

Ph.D disszertáció tézisei

**Egy új toxin-antitoxinszerű modul nem
tipikus transzkripciós szabályozása és
funkciója *Bradyrhizobium japonicum*-ban**

Miclea Sebastian Paul

**Témavezető: Dr. Dusha Ilona
Genetikai Intézet
Szegedi Biológiai Központ
Magyar Tudományos Akadémia**

Szegedi Tudományegyetem

2010

Bevezetés

Az utóbbi években ismertté vált nagyszámú prokarióta genomszekvencia elősegítette számos új típusú genetikai modul azonosítását bakteriális plazmidokon és kromoszómákon. Ezek az ún. toxin-antitoxin (TA) modulok.

Az első TA modulokat plazmidokon azonosították mint ún. „post-segregational killing” rendszereket, melyek megakadályozzák a plazmid nélküli utódsejtek proliferációját. Később ezeknek a plazmidon lokalizált TA moduloknak számos homológját mutatták ki különböző baktériumok kromoszómáján is, és e rendszerek az érdeklődés előterébe kerültek. Az eredmények arra utaltak, hogy a TA rendszerek a globális translációs szintnek a különböző stressz körülmények között bekövetkező modulálásában szerepelnek.

A TA modulok tipikusan olyan operonokba szerveződnek, melyekben az első gén az antitoxin fehérjét, a második gén pedig a toxin fehérjét kódolja. A fehérjék komplexet alkotnak, eképpen akadályozva meg a toxin káros hatását. Mind az antitoxin, mind a komplex képes az operon saját promóteréhez kötődni és represszálni a modul

transzkripcióját. Specifikus körülmények hatására az instabil antitoxin a proteázok hatására gyorsabban lebomlik, mint a stabil toxin. Az így szabaddá váló toxin a sejtben lévő targeteken fejt ki hatását.

A TA lókuszokat a kódolt fehérjék domén szerkezete és a modulok szerveződése alapján hét családba sorolták. A legnépesebb család a Gram pozitív-, Gram negatív- és archebaktériumokban is előforduló *vapBC* család, melynek tagjai egy PIN domént tartalmazó toxinból és egy DNS kötő motívumot tartalmazó antitoxinból állnak.

Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy a *Rhizobium* fajokban először azonosított TA rendszer, a *Sinorhizobium meliloti*-ban található *vapBC*-típusú *ntrPR* operon részt vesz a baktérium metabolizmusának szimbiótikus körülmények közötti átállításában. A szimbiótikus baktériumok TA rendszerei fontos szabályozói lehetnek az olyan metabolikus folyamatoknak, melyek biztosítják a baktérium túlélését stresszkörülmények között, illetve a szabadon élő állapotból a szimbiótikus életformává való átalakulás során.

Célkitűzés

Célunk volt, hogy azonosítsunk, valamint szerkezetileg és funkcionálisan jellemezzünk egy *vapBC*-

típusú TA modul a szimbiótikus nitrogénkötő *Bradyrhizobium japonicum* baktériumban, mely a szója (*Glycine max*) mikroszimbiontája.

Eredmények

A hasonló szerveződés, valamint a *vapBC*-típusú TA családdal való szekvencia homológia és hasonló méret alapján egy TA modul azonosítottunk *Bradyrhizobium japonicum*ban, melyet *bat/bto* operonnak neveztünk el. A *bat/bto* lókuszt két gén alkotja: a 285 bp méretű *bat*, mely a Phd/YefM domént tartalmazó feltételezett antitoxint kódolja, és a 426 bp méretű *bto*, mely a PIN doménnel homológ feltételezett toxint kódolja. A *bto* transzlációs start kodonja átfed a *bat* transzlációs stop kodonjának utolsó nukleotidjával, jelezve a szoros transzlációs kapcsoltságot.

További szekvencia analízis azt bizonyította, hogy a *bat/bto* operon két, evolúciósan független modulból épülhet fel, melyeket egy tranzíciós régió kapcsol össze. Úgy tűnik, a *bat/bto* operon egy olyan rekombináció eredménye, mely a SpoVT/AbrB doménnel homológ *vapBC* és a *phd/doc* típusú TA rendszerek között jött létre, és egy Phd illetve SpoVT típusú antitoxin, valamint egy PIN domén típusú toxin keverékét eredményezte.

A negatív autoreguláció a legtöbb TA rendszer jellemző tulajdonsága. A *bat/bto* modul expressziós szintje azonban, melyet egy *bat/bto* promóter-*lacZ* fúzió segítségével határoztunk meg, magasabb volt a vad típusú sejtekben, mint a mutáns törzsben, jelezve, hogy a toxin-antitoxin komplexnek pozitív szerepe lehet a folyamatban. A *B. japonicum bat/bto* operonjának feltételezett promóter régiója átfed aszomszédos *glpD* gén promóter régiójával. Ebben a gének közötti régióban két feltételezett *glpD* represszor kötőhelyet azonosítottunk, melyek közül az egyik részben átfedi a toxin-antitoxin komplex lehetséges kötőhelyét, egy direkt ismétlődő szekvenciát. Feltételeztük, hogy a *bat/bto* rendszer szabályozását befolyásolhatja a toxin-antitoxin komplex és a *glpD* represszor versengése az átfedő kötőhelyekért. Kimutattuk, hogy valóban, a *bat/bto* modul kifejeződését pozitívan befolyásolja a *glpD* represszor kötődésének gátlása.

A Bto toxin kifejeződése nem volt káros hatással az *Escherichia coli* sejtekre, azonban akár a Bat antitoxin, akár a teljes modul ektopikus kifejeződése a sejtek életképességének jelentős csökkenésével járt. Ez arra utalt, hogy a Bto protein elvesztette a TA modulokra jellemző tipikus funkcióját.

A *bat/bto* operon deléciója különböző metabolikus utak megváltozását okozta a mutáns baktériumban. A mutáns

generációs ideje jelentősen csökkent komplex szén és nitrogénforrást tartalmazó táptalajokban történő növesztéskor, de minimál táptalajban a mutáns sejtek egyáltalán nem szaporodtak. Különböző képalkotó technikákkal (AFM, LSM) kimutattuk a mutáns sejtek megváltozott (rövidebb és szélesebb) alakját. Atomerő mikroszkóppal végzett mérések lágyabb sejtfelszín jeleztek a mutánsban, melyek a mutáns sejtmembrán jelentős változására utaltak.

A mutáns sejtek a vad típusú sejtekhez képest négyszer kevesebb lipopoliszacharidot termeltek, főleg inkomplett molekulák formájában. A zsírsav és a foszfolipid komponensek meghatározásával figyelemreméltó különbségeket tapasztaltunk a vad típusú és a mutáns törzsek membrán összetételében, melyek magyarázatot adhatnak a mutáns baktériumoknál tapasztalt fenotípus változásokra. A vad típusú sejtekben az összes zsírsav 80%-a cisz-vakszénsav sav, ezzel ellentétben, a mutáns membránokban számos más zsírsav is jelen volt. A foszfolipid tartalom analízise kimutatta, hogy a foszfatidilkolin hiányzik, míg a kardiolipin és a foszfatidiletanolamin megnövekedett mennyiségben van jelen a mutáns membránokban. A kardiolipin domének nagyobb mennyisége nagyban hozzájárulhat az osztódási ráta megnövekedéséhez. Az osztódási rátának és a sejt alakjának

megváltozását ugyancsak kiválthatta az átalakult sejtfal megnyúlás és membrán összetétel.

A kromoszómán lokalizált TA rendszerek funkciójáról általánosan elfogadott nézet, hogy a baktérium metabolizmusának stressz menedzsereiként működhetnek, mivel tápanyaghiány vagy különböző stressz körülmények esetén a transláció általános szintjének modulálásában játszanak szerepet. Úgy tűnik azonban, hogy ezzel szemben a *B. japonicum* *bat/bto* rendszere a sejt normális fiziológiai állapotjának fenntartásában lehet jelentős azáltal, hogy a metabolikus ráták modulálásával biztosíthatja a hosszabb túlélést, és a környezeti feltételekhez való jobb alkalmazkodást.

Publikációs lista:

Bodogai M., Ferenczi Sz., Bashtovyy D., **Miclea P.**, Papp P., Dusha I. 2006. The *ntrPR* operon of *Sinorhizobium meliloti* is organized and functions as a toxin-antitoxin module. Mol. Plant-Microbe Interact. 19(7): 811-822. **IF: 3.936**

Miclea S. P., and Dusha I. 2007. Toxin-antitoxin modules affect the stress response and metabolism in Rhizobia, Acta Biologica Szegediensis. 51 (2): 137-160.

Bodogai M., Ferenczi Sz., **Miclea S.P.**, Papp P., Dusha I. 2008. Toxin-antitoxin modules and symbiosis. ED: Dakora FD, Chiphango SBM, Valentine AJ, Elmerich C, Newton WE. Sustainable agriculture. SPRINGER, 2008. pp. 237-238.

Miclea S. P., Dusha I. Mutant *Bradyrhizobium* bacteria for the improvement of nitrogen fixation at various leguminous plants, especially at soybean. Submitted and registered to Hungarian Patent Office (Magyar Szabadalmi Hivatal) on 15.04.2008 under the number P0700337.

Miclea, S. P., Péter, M., Végh, G., Cinege, G., Kiss, E., Váró, G., Horváth, I., and Dusha, I. 2010. Atypical transcriptional regulation and role of a new toxin-antitoxin-like module and its effect on the lipid composition of

Bradyrhizobium japonicum. Mol. Plant-Microbe Interact.
23:638-50. **IF: 4.136**

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr.Dusha Ilona, Paul S. Miclea (jelölt) Ph.D munkájának témavezetőjeként igazolom, hogy a jelölt tézisei az általa végzett tudományos kutatómunka eredményeit híven tükrözik.

Igazolom, hogy a jelöltnek döntő szerepe volt elsőszerzős publikációjának létrehozásában, amely a tézis alapjául szolgált. Ezentúl jelentős mértékben hozzájárult több tudományos közlemény és egy szabadalmi beadvány megszületéséhez is.

Szeged, 2010. szept. 5.

.....
Dr. Dusha Ilona
Tud. tanácsadó
MTA SZBK Gnetikai Intézet

Poszterek

Bodogai M., **Miclea S. P.**, Becker A., Puskas L., Dusha I.: Az ntrR gen transzkripcios szintet moduláló hatása *Sinorhizobium meliloti*-ban, The 6th Hungarian Cell and Development Biology Congress, Eger, Hungary, 2005.

Bodogai M., Ferenczi Sz., **Miclea S.P.**, Papp P., Dusha I.: A toxin-antitoxin module in *Sinorhizobium meliloti*, 7th European Nitrogen Fixation Conference. Aarhus, Denmark, 2006.

Bodogai M., Ferenczi Sz., **Miclea S.P.**, Papp P., Dusha I.: Toxin-antitoxin modules and symbiosis, 15th International Conference on Nitrogen Fixation, Capetown, South Africa, January 2007.

Miclea S.P., Horvath I., Dusha I.: Toxin-antitoxin like module in *Bradyrhizobium japonicum*. 8th European Nitrogen Fixation Conference, Ghent, Belgium, September 2008.

Előadások

Paul S. Miclea, Dusha Ilona,: Toxin-antitoxin like module in the soybean microsymbiont, 6th Hungarian Genetics Miniconference, Szeged, Hungary, September, 2007.

Miclea, S. P., Péter, M., Végh, G., Cinege, G., Kiss, E., Váró, G., Horváth, I., and Dusha, I.: “Newcomer” gets a leading role in *Bradyrhizobium japonicum*. Straub-days, Szeged, Hungary, 2010.