

**A *STREPTOMYCES GRISEUS* 45H ÁLTAL TERMELT EXTRACELLULÁRIS,
PLEIOTRÓP AUTOREGULÁTOR FEHÉRJE – A C FAKTOR – SZEREPÉNEK
VIZSGÁLATA A STREPTOMYCESEK DIFFERENCIÁLÓDÁSÁBAN ÉS ANTIBIOTIKUM
TERMELÉSÉBEN**

BIRÓ SÁNDOR



DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
HUMÁNGENETIKAI TANSZÉK
DEBRECEN, 2009

TARTALOMJEGYZÉK

I.	Bevezetés	3
II.	Célkitűzések	7
III.	Az eredmények összefoglalása	9
III.1.	Tiszta formában izoláltuk a C faktor fehérjét	9
III.2.	Megállapítottuk, hogy a C faktor rendkívül alacsony koncentrációban kifejti jellegzetes citomorfológiai hatását	9
III.3.	A C faktor az elsőként leírt, streptomycesekben sejtdifferenciálódást kiváltó autoregulátor fehérje	10
III.4.	Klónoztuk és azonosítottuk a C faktor fehérjét kódoló gént	10
III.5.	A gén egy 324 aminosavból álló fehérjét kódol	11
III.6.	Szekvencia adatok megerősítése tömegspektrometriával	11
III.7.	A klónozott C faktor gén biológiai hatásának vizsgálata	12
III.8.	A C faktor gén kifejeztetése nagy kópiaszámú plazmidről	12
III.9.	A C faktor gén kifejeztetése <i>E. coliban</i>	13
III.10.	A C faktor gén egyetlen promoterről, életsiklus függően kerül transzkripcióra	13
III.11.	A C faktor helyreállítja a <i>S. griseus</i> NRRL B-2682 törzs kopasz mutánsainak spóráképzését	15
III.12.	A C faktor gén delécioja kopasz (<i>bld</i>) fenotípust eredményez	16
III.13.	A C faktor indukálja az A-faktor regulont <i>S. griseus</i> NRLL B-2682 törzsben	16
III.14.	A helyreállított expressziójú gének AdpA regulonba tartozásának további bizonyítéka	18
III.15.	A C faktor helyreállítja a <i>S. griseus</i> B-2682 AFN törzs A-faktor termelését	19
III.16.	A <i>S. griseus</i> B-2682 AFN törzs vad típusú <i>afsA</i> gént tartalmaz, melynek transzkripciója fokozott	20
III.17.	A C faktor fokozza a <i>S. griseus</i> streptomycin termelését	22
III.18.	Az A-faktor hiányos mutánsban a tápanyag felvételben és stressz válaszban résztvevő fehérjék túltermelődnék	22
III.19.	A megnövekedett fehérjeszint transzkripciós szabályozás eredménye	24
III.20.	A C faktor feltételezett hatása az A-faktor bioszintézisre	25
III.21.	A <i>facC</i> előfordulása és terjedése	26
III.22.	A C faktor termelő törzs taxonómiai besorolása	26
III.23.	A C faktor mint patogenitási faktor?	27
IV.	Gyakorlati hasznosíthatóság	28
V.	Epilógus	29
VI.	Irodalomjegyzék	31
VII.	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	34

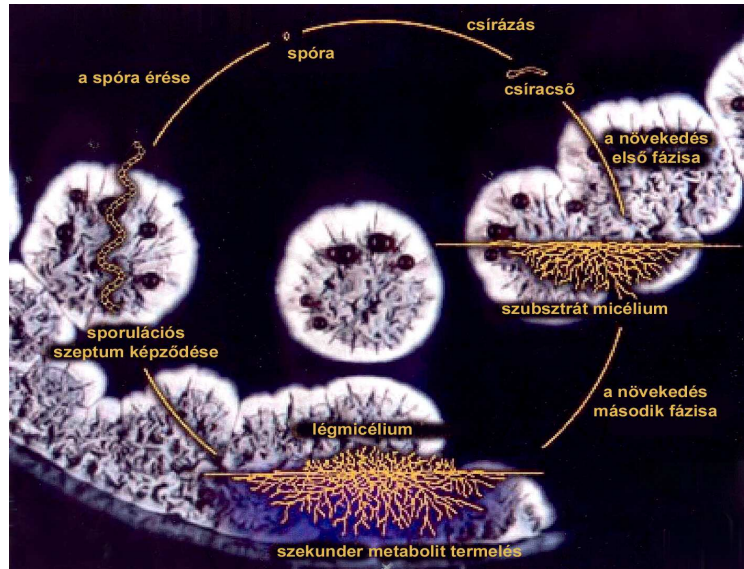
I. BEVEZETÉS

A streptomycesek Gram pozitív, aerob, fonalas növekedésű, elsősorban talajban élő baktériumok, melyek sokféle extracelluláris mechanizmussal rendelkeznek a növekedésüket biztosító tápanyagellátásuk, más élőlényekkel (mikroorganizmusok, növények) való kölcsönhatásuk, és komplex, spórából kiinduló és sporulációval végződő életsiklusuk biztosítására.

A streptomycesek tanulmányozása elméleti szempontból azért fontos, mert életsiklusuk során komplex morfológiai változásokon mennek keresztül. Ez a folyamat viszonylag egyszerű (mert a streptomycesek prokarióták), könnyen tanulmányozható, de már soksejtűnek számító differenciálódási modell (Chater, 1998; Chater, 2006). Morfológiai differenciálódásukkal párhuzamosan lejátszódó fiziológiai/biokémiai differenciálódásuk során pedig nagyszámú, a gyógyászatban és iparban alkalmazott vegyületet (antibiotikum, pigment, enzim, enzim inhibitor, rovarellenes szer, immuno-modulátor, tumor ellenes vegyület stb.) termelnek (Strohl, 1997; Bérdy, 2005). Mivel az egyes *Streptomyces* törzsek között lényeges különbségek vannak, s ezen eltérő törzsek különböző, gyógyászati és gazdasági szempontból fontos vegyületeket termelnek, a legrészletesebben tanulmányozott *Streptomyces coelicolor* mellett további *Streptomyces* törzsek differenciálódásának, valamint a differenciálódás és szekunder metabolizmus összefüggésének vizsgálata is indokolt. Ezt támasztja alá az is, hogy ma már több mint tizenöt különböző *Streptomyces* törzs genomi szekvenálását végezték el.

A streptomycesek spórából kiinduló növekedésük során, szilárd táptalajon, kezdetben több genomot tartalmazó (cönocyticus), elágazó hifahálózatot hoznak létre, melyben szeptum csak ritkán fordul elő. Ez a hifahálózat átszövi a táptalajt, ezért szubsztrátmicéliumnak nevezik. A tápanyag fogytával a szubsztrátmicéliumra merőlegesen, a levegő irányába légmicéliumot fejlesztenek, amely parazita módon a programozott sejthalál során széteső

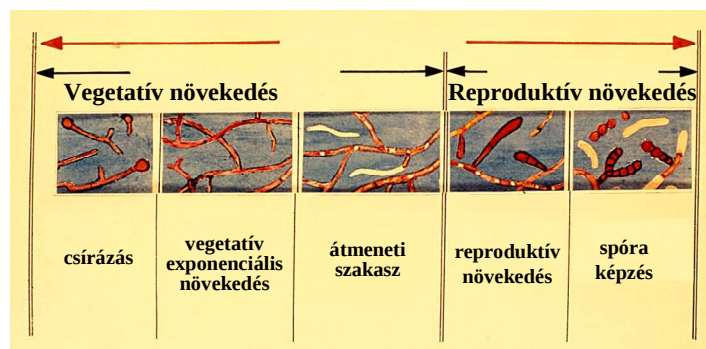
szubsztrátmicéliumból táplálkozik (Manteca és mtsai, 2007). A telep felszínét befedő légmicélium később intenzív szeptumképzéssel egyetlen genomot tartalmazó kompartmentumokká (prespóra) alakul, melyekből pigmentált, érett spórák jönnek létre (1. ábra).



1. ábra. A streptomycesek életciklusa szilárd táptalajon (Thompson CJ nyomán.)

A spóráképzésre nem képes mutánsoknak két fő csoportját különböztetjük meg. Az egyik a légmicélium képzésére nem képes kopasz (*bald*) mutánsok csoportja. Az elnevezés a mutánsok viasz-szerű, fényes felületű megjelenésére utal. A másik csoportba tartozó mutánsok a légmicéliumból érett spórát nem képesek létrehozni. Ezeket *white* mutánsoknak hívjuk, mivel bennük elmarad a spóra érése során jellemző sporulációs pigmentek termelése, s a telepek fehérek maradnak.

A streptomycesek növekedése folyékony tenyészetben is hasonló. Kezdetben szerteágazó, cönocyticus hifafonalakat hoznak létre. Ezt a kvázi-exponenciális vegetatív növekedést egyes fonalak lízise mellett reproduktív típusú (sporogén) hifafonalak megjelenése követi, melyeken az életciklus befejeződéseként bizonyos törzseknél spóráképzés figyelhető meg (2. ábra).



2. ábra. A streptomycesek növekedése folyékony tenyészetben (Vitális S. nyomán).

A bakteriális differenciálódást bonyolult, szövevényes reguláció vezérli, melyben a környezeti szignálok érzékelése és az azokra adott válaszok mellett a sejtek közötti kommunikációnak is igen fontos szerepe van.

A differenciálódás szabályozásában és a sejtek közötti kommunikációban a többsejtűnek tekinthető streptomycesek esetében változatos szerkezetű autoregulátorok vesznek részt (Willey és Nodwell, 2008). Ilyen autoregulátor az intézetünkben leírt C faktor (Szabó és mtsai, 1962; Szabó és mtsai, 1964; további hivatkozások a disszertációban), és a Khokhlov professzor vezette szovjet-orosz munkacsoport által felfedezett A-faktor (Khokhlov és mtsai, 1967). Az A-faktor hatásmódjának részletes tanulmányozása a Beppu és Horinouchi professzorok által vezetett japán munkacsoport nevéhez fűződik (Horinouchi és Beppu 1992a; Horinouchi és Beppu 1992b; Horinouchi és Beppu 1994; Horinouchi és Beppu, 1995; további hivatkozások a disszertációban).

Disszertációmban a C faktor tisztítására és hatásmódjának felderítésére irányuló kísérleteinket foglalom össze, mely kísérletek egyúttal a két legrészletesebben tanulmányozott autoregulátor, a C faktor és A-faktor kölcsönhatására is adatokat szolgáltatnak. Ezek megerősítik azt a korábbi hipotézisünket, hogy a spóráképzés, mint a törzsek fennmaradásának eszköze, egy olyan folyamat, melyért semmilyen ár nem drága, s amelynek létrejötte

nyilvánvalóan nemcsak egyetlen úton, hanem egymással legalábbis részben összefüggő, alternatív útvonalakon játszódhat le. Ezek az útvonalak a különböző *Streptomyces* törzsekben eltérhetnek, egyes elemei az evolúció során elveszhetnek stb. Véleményem szerint ilyen alternatív spóráképzési programok autoregulátorai a C faktor és az A-faktor. Adataink ezen alternatív útvonalak létezésének és kölcsönhatásuknak az első bizonyítékai.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám célja az Intézetünkben korábban felfedezett és a *S. griseus* differenciálódásának szabályozásában szerepet játszó autoregulátor C faktor azonosítása, tiszta formában történő előállítása, s a differenciálódásban betöltött szerepének molekuláris szintű analízise, melyhez az alábbi feladatok elvégzését tűztem ki célul:

1. A C faktor kémiai mibenlétének tisztázása, tiszta formában való előállítása és jellemzése.
2. A C faktor fehérje voltának megállapítása után a fehérje génjének klónozása, és analízise.
3. A klónozott gén, illetve géntermék differenciálódásra kifejtett hatásának vizsgálata különböző *Streptomyces* törzsekben.
4. A fehérje génjének deléciónja és a $\Delta facC$ mutáns vizsgálata.
5. A gén transzkripciójának tanulmányozása.
6. A C faktor fehérje kifejeztetése a klónozott génről *S. griseus*ban, *S. lividans*ban és *E. coliban*, nagy mennyiségű, könnyen tisztítható C faktor előállítása céljából.
7. A heterológ gazdában kifejeztetett C faktor fehérje biológiai hatásának vizsgálata.
8. A C faktorra homológ fehérjék azonosítása streptomycesekben és egyéb mikroorganizmusokban, szekvencia adatbázisok felhasználásával, s ez alapján a gén mikroorganizmusok közötti terjedésére hipotézis felállítása.
9. Arra alapozva, hogy a C faktor génje néhány humán patogén *Aspergillus* fajban is megtalálható, aszpergillózis korai diagnosztizálására alkalmas kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció alapú eljárás kifejlesztése.
10. Az A-faktor és C faktor által indukált regulációs útvonalak, illetve azok esetleges kölcsönhatásainak vizsgálata.

11. A C faktor szekunder metabolizmus szabályozásában betöltött szerepének tanulmányozása.
12. Mivel a C faktor (és az A-faktor is) extracelluláris autoregulátorai a differenciálódásnak és szekunder metabolizmusnak, továbbá streptomycesekben az extracelluláris eseményeknek rendkívül fontos a szerepe, célul tűztük ki a C faktor extracelluláris proteomra kifejtett hatásának vizsgálatát.
13. Tekintettel arra, hogy a C faktor termelő *Streptomyces* törzs eredete kezdetől fogva kétséges volt, a törzs taxonómiai besorolásának megerősítése, vagy helyes taxonómiai besorolása 16S rDNA szekvencia alapján.

III. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

III.1. TISZTA FORMÁBAN ISOLÁLTUK A C FAKTOR FEHÉRJÉT

Több lépéses eljárás során (ioncsere kromatográfia, DNS-agaróz affinitás kromatográfia) tiszta formában izoláltuk a C faktor fehérjét a *S. griseus* 45H törzs fermentlevéből. A tisztítás során lényeges volt a proteáz gátlók (EDTA, N-etil-maleinimid, fenil-metil-szulfonil-flourid) alkalmazása, mivel a streptomycesek nagyszámú és nagy mennyiségű proteázt szekretálnak, amelyek az ugyancsak a tápfolyadékba kiválasztott C faktor fehérjét lebontják. Lényeges volt továbbá a DNS-affinitás kromatográfia során a glicerol alkalmazása a pufferben, amely feltehetőleg a fehérje megfelelő konformációjának kialakulását segíti elő. SDS-PAGE-val, illetve izoelektromos fókuszálással megállapítottuk, hogy a C faktor egy 34500 Dalton molekulatömegű, bázikus fehérje. Ezek az adatok nagyon jól egybeesnek a később, a fehérje génjének ismeretében számítható molekulatömeg és izoelektromos pont értékekkel.

III.2. MEGÁLLAPÍTOTTUK, HOGY A C FAKTOR RENDKÍVÜL ALACSONY KONCENTRÁCIÓBAN KIFEJTI JELLEGZETES CITOMORFOLÓGIAI HATÁSÁT

Amennyiben 1 egység C faktort úgy definiálunk, hogy az a fehérje mennyiség milliliterenként, amely a biológiai tesztrendszerünkben a jellegzetes citomorfológiai hatást kifejti, akkor 1 egység 8 nanogramm fehérjének felelt meg. Ha feltételezzük, hogy a preparátumban lévő fehérje egy része inaktív, ez az érték még ennél is kisebb lehetett. Ez egyúttal azt is jelenti, hogy a tesztrendszerünkben a leoltáskor mintegy 1000 C faktor molekula van jelen *S. griseus* 52-1 spóránként. Mivel a C faktor jellegzetes citomorfológiai hatását 20-24 óráig fejti ki, a növekedésnek ebben a stádiumában mintegy 10 molekula C faktor esik genom-ekvivalensenként. Ezek az adatok a C faktor molekula és a C faktor biológiai hatás rendkívüli hatékonyságára és specifikusságára utalnak.

III.3. A C FAKTOR AZ ELSŐKÉNT LEÍRT, STREPTOMYCESEKBEN SEJTDIFFERENCIÁLÓDÁST KIVÁLTÓ AUTOREGULÁTOR FEHÉRJE

Az első közlemény, melyben streptomycesek által termelt, sporulációt serkentő, extracelluláris, diffúzibilis anyagot írtak le, 1957-ben jelent meg (Dondero és Scotti, 1957). Ezt követően a *Streptomyces griseus* által termelt autoreglátor faktort (A-faktor) Khokhlov és munkatársai tíz évvel később, 1967-ben fedezték fel (Khokhlov és mtsai, 1967), nagyszámú mutáns szisztematikus vizsgálatával egy olyan törzsben, amely nagyon kevés streptomycint termelt. Az anyagot más, streptomycint nem termelő mutánsokhoz adva azok antibiotikum termelését nagymértékben fokozta. Később az A-faktort nagyszámú *S. griseus* törzsben, sőt egyéb *Streptomyces* fajokban is megtalálták (Anisova és mtsai, 1984).

A Dondero és Scotti által leírt jelenséget kiváltó anyagot kémiaiilag nem azonosították, az A-faktor pedig egy kis molekulatömegű, lipid oldékony butirolakton. Bár a C faktor fehérje leírása 1962-ben megtörtént (Szabó és mtsai, 1962) fehérje voltának megbízható bizonyítéka a tisztítása volt, ami egyúttal az első fehérje természetű autoregulátor leírása is (Biró és mtsai, 1980).

III.4. KLÓNOZTUK ÉS AZONOSÍTOTTUK A C FAKTOR FEHÉRJÉT KÓDOLÓ GÉNT

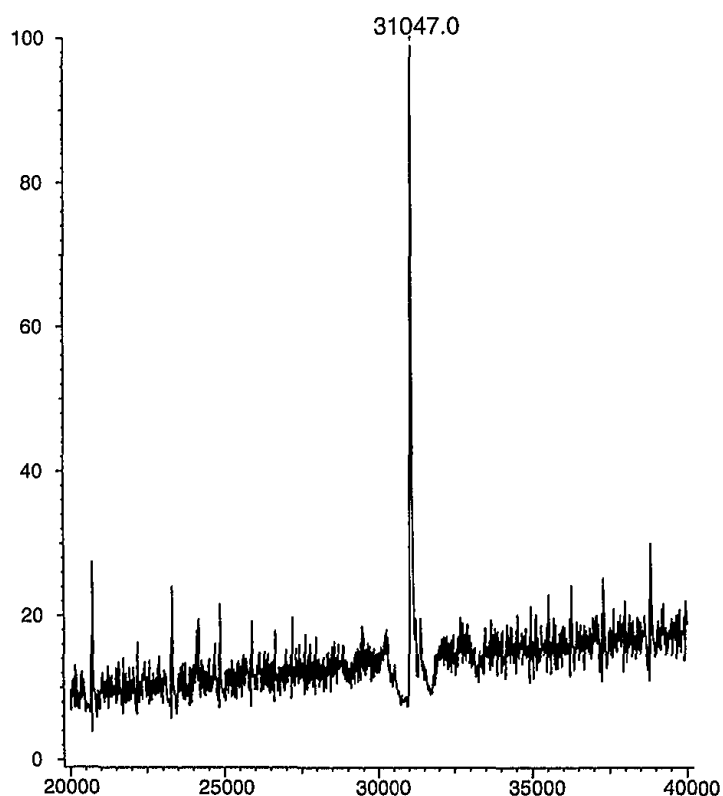
Egy „mini-génbank” screenelésével, próbaként az érett C faktor fehérje ismert N-terminális végét kódoló 76 bp degenerált oligonukletidot használva klónoztuk és analizáltuk a C faktort kódoló gént. A gén 975 bp hosszúságú, s startkodonja nem a baktériumokban általános ATG, hanem a streptomycesekben gyakran startkodonként használt GTG. A gén GC tartalma 70,7 mol%, s a tripletek harmadik pozíciójában 96,9% gyakorisággal G vagy C van. Ezen utóbbi adatok jellegzetesek a *Streptomyces* génekre.

III.5. A GÉN EGY 324 AMINOSAVBÓL ÁLLÓ FEHÉRJÉT KÓDOL

A klónozott gén DNS szekvenciája alapján megállapítottuk, hogy a C faktor fehérje 324 aminosavból áll, s molekulatömege 34523 Da. A kódolt fehérje N-terminális végén egy 38 aminosavat tartalmazó tipikus szekréciós szignál szekvencia található, amely szekréció közben levágódik, s nem része az érett, biológiailag aktív fehérjének. Szekvencia analízis alapján valószínűsítettük, hogy a fehérje a Tat (twin arginine translocation) útvonalon kerül exportra. Az érett C faktor fehérje 286 aminosavból áll, s molekulatömege 31038 Da. A fehérje számított izoelektromos pontja 9,59, ami jó egyezés a korábban tisztított fehérje kísérletesen meghatározott izoelektromos pontjával.

III.6. SEKVENCIA ADATOK MEGERŐSÍTÉSE TÖMEGSPEKTROMETRIÁVAL

A gén szekvenálását, s a szekvencia alapján megállapított aminosav sorrendet a C faktor fehérje, illetve a fehérje triptikus fragmentjeinek electrospray-tömegspektrometriás analízisével erősítettük meg. Az érett fehérje mért tömege 31047 Da, ami jól megegyezik a szekvencia alapján számított 31038 Daltonnal (3. ábra). Ugyancsak tökéletes az egyezés a 11 triptikus fragment esetében megállapított aminosav sorrend és a gén szekvencia alapján várható aminosav sorrend között (Szabó és mtsai, 1999).



3. ábra. A C faktor fehérje molekulatömegének ES-MS meghatározása.

III.7. A KLÓNOZOTT C FAKTOR GÉN BIOLÓGIAI HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

A klónozott C faktor gént kis kópiaszámú, pSGF4 plazmidon — melyen a gén saját promoteréről fejeződik ki — bejuttatva a *S. griseus* 52-1 tesztörzsbe, ugyanolyan citomorfológiai hatást vált ki, mint az exogén hozzáadott C faktor fehérje.

III.8. A C FAKTOR GÉN KIFEJEZTETÉSE NAGY KÓPIASZÁMÚ PLAZMIDRÓL

A fehérje könnyebb tisztíthatósága érdekében megpróbáltuk a fehérjét a nagy kópiaszámú pIJ702 plazmid *MelC1* promoter kontrollja alá klónozott *facC* génről kifejeztetni *S. griseus* és *S. lividans* törzsekben, de ez nem sikerült. Ennek okát abban látjuk, hogy a C faktor fehérje streptomycesekben nagy koncentrációban letális. Ez egybevág azzal a biológiai értékmérés során szerzett

korábbi tapasztalatunkkal, hogy nagyobb exogén C faktor koncentráció részleges, vagy teljes növekedésgátlást okoz.

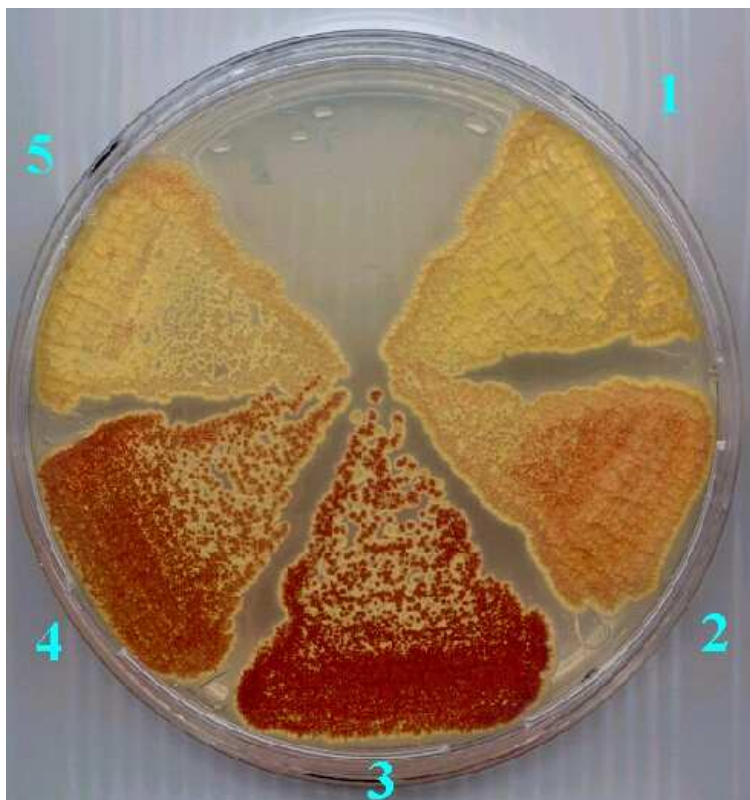
III.9. A C FAKTOR GÉN KIFEJEZTETÉSE *E. COLIBAN*

Sikeresen kifejeztettük a C-terminálisan hexa-hisztidin farkat tartalmazó C faktor génjét a filogenetikailag távoli *E. coliban*. Az így Ni-affinitás kromatográfiával izolált rekombináns fehérje mind a hisztidin farok, mind a C faktor ellenes antitesttel reagál, s biológiailag ugyanolyan aktív, mint a *S. griseus* 45H törzs tápfolyadékából izolált fehérje.

III.10. A C FAKTOR GÉN EGYETLEN PROMOTERRŐL, ÉLETCIKLUS FÜGGŐEN KERÜL TRANSZKRIPCIÓRA

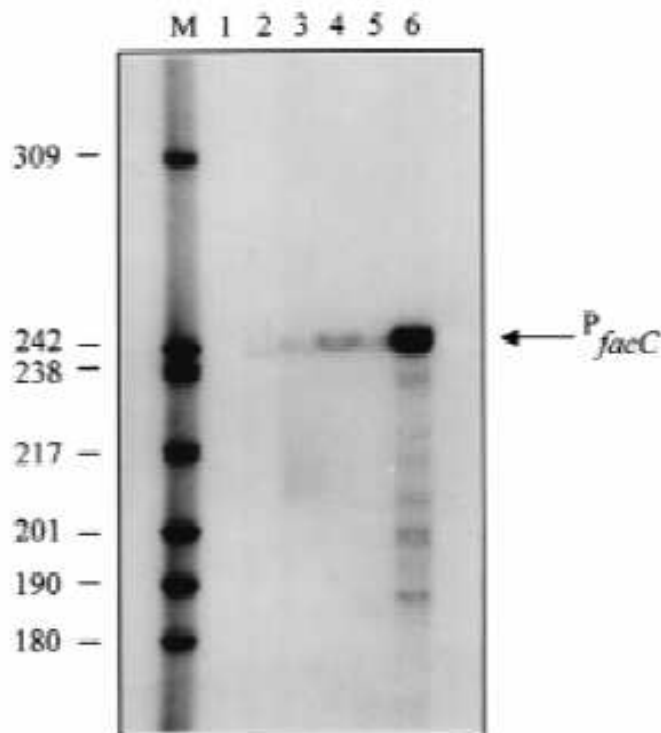
Amikor a C faktor gén 5'-végét és a kódoló részt megelőző, mindösszesen 547 bp-nyi szekvenciát, mely feltételezésünk szerint a promotert kódolja, a pIJ2587 promoter próba vektorba klónoztuk, s a plazmidot *S. coelicolor* M512 törzsbe transzformáltuk, az a légmicélium megjelenése után piros pigment termelését eredményezte. Az inszertet nem tartalmazó kontroll tenyészet fehér maradt (4. ábra).

Ez arra utal, hogy a klónozott DNS fragmentum tartalmazta a *facC* promotert, s annak kifejeződése a légmicélium megjelenése után következik be. Ez megfelel korábbi feltevésünknek, miszerint a C faktor a differenciálódás fontos regulátora, s expressziója életciklus függő.



4. ábra. A *facC* promoter régió *in vivo* tesztelése *S. coelicolor* M152 törzsben. 1. pIJ2587 kontroll plazmid; 2. expresszió a *facC* promoterről; 3. és 4. expresszió *ramC* vegetatív promoterről; 5. expresszió a promoter nélküli *facC* génről.

A C faktor gén S1 nukleáz térképezésével megállapítottuk, hogy a gén egyetlen promoterről, a differenciálódási program reprodukzív szakaszában kerül transzkripcióra (5. ábra). A -10 és -35 régiók szekvencia analízise alapján valószínűsítettük, hogy promoterét nem az általános (a gének többségének felismerésében résztvevő σ^{hrdB}) szigma faktor ismeri fel.



5. ábra. A *facC* transzkripció starthelyének meghatározása „shift-down” kísérletben S1 nukleáz térképezéssel. M. 32 P-végjelölt *Hpa*II emésztett pBR322 molekulaméret marker, mellette a fragmentumok bázispárban kifejezett méretével; az 1-6 oszlopok a 0, 30, 60, 120, 240 és 420 perces mintavételi időpontokból nyert mRNS mintákkal kapott szignálok.

III.11. A C FAKTOR HELYREÁLLÍTJA A *S. GRISEUS* NRRL B-2682 TÖRZS KOPASZ MUTÁNSAINAK SPÓRAKÉPZÉSÉT

A saját promoterről kifejeztetett, klónozott C faktor gén helyreállítja a differenciálódásában blokkolt, kopasz *S. griseus* NRRL B-2682 törzs A-faktor termelő (B-2682 AFP) és A-faktort nem termelő (B-2682 AFN) mutánsainak spóraképzését. Ez különösen érdekes felismerés, mivel a mutánsok, és szülői törzsük sem tartalmazzak C faktor gént. Ez egyúttal azt is jelenti, hogy ezek a *S. griseus* törzsek tartalmazzak C faktorról kölcsönhatásba lépő, ez idáig azonosítatlan regulációs elemeket.

III.12. A C FAKTOR GÉN DELÉCIÓJA KOPASZ (*BLD*) FENOTÍPUST EREDMÉNYEZ

A C faktor fehérjének a streptomycesek differenciálódásában betöltött szerepét a génnek a termelő *S. griseus* 45H törzsben való inaktiválásával is bizonyítani kívántuk. Terveink szerint génmegszakítás módszerével (inszerációs inaktiválás) C faktort nem termelő „null” mutánst kívántunk előállítani. A tervezett génmegszakítás helyett azonban a *facC* gén deléciója következett be. Az így előállított $\Delta facC$ mutáns kopasz fenotípusú, s amelynek normál sporulációja a *facC* génnel helyreállítható. Ez a C faktornak a morfológiai differenciálódásban betöltött szerepét egyértelműen alátámasztja.

III.13. A C FAKTOR INDUKÁLJA AZ A-FAKTOR REGULONT *S. GRISEUS* NRLL B-2682 TÖRZSBEN

A *S. griseus* B-2682, B-2682 AFN mutánsa és a B-2682 AFN/pSGF4 transzformánsa proteom analízisével azt vizsgáltuk, melyek azok a fehérjék, amelyeknek szintézise a kopasz mutánsban szignifikánsan eltér a vad típusú törzsben észlelt szinttől, s amelyek kifejeződése a transzformánsban visszaáll a vad típus szintjére. Szignifikánsnak az eltérést akkor tekintettük, ha a fehérje szintek közötti különbség legalább kétszeres volt. A fehérjéket, melyek a fenti kritériumnak megfeleltek, a gélből kivágtuk, és triptikus emésztés után MALDI-TOF-MS analízissel azonosítottuk. Az 1. táblázatban adom meg azokat a fehérjéket, melyek expressziója a B-2682 AFN mutánsban csökkent, s a mutáns *facC* transzformánsában visszaállt a vad típus szintjére.

1. táblázat. Az A-faktort nem termelő *S. griseus* B-2682 AFN mutánsban csökkent expressziót mutató fehérjék

Elnevezés	Fehérje jelölése	Adatbázis azonosító	Egyezés ^a	Lefedettség ^b	MW ^c	PSD vagy CID ^d megerősítés
Tripszin-szerű szerin proteáz	SprU	BAD24662	11/24	28%	26 kDa	igen
Karboxi-peptidáz	Cpase SG	CAA46635	27/34	41%	49 kDa	igen
Amino-peptidáz	SGAP	BAD67179	15/28	37%	36 kDa	igen
Proteáz A	SGPA	CAA01746	6/21	46%	18 kDa	igen
Metallo-endo-peptidáz	SgmA	BAC21011	9/17	13%	70 kDa	igen
NAD(P) függő oxidoreduktáz	StrU	CAH94303	13/14	31%	45 kDa	igen
Foszfát kötő fehérje	PstS	CAB65418	18/47	38%	39 kDa	igen
Szuperoxid dizmutáz	SodF	AAD30139	19/36	37%	23 kDa	igen
Szuperoxid dizmutáz	SodF	AAD30139	13/35	34%	23 kDa	igen

a Az azonos és észlelt triptikus fragmentek száma

b Szekvencia lefedettség

c Számított molekulatömeg. A poszttranszlációs modifikáció miatt lényegesen eltérhet az észlelt tömegtől.

d PSD vagy CID megerősítés történt-e.

Az eredmények azt mutatták, hogy a mutánsban nem, vagy nagyon lecsökkent expressziójú extracelluláris hidrolázok termelése, amelyek a fejlődő légmicéliumot (sporogén hifát) látják el tápanyaggal az apoptotikus folyamat során elpusztuló sejtek anyagainak hidrolízisével, C faktor hatására helyreáll. Meglepetésünkre, az azonosított enzimek egy része (SprU, SGPA, SgmA és StrU) *S. griseus*-ban az A-faktor regulon által szabályozott.

III.14. A HELYREÁLLÍTOTT EXPRESSZIÓJÚ GÉNEK ADPA REGULONBA TARTOZÁSÁNAK TOVÁBBI BIZONYÍTÉKA

Az azonosított fehérjék további jellemzése céljából az összes fehérjét kódoló gént *in silico* vizsgáltuk a Target Explorer programmal (Sosinsky és mtsai, 2003) annak megállapítására, hogy tartalmazznak-e a promoter régiójukban potenciális AdpA fehérje kötő helyet, ami az AdpA regulonhoz való tartozásukra utalna. Mivel ilyen szekvenciát mindegyik gén esetén sikerült azonosítani (2. táblázat), elmondhatjuk, hogy valószínűleg az összes azonosított fehérje bioszintézise AdpA által szabályzott.

A helyreállított expressziójú gének további közös jellemzője, hogy kofaktoruk van (ami többségükben cink) és a Tat (twin arginine translocation) útvonalon kerülnek szekrécióna.

2. táblázat. Cisz elhelyezkedésű AdpA fehérje-kötő szekvenciák a B-2682 AFN mutánsban csökkent expressziót mutató fehérjék génjei előtti régióban

NCBI azonosító	Gén	A fehérje neve	cisz szekvencia	Pozíció ^b	Score	Megerősítés ^c
AB182576	<i>sprU</i>	Tripszin-szerű szerin proteáz	TGGCCGAAAA	- 300	6.84	Kato és mtsai, 2005
X65719	<i>scpD</i>	Karboxipeptidáz	TGGCCGGAAC	-98	8.23	<i>in silico</i> adat
AB125217	<i>sgaP</i>	Aminopeptidáz	CGGCCGGATC	- 72	7.51	<i>in silico</i> adat
			TGTCCGGTTT	- 171	7.23	
A24972	<i>sprA</i>	Proteáz A	AGGCCGGATT	- 149	6.59	Tomono és mtsai, 2005
			TTGCTACCTT	- 382	0.62	
AB085745	<i>sgmA</i>	Metallo- endopeptidáz	TGGCCGGTTT	-100	8.89	Kato és mtsai, 2002
			TGGCCAGATT	-300	8.56	
AJ862840	<i>strU^a</i>	NAD(P)-függő oxidoreduktáz	CGGCTGATTC	-332	5.36	Vujaklija és mtsai, 1991
			TGGCGCGATC	-319	7.20	
			TGACCGAAAA	-115	4.81	
			TGGCCGTTGC	-89	2.79	
AJ243674	<i>pstS</i>	Foszfát-kötő fehérje	CGTCCGAAAT	- 107	4.59	<i>in silico</i> adat
			CGGCGGCTTC	-130	4.48	
AF141866	<i>sodF</i>	Szuperoxid dizmutáz	TGGCCCGTAA	- 89	5.79	<i>in silico</i> adat
			CGGCCCGAAC	- 344	5.39	

- a Az AdpA kötőhely az *strR* gén előtt van, amely az *strU* gén transzkripció aktivátora.
- b A translációs starthelytől legtávolabbi nukleotid pozíció.
- c A megerősítés vagy kísérletes bizonyítékot, vagy *in silico* adattal való alátámasztást jelent.

III.15. A C FAKTOR HELYREÁLLÍTJA A *S. GRISEUS* B-2682 AFN TÖRZS A-FAKTOR TERMELÉSÉT

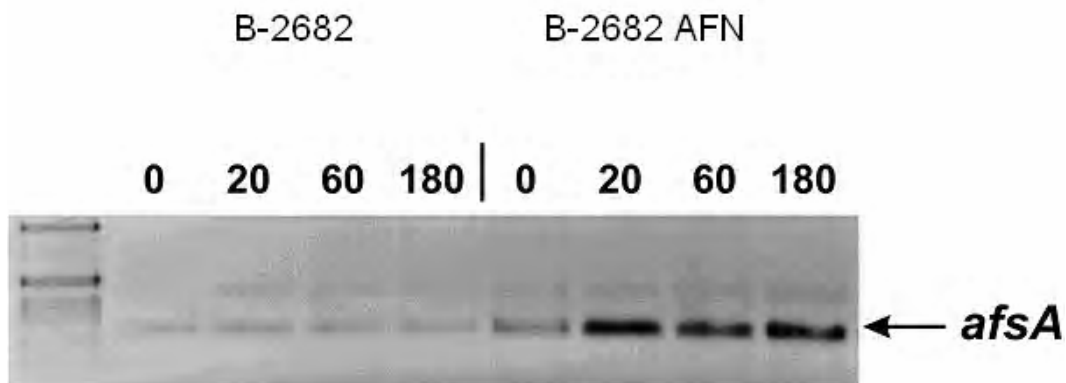
Azok a kísérleti eredmények, melyek szerint a *S. griseus* B-2682 AFN mutáns normál spóráképzése a *facC* hatására helyreállt, s a transzformáns extracelluláris proteomja a vad típusúhoz volt hasonló, beleértve az AdpA által szabályzott hidrolitikus enzimek megjelenését, azt sugallták, hogy valamilyen módon a *facC* helyreállította a *S. griseus* B-2682 AFN törzs A-faktor termelését. Ez különösen érdekes, mert a *S. griseus* B-2682 törzs és AFN mutánsa nem tartalmaz C faktor gént.

Az A-faktor bioszintézis helyreállítására vonatkozó feltételezésünket megerősítette az autentikus A-faktor, valamint a vizsgált törzsek sejtextraktumának HPLC-MS/MS analízise. Az A-faktor tömegspektrometriás mérése azt mutatta, hogy a *S. griseus* B-2682 és a *S. griseus* B-2682 AFN/pSGF4 törzsek nagyjából azonos mennyiségű (2 mg ml^{-1} a standard módon készített sejtextraktumban) A-faktort termelnek. A *S. griseus* B-2682 AFN törzs extraktumában csak nyomokban detektáltunk A-faktort, míg a *S. griseus* 45H törzs extraktumában egyáltalán nem találtunk A-faktort. A *S. griseus* B-2682 AFN törzs esetén nyomokban detektált A-faktor a molekula fragmentációs mintázata alapján minden kétséget kizáróan A-faktornak felel meg, azaz ebben a mutánsban az A-faktor bioszintézis génjei minden bizonnyal funkcióképesek, de a bioszintézis aktiválása elmarad. Amennyiben ez igaz, ez a mutáns az A-faktor bioszintézis szabályozásának megértésében nagyon hasznos lehet.

III.16. A *S. griseus* B-2682 AFN TÖRZS VAD TÍPUSÚ *afsA* GÉNT TARTALMAZ, MELYNEK TRANSZKRIPCIÓJA FOKOZOTT

Annak eldöntésére, hogy az A-faktor szintézis elmaradása a *S. griseus* B-2682 AFN mutánsban az *afsA* (az egyetlen eddig ismert, az A-faktor bioszintézisben résztvevő és arra specifikus gén) mutációjának a következménye, vagy valamilyen más okból nem kerül expresszióra, meghatároztuk a gén szekvenciáját, illetve vizsgáltuk a gén transzkripcióját szemikvantitatív RT-PCR módszerrel. A mutáns törzs *afsA* génje és a vad típusú törzs *afsA* génje mindössze egyetlen szinonim GGT>GGC (Gly) tripletben különbözött, ami nem magyarázza az A-faktor termelésbeli különbséget.

Az A-faktor termelés és sporuláció folyékony tenyészetben a tápanyag elfogyásakor következik be, ezért a transzkripció tanulmányozására itt is ún. shift-down tenyészetet alkalmaztunk, amikor is az exponenciális növekedési szakaszban lévő tenyészetet minimál táptalajba visszük át. Ennek hatására a vad típusú törzs tenyészetében 1,5-2 órával az átmosás után reproduktív fonalak, majd 4-5 órával az átmosás után spóráképzés volt megfigyelhető. Ugyanez a kopasz mutáns esetén nem következett be. Meglepetésünkre azt tapasztaltuk, hogy a shift-down csak kis mértékben befolyásolta az *afsA* mRNS mennyiségét, s az mRNS mennyisége a mutánsban jelentősen felülmúlta a vad típusú törzsét (6. ábra).



6. ábra. Az *afsA* gén transzkripciójának vizsgálata szemikvantitatív RT-PCR módszerrel. A minimál táptalajba való átmosáskor és utána 20, 60 és 180 perccel RNS-t izoláltunk, s az RT-PCR reakcióban minden esetben 100 ng RNS-t használtunk. Reverz transzkriptáz nélküli kontroll reakcióban nem kaptunk felszaporodó terméket, ami az RNS preparátumok DNS mentességét igazolta.

Figyelembe véve, hogy a mutáns kis mennyiségű A-faktort termel, s az *afsA* génje funkcióképes, valószínűsíthető, hogy a mutáció az A-faktor bioszintézis szabályozásában résztvevő, eddig még ismeretlen génben van. Az *afsA* mRNS túltermelése a mutánsban arra utal, hogy a törzs az *afsA* gén fokozott expressziójával próbálja kompenzálni az A-faktor hiányt. Ezek az eredmények, az irodalomban elsőként, a két legrészletesebben tanulmányozott *Streptomyces* differenciálódásban és antibiotikum termelésben szabályozó szereppel bíró autoregulátor, a C faktor és A-faktor regulációs utak kölcsönhatására utalnak.

III.17. A C FAKTOR FOKOZZA A *S. GRISEUS* STREPTOMYCIN TERMELÉSÉT

A szekunder metabolitok termelése a morfológiai differenciálódással összefüggésben, szilárd táptalajon a légmicéliumképzéssel párhuzamosan, folyékony tápközegben pedig a kvázi-exponenciális növekedés befejeződése után történik. A szekunder metabolitok közül ipari és gyógyászati szempontból kiemelkedő jelentőségűek az antibiotikumok. Az általunk vizsgált *S. griseus* 52-1, *S. griseus* B-2682, *S. griseus* B-2682 AFN és *S. griseus* B-2682 AFP törzsek, bár eltérő mennyiségben, streptomycint termelnek. Arra kerestük a választ, hogy ezeknek a törzseknek a C faktor gént kis, illetve nagy kópiaszámban tartalmazó transzformánsaiban hogyan változik a streptomycin szintézis mértéke, vagyis a C faktor hatással van-e a morfológiai differenciálódással összefüggésben lévő antibiotikum termelésre. Adataink szerint a kis kópiaszámú, saját promoterről kifejeztetett C faktor gén a *S. griseus* 52-1 törzs streptomycin termelését lényegesen nem befolyásolja, míg a B-2682 AFN és B-2682 AFP törzsek streptomycin termelése a kis kópiaszámú plazmidon klónozott C faktor gén hatására jelentősen fokozódik. Ezek az adatok alátámasztják, hogy a C faktor a morfológiai differenciálódás és antibiotikum termelés pleiotróp regulátora.

III.18. AZ A-FAKTOR HIÁNYOS MUTÁNSBAN A TÁPANYAG FELVÉTELLEN ÉS STRESSZ VÁLASZBAN RÉSZTVEVŐ FEHÉRJÉK TÚLTERMELŐDNEK

A *S. griseus* B-2682 AFN törzsben a vad típusú, illetve a klónozott *facC* által komplementált törzsekhez viszonyítva fokozódik az ozmotikus és oxidatív stresszválaszban résztvevő fehérjék expressziója, valamint a tápanyagfelvételben résztvevő ABC transzporter fehérjék szubsztrát-kötő alegységeinek expressziója is (3. táblázat). Ez utóbbi valószínűleg a hidrolitikus enzimek expressziójának elmaradása miatt előálló tápanyag hiány kompenzálására irányul, s a légmicélium (és sporogén hifa) tápanyag ellátását hivatott (próbálja) megoldani.

3. táblázat. A *S. griseus* B-2682 AFN törzsben azonosított, megnövekedett expressziót mutató fehérjék.

Adatbázis azonosító	Elnevezés	Egyezés ^a	Lefedettség ^b	Mr ^c (kDa)	PSD vagy CID megerősítés ^d	Sec ^e	ADP-ribozilációs szekvencia ^f
SGR1460	Osm C-szerű ATP/GTP-kötő fehérje	4/9	24%	14.5	igen	nincs	nincs
SGR2245	szuperoxid dizmutáz SodN	11/15	32%	15	igen	nincs	nincs
SGR3109	feltételezett aminosztransferáz	31/43	51%	39.4	igen	nincs	nincs
SGR1498	xylóz ABC transzporter szubsztrát-kötő fehérje	32/34	56%	38.8	nem	1-27	²¹ LAACG ²⁵
SGR5704	Spo0M sporulációs kontrol fehérje	16/24	29%	28.5	igen	1-17	nincs
SGR2237	feltételezett arginin-, ornitin-kötő fehérje	34/47	69%	33.5	igen	1-25	²⁹ LTACG ³³
SGR5275	Maltóz-kötő fehérje MalE	21/45	43%	44.8	igen	1-29	¹⁸ ATACG ²²
SGR1737	glutamát ABC transzporter szubsztrát-kötő fehérje	35/38	56%	33	igen	1-22	¹⁹ ATACG ²³
	mangán szuperoxid dizmutáz SodA	9/14	56%	22.4	igen	nincs	nincs
SGR5280	feltételezett α -amylase	25/46	44%	60.7	igen	1-35	nincs

a Az azonos és észlelt triptikus fragmentek száma.

b Szekvencia lefedettség.

c Számított molekulatömeg. A poszttranszlációs modifikáció miatt lényegesen eltérhet az észlelt tömegtől.

d PSD vagy CID analízissel megerősítés.

e A szekréción szignál szekvencia hossza.

f Az ADP-ribozilációs szekvencia pozíciója.

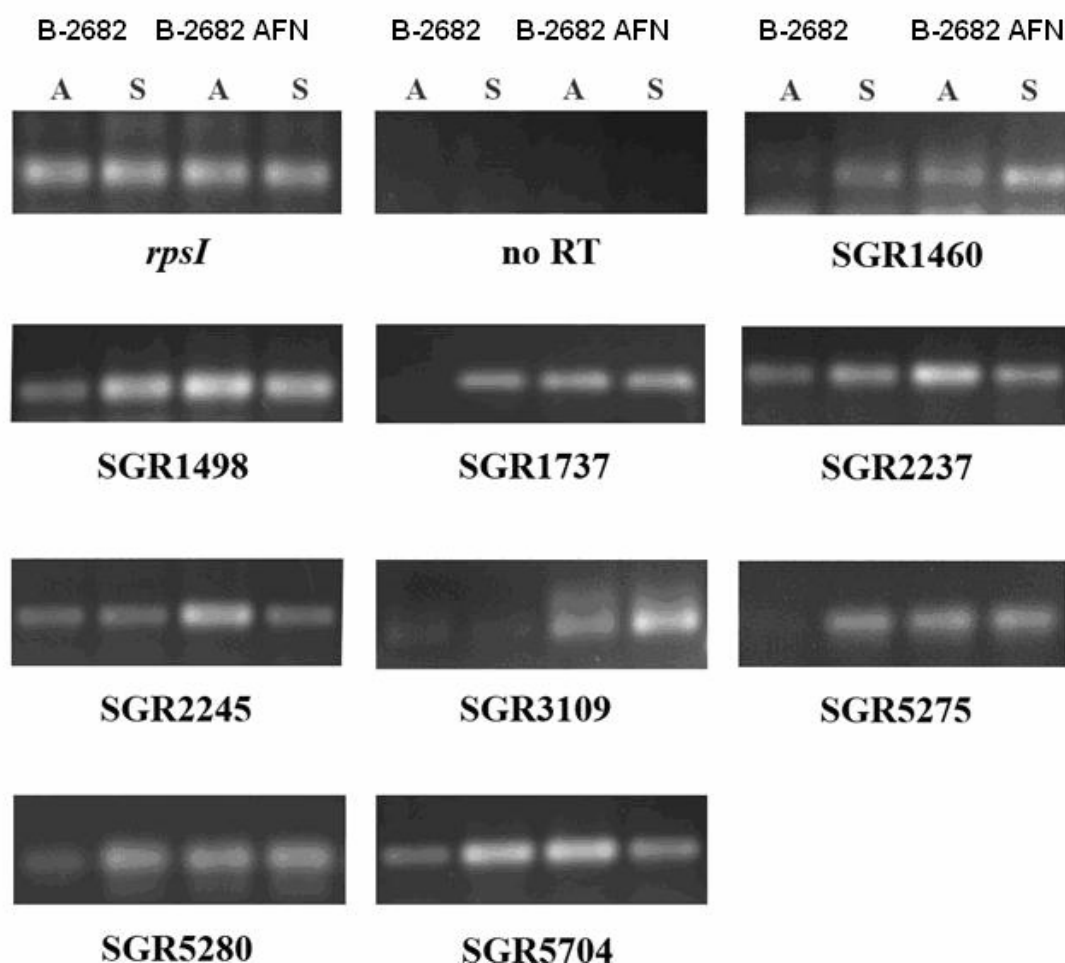
A fehérjék többsége rendelkezik amino-terminális szekréción szignál szekvenciával, és egy konzervált prokarióta membrán lipoprotein lipid kötőhellyel, amelyben megtalálható a szekréción szabályzó ADP-ribozilációban

résztevő konzervált cisztein. A fehérjék mindegyike nagyfokban konzervált az ismert genomú streptomycesekben.

III.19. A MEGNÖVEKEDETT FEHÉRJESZINT TRANSZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁS EREDMÉNYE

A kopasz mutánsban (B-2682 AFN) túltermelt azonosított extracelluláris fehérjék egy része meglepetésünkre lipoprotein, melyek a sejtfelületen lokalizálódnak, tehát a szekretomban észlelt koncentrációjuk nem feltétlenül tükrözi génjük transzkripció aktivitását. Ez természetesen igaz a szekretom összes fehérjéjére is, mivel a szintetizált fehérje mennyisége poszttranszkripcionálisan, valamint a transláció és poszttranszlációs lépések során is szabályozható. Ezért annak eldöntésére, hogy az észlelt fehérje túltermelés legalábbis részben a gének fokozott transzkripciójának a következménye-e, vizsgáltuk a tenyészetekben a gének expresszióját szemi-kvantitatív RT-PCR módszerrel (7. ábra).

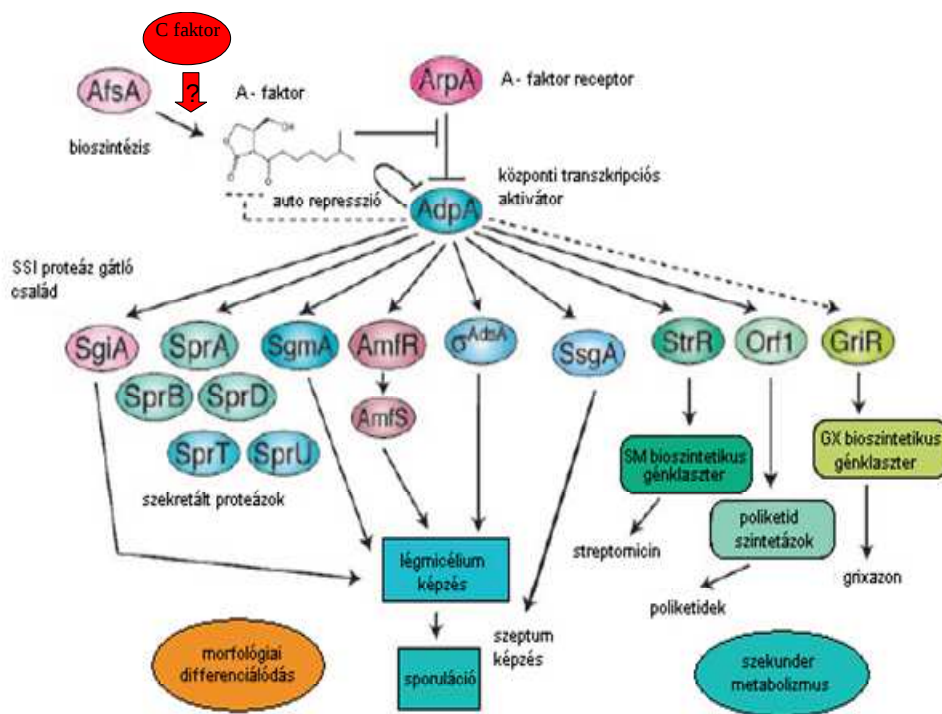
Eredményeink azt mutatták, hogy az összes vizsgált fehérje transzkripciója jelentősen magasabb volt a légmicélium képzés korai szakaszában (A oszlopok) a kopasz mutánsban (B-2682 AFN), mint a vad típusú törzsben (B-2682). Ez a streptomycesek életciklusa során megfelel annak a kritikus szakasznak, amikor a programozott sejthalál megkezdődik, és a sejtek lízise szolgáltatja a tápanyagot a differenciálódó légmicéliumnak. Lényegesen kisebb expressziós szintkülönbséget észleltünk a vizsgált törzsek között a sporuláció időszakában (S oszlopok). Ez arra utal, hogy a transzkripció fokozódása a programozott sejthalál időszakára specifikus, s a megnövekedett fehérje szintek a gének fokozott mértékű transzkripciójának eredményei.



7. ábra. A *S. griseus* B-2682 AFN törzsben túltermelt 9 fehérjét kódoló gén transzkripciójának vizsgálata szemikvantitatív RT-PCR módszerrel. A. Mintavétel a légmicélium képzés időszakában (36 óra); S. Mintavétel a sporuláció időszakában (54 óra). Az *rpsI* az SGR2801 fehérje génje, mely az S9 riboszómális fehérjét kódolja, s belső kontrollként használtuk. No RT. Kontroll, mely azonos az *rpsI*-el, csak nem adtunk reverz transzkriptázt.

III.20. A C FAKTOR FELTÉTELEZETT HATÁSA AZ A-FAKTOR BIOSZINTÉZISRE

A C faktor hatásának molekuláris szintű értelmezése ugyan nem adható meg a dolgozatban leírt kísérletek alapján, de feltételezhető, hogy hatása, legalábbis a *S. griseus* B-2682 törzsben az A-faktor bioszintézis eddig ismeretlen regulációs lépését érinti (8. ábra), melyet a *S. griseus* B-2682 törzs és AFN mutánsának genomi szekvenálásával, s a mutáció azonosításával kívánunk megválaszolni.



8. ábra. Az A-faktor és C faktor regulációs útvonalak feltételezett kölcsönhatása *S. griseus* B-2682 törzsben.

III.21. A *FACC* ELŐFORDULÁSA ÉS TERJEDÉSE

Elsősorban *in silico* analízissel kimutattuk, hogy a gén csak néhány *Streptomyces* törzsben, bizonyos humánpatogén fonalas gombákban, s egyes Gram-pozitív baktériumokban és fágjaikban fordul elő, s ezen mikroorganizmusok között horizontális géntranszferrel terjedt. A humánpatogén gombákban való előfordulás pedig a gén detektálásának diagnosztikai célú felhasználását teszi lehetővé.

III.22. A C FAKTOR TERMELŐ TÖRZS TAXONÓMIAI BESOROLÁSA

A törzsek 16S rRNS gén szekvenciája alapján megállapítottuk, hogy a *S. griseus* 45H jelű törzs taxonómiai besorolása helytelen. A törzs valójában a *S. albidoflavus* csoport tagja, ezért javasoltuk elnevezését *S. albidoflavus* 45H-ra megváltoztatni.

III.23. A C FAKTOR MINT PATOGENITÁSI FAKTOR?

A C faktor termelő törzs megváltozott taxonómiai besorolása, s az, hogy a gén a burgonya varasodást okozó *S. scabies* törzsben, illetve humánpatogén gombákban fordul elő, felvetette a C faktor esetleges szerepét a patogenitás kialakulásában. Mint hozzáférhető kísérleti rendszert, a burgonya varasodás kialakulását vizsgáltuk kooperációban, mikrogumó fertőzésével. Eredményeink alapján a burgonya varasodás kialakulásában szerepet játszó extracelluláris észteráz termelése, amely potenciális patogenitási faktor, ugyancsak a C faktor regulációja alatt áll.

IV. GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁG

A dolgozat eredményei alapján két területen látok jelentős gyakorlati hasznosítási lehetőséget.

1. A C faktor gén egyes humán patogén fonalas gombában (*Aspergillus fumigatus*, *A. terreus*, *Neosartorya fischeri*, *Chaetomium globosum*) való előfordulása alapján lehetőség van az emberben aszpergillózist okozó törzsek humán eredetű mintákban (vér, bronchoalveoláris mosófolyadék, stb) való kimutatására. Az erre a célra alkalmas, rendkívül érzékeny és specifikus, TaqMan alapú RT-qPCR esszéket ki is dolgoztuk. Ezek az esszék alkalmasak diagnosztikai célú kitek kifejlesztésére. Az eljárás magyar szabadalmi igénybejelentése 2008-ban P0800722 számon megtörtént. Jelenleg a nemzetközi bejegyzés [PCT] van folyamatban.

2. Az eredmények lehetőséget kínálnak a C faktor génnek az antibiotikum termelő ipari törzsek fejlesztésében való hasznosítására is. Igen gyakori probléma az iparban a törzsfenntartás, mivel a törzsek nem képeznek spórát. Bizonyos törzsek esetén legalábbis látok esélyt arra, hogy C faktor génnel való transzformációjuk megoldhatja ezt a gyakorlatban fontos kérdést.

Eredményeink alapján bizonyos törzsek esetében ugyancsak elképzelhető, hogy C faktor génnel való transzformációjuk a termelt antibiotikum mennyiségének fokozását eredményezi.

V. EPILOGUS

Befejezésül néhány gondolat a streptomycesek differenciálódásáról, a differenciálódással összefüggő szekunder metabolizmusról és ezen folyamatok szabályozásáról.

A streptomycesek a talaj baktérium populációinak jelentős részét alkotják. Ennek oka nyilvánvalóan az, hogy kiválóan alkalmazkodnak az adott élőhelyhez. Ebben micéliális növekedésük, a nagyszámú extracelluláris hidrolitikus enzim termelése, melyekkel a legkülönbözőbb, más baktériumok számára hozzáférhetetlen, vagy nehezen hasznosítható tápanyagokat képesek felhasználni, s szekunder metabolit termelésük egyaránt fontos szerepet játszik. Bőséges tápanyag ellátottság esetén a hifafonalak apikális növekedése és a gyakori elágazásai révén a telep növekedése kvázi-exponenciális. A hifafonalak átszövik a talajt, tehát helyhez kötöttek. Ez a tápanyag lokális elfogyásakor az élőlény pusztulásával járna. Hogy ez ne következzen be, az evolúció során kialakult a mozgékony, túlélő sejtek létrehozásának a képessége. Ezek a túlélő sejtek, a spórák, a legkülönbözőbb fizikai és kémiai behatásokkal szemben rezisztensek, metabolizmusuk gyakorlatilag leáll, akár évszázadokig is képesek nyugvó állapotban maradni, s amikor kedvező körülmények közé kerülnek, újra kicsírázni és vegetatív növekedésbe kezdeni. A sporuláció tehát a törzsek fennmaradásának eszköze, melyért semmilyen ár nem drága, s amelynek létrejötte nyilvánvalóan nemcsak egyetlen úton, hanem egymással legalábbis részben összefüggő, alternatív útvonalakon játszódhat le. Ezek az útvonalak a különböző *Streptomyces* törzsekben eltérhetnek, egyes elemei az evolúció során elveszhetnek stb. Ennek a spóráképzési programnak a része a légmicélium képzés, a telep bizonyos hifáinak programozott elhalása, az elpusztult sejtek anyagainak hidrolízisére szolgáló enzimek termelése, s az ilyenkor felszabaduló tápanyag védelme más talajlakó mikroorganizmusokkal szemben, melyre a szekunder metabolitok széles tárháza szolgálhat.

Mindezeknek a folyamatoknak térben és időben szigorúan meghatározott rendben kell lejátszódnuk, melyet csak egy bonyolult szabályozás biztosíthat. Úgy tűnik, hogy a reguláció elsősorban a transzkripció szintjén valósul meg. A szabályzásnak hierarchikus rendje van. Központi transzkripciós aktivátorok további transzkripciós aktivátorok szintézisét iniciálják, amelyek bonyolult bioszintetikus utakat kapcsolnak be. Nyilvánvalóan előnyös, ha ezek a folyamatok egyszerre sok, vagy az összes sejtben összehangoltan játszódnak le. Erre szolgálhatnak a különböző diffúzibilis autoregulátor molekulák.

A két legrészletesebben tanulmányozott autoregulátor a *S. griseus* által termelt A-faktor, és a *S. griseus* 45H által termelt C faktor. Érdekes, hogy az A-faktor egy lipidoldékony kismolekula, a C faktor pedig egy fehérje. További érdekesség, hogy mindkét autoregulátor homológjai megtalálhatók az ugyancsak talajlakó fonalas gombákban. Ez a regulátor molekuláknak az élőhelyhez való alkalmazkodás kialakulásában nyújtott előnyös voltára utal.

Az a tény pedig, hogy az A-faktor termelésére nem képes *S. griseus* 45H által termelt autoregulátor, a C faktor, a C faktor génnel nem rendelkező *S. griseus* NRRL B-2682 törzs mutánsában az A-faktor termelését és az A-faktor regulon aktiválását váltja ki, arra utalhat, hogy korábban együtt létező, egymással kölcsönhatásba lépni képes alternatív regulációs útvonalakkal állunk szemben.

VI. IRODALOMJEGYZÉK

- Anisova L, Blinova IN, Efremenkova ON, Kozmin YP, Onoprienko VV, Smirnova GM, Khokhlov AS. Regulators of development in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Izv Akad Nauk SSSR Biol 98-108 (1984).
- Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. J Antibiot (Tokyo) 58, 1-26 (2005).
- Biró S, Békési I, Vitális S, Szabó G. A substance effecting differentiation in *Streptomyces griseus*. Purification and properties. Eur J Biochem 103, 359-363 (1980).
- Chater KF. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 361, 761-768 (2006).
- Chater KF. Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. Microbiol 144, 1465-1478 (1998).
- Dondero NC, Scotti T. Excretion by streptomycetes of factors causing formation of aerial hyphae by old cultures. J Bacteriol 73, 584-585 (1957).
- Horinouchi S, Beppu T. A-factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. Mol Microbiol 12, 859-864 (1994).
- Horinouchi S, Beppu T. Autoregulators. Biotechnology. 28, 103-119 (1995).
- Horinouchi S, Beppu T. Autoregulatory factors and communication in *Actinomycetes*. Ann Rev Microbiol 46, 377-398 (1992a).
- Horinouchi S, Beppu T. Regulation of secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomyces*: A-factor as a microbial hormone and the AfsR protein as a component of a two-component regulatory system. Gene 115, 167-172 (1992b).
- Kato J, Chi WJ, Ohnishi Y, Hong SK, Horinouchi S. Transcriptional control by A-factor of two trypsin genes in *Streptomyces griseus*. J Bacteriol 187, 286-295 (2005).

- Kato J, Szuki A, Yamazaki H, Ohnishi Y, Horinouchi S. Control by A-factor of a metalloendopeptidase gene involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus*. J Bacteriol 184, 6016-6025 (2002).
- Khokhlov AS, Tovarova II, Borisova LN, Pliner SA, Shevchenko LN, Kornitskaia EI, Ivkina NS, Rapoport IA. The A-factor, responsible for streptomycin biosynthesis by mutant strains of *Actinomyces streptomycini*. Dokl Akad Nauk SSSR 177, 232-235 (1967).
- Manteca A, Claessen D, Lopez-Iglesias C, Sanchez J. Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. FEMS Microbiol Lett 274, 118-125 (2007).
- Sosinsky A, Bonin CP, Mann RS, Honig B. Target explorer: An automated tool for the identification of new target genes for a specified set of transcription factors. Nucleic Acids Res 31, 3589-3592 (2003).
- Strohl WR. Industrial antibiotics: Today and the future. In: Biotechnology of antibiotics Edited by Strohl WR. Marcel Dekker, Inc. New York-Basel-Hong Kong pp. 1-47 (1997).
- Szabó G, Vályi-Nagy T, Vitális S. A new factor regulating life cycle of *Streptomyces griseus*. In: Genetics of Microorganisms. Proc Symp on Heredity and Variability of Microorganisms. Edited by Timakova VD, State Publishing House of Medical Literature, Moscow. pp. 282-292 (1962).
- Szabó G, Vályi-Nagy T, Vitális S. An endogenous factor regulating the life cycle of *Streptomyces griseus*. Acta Biol Acad Sci Hung 18, 237-243 (1964).
- Szabó PT, Kele Z, Birkó Z, Szeszák F, Biró S, Janáky T. Identification of factor C protein from *Streptomyces griseus* by microelectrospray mass spectrometry. J Mass Spectrometry 34, 1312-1316 (1999).

- Tomono A, Tsai Y, Ohnishi Y, Horinouchi S. Three chymotrypsin genes are members of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. J Bacteriol 187, 6341-6353 (2005).
- Vujaklija D, Ueda K, Hong SK, Beppu T. Identification of an A-factor-dependant promoter in the streptomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces griseus*. Mol Gen Genet 229, 119-128 (1991).
- Willey JM, Nodwell JR. Diverse cell-cell signaling molecules control formation of aerial hyphae and secondary metabolism in *Streptomyces*. In: Chemical communication in bacteria. Ed. Winans SC, Bassler BL. ASM Press, Washington DC pp. 91-103. (2008).

VII. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Biró S**, Békési I, Vitális S, Szabó G. A substance effecting differentiation in *Streptomyces griseus*. Eur J Biochem 103, 359-363 (1980). if. 3,606.
2. Szabó G, Vitális S, Szeszák F, **Biró S**. Phenotypic heterogeneity of the progeny of *Streptomyces griseus* conidia. Acta Biol Acad Sci Hung 48(1), 45-65 (1997). if. 0.
3. Szeszák F, Vitális S, **Biró S**, Dalmi L, Szabó G. Amino acid sequence homology of factor C produced by *Streptomyces griseus* with regulatory proteins of zinc finger type. Acta Biol Acad Sci Hung 48(3), 265-273 (1997). if. 0.
4. Birkó Zs, Sümegi A, Vinnai A, van Wezel G, Szeszák F, Vitális S, Szabó P, Kele Z, Janáky T, **Biró S**. Characterization of the gene for factor C, an extracellular signal protein involved in morphological differentiation of *Streptomyces griseus*. Microbiology 145, 2245-2253 (1999). if. 2,700.
5. Szabó PT, Kele Z, Birkó Z, Szeszák F, **Biró S**, Janáky T. Identification of factor C protein from *Streptomyces griseus* by microelectrospray mass spectrometry. J mass spectrometry 34, 1312-1316 (1999). if. 3,167.
6. **Biró S**, Birkó Z, van Wezel G P. Transcriptional and functional analysis of the gene for factor C, an extracellular signal protein involved in cytodifferentiation of *Streptomyces griseus*. Antonie van Leeuwenhoek 78, 277-285 (2000). if. 2,555.
7. Birkó Z, Schauwecker F, Pfennig F, Szeszák F, Keller U, **Biró S**. Expression and rapid one-step purification of biologically active His-tagged factor C by Ni affinity column chromatography. FEMS Microbiol Lett 196, 223-227 (2001). if. 1,806.
8. Birkó Z, Bialek S, Buzás K, Szájli E, Traag BA, Medzihradszky KF, Rigali S, Vijgenboom E, Penyige A, Kele Z, van Wezel GP, and **Biró S**. The Secreted Signalling Protein Factor C Triggers the A-Factor Response Regulon in

Streptomyces griseus. Molecular and Cellular Proteomics **6.7**, 1248-1256 (2007). if. 9,425.

9. Kiss Z, Ward AC, Birkó Z, Chater KF, **Biró S.** *Streptomyces griseus* 45H, a producer of the extracellular autoregulator protein factor C, is a member of the species *Streptomyces albidoflavus*. Int J Sys Evol Microbiol. 58, 1029-1031 (2008). If. 2,222.

10. Birkó Z, Swiatek M, Szájli E, Medzihradszky KF, Vijgenboom E, Penyige A, Keserű J, van Wezel GP, **Biró S.** Lack of A-factor production induces the expression of nutrient scavenging and stress-related proteins in *Streptomyces griseus*. Mol Cell Proteomics 8, 2396-2403 (2009). If. 8.834.

11. Chater KF, **Biró S**, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. The extracellular biology of *Streptomyces*. FEMS Microbiol Rev, közlésre elfogadva. If. 7.963.

12. **Biró S**, Birkó Z, és Paholcsek M. P0800722 alapszámú magyar szabadalmi bejelentés. Aszpergillózisos betegségek detektálására alkalmas diagnosztikai módszer. (2008)

13. Kiss Z, Dobránszki J, Hudák I, Birkó Z, Vargha G, **Biró S.** The possible role of factor C in common scab disease development. Acta Biol Acad Sci Hung, közlésre elfogadva if. 0,619.

A disszertáció alapját képező dolgozatok impakt faktora: 42,897.

Dolgozataim összesített impakt faktora: 81,026

Első és utolsó szerzős cikkeim impakt faktora: 43,873.

A kandidátusi védés óta megjelent dolgozataim impakt faktora: 56,616.

A kandidátusi védés óta megjelent első és utolsó szerzős cikkeim impakt faktora: 31,464

A publikációimra kapott hivatkozások száma: 445, ebből független hivatkozás 325.