASVYVCDGLGVQ : 351
AAM27857/1 : ILADNQLSIGRALQAE GAAQVIELEGLEHELPRQ---LALLMSRNDIREVMSQAASVYVCDGLGVQ : 351
v l A N Q a l g a dg g

```

```

          400
CAB62153/1 : EVVRAITDRLCCRI~~~~ : 377
ABD15240/1 : EVARRIADGLRRSV~~~~ : 377
AAZ18516/1 : RVISYMLKGFYDSRYS~ : 349
ABP81460/1 : RVAGWLFVRAKQ~~~~~ : 376
EBA14549/1 : RVQLAMQGEIQS~~~~~ : 367
EAZ98227/1 : ~~~~~ : -
ABI57665/1 : RVRNGLMGVEMANEANDG : 399
AAM27875/1 : LIAELMKMYSHAGGVA~ : 367
CAP42648/1 : RVADLMKERS~~~~~ : 366
AAM27837/1 : RVVDHIYE~~~~~ : 359
AAM27857/1 : RVVDHIYE~~~~~ : 359
v

```

### 10.3.5. Az RkpP és a homológ fehérjék illesztése

```

          *           20           *           40           *           60
AAM27876/1 : ~~~~~~MSHDLGILRAIKAEELVMLMWRNAPSVRANMYTRHEISWDEHLAWWERTKSRKDQA : 57
ABP81459/1 : ~~~~~~MKDSVLRRLGVLRAIKPKELELMLSWRNAPSVRANMYTRHEISLVEHLAWWAQIQDRSDQK : 60
CAB62154/1 : ~~~~~~MTNSTYGRLLRAATDDQIMRRWRNIEAVREKMYTCHHEISEEHLRWERTKSVRNNQ : 58
ABI57666/1 : ~~~~~~MYTRHEIGAEHLAWFERVRHDESRL : 26
CAP42649/1 : ~~~~~~MRADDLARVLAWRNHEQIRRFMYTTHEISLEEHAAWFORASADARKH : 47
AAZ18517/1 : MIVDTPSFGEVELLNLITSLSYESKMKILEMRNHEKVRQAQMSQDIINEEGHINFIELLLKDNAEKQ : 65
rn p r Myt heI eHl w

```

```

          *           80           *           100           *           120           *
AAM27876/1 : YFMYYEYKGVSSGIVAFITGIDSANRNSWAFYASTEAPKG-TGSRMEFLALDYAFGDMGLHKKLYCE : 121
ABP81459/1 : YFMHEYQGTPLGIVAFITGIDSTNRNSWAFYASFPQAPKG-TGSKMEFLALEHAFHDMKLLHKLCE : 124
CAB62154/1 : YFIYEYRNTPMGVVSNFNIDKQENASWAFYASPD AERG-TGSRMEFLALDHAFD LKLLHKLFC : 122
ABI57666/1 : AMIFEIDHQPICGFVQF SVVDVKAGRADWGFY LAPDAPRG-SGYQLGESALTHAFGQLLLHKKVCGE : 90
CAP42649/1 : LLIFEADGVPMGFANLNVATAGA-IAEWGFYVAPDAPRG-TGMRLGRTVLAHAFGPLGLHKKVCGE : 110
AAZ18517/1 : YLMVNYQKSI VGVYIYETDIDDGKHS AVFGVYANLYKKLDSAGSVLMESALAYFDRSINLKKISLE : 130
e G f d w fY a g G aL af LhK E

```



```

          140          *          160          *          180          *
AAM27876/1 : VLAENAPVTKLHQKYGFKAEGVFRHHMVDGAYVDIHRLGILLATEWNDKRSEIKEKLIALSRG~ : 184
ABP81459/1 : VLAENTSVIKLHQKFQKVEGILREQHVVEAFADVYRLGLVASEWQALREEMLKKLLKFSGSI : 188
CAB62154/1 : VLDENTSVIKLHKKFGFVEEGIFRQHYQRDGGQFYDIHRLSILLAREWTDRRTDMLASIPVPRGE~ : 185
ABI57666/1 : ALAENERSIRFERLGFTKFASLFDHFFDGETYHDVVGFLLSAEWNERKEAKCP~~~~~ : 145
CAP42649/1 : ALAENERSINFRGRLGFRQEGVLRDQHFDDGETYCSIVVFGLLSHEWKPL~~~~~ : 159
AAZ18517/1 : VYESNNIAVNLYIKFGFSLVSSFDQGGEK-----VLTMQLTKNDL~~~~~ : 170
          l f N   i   h   G F   e   r                               l   e w

```

### 10.3.6. Az RkpQ és a homológ fehérjék illesztése

```

          *          20          *          40          *          60
AAM27839/1 : ~MNVKVISIAGRAIGPDYPPYIIAEMSANHNGSLETAFRIIEAAKSCGADALKIQTYPDTITLN : 63
AAM27859/1 : ~MNVKVISIAGRAIGPDYPPYIIAEMSANHNGSLETAFRIIEAAKSCGADALKIQTYPDTITLN : 63
CAB62155/1 : MKLTRVITIAGREIGSDFPPYIIAEMSANHNGRIETALSILIDRAKEAGADAVKIQTYRPDTITLD : 65
ABD15239/1 : ~~~~~MNSANHNGRIETALSILIDRAKEAGADAVKIQTYRPDTITLD : 40
EAZ98229/1 : ~~~~~METSKEKIGSKYPPYIIAELSANHNGKFETALKIIEEAAKAGADAVKIQTYRPDTITLD : 59
ABI57667/1 : ~MSDPHIVIDEERRIGADELPYIIAELSANHNGKLETALKIIDEAKQAGADAVKIQTYRPDTITLD : 64
CAP42650/1 : ~MSIPHISIAGRRISQEDPPYIIAEVNSANHNGRLDVALRLIDEAKKAGADAVKIQTYTADTITLD : 64
ABP81458/1 : ~MNAKISISGREIGLDHPPYIIAELSANHNGRLDTAMQIVEAAKAGADAVKIQTYTADTITLN : 63
AAM27877/1 : ~MTSSIVIAGREIGCGFPPYIIAELSANHNGKIENALDIVSAKASGADAVKIQTYKPETITLR : 63
EBA14551/1 : ~MTDTLYIADRAIGPDHPPYIIAEMSANHNGNLDAAFALIEQAQKAGADALKIQTYPETITLK : 63
AAZ18519/1 : ~MSHIEINGRKIGQDFPPYIIAELSANHNGVLQKALDTITAAKNGGADGKIQTYTSADTMTID : 62
          i   r   i g   p p y   i a e   S A N H N G   A   i   A k   G A D a   K   Q T Y   d T i l

```

```

          *          80          *          100          *          120          *
AAM27839/1 : SDLPDFRISGGLWGGKTLYELYEWAHTPWWEHTPFMEYARKIGVTIFSSPFDPTAVDLEDLNP : 128
AAM27859/1 : SDLPDFRISGGLWGGKTLYELYEWAHTPWWEHTPFMEYARKIGVTIFSSPFDPTAVDLEDLNP : 128
CAB62155/1 : SDADEFRIQGLWGGKTLYQLYSEAYMPWDWHVPLFEHARKTGITIFSSPFDNTAVDLEDLNP : 130
ABD15239/1 : SDGEDFRISGGLWGGKTLYQLYSEAYMPWEWHTALFEHARKIGITIFSSPFDNTAVDLEDLNP : 105
EAZ98229/1 : SDADEFKIKGGLWDGRTLYSLYQEAHMPWEWHKPLFEHARKIGIPIFSSPFDNTAVDLEDLNP : 124
ABI57667/1 : CDSEDFQIHGGLWDGRTLYELYEWAHMPWEWHKPLFDHARKLGVITIFSSPFDNTAVDLEDLNP : 129
CAP42650/1 : ADTEDFQIRGGLWDGKTLYQLYQEAHMPWEWEHPLFEHARKVGIPIFSSPFDRTAADLLDLSNP : 129
ABP81458/1 : CDSEEFQIHGGLWDGKTLYQLYQEAHMPWEWHQPLFAHARKLGITIFSSPFDSTAVDLEDLNP : 128
AAM27877/1 : SDAEEFKITEGLWRGRTLYDLYEWAHMPWEWHKPLFEHAARLGITIFSSPFDSTAVDLEDLNP : 128
EBA14551/1 : SDAEDFCIKGGLWDGRTLYDLYEWAHMPWEWHKPLFEHAARLGITIFSSPFDSTAVDLEDLNP : 128
AAZ18519/1 : CDTKDFMINGGLWDGKTLYQLYQEAHMPWEWHKPLFEHARKVGIPIFSSPFDNTAVDLEDLNP : 127
          D   F   I   g   l   W   G   t   L Y   L Y   A   P w e W H   p   F   h   A r k   g   i   F   S   S   P   F   D   T   A   D   L   L   e   d   l   a   P

```

```

          140          *          160          *          180          *
AAM27839/1 : AYKIASFEATDLPLIKYVAATGKPMIISTGMADLEEIQEAVDAAQAGGCKELAILHCVSGYPAPA : 193
AAM27859/1 : AYKIASFEATDLPLIKYVAATGKPMIISTGMADLEEIQEAVDAAQAGGCKELAILHCVSGYPAPA : 193
CAB62155/1 : AYKIASFEAVDPLIRYAAAGTGPMMIISTGMADDEEIAEAIEAAREGGCKDLAILHCVSGYPAPA : 195
ABD15239/1 : AYKIASFEAVDPLIRYAAATGKPMIISTGMADDEEIAEAIEAAREGGCKDLAILHCVSGYPAPA : 170
EAZ98229/1 : AYKIASFEAVDPLIRYVASTGKPMIISTGMADAEIIEAIAAAREGGCKELAILHCVSGYPAPA : 189
ABI57667/1 : AYKIASFEAVDPLIEYVASTGKPMIISTGMADAEIIEAIAAAREGGCKELAILHCVSGYPAPA : 194
CAP42650/1 : AYKIASFEAVDPLIRYVAGKGPMMIISTGMADDEEIQEAVDAAQAGGCKELAILHCVSGYPAPA : 194
ABP81458/1 : AYKIASFEAVDPLIKYVAATGKPMIISTGMADAEIIEAIAAAREGGCKELAILHCVSGYPAPA : 193
AAM27877/1 : AYKIASFEAVDPLIRYAAATGKPMIISTGMADAEIIEAIAAAREGGCKELAILHCVSGYPAPA : 193
EBA14551/1 : AYKIASFEATDLPLIRYVAATGKPMIISTGMADDEEIEAIAAAREGGCKELAILHCVSGYPAPA : 193
AAZ18519/1 : AYKIASFEATDLPLIRYVAATGKPMIISTGMADAEIIEAIAAAREGGCKELAILHCVSGYPAPA : 192
          A y K I A S F E A   D L P L I   Y   A   t g K P m I i S T G M A D   E E I   E a   a A   G C   L a i l h C v S g Y P A P

```

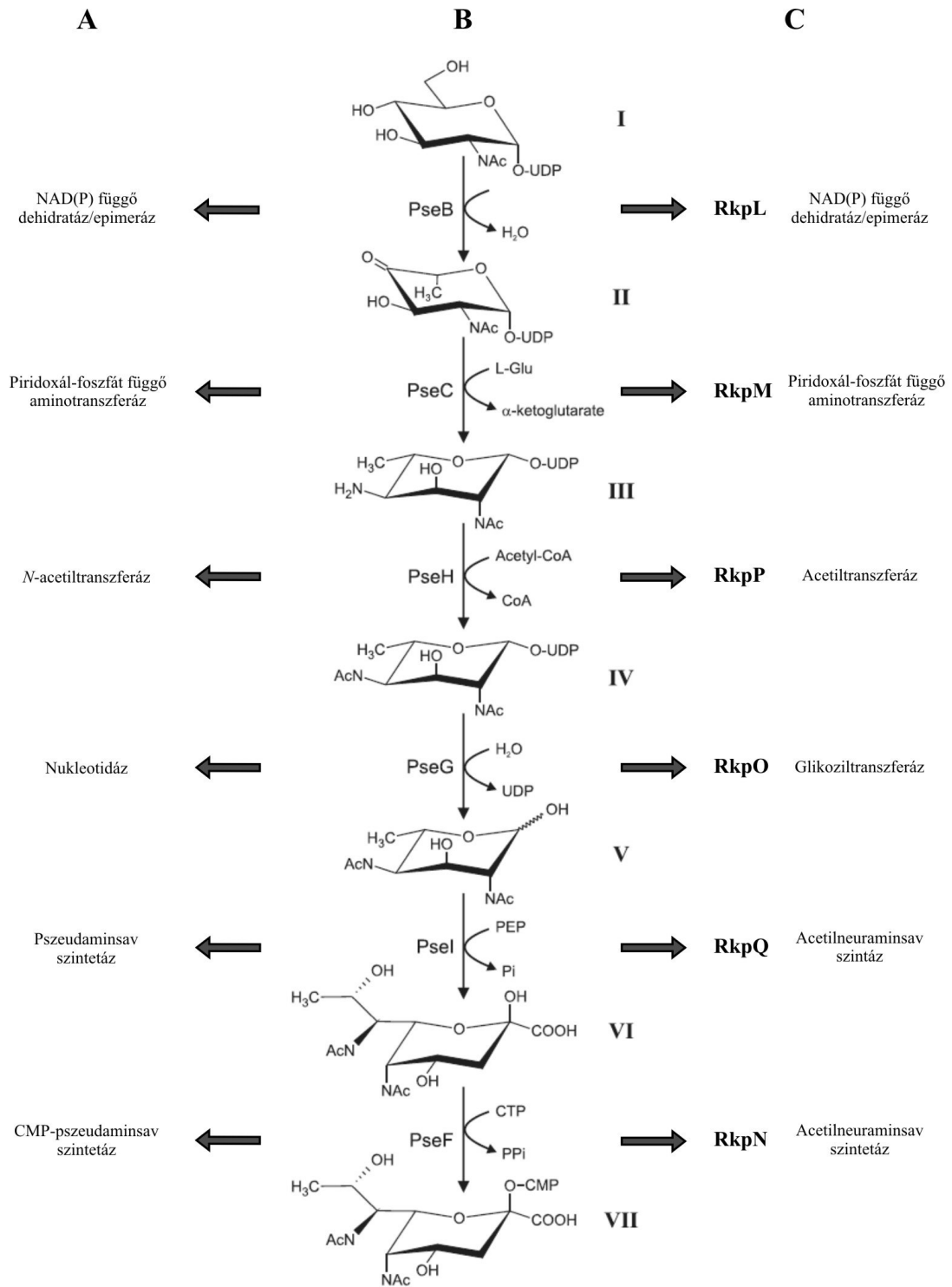
200 \* 220 \* 240 \* 260  
 AAM27839/1 : QDYNLRITITDMQKRHGLVIGLSDHTLDNTTATASVALGASIIIEKHFTLNRNGGGPDDSFSLPEAE : 258  
 AAM27859/1 : QDYNLRITITDMQKRHGLVIGLSDHTLDNTTATASVALGASIIIEKHFTLNRNGGGPDDSFSLPEAE : 258  
 CAB62155/1 : RDYNLRITIPDMIERFGLATGLSDHTLDNTTATASVALGSSLIIEKHFTLDRSGGGPDDSFSLPEQE : 260  
 ABD15239/1 : SDYNLRITIPDMIERFGLATGLSDHTLDNTTATASVALGSSLIIEKHFTLDRSGGGPDDSFSLPEQE : 235  
 EAZ98229/1 : EDYNLRITIPDMMERFGLVLTGLSDHTLDNTTATASVVLGASIIIEKHFTLDRKGGGPDDSFSLPEAE : 254  
 ABI57667/1 : EDYNLRITIPDMIDRFGLVLTGLSDHTLDNTTATASVALGASVIEKHFTLDRNGGGPDDSFSLPEAE : 259  
 CAP42650/1 : QDYNLRITIPDMIQRFGLVLTGLSDHTLDNTTAVTSVALGASLIEKHFTLDRSGGGPDDSFSLPEAD : 259  
 ABP81458/1 : EDYNLRITIPDMMQRFGLATGLSDHTLDNTTATASVVLGASIIIEKHFTLDRNGGGPDDSFSLPEAE : 258  
 AAM27877/1 : EDYNLLTIPDMIRRFNLVLTGLSDHTLDNTTATASVALGASIIIEKHFTLNRDGGGPDDSFSLPEAE : 258  
 EBA14551/1 : EDYNLRITIPDMGARFGTLTGLSDHTLISNATAIASVALGACVIEKHFTLDRQGGGPDDSFSLPEAD : 258  
 AAZ18519/1 : EQSNLLTIPDMRKKLGVQIGLSDHTISNTASVVATGLGATLIEKHFTLDRNDKGPDDSFSLPEAE : 257  
 dyNLRtIpDM r gl GLSDHTldNttai sv LGas IEKHFTl R ggGPdSfSLEP

\* 280 \* 300 \* 320  
 AAM27839/1 : LSALCRDSKTAWASLIGIVDYGKRSSEAGNVKFRRSLYAIRDIEAGEPLTAENIRSVRPGYGLSPK : 323  
 AAM27859/1 : LSALCRDSKTAWASLIGIVDYGKRSSEAGNVKFRRSLYAIRDIEAGEPLTAENIRSVRPGYGLSPK : 323  
 CAB62155/1 : FAALCRDAKTAWAALGNVDYGHKSSSETGNVVFVVKFLKAGDIVTPDAVRSVRPGFGLAPK : 325  
 ABD15239/1 : LAALCRDTSSTAWAALGKIDYGRKSSEAGNVKFRRSLYFVKALKAAGDVVTADAVRSVRPGFGLAPK : 300  
 EAZ98229/1 : LAALCRDSKTAWNALGKIDYGRKSSEQDNVVFVVKMNAAGDIVTADSVRSVRPGFGLAPK : 319  
 ABI57667/1 : LAALCRDSKTAWQALGKVDYGRKSSEQGNVVFVVKDLKAGDIVTADAVRSVRPGFGLVPEK : 324  
 CAP42650/1 : LAALCRDSRTAWQALGKVDYGRKSSEQGNVVFVVKPLQAGETITADAVRSVRPGFGLVPEK : 324  
 ABP81458/1 : LAALCRDSKTAWAALGRVDYGRKSSEQGNVVFVVKDLQAGERITPDAVRSVRPGYGLAPR : 323  
 AAM27877/1 : LAALCRDSKTAWAALGKIDYGRKSSEIGNVKFRRSLYFVKDMRKGQLITQDSIRSVRPGFGLVAPK : 323  
 EBA14551/1 : LVSLCRDSKEAWAAMGQVNYGRKSSEQGNVVFVVRDLKAGEVITADAVRSVRPGYGLKPK : 323  
 AAZ18519/1 : LLSLIEQTNDAWLSLGGAGYERKPAEEANIKFRRSVYFVKDLPAAGSLVTADSIIRIRPGLGLAPK : 322  
 l aLcRd tAW lG dYgrKssE gN FRRSlyfv aG T d RsvRPG Gl Pk

\* 340 \*  
 AAM27839/1 : HYTEVLGKTAAVKIPAHTPIHWEKLSDD~ : 351  
 AAM27859/1 : HYTEVLGKTAAVKIPAHTPIHWEKLSDD~ : 351  
 CAB62155/1 : FLDRVLGKILRKDVQINTPVTEDAIAVEL : 354  
 ABD15239/1 : YLDRVLGKKLHRDVEINTPVTKDSVEF~~ : 327  
 EAZ98229/1 : KLEWVLGQKLNKPVSAANTPVKEDSFA~~~ : 345  
 ABI57667/1 : HINDILGRKVVVDIRRTAVRKVDIS~~~ : 350  
 CAP42650/1 : QLDDVVGRKVGGRDIAANTPVRAQDLRD~~ : 351  
 ABP81458/1 : LLDQLMGKVLQRQDVKANMPVRLDFLQS~~ : 350  
 AAM27877/1 : YLESIVGRTVSDDVRSGLAVSWDLISAE~ : 351  
 EBA14551/1 : LADALIGKRVKSDVSWGQATSWDVIEADD : 352  
 AAZ18519/1 : HEQEIIIGKRLKTSVTRGTPTSWDLFDE~~ : 349  
 G t

### 10.4. melléklet: A pszeudaminsav szintézis modellje

Schoenhofen et al., 2006 és a homológia vizsgálatok alapján. A: a bioszintézis út enzimei. B: a bioszintézis útvonala az intermedierekkel. (I) UDP-GlcNAc; (II) UDP-2-acetamido-2,6-dideoxy-b-L-arabinohexos-4-ulose; (III) UDP-4-amino-4,6-dideoxy-b-L-AltNAc; (IV) UDP-2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxy-b-L-altropyranose; (V) 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxy-b-L-altropyranose; (VI) pseudaminsav; (VII) CMP-pseudaminsav. C: A homológ fehérjék és prediktált funkciójuk *S. meliloti* 41-ben.



## 11. Irodalmi hivatkozások

- Allen, O.N., and E.K. Allen. 1981. The Leguminosae: A source book of characteristics, uses, and nodulation The University of Wisconsin Press, Madison.
- Al-Sherif, E.M. 1998. Ecological studies on the flora of some aquatic systems in Beni-Suef district. M.Sc. thesis. Cairo University (Beni-Suef Branch), Beni-Suef, Egypt.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Becker, A., N. Fraysse, and L. Sharypova. 2005. Recent Advances in Studies on Structure and Symbiosis-Related Function of Rhizobial K-Antigens and Lipopolysaccharides. *MPMI* 18:899–905.
- Banfalvi, Z., V. Sakanyan, C. Koncz, A. Kiss, I. Dusha, and , and A. Kondorosi. 1981. Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 184:318-325.
- Barnet, Y. M., and B. Humphrey. 1975. Exopolysaccharide depolymerases induced by rhizobium bacteriophages. *Can. J. Microbiol.* 21:1647-1650.
- Barnett, M., R. Fisher, T. Jones, C. Komp, A. Abola, F. Barloy-Hubler, L. Bowser, D. Capela, F. Galibert, J. Gouzy, M. Gurjal, A. Hong, L. Huizar, R. Hyman, D. Kahn, M. Kahn, S. Kalman, D. Keating, C. Palm, M. Peck, R. Surzycki, D. Wells, K. Yeh, R. Davis, N. Federspiel, and S. Long. 2001. Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:9883-9888.
- Becking, T.H. 1992. The *Rhizobium* symbiosis of the nonlegume *Parasponia*. Chapman & Hall, New York.
- Becquart-de Kozak, I., B.L. Reuhs, D. Buffard, C. Breda, J.S. Kim, R. Esnault, and A. Kondorosi. 1997. Role of the K-antigen subgroup of capsular polysaccharides in the early recognition process between *Rhizobium meliloti* and alfalfa leaves. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:114-123.
- Berg D. E., A. Weiss, and L. Crossland. 1980. Polarity of Tn5 insertion mutations in *Escherichia coli*. *J. Bacteriology.* 142(2):439-446.
- Bernheimer, H. P., and J.-G. Tiraby. 1976. Inhibition of phage infection by *Pneumococcus* capsule. *Virology* 73:308–309.
- Bhagwat, A. A., A. Mithöfer, P.E. Pfeffer, C. Kraus, N. Spickers, A. Hotchkiss, J. Ebel, and D. L. Keister. 1999. *Plant Physiol.* Further studies of the role of cyclic beta-glucans in symbiosis. An NdvC mutant of *Bradyrhizobium japonicum* synthesizes cyclodecakis-(1->3)-beta-glucosyl. 119(3):1057-64.
- Breedveld, M.W., and K.J. Miller. 1994. Cyclic  $\beta$ -glucans of members of *Rhizobiaceae*. *Microbiol. Rev.* 58:145-161.
- Broughton, W.J., M.J. Dilworth, and I.K. Passmore. 1972. Base ratio determination using unpurified DNA. *Anal. Biochem.* 46:164-172.
- Brüssow, H., R. W. Hendrix. 2002. Phage genomics: small is beautiful. *Cell* 108:13–16.
- Brzoska, P.M., and E.R. Signer. 1991. *lpsZ*, a lipopolysaccharide gene involved in symbiosis of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 173:3235-3237.

- Bullock, W.O., J.M. Fernandez, and J.M. Short. 1987. X11-blue: A High Efficiency Plasmid Transforming RecA Es. *Biotechniques*. 5:376-379.
- Burris, R.H. 1994. Nitrogen fixation with nonlegumes: Biological nitrogen fixation—past and future. The American University in Cairo Press, Cairo, Egypt.
- Burns, R.C., and R.W.F. Hardy. 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer Verlag, New York.
- Campbell, G.R.O., B.L. Reuhs, and G.C. Walker. 2002. Chronic intracellular infection of alfalfa nodules by *Sinorhizobium meliloti* requires correct lipopolysaccharide core. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:3938-3943.
- Capela, D., F. Barloy-Hubler, J. Gouzy, G. Bothe, F. Ampe, J. Batut, P. Boistard, A. Becker, M. Boutry, E. Cadieu, S. Dreano, S. Gloux, T. Godrie, A. Goffeau, D. Kahn, E. Kiss, V. Lelaure, D. Masuy, T. Pohl, D. Portetelle, A. Puhler, B. Purnelle, U. Ramsperger, C. Renard, P. Thebault, M. Vandenbol, S. Weidner, and F. Galibert. 2001. Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:9877-9882.
- Caroff, M., D. Karibian, J. M. Cavaillon, and N. Haeffner-Cavaillon. 2002. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microb. Infect.* 4:915-926.
- Cava, J.R., P.M. Elias, D.A. Turowsky, and K.D. Noel. 1989. *Rhizobium leguminosarum* CFN42 genetic regions encoding lipopolysaccharide structures essential for complete nodule development on bean plants. *J. Bacteriol.* 171: 8-15.
- Charbit, A., and M. Hofnung. 1985. Isolation of different bacteriophages using the Lamb protein for adsorption on *Escherichia coli* K-12. *J. Virol.* 53:667-671.
- Cheng, H.P., and G.C. Walker. 1998. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* 180:5183-5191.
- Chataigné G., F. Couderc, and V. Poinso. 2008. Polysaccharides analysis of sinorhizobial capsids by on-line anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection and mass spectrometry coupling. *J Chromatogr A*. 1185:241-250.
- Claros, M.G., and G.v. Heijne. 1994. TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput. Applic. Biosci.* 10:685-686.
- Currier, W.M., and G.A. Strobel. 1974. Chemotaxis of a *Rhizobium spp* to a glucoprotein produced by birdsfoot trefoil roots. *Science*. 196: 434-436.
- Csiszovszki, Z., Z. Buzas, S. Semsey, T. Ponyi, P. Papp, and L. Orosz. 2003. *immX* immunity region of *Rhizobium* phage 16-3: Two overlapping cistrons of repressor function. *J Bacteriol.* 185:4382-4392.
- Dallman, G., L. Orosz, and B. Sain. 1979. Restriction mapping of DNA of temperate *Rhizobium meliloti* phage 16-3 : Comparision of genetic and physical maps indicates a long genetically silent chromosomal arm. *Mol. Gen. Genet.* 176:439-448.
- Dallmann, G., F. Marincs, P. Papp, M. Gaszner, and 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*. *Mol Gen Genet.* 227:106-112.
- Dallmann, G., P. Papp, and L. Orosz. 1987. Related repressor specificity of unrelated phages. *Nature*. 330:398-401.

- David, M., M.-L. Daveran, J. Batut, A. Dedien, O. Domergue, J. Ghai, C. Hertig, P. Boistard, and D. Kahn. 1988. Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell*. 54:671-683.
- Dénarié, J., F. Dabellé, and C. Rosenberg. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. *Annu Rev Microbiol*. 46:497-531.
- Desiere, F., W. M. McShan, D. van Sinderen, J. J. Ferretti, and H. Brüßow. 2001. Comparative genomics reveals close genetic relationships between phages from dairy bacteria and pathogenic streptococci: evolutionary implications for prophage-host interactions. *Virology* 288:325–341.
- Diaz, C.L., L.S. Melchers, P.J.J. Hooykaas, B.J.J. Lugtenberg, and J.W. Kijne. 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium* legume symbiosis. *Nature*. 338:579-581.
- Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin, and D.R. Helinski. 1980. Broad host- range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77: 7347-7351.
- Dixon, R.O.D., and C.T. Wheeler. 1986. Nitrogen fixation in plants. Blackie and Son, Glasgow (UK).
- Doolittle WF. 1999. Lateral genomics. *Trends Cell Bio*. 19(12):M5-8.
- Dorgai, L., F. Olsasz, M. Berenyi, G. Dallmann, A. Pay, and L. Orosz. 1981. Orientation of the genetic and physical map of *Rhizobium meliloti* temperate phage 16-3. *Mol. Gen. Genet*. 182:321-325.
- Dorgai, L., G. Polner, E. Jonas, N. Garamszegi, Z. Ascher, A. Pay, G. Dallmann, and L. Orosz. 1983. The detailed physical map of the temperate phage 16-3 of *Rhizobium meliloti* 41. *Mol Gen Genet*. 191:430-433.
- Downie, J.A, and J.P. Young. 2001. The ABC of symbiosis. *Nature* 412:597-598.
- Dudley, M.E., T.W. Jacobs, and S.R. Long. 1987. Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by *Rhizobium meliloti*. *Planta*. 171:289-301.
- Dylan, T., P. Nagpal, D. R. Helinski, and G. S. Ditta. 1990. Symbiotic pseudorevertants of *Rhizobium meliloti* *ndv* mutants. *J. Bacteriol*. 172:1409-1417.
- Epple, G., K.M.G.M. vanDerDrift, J.E. Thomas-Oates, and O. Geiger. 1998. Characterization of a novel acyl carrier protein, RkpF, encoded by an operon involved in capsular polysaccharide biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol*. 180:4950-4954.
- Ferguson, G.P., A. Datta, J. Baumgartner, R. M. Roop, R.W. Carlson, and G.C. Walker. 2004. Similarity to peroxisomal-membrane protein family reveals that *Sinorhizobium* and *Brucella* BacA affect lipid-A fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(14):5012-7.
- Finan, T., S. Weidner, K. Wong, J. Buhrmester, P. Chain, F. Vorholter, I. Hernandez-Lucas, A. Becker, A. Cowie, J. Gouzy, B. Golding, and A. Puhler. 2001. The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:9889-9894.
- Finan, T. M., B. Kunkel, G. F. deVos, and E. Signer. 1986. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J. Bacteriol*. 167:66-72.
- Finan, T.M., E. Hartweg, V. LeMieux, K. Bergman, G.C. Walker, and E. Signer. 1984. General transduction in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol*. 159:120-124.

- Fischer, H.-M. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev.* 58:352-386.
- Forsberg, L.S., and B.L. Reuhs. 1997. Structural characterization of the K antigens from *Rhizobium fredii* USDA257: evidence for a common structural motif, with strain-specific variation, in the capsular polysaccharides of *Rhizobium* spp. *J. Bacteriol.* 179:5366-5371.
- Frayse, N., B. Lindner, Z. Kaczynski, L. Sharypova, O. Holst, K. Niehaus, and V. Poinso. 2005. *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 produces a low-molecular-mass capsular polysaccharide that is a homopolymer of 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid harboring a phospholipid anchor. *Glycobiology.* 15:101-108.
- Frayse, N., F. Couderc, and V. Poinso. 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270:1365-1380.
- Freiberg, C., R. Fellay, A. Bairoch, W.J. Broughton, A. Rosenthal, and X. Perret. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature.* 387:394-401.
- Gage, D.J. 2004. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbio Molec Bio Review.* 68:280-300.
- Gage, D.J., and W. Margolin. 2000. Hanging by thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Current Opinion Microbio.* 3:613-617.
- Galibert, F., T. Finan, S. Long, A. Puhler, P. Abola, F. Ampe, F. Barloy-Hubler, M. Barnett, A. Becker, P. Boistard, G. Bothe, M. Boutry, L. Bowser, J. Buhrmester, E. Cadieu, D. Capela, P. Chain, A. Cowie, R. Davis, S. Dreano, N. Federspiel, R. Fisher, S. Gloux, T. Godrie, A. Goffeau, B. Golding, J. Gouzy, M. Gurjal, I. Hernandez-Lucas, A. Hong, L. Huizar, R. Hyman, T. Jones, D. Kahn, M. Kahn, S. Kalman, D. Keating, E. Kiss, C. Komp, V. Lelaure, D. Masuy, C. Palm, M. Peck, T. Pohl, D. Portetelle, B. Purnelle, U. Ramsperger, R. Surzycki, P. Thebault, M. Vandenbol, F. Vorholter, S. Weidner, D. Wells, K. Wong, K. Yeh, and J. Batut. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science.* 293:668-672.
- Ganyu A., Csiszovszki Z., Ponyi T., Kern A., Buzas Z., Orosz L., and P. P Papp. 2005. Identification of cohesive ends and genes encoding the terminase of phage 16-3. *J Bacteriol* 187:2526-2531.
- German, G. J., and R. Misra. 2001. The TolC protein of *Escherichia coli* serves as a cell-surface receptor for the newly characterized TLS bacteriophage. *J. Mol. Biol.* 308:579-585.
- Glazebrook, J., and G.C. Walker. 1989. A novel exopolysaccharide can function in place of the Calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell.* 56:661-672.
- González, J.E., C.E. Semino, L.X. Wang, L.E. Castellano-Torres, and G.C. Walker. 1998. Biosynthetic control of molecular weight in the polymerization of the octasaccharide subunits of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:13377-13482.
- Göttfert, M., S. Röthlisberger, C. Kündig, C. Beck, R. Marty, H. Hennecke. 2001. Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410 kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *J. Bacteriol.* 183: 1405-1412.
- Gray, J.X., H.J. Zhan, S.B. Levery, L. Battisti, B.G. Rolfe, and J.A. Leigh. 1991. Heterologous exopolysaccharide production in *Rhizobium* sp. strain NGR234 and consequences for nodule development. *J. Bacteriol.* 173:3066-77.

- Gross, R. J., T. Cheasty, and B. Rowe. 1977. Isolation of bacteriophages specific for the K1 polysaccharide antigen of *E. coli*. *J. Clin. Microbiol.* 6:548–550.
- Guerry P., C. P. Ewing, M. Schirm, M. Lorenzo, J. Kelly, D. Pattarini, G. Majam, P. Thibault, and S. Logan. 2006. Changes in flagellin glycosylation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence. *Mol Microbiol.* 60:299–311.
- Guerrero, G., H. Peralta, A. Aguilar, R. Díaz, M. A. Villalobos, A. Medrano-Soto, J. Mora. 2005. Evolutionary, structural and functional relationships revealed by comparative analysis of syntenic genes in Rhizobiales. *BMC Evol. Biol.* 5:55.
- Gupta, D. S., B. Jann, and K. Jann. 1983. Enzymatic degradation of the capsular K5-antigen of *E. coli* by coliphage K5. *FEMS Microbiol. Lett.* 16:13–17.
- Haapa, S., S. Suomalainen, S. Eerikäinen, M. Airaksinen, L. Paulin, and H. Savilahti. 1999. An efficient DNA sequencing strategy based on the bacteriophage Mu *in vitro* DNA transposition reaction. *Genome Res.* 9:308-315.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557–580.
- Hanfling, P., A. S. Shashkov, B. Jann, and K. Jann. 1996. Analysis of the Enzymatic Cleavage (b Elimination) of the Capsular K5 Polysaccharide of *Escherichia coli* by the K5-Specific Coliphage: a Reexamination.
- Hashemolhosseini, S., Z. Holmes, B. Mutschler, and U. Henning. 1994. Alterations of receptor specificities of coliphages of the T2 family. *J. Mol. Biol.* 240:105–110.
- Hashemolhosseini, S., D. Montag, L. Kramer, and U. Henning. 1994. Determinants of receptor specificity of coliphages of the T4 family. A chaperone alters the host range. *J. Mol. Biol.* 241:524–533.
- Higashi, S., and M. Abe. 1978. Phage-induced depolymerase for exopolysaccharides of Rhizobiaceae. *J. Gen. Appl. Microb.* 24:143-153.
- Hirsch, A.M. 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122:211-237.
- Incardona, N. L., J. K. Tuech, and G. Murti. 1985. Irreversible binding of phage phi X174 to cell-bound lipopolysaccharide receptors and release of virus-receptor complexes. *Biochemistry* 24:6439–6446.
- Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 96:23-28.
- Ish-Horovicz, D., and J.F. Burke. 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucl. Acids Res.* 9:2989-2998.
- Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, Y. Mochizuki, S. Nakayama, N. Nakazaki, S. Shimpo, M. Sugimoto, C. Takeuchi, M. Yamada, and S. Tabata. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7:331-338.
- Kannenbergh, E.L., and N.J. Brewin. 1994. Host-plant invasion by *Rhizobium* : the role of cell-surface components. *Trends Microbiol.* 2:277-283.
- Kereszt, A., E. Kiss, B. Reuhs, R.W. Carlson, A. Kondorosi, and P. Putnoky. 1998. Novel *rkp* gene clusters of *Sinorhizobium meliloti* involved in capsular polysaccharide production and the invasion of the symbiotic nodule: *rkpK* gene encodes for a UDP-glucose dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 180:5426-5431.



- Knirel, Y. A., and N. K. Kochetkov. 1994. The structure of lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. III. The structure of O-antigens: a review. *Biochemistry*. 59:1325–1383.
- Kiss, E., A. Kereszt, F. Barta, S. Stephens, B. Reuhs, L., A. Kondorosi, and P. Putnoky. 2001. The *rkp-3* gene region of *Sinorhizobium meliloti* Rm41 contains strain-specific genes that determine K antigen structure. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14:1395-1403.
- Kiss, E., and A. Kondorosi. 1997. Complete sequence of a *Rhizobium* plasmid carrying genes necessary for symbiotic association with the plant host. *BioEssays*. 19:843-846.
- Kiss, E., B. Reuhs, J. Kim, A. Kereszt, G. Petrovics, P. Putnoky, I. Dusha, R.W. Carlson, and A. Kondorosi. 1997. The *rkpGHI* and *-J* genes are involved in capsular polysaccharide production by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 179:2132-2140.
- Kiss, G.B., E. Vincze, Z. Kalman, T. Forrai, and A. Kondorosi. 1979. Genetic and biochemical analysis of mutants affected in nitrate reduction in *Rhizobium meliloti*. *J. Gen. Microbiol.* 113:105-118.
- Kovach, M.E., P.H. Elzer, D.S. Hill, G.T. Robertson, M.A. Farris, R.M. Roop, and K.M. Peterson. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*. 166:175-176.
- Larkin, M. A., G. Blackshield, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettting, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, D. G. Higgins. 2007. *Bioinformatics*. 23: 2947-8.
- Lagares, A., G. Caetano-Anolles, K. Niehaus, J. Lorenzen, H.D. Ljunggren, A. Puhler, and G. Favelukes. 1992. A *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation in alfalfa. *J Bacteriol.* 174:5941-5952.
- Lagares, A., D. Hozbor, K. Niehaus, A. Otero, J. Lorenzen, W. Arnold, and A. Puhler. 2001. Genetic characterization of a *Sinorhizobium meliloti* chromosomal region in lipopolysaccharide biosynthesis. *J Bacteriol.* 183:1248-1258.
- Lawrence, J. G., R. W. Hendrix, and S. Casjens. 2001. Where are the pseudogenes in bacterial genomes? *Trends Microbiol* 9:535–540.
- Lawson, K. A., Y. M. Barnet, and C. A. McGilchrist. 1987. Environmental Factors Influencing Numbers of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii and Its Bacteriophages in Two Field Soils. *App. Env. Microbiol.*
- Le Quere A. J.-L., D. W. Deakin, C. Schmeisser, R. W. Carlson, W. R. Streit, .W.J. Broughton, and L. S. Forsberg. 2006. Structural characterization of a K-antigen capsular polysaccharide essential for normal symbiotic infection in *Rhizobium* sp. NGR234. *J Biol Chem.* 281:28981–28992. 53:1125-1131.
- Lenski, R. E. 1984. Two-step resistance by *Escherichia coli* B to bacteriophage T2. *Genetics* 107:1–7.
- Leigh, J.A., and G.C. Walker. 1994. Exopolysaccharides of *Rhizobium*: Synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends Genet.* 10:63-67.
- LeVier, K., R. W. Phillips, V. K. Grippe, R. M. Roop, and G. C. Jr. & Walker. 2000. Similar requirements of a plant symbiont and a mammalian pathogen for prolonged intracellular survival. *Science.* 287:2492–2493.

- van der Ley, P., P. De Graaff, and J. Tommassen. 1986. Shielding of *Escherichia coli* outer membrane proteins as receptors for bacteriophages and colicins by O-antigenic chains of lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 168:449–451.
- Likhacheva, N. A., Samsonov, V. V., Samsonov, V. V. and Sineoky, S. P., 1996. Genetic control of the resistance to phage C1 of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 178: 5309-5315.
- Manoil, C., J.J. Mekalanos, and J. Beckwith. 1990 Alkaline phosphatase fusions: Sensors of subcellular location. *J. Bacteriol.* 172:515-518.
- Meade, H.M., S.K. Long, G.B. Ruvkun, S.E. Brown, and F.M. Ausubel. 1982 Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.* 149:114-122.
- Mellor, R., and D. Werner. 1987 Peribacteroid membrane biogenesis in mature legume root nodules. *Symbiosis.* 3:75-100.
- Mills, K.K., and W.D. Bauer. 1985. *Rhizobium* attachment to clover roots. *J Cell Sci Suppl.* 2:333-345.
- Müller, P., M. Hynes, D. Kapp, K. Niehaus, and A. Puhler. 1988. Two classes of *Rhizobium meliloti* infection mutants differ in exopolysaccharide production and in coinoculation properties with nodulation mutants. *Mol. Gen. Genet.* 211:17-26.
- Nicholas, K. B., H. B. Nicholas Jr., and D. W. II. Deerfield. 1997 GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW NEWS* 4:14
- Niehaus, K., R. Baier, B. Kohring, E. Flashl, and A. Puhler. 1997. Symbiotic suppression of the *Medicago sativa* plant defence system by *Rhizobium meliloti* oligosaccharides. In *Biological fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture*. A. Legocki, H. Bothe, and A. Puhler, editors. Springer Verlag, Heidelberg, Germany. 110-114.
- Nieweg, A., and E. Bremer. 1997. The nucleoside-specific Tsx channel from the outer membrane of *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*: functional characterization and DNA sequence analysis of the *tsx* genes. *Microbiology* 143:603–615.
- Nikaido, H. 1994. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 3905-3908.
- Noel, K.D. 1992. Rhizobial polysaccharides required in symbioses with legumes. In *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications* D.P.S. Verma, editor. Florida CRC Press; Boca Raton. 341-357.
- Ochman H, J.G. Lawrence, E.A. Groisman. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405(6784):299-304.
- Orosz, L., and T. Sik. 1970. Genetic mapping of rhizobiophage 16-3. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 17:185-194.
- Orosz, L., Z. Svab, A. Kondorosi, and T. Sik. 1973. Genetic studies on Rhizobio- phage 16-3. Genes and functions on the chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 125:341- 350.
- Pálvölgyi, A., Deák, V., Poinsoy, V., Nagy, T., Nagy, E., Kerepesi, I. and P. Putnoky. Genetic Analysis of the *rkp-3* Gene Region in *Sinorhizobium meliloti* 41: *rkpY* Directs Capsular Polysaccharide Synthesis to KR5 Antigen Production. *MPMI* (In Press).

- Papp, P., T. Nagy, Sz. Ferenczi, P. Elő, Zs. Csiszovszki, Zs. Buzás, A. Patthy, and L. Orosz. 2002. Binding sites of different geometries for the 16-3 phage repressor. *PNAS*. 99:8790-8795.
- Parada M., J. M. Vinardell, F. J. Ollero, A. Hidalgo, R. Gutierrez, A. M. Buendia-Claveria, W. Lei, I. Margaret, F. J. Lopez-Baena, A. M. Gil-Serrano, M. A. Rodriguez-Carvajal, J. Moreno, and J. E. Ruiz-Sainz. 2006. *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan*. *MPMI*. 19:43-52.
- Pavelka, M.S., Jr., L.F. Wright, and R.P. Silver. 1991. Identification of two genes, *kpsM* and *kpsT*, in region 3 of the polysialic acid gene cluster of *Escherichia coli* K1. *J. Bacteriol.* 173:4603-4610.
- Pazzani, C., C. Rosenow, G.J. Boulnois, D. Bronner, K. Jann, and I.S. Roberts. 1993. Molecular analysis of region 1 of the *Escherichia coli* K5 antigen gene cluster: a region encoding proteins involved in cell surface expression of capsular polysaccharide. *J. Bacteriol.* 175:5978-5983.
- Peoples, M.D, D.F. Herridge, J.K. Ladha. 1995. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant and Soil*. 174:3-28.
- Perret, X., C. Staehelin, and W. Broughton. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev*. 64:180-201.
- Petrovics, G., P. Putnoky, B. Reuhs, J. Kim, T.A. Thorp, K.D. Noel, R.W. Carlson, and A. Kondorosi. 1993. The presence of a novel type of surface polysaccharide in *Rhizobium meliloti* requires a new fatty acid synthase-like gene cluster involved in symbiotic nodule development. *Mol. Microbiol.* 8:1083-1094.
- Price, N.P.J., B. Jeyaretnam, R.W. Carlson, J.L. Kadrmas, C.R.H. Raetz, and K.A. Brozek. 1995. Lipid A biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum*: Role of a 2-keto-3-deoxyoctulosonate-activated 4' phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:7352-7356.
- Putnoky P., Deák V., Békási K., Pálvölgyi A., Maász A., Palágyi Z., Hoffmann G., and Kerepesi I. 2004. H protein of bacteriophage 16-3 and RkpM protein of *Sinorhizobium meliloti* 41 are involved in phage adsorption. *J Bacteriol.* 186:1591-1597.
- Putnoky, P., G. Petrovics, A. Kereszt, E. Grosskopf, D.T.C. Ha, Z. Banfalvi, and A. Kondorosi. 1990. *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. *J. Bacteriol.* 172:5450-5458.
- Putnoky, P., E. Grosskopf, D.T.C. Ha, G.B. Kiss, and A. Kondorosi. 1988. *Rhizobium fix* genes mediate at least two communication steps in symbiotic nodule development. *J. Cell Biol.* 106:597-607.
- Raymond, C.K., E.H. Sims, A. Kas, D.H. Spencer, T.V. Kuttyavin, R.G. Ivey, Y. Zhou, R. Kaul, J.B. Clendenning, and M.V. Olson. 2002. Genetic variation at the O-antigen biosynthetic locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 184:3614-3622.
- Redmond, J.W., M. Batley, M.A. Djordjevic, R.W. Innes, P.L. Kuempell, and B.G. Rolfe. 1986. Flavons induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature*. 323:632-635.
- Reinhold, B.B., S.Y. Chan, T.L. Reuber, A. Marra, G.C. Walker, and V.N. Reinhold. 1994. Detailed structural characterization of succinoglycan, the major exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* Rm1021. *J. Bacteriol.* 176:1997-2002.

- Reuber, T.L., and G.C. Walker. 1993. The acetyl substituent of succinoglycan is not necessary for alfalfa nodule invasion by *Rhizobium meliloti* Rm1021. *J. Bacteriol.* 175:3653-3655.
- Reuhs, B.L., B. Relic, L. S. Forsberg, C. Marie, T. Ojanen-Reuhs, S. B. Stephens, C. H. Wong, S. Jabbouri, W.J. Broughton. 2005. *J. Bacteriol.* 187(18): 6479–6487.
- Reuhs, B.L., D.P. Geller, J.S. Kim, J.E. Fox, and S.G. Pueppke. 1998. *Sinorhizobium fredii*, and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4930-4938.
- Reuhs, B.L. 1997. Acidic capsular polysaccharides (K antigens) of *Rhizobium*. In *Biology of Plant-Microbe Interactions*. G. Stacey, B. Mullin, and P.M. Gresshoff, editors. International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul. 331-336.
- Reuhs, B.L., J.S. Kim, and A.G. Matthyse. 1997. Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot cells and *Arabidopsis* wound sites is correlated with the presence of a cell-associated, acidic polysaccharide. *J. Bacteriol.* 179:5372-5379.
- Reuhs, B.L., M.N. Williams, J.S. Kim, R.W. Carlson, and F. Cote. 1995. Suppression of the Fix- phenotype of *Rhizobium meliloti* *exoB* mutants by *lpsZ* is correlated to a modified expression of the K polysaccharide. *J. Bacteriol.* 177:4289-4296.
- Reuhs, B.L., R.W. Carlson, and J.S. Kim. 1993. *Rhizobium fredii* and *Rhizobium meliloti* produce 3-deoxy-D-manno-2- octulosonic acid-containing polysaccharides that are structurally analogous to group II K antigens (capsular polysaccharides) found in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:3570-3580.
- Roberts, I.S. 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 50:285-315.
- Robertson, J.G., and P. Lyttleton. 1982. Coated and smooth vesicles in the biogenesis of cell walls, plasma membranes, infection threads and peribacteroid membrane in root hairs and nodules of white clover. *J Cell Sci.* 58:63-78.
- Rosenow, C., F. Esumch, I.S. Roberts, and K. Jann. 1995. Characterization and Localization of the KpsE Protein of *Escherichia coli* K5, Which Is Involved in Polysaccharide Export. *J Bacteriol.* 177:1137-1143.
- Sandulache, R., P. Prehm, and D. Kamp. 1984. Cell wall receptor for bacteriophage Mu G(+). *J. Bacteriol.* 160:299–303.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* - 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schneider, H., H. Fsihi, B. Kottwitz, B. Mygind, and E. Bremer. 1993. Identification of a segment of the *Escherichia coli* Tsx protein that functions as a bacteriophage receptor area. *J. Bacteriol.* 175:2809–2817.
- Schirm M., E. C. Soo, A. J. Aubry, J. Austin, P. Thibault, and S. M. Logan. 2003. Structural, genetic and functional characterization of the flagellin glycosylation process in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.* 48:1579-1592.
- Schoenhofen I. C., D. J. McNally, J.-R. Brisson, and S. M. Logan. 2006. Elucidation of the CMP-pseudaminic acid pathway in *Helicobacter pylori*: synthesis from UDP-N-acetylglucosamine by a single enzymatic reaction. *Glycobiol.* 16:8C-14C.
- Schultze, M., E. Kondorosi, P. Ratet, M. Buire, and A. Kondorosi. 1994. Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions. *Int. Rev. of Cytol.* 156:1-75.

- Sharypova L. A., G. Chataigné, N. Fraysse, A. Becker, and V. Poinso. 2006. Overproduction and increased molecular weight account for the symbiotic activity of the *rkpZ*-modified K polysaccharide from *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *Glycobiol.* 16:1181–1193.
- Silver, R.P., K. Prior, C. Nsahlai, and L.F. Wright. 2001. ABC transporters and the export of capsular polysaccharides from gram-negative bacteria. *Res Microbiol.* 152:357-364.
- Silverman, J. A., and S. A. Benson. 1987. Bacteriophage K20 requires both the OmpF porin and lipopolysaccharide for receptor function. *J. Bacteriol.* 169:4830–4833.
- Sprent, J. I., and P. Sprent. 1990. Nitrogen fixing organisms. Pure and applied aspects. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
- Steenbergen, S. M., and E. R. Vimr. 2008. Biosynthesis of the Escherichia coli K1 group 2 polysialic acid capsule occurs within a protected cytoplasmic compartment. *Molecular Microbiology.* 68:1252–1267.
- Steven, A. C., B. L. Trus, J. V. Maizel, M. Unser, D. A. Parry, J. S. Wall, J. F. Hainfeld, and F. W. Studier. 1988. Molecular substructure of a viral receptor-recognition protein. The gp17 tail-fiber of bacteriophage T7. *J. Mol. Biol.* 200:351–365
- Szende, K., and F. Ordogh. 1960. Die Lysogenie von *Rhizobium meliloti*. *Naturwissenschaften.* 47:404-412.
- Semsey, Sz., I. Papp, Zs. Buzas, A. Patthy, L. Orosz, and P. P. Papp. 1999. Identification of Site-Specific Recombination Genes *int* and *xis* of the *Rhizobium* Temperate Phage 16-3. *J. Bacteriol.* 181: 4185–4192.
- Szmelcman, S., and M. Hofnung. 1975. Maltose transport in *Escherichia coli* K-12: involvement of the bacteriophage lambda receptor. *J. Bacteriol.* 124:112–118
- Tamames J. 2001: Evolution of gene order conservation in prokaryotes. *Genome Biol.* 2(6):R0020.
- Thatte V., Bradley D. E., and V. N. Iyer 1985. N conjugative transfer system of plasmid pCU1. *J Bacteriol.* 163:1229-1236.
- Walker, G.C. 1992. Role of exopolysaccharides in nodulation. In Nodulation and Nitrogen Fixation in Rice. G.S. Khush and J. E-Bennett, editors. Int Rice Research Inst, Manila. 55-60.
- Wang, J., M. Hofnung, and A. Charbit. 2000. The C-terminal portion of the tail fiber protein of bacteriophage lambda is responsible for binding to LamB, its receptor at the surface of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 182:508-512.
- Wang, J., V. Michel, M. Hofnung, and A. Charbit. 1998. Cloning of the *J* gene of bacteriophage lambda, expression and solubilization of the J protein: first in vitro studies on the interactions between J and LamB, its cell surface receptor. *Res Microbiol.* 149:611-624.
- Werts, C., V. Michel, M. Hofnung, and A. Charbit. 1994. Adsorption of bacteriophage lambda on the LamB protein of *Escherichia coli* K-12: point mutations in gene *J* of lambda responsible for extended host range. *J. Bacteriol.* 176:941-947.
- Whitfield, C. 2006. Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* 75:39–68.
- Whitfield, C., and I.S. Roberts. 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 31:1307-1319.
- Wilkinson, B. J., and K. M. Holmes. 1979. *Staphylococcus aureus* cell surface: capsule as a barrier to bacteriophage adsorption. *Infect. Immun.* 23:549–552.

- Yu, F., and S. Mizushima. 1982. Roles of lipopolysaccharide and outer membrane protein OmpC of *Escherichia coli* K-12 in the receptor function for bacteriophage T4. *J. Bacteriol.* 151:718–722.
- Zahran, H.H. 1999. *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiol and Mol. Biol. Rev.* 63:968-989.

## 12. Publikációk

### A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények:

Putnoky, P., Deák, V., Békási, K., Pálvölgyi, A., Maász, A., Palágyi, Z., Hoffmann, G., Kerepesi, I. (2004): H protein of bacteriophage 16-3 and RkpM protein of *Sinorhizobium meliloti* 41 are involved in phage adsorption. *J. Bacteriol.* 186:1591-1597. (IF:4.146)

Pálvölgyi, A., Deák, V., Poinso, V., Nagy, T., Nagy, E., Kerepesi, I. and P. Putnoky. (2009) Genetic Analysis of the *rkp-3* Gene Region in *Sinorhizobium meliloti* 41: *rkpY* Directs Capsular Polysaccharide Synthesis to KR5 Antigen Production. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22: 1422-1430. (IF: 4,275).

Összesített impakt faktor: 8.421

### 13. Köszönetnyilvánítás

Munkámat mind szakdolgozóként, mind doktoranduszként a PTE Természettudományi Kar, Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszékén végeztem. Hálás vagyok a tanszék összes dolgozójának, hogy megfelelő háttérrel biztosítottak terveim megvalósításához, eredményeim eléréseihez.

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Putnoky Péternek munkám irányításáért, önzetlen segítségéért és rengeteg tanácsáért.

Köszönöm Deák Veronikának, - akivel szakdolgozóként közös témánk kísérleteit együtt végeztem, majd később is dolgoztunk együtt - kitartását, hasznos ötleteit és építő kritikáit. Továbbá köszönöm, hogy a *I6-3* bakteriofágon végzett munkájával hozzájárult a baktérium-fág felismerés tanulmányozásához.

Köszönöm Hoffmann Gyulának, hogy rendelkezésünkre bocsájtotta az izolált baktérium mutánsokat. Hálás vagyok Nagy Tibornak a bioinformatikai elemzésekben adott hasznos segítségéért valamint, hogy részt vett az *rkpY* régió bázissorrendjének meghatározásában és elemzésében. Ezen kívül tanszékünk minden szakdolgozójának köszönöm, akik hasznos eredményekkel és munkával járultak hozzá a témához, Békási Krisztinának, Maász Anitának és Szabó Csillának. Szeretnék köszönetet mondani tanszékünk asszisztenseinek is, Miklósvári Zoltánnának, Keidl Juditnak, és Garai Krisztinának segítő munkájukért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, hogy támogattak és lehetővé tették, hogy ezt a pályát választhattam és biológussá lehettem.