

MTA DOKTORI PÁLYÁZAT

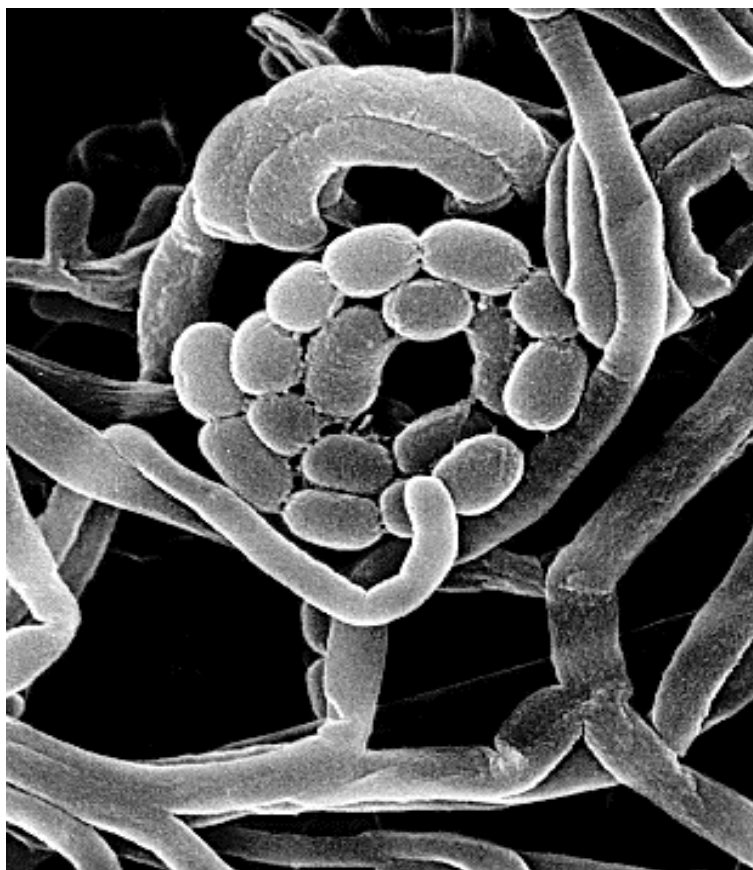
DOKTORI ÉRTEKEZÉS

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



BIRÓ SÁNDOR

DEBRECEN, 2009



***Streptomyces* légmicélium és spóralánc pásztázó elektronmikroszkópos képe.**

Mark Buttner és Kim Findlay (John Innes Centre) felvétele.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Egy akadémiai doktori disszertáció nemcsak az abban szereplő néhány dolgozatot, hanem az odáig vezető teljes kutatói, s esetemben egyetemi oktatói életpályát is reprezentálja. Ez egy nagyon hosszú folyamat, ezért a köszönetnyilvánítás is hosszú, s talán nem is sikerülhet teljes körűre, amiért elnézést kérek.

Mindenekelőtt hálával tartozom családomnak, azon belül is elsősorban feleségemnek, Dr. Kaszás Évának, aki mindvégig támogatott, biztatott, aki biztosította a munkámhoz szükséges nyugodt háttérrel, s akinek támogatása nélkül ez a disszertáció nem készülhetett volna el.

Köszönettel tartozom egykori tanárainknak (Dr. Gergely Artúr, Dr. Nagypál István, Dr. Sóvágó Imre professzoroknak), akik diákkörös koromban a természettudományos gondolkodás és probléma megoldás alapjaival, s a kutatás, a megismerés örömeivel megismertettek.

Öszinte hálával tartozom az egyetemi évek után befogadó új közösség, a Debreceni Orvostudományi Egyetem Biológiai Intézete tagjainak, akik egy számomra új tudományterület megismerése során türelemmel támogattak. Mindenekelőtt Szabó Gábor professzornak, akitől nemcsak szakmát, hanem úgy gondolom bölcsességet, emberséget is sikerült tanulnom. Köszönet illeti továbbá a Biológiai Intézet vezető oktatóit, akikkel az évek során szorosan együttműködve dolgoztam (Dr. Vitális Sándor, Dr. Békési István, Dr. Szeszák Ferenc, Dr. Valu Gabriella, Dr. Barabás György), s akiktől, a kezdetektől fogva sokat tanultam.

Kollégáim közül meghatározó volt továbbá Dr. Schlammadinger József oktatói, kutatói példamutatása, emberi tartása, bölcsessége.

Kor- és pályatársaim közül Dr. Fehér Zsigmond önzetlen segítsége, s a mai napig tartó támogatása és barátsága felbecsülhetetlen értékű.

Köszönettel tartozom velem együtt dolgozó kollégáimnak (Dr. Vargha György, Dr. Penyige András, Dr. Szabó István, Dr. Birkó Zsuzsa, Keserű Judit, Szentesiné Szirák Krisztina, Vinnai Andrea), akik közül legszorosabb, leghosszabban tartó és legeredményesebb a Birkó Zsuzsával való együtt dolgozásunk volt, amit külön is köszönök.

Köszönöm egykori és jelenlegi diákjaim, tanítványaim (Dr. Mátyus János, Dr. Bodnár Béla, Dr. Magyar Sándor, Dr. Nagy Zoltán, Tóth Tímea, Kiss Zsuzsa, Borsy Adrienn, Valóczki Imre, Farkas Krisztina, Paholcsek Melinda) inspirálását és a munka bizonyos fejezeteiben való részvételét.

Hálás köszönet illeti azokat a szakasszisztenseket (Dr. Kiss Ákosné, Csuha Katalin, Kiss Jolán, Szilágyi Istvánné, Pekár Ibolya, Solymosi Livia, Guba Erika, Kosztolányi Katalin), akik a kísérleti munka egyes szakaszaiban nagy szakértelemmel, és odaadással segítettek munkámat, s Szabó Endrénét rendkívül precíz, megbízható titkárnői munkájáért, amivel nagyon sok adminisztratív terhet vett le a vállamról.

Nagyon fontos volt számomra hazai kooperációs partnereim (Dr. Medzyhradszki Katalin, Dr. Szájli Emilia, Dr. Buzás Krisztina, Kele Zoltán, Szabó Pál) megbízható munkája, amelyért itt is köszönetet mondok.

Végezetül azoknak a külföldi mestereimnek, kollégáimnak, barátaimnak (Sir David Hopwood, Prof. Keith Chater, Prof. Richard Hutchinson, Prof. Gilles van Wezel, Dr. Ullrich Keller), fejezem ki hálámat és nagyrabecsülésemet, akiknek a laboratóriumában évekig dolgoztam, akik pályám kezdetén önzetlenül segítettek a *Streptomyces* genetika eszköztárának és elméletének elsajátításában, s akikkel kapcsolatomban a mai napig élő és eredményes.

TARTALOMJEGYZÉK	OLDAL
1. BEVEZETÉS.....	7
1.1. A C FAKTOR FELFEDEZÉSE ÉS HATÁSMÓDJÁNAK LEÍRÁSA.....	12
1.2. AZ A-FAKTOR FELFEDEZÉSE ÉS HATÁSMÓDJÁNAK VIZSGÁLATA.....	16
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	20
3. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	
3.1. A C FAKTOR TERMELŐ TÖRZS TAXONÓMIAI ÁTSOROLÁSA.....	21
3.2. A C FAKTOR EGY 34500 DA MOLEKULATÖMEGŰ FEHÉRJE.....	25
3.3. A C FAKTOR GÉN 324 AMINOSAVAT KÓDOL.....	27
3.4. A KLÓNOZOTT GÉN HATÁSA <i>STREPTOMYCES GRISEUS</i> 52-1 TÖRZSBEN MEGEGYEZIK AZ EXOGÉN HOZZÁADOTT FEHÉRJE HATÁSÁVAL.....	32
3.5. A C FAKTOR GÉN EGYETLEN PROMOTERRŐL, ÉLETCIKLUS FÜGGŐEN FEJEZŐDIK KI.....	34
3.6. A C FAKTOR HELYREÁLLÍTJA A <i>STREPTOMYCES GRISEUS</i> NRRL B-2682 TÖRZS KOPASZ MUTÁNSAINAK SPÓRAKÉPZÉSÉT.....	38
3.7. A C FAKTOR GÉN DELÉCIÓJA KOPASZ (<i>BLD</i>) FENOTÍPUS EREDMÉNYEZ.....	40
3.8. AZ <i>E. COLI</i> BAN KIFEJEZTETETT C FAKTOR FEHÉRJE BIOLÓGIAILAG AKTÍV...	43
3.9. A C FAKTOR INDUKÁLJA AZ A-FAKTOR REGULONT <i>STREPTOMYCES</i> <i>GRISEUS</i> NRRL B-2682 TÖRZSBEN.....	46
3.10. A C FAKTOR HELYREÁLLÍTJA A <i>S. GRISEUS</i> NRRL B-2682 AFN TÖRZS A-FAKTOR TERMELÉSÉT.....	50
3.11. A C FAKTOR FOKOZZA A <i>S. GRISEUS</i> STREPTOMYCIN TERMELÉSÉT.....	53
3.12. AZ A-FAKTOR HIÁNYOS MUTÁNSBAN A TÁPANYAG FELVÉTELBN ÉS STRESSZ VÁLASZBAN RÉSZTVEVŐ FEHÉRJÉK TÚLTERMELÉSE FIGYELHETŐ MEG.....	56
3.13. <i>FAC</i> HOMOLÓGOK A STREPTOMYCESEK MELLETT ELŐFORDULNAK FONALAS GOMBÁKBAN, BAKTÉRIUMOKBAN ÉS BAKTÉRIOFÁGOKBAN IS.....	63
3.14. A <i>FAC</i> GÉN VALÓSZÍNŰLEG HORIZONTÁLIS GÉNTRANSZFERREL TERJEDT...	66
3.15. A C FAKTOR GÉN, MINT LEHETSÉGES DIAGNOSZTIKAI MARKER ASZPERGILLÓZIS DETEKTÁLÁSÁBAN.....	69
3.16. A C FAKTOR SZEREPET JÁTSZHAT A NÖVÉNYPATOGENITÁSBAN.....	75
4. A LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	80
5. EPILOGUS.....	84
6. IRODALMI HIVATKOZÁSOK.....	86
7. FÜGGELÉK.....	101
8. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	110
9. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK MÁSOLATAI.....	115

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A.	<i>Aspergillus</i>
AdpA	A-faktor függő fehérje
adsA	A-faktor függő, extracitoplazmatikus funkciójú szigma faktor génje
AFN	A-faktort nem termelő
AFP	A-faktort termelő
afsA	A-faktor bioszintézis génje
amfR	A légmicélium képzést szabályzó fehérje génje
Apr ^R	Apramicin rezisztencia
ArpA	A-faktor receptor fehérje
B.	<i>Bacillus</i>
bp	bázispár
Cpase SG	<i>Streptomyces griseus</i> karboxipeptidáz
ESI	Elektrospray ionizáció
facC	C faktor fehérje génje
HGT	Horizontális géntranszfer
HPLC	Nagynyomású folyadékkromatográfia
L.	<i>Lactobacillus</i>
MS	Tömegspektrometria
Nec1	Nekrózis faktor
ORF	Nyitott leolvasási keret
PAI	Patogenitást okozó géneket hordozó genetikai elem
PAS	Perjódsav-Schiff reakció
PCR	Polimeráz láncreakció
P _{facC}	A <i>facC</i> gén promotere
pstS	Foszfát-kötő fehérje génje
ramC	A légmicélium képzés regulátorának génje
RBS	Riboszóma kötőhely
S.	<i>Streptomyces</i>
scpD	<i>Streptomyces</i> karboxipeptidáz gén
SGAP	<i>Streptomyces griseus</i> aminopeptidáz
sgiA	Subtilizin inhibítor génje
sgmA	Metallo-endoropeptidáz génje
sodA	Szuperoxid dizmutáz génje
sodF	Szuperoxid dizmutáz génje
sprA	Kimotripszin típusú proteáz génje
sprB	Kimotripszin típusú proteáz génje
sprC	Kimotripszin típusú proteáz génje
sprT	Tripszin típusú proteáz génje
sprU	Tripszin típusú proteáz génje
ssgA	Sporulációt gátló kisméretű fehérje génje
SSI	<i>Streptomyces</i> subtilisin inhibítor
strR	A streptomycin bioszintézis transzkripció aktivátorának génje
StrU	A streptomycin bioszintézisben résztvevő oxido-reduktáz
Tat	„Twin arginine” fehérje szekréciós útvonal
Thio ^R	Thiostrepton rezisztencia
Δ adpA	Az <i>adpA</i> gén deléciója
Δ facC	A <i>facC</i> gén deléciója

1. BEVEZETÉS

A streptomycesek Gram pozitív, aerób, 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 életciklusuk biztosítására.

A genetika egyik alapvető kérdése, a szabályozásnak egy, a fehérje szintézis regulációjánál bonyolultabb, magasabb rendű szintje; az egyedfejlődés során kialakuló szubmikroszkópos, mikroszkópos szerkezetek létrejöttének, ill. a két- vagy többsejtű szervezetek fejlődésének, differenciálódásának megismerése.

A differenciálódás már egysejtű mikroorganizmusok esetén is megfigyelhető az élet egyes szakaszaiban eltérő funkciók és szerkezetek létrehozása során, de általánosíthatóbb modellként a már kétsejtűnek számító spóráképző prokarióta *Bacillus subtilis* használják. A sejtdifferenciálódás tanulmányozásának egy kissé bonyolultabb, de kiváló modelljei a streptomycesek. Ezek az élőlények ugyanis még viszonylag egyszerűek, mert prokarióták, de soksejtű szervezetnek tekinthetők, melyeknek morfológiai differenciálódása összetettebb, ugyanakkor mikroszkópos és szabad szemmel látható markerek segítségével jól tanulmányozható. A *Streptomyces coelicolor* mint modellszervezet differenciálódását igen részletesen tanulmányozták, s erről az utóbbi években is több összefoglaló cikk jelent meg (Chater és Losick, 1997; Chater, 1998; Chater, 2000; Chater, 2001; Chater, 2006; Chater és Chandra, 2008). A *Streptomyces coelicolor* genomjának szekvenálása is befejeződött 2002-ben (Bentley és mtsai, 2002).

A streptomycesek az elméleti szempontból fontos morfológiai differenciálódásuk mellett azért is jelentősek, és igen szerteágazóan tanulmányozottak, mert differenciálódásukkal párhuzamosan nagyszámú, gyógyászatban és iparban alkalmazott vegyületet (antibiotikum, pigment, enzim, enzim inhibitor, rovarellenes szer, immunomodulátor, tumor ellenes vegyület stb.) termelnek (Strohl, 1997; Bérdy, 2005). Tekintettel azonban arra, hogy az egyes *Streptomyces* törzsek között lényeges különbségek vannak, s ezen eltérő törzsek különböző, gyógyászati és gazdasági szempontból fontos vegyületeket termelnek, további *Streptomyces* törzsek differenciálódásának, valamint a differenciálódás és szekunder metabolizmus összefüggésének vizsgálata is indokolt. Ennek alátámasztására elég talán megemlíteni, hogy az utóbbi években további *Streptomyces* törzsek genomi

szekvenálása történt meg, amelyek egy része már annotálva is van és hozzáférhető. Ilyen a streptomycint termelő *S. griseus* IFO 13350 (Ohnishi és mtsai, 2008), az avermectin termelő *S. avermitilis* MA-4680 (Ikeda és mtsai, 2003), a streptomycesek között ritkának számító növény-patogén *S. scabies* 87.22 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_scabies/), és néhány, a különböző genomikai központok által annak reményében szekvenált alábbi fajok egyes törzsei (*S. albus*, *S. clavuligerus*, *S. ghanaensis*, *S. griseoflavus*, *S. hygroscopicus*, *S. lividans*, *S. noursei*, *S. roseosporus*, *S. viridochromogenes*, *S. roseum*, valamint a taxonómiaiilag nem karakterizált *Streptomyces* törzsek [Mg1, SBP78, AA4, ACF1, C]), hogy sikerül antibiotikum termelésben résztvevő, eddig nem azonosított, törzs-specifikus, és/vagy nyugvó géneket azonosítani (<http://genomesonline.org>). Ezen törzsek egy része extrém élőhelyekről származik. Itt említhető továbbá a korábban *S. erythreus*ként ismert – erythromicin termelő – *Saccharopolyspora erythraea* is (Oliynyk és mtsai, 2007).

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).

A spóráképzésre nem képes mutánsoknak két fő csoportját különböztetjük meg. Az egyik a légmicélium képzésére nem képes *bald* (kopasz) 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 szilárd táptalajon történő spóráképzés ezen általánosan elfogadott mechanizmusa mellett ettől eltérő módon is lehetséges spóráképzés. *Streptomyces bikiniensis* (*S. griseus*) HH1, légmicélium képzésére nem képes törzsének differenciálódását tanulmányozva, a tenyésztésre használt táptalajtól függően spóráképzést figyeltek meg (Szabó és Vitális, 1992). Ezek a spórák a szubsztrátmicélium reproduktív típusú átalakulásával, a telep belsejében fejlődnek. A spórák morfológiai és fiziológiai szempontból is sokkal heterogénebbek, mint a légmicéliumból keletkezett spórák.

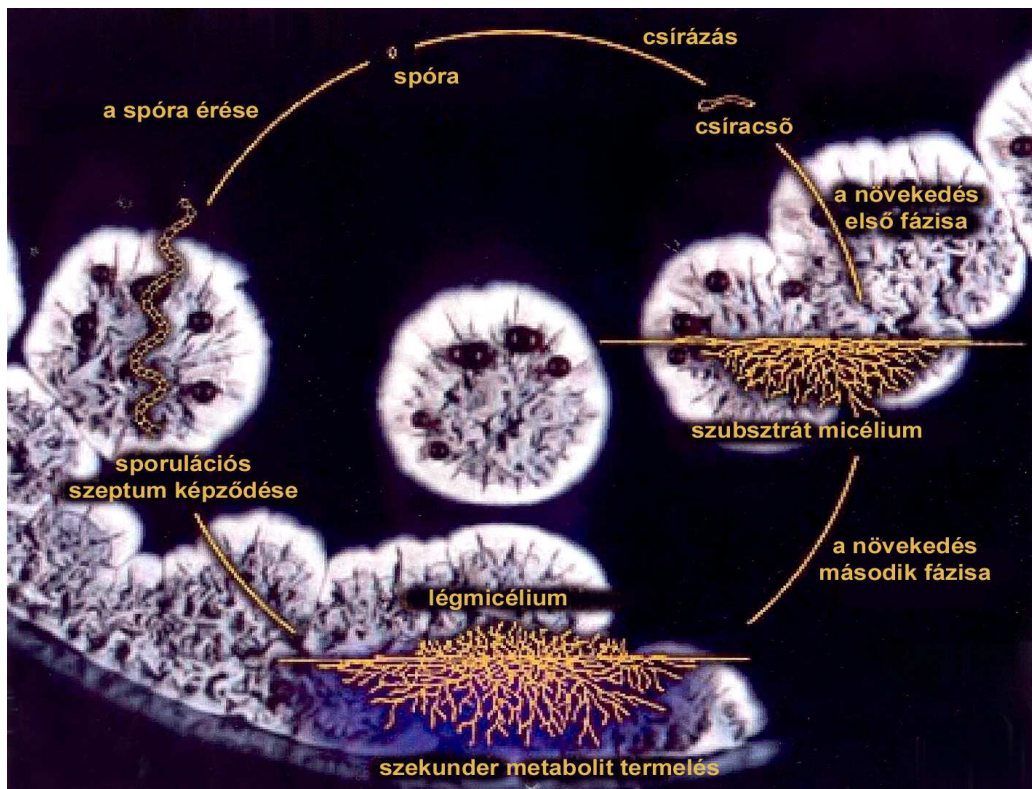
Egy vad típusú, tehát légmicéliumot- és spórát egyaránt képző *S. carpinensis* telepmorfológiai vizsgálata ugyancsak azt a meglepő eredményt hozta, hogy a szubsztrátmicéliumban is van spóráképzés. A kétféle spóra képzése egyszerre történik, de amíg a légmicélium egésze átalakul spórává, addig a szubsztrátmicéliumban csak egy rendkívül szűk zónában a telep alján van spóráképzés. Különbözött továbbá a spórák felszíne is. A légmicélium spóráit vékony réteg fedi, míg a szubsztrátmicélium spóráinak felszínét amorf nagy elektronvezetőségű anyag borította (Miguélez és mtsai, 1997).

Mindezek az általánostól eltérő spóráképzési módok valószínűleg annak tükrében érthetők meg, ha figyelembe vesszük, hogy a spóra ezen élőlények túlélő sejtje, azaz amennyiben az életfeltételek kedvezőtlenek, a spóráképzés a túlélés egyetlen esélye, tehát a törzsek bármi áron és bármilyen alternatív módon igyekeznek spórát képezni.

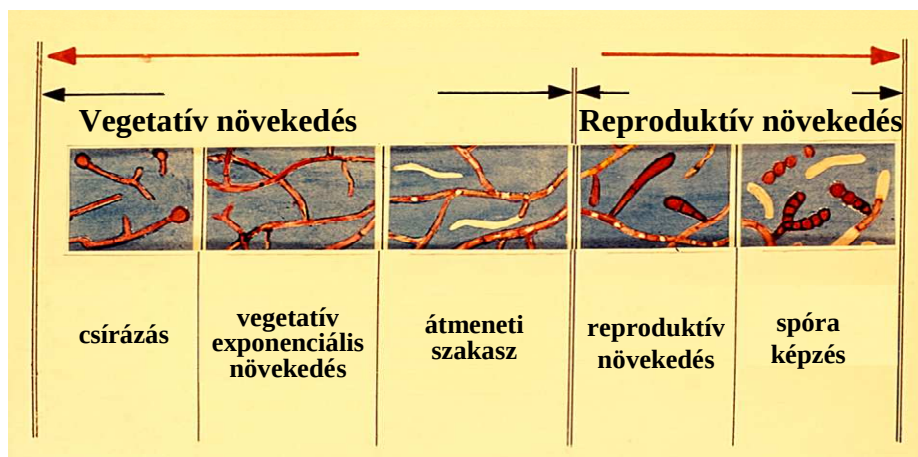
A streptomycesek növekedése folyékony tenyészetben is hasonló. Kezdetben szerteágazó, cönocyticus hifafonalakat hoznak létre. Ezt a kvázi-exponenciális vegetatív növekedést egyes fonalak lízise mellett reproduktív típusú (sporogén) hifafonalak megjelenése követi, melyeken az életciklus befejeződéseként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

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 elsőként intézetünkben leírt C faktor (Szabó és mtsai, 1962; Szabó és mtsai, 1964), 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 az 1.2. fejezetben).



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



2. ábra. A streptomycesek növekedése folyékony tenyészetben (Vitális S. 1979).

A streptomyceseknél a differenciálódás és az antibiotikum termelés közötti kapcsolatra utal a két folyamat gyakori időbeli egybeesése és közös szabályozása, valamint az, hogy *S. coelicolor*-ban és *S. griseus*-ban is sok olyan mutáció ismert, amelyek mindkét folyamatot blokkolják (Horinouchi, 1999; Chater, 2006). Az antibiotikumokat sokan ún. szekunder anyagcsereterméknek tekintik. E termékek időbeli megjelenése az életciklus késői differenciálódási szakaszára jellemző. Az, hogy mi az antibiotikumok szerepe, hogyan vesznek részt az őket termelő szervezetek életfolyamatainak szabályozásában, még nem ismert. Egyes feltételezések szerint szerepük lehet a szubsztrátmicélium lizisekor felszabaduló tápanyagok más mikroorganizmusoktól való védelmében (Chater és Merrick, 1979). Ezt támaszthatja alá, hogy az antibiotikum termelés időben egybeesik a légmicélium képzéssel. Az antibiotikumokat termelő szervezetekben a primer és szekunder anyagcsere-utak egymással való kapcsolata és ezek genetikai szabályozása, annak megértése, hogy ezek miként kapcsolódnak a sejtdifferenciálódáshoz, mindkét folyamat megismeréséhez közelebb vihet.

A disszertáció a C faktor azonosítására és a differenciálódás szabályozásában betöltött szerepének tisztázására irányuló kísérleteinket tárgyalja, melyeket nagyrészt az utóbbi 10 évben végeztünk. Az eredmények tárgyalása nem feltétlenül követi a kísérletek végzésének kronológiai sorrendjét. Terjedelmi okokból azoknak a kísérleti eredményeknek a tárgyalása, amelyek lektorált nemzetközi folyóiratokban korábban publikálásra kerültek rövidebb, s általában az ábrák és táblázatok közül is csak a tárgyalás szempontjából elengedhetetlenül fontosakat ismételtem meg a disszertációban, a részletek pedig a disszertáció végén, az eredeti közleményekben találhatók meg.

1.1. A C FAKTOR FELFEDEZÉSE ÉS HATÁSMÓDJÁNAK LEÍRÁSA

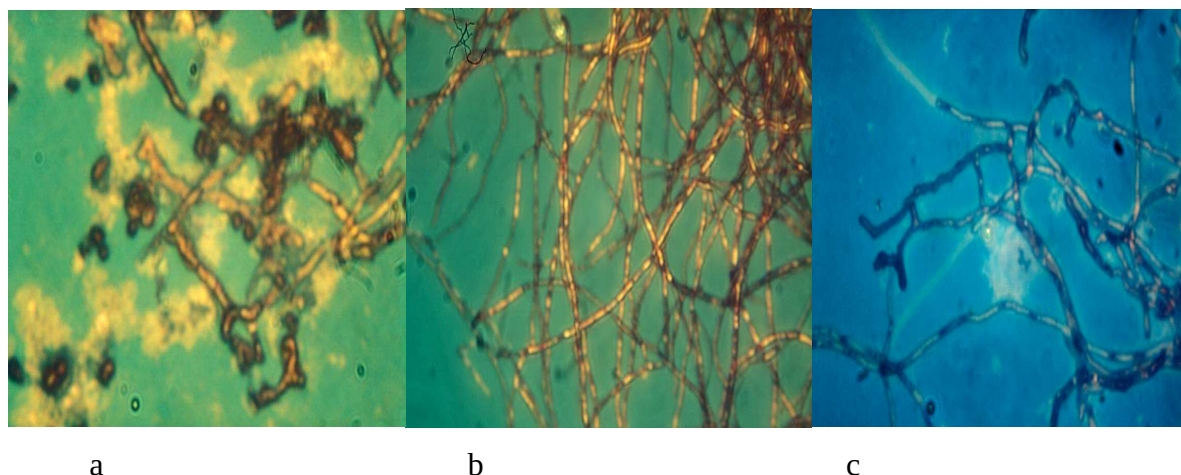
A fejezethez tartozó saját közlemény:

Szabó G, Vitális S, Szeszák F, Biró S. Phenotypic heterogeneity of the progeny of *Streptomyces griseus* conidia. Acta Biol Acad Sci Hung 48, 45-65 (1997).

A differenciálódás tanulmányozása a Debreceni Orvostudományi Egyetemen az 1960-as években Szabó Gábor professzor vezetésével kezdődött, amelyhez kísérleti objektumként a már akkor is ismert – a spóra csírázásával kezdődő, s a fonalas micéliumon át spóráképzéssel végződő – komplex életciklussal rendelkező, ipari szempontból is fontos *Streptomyces griseus* törzset választották. Célul tűzték ki természetes (endogénnek tekinthető) anyag, vagy anyagok azonosítását, izolálását, jellemzését, és a sejtdifferenciálódást befolyásoló hatásának tanulmányozását (Szabó, 1970). Az ilyen jellegű kutatás nem példa nélküli, hiszen 1957-ben a Journal of Bacteriology-ban közölt tanulmányban (Dondero és Scotti, 1957) arról számolnak be, hogy különböző ipari *Streptomyces* törzsek, melyek mai ismereteink szerint a törzsfejlesztés során elveszítették légmicélium- és spóráképző képességüket, szilárd táptalajon közvetlenül egymás mellett tenyésztve, egy másik törzs légmicélium képzését helyreállítják. Ez valamilyen extracelluláris diffúzibilis anyag hatására utal. Ez valószínűleg a sejtek közötti kommunikáció egyik első leírása. Arra vonatkozóan azonban megbízható adattal nem rendelkezem, hogy ezt a közleményt ismerte-e Szabó professzor.

Vizsgálataikat az ipari streptomycin termelő *S. griseus* 52-1 jelű törzsével (amely folyékony tenyészetben differenciálódásában elakad, ezért nem képez spórát), és annak egy általuk izolált, streptomycint nem termelő mutánsával, a *S. griseus* 45H jelű törzsével végezték, amely folyékony tenyészetben is teljes életciklussal rendelkezik, azaz spórát képez (Szabó és mtsai, 1961; valamint 3a. és 3b. ábra). A törzseket több szempontból is összehasonlították, így például sejtfal összetételüket (Barabás és Szabó, 1965), és növekedésüket különböző tenyésztési körülmények esetén (Szabó és mtsai, 1960). Mivel abban már az 1960-as években is konszenzus volt, hogy a streptomycesek életciklusa két jól elkülöníthető fázisra, a vegetatív és reproduktív szakaszra osztható, a fenti két törzs vizsgálatával lehetőséget láttak arra, hogy olyan, a törzsek által termelt anyagot tudnak azonosítani, ami a vegetatív-reproduktív átmenetet befolyásolja, vagy szabályozza. Ilyen anyagot a teljes életciklussal rendelkező *S. griseus* 45H törzs fermentlevében valóban tudtak is azonosítani. A fermentlé a *S. griseus* 52-1 törzs tápfolyadékához adva annak életciklusát megváltoztatta, a teljes életciklussal rendelkező törzshöz hasonlóvá tette, megjelentek a

reproduktív típusú fonalak és spóraszerű képletek (3c. ábra). Az akkor még ismeretlen anyagot (göbös növekedést okozó hatására utalva a göb angol neve [clump] kezdőbetűjével) C faktornak nevezték el, s citomorfológiai hatását részletesen tanulmányozták (Vitális és mtsai, 1963; Szabó és mtsai, 1967; Vitális és Szabó, 1969).



3. ábra. A *S. griseus* 45H (a), a *S. griseus* 52-1 (b), törzsek növekedése folyékony táptalajon, s a C faktor hatása a *S. griseus* 52-1 törzs növekedésére (c) folyékony tenyészetben. 1700-szoros nagyítás (Vitális, 1979)

Az anyag előzetes vizsgálatok alapján hőérzékenynek, és nagy molekulájúnak bizonyult, s DNáz rezisztenciája alapján kizárható volt hogy DNS lenne. A kísérleti eredmények alapján az is feltételezhető volt, hogy a C faktor valamilyen módon DNS-hez kötődve fejt ki hatását, s befolyásolja az mRNS szintézisét (Szabó és mtsai, 1967; Szeszák és Szabó, 1973). Később, már az általam előállított, nagy tisztaságú C faktor fehérje preparátummal kimutatták, hogy a C faktor, már igen kis koncentrációban ($0,7 \text{ ng ml}^{-1}$) káliumion kibocsátást indukál (Szeszák és mtsai, 1989). Ugyancsak az általam előállított tiszta C faktor fehérje preparátummal, nyúlban, monoklonális antitestet állítottak elő, amellyel a C faktor előfordulását vizsgálták különböző *Streptomyces* törzsekben. Kimutatták, hogy a légmecélium képzésre képes *Streptomyces* törzsek általában nagyobb mennyiségű C faktort termelnek, ami megfelelt annak a feltételezésnek, hogy a C faktor a reproduktív fázis induktora (Szeszák és mtsai, 1990).

Mivel a tanulmányozott két törzs (*S. griseus* 52-1 és *S. griseus* 45H) bizonyos sajátosságai (sejtfal összetétel, növekedésük különböző táptalajokon) a vártnál nagyobb különbséget mutattak, vizsgálták a törzsek genetikai rokonságát is DNS-DNS hibridizációval.

Ez azzal a nem várt eredménnyel zárult, hogy a két törzs közötti rokonság nem nagyon közeli (Fehér és Szabó, 1978).

Részletesen vizsgáltuk és analizáltuk továbbá a differenciálódási program lejátszódását egyes differenciálódási markerek megjelenésének követésével a két törzsben (Szabó és mtsai, 1997). A streptomycesek differenciálódása szilárd táptalajon szemmel is nyomon követhető, a telep felszínének és színének változása alapján. Folyékony tenyészetben ez nem ennyire nyilvánvaló. Itt is vannak azonban markerek, melyek a fejlődés egyes stádiumaira jellemzőek. Ilyen markerek a folyékony tenyészetek differenciálódásának követésében a sejtfal vastagsága, a citoplazma festődése, a poliszaharid eloszlása PAS reakcióval követve, a nukleoid festődése Feulgen reakcióval, vagy metilzöld-pironin festéssel. Ez alapján a folyékony tenyészetben megkülönböztetünk fiatal, tranziens és öreg vegetatív hifafonalakat, s reproductív (sporogén) hífát, ami érett spóraláncokká alakul. A folyékony tenyészetben is spórázó *S. griseus* 45H esetében ezek a stádiumok, s a rájuk jellemző markerek, bár a növekedés aszinkron volta miatt a tenyészetekben egyszerre megfigyelhetők, a hifafonalak szabályos heterogenitásának tekinthető. Egyetlen hifafonal fejlődése során azonban időbeni megjelenésük karakterisztikus, s korrelál a differenciálódás egyes stádiumaival.

Eltérő a helyzet a differenciálódásában elakadt *S. griseus* 52-1 növekedése során. A karakterisztikus differenciálódási markerek egyetlen hifafragmenten belül is sokféle kombinációban jelennek meg, s spórát soha sem képeznek. A törzs tenyészetéhez az autoregulátor C faktor fehérjét hozzáadva, a differenciálódás koordináltabbnak tűnik, s megjelennek a reproductív ágak is, melyek ugyanazokat a karakterisztikus jegyeket mutatják, mint a spórázó törzs esetében, de spórát csak kis számban képeznek. Érdekes módon azt találtuk, hogy nemcsak a hifa fonalak heterogének, hanem a képződő spórák is. Eltérnek méretben, alakban, citológiai markerekben, sejtfal vastagságban, és refraktivitásban is, pedig elvileg genomjuk azonos. Eltérnek továbbá fiziológiailag, életképességüket és ellenállóképességüket tekintve is.

Ezek azok a korai eredmények, amelyek többsége azelőtt született, mielőtt a C faktorról kapcsolatos munkákba bekapcsolódtam volna. Ennyi év távlatából, s az elmúlt tíz év eredményeinek ismeretében is elmondhatom, hogy egy alaposan végiggondolt, és helytálló munkahipotézis alapján indultak el ezek a kutatások, s annak ellenére, hogy a kutatás anyagi és technikai feltételei meglehetősen korlátozottak voltak, egy rendkívül jelentős felismerés történt olyan területen, amely elméleti és gyakorlati szempontból egyaránt fontos. Ezt

támasztja alá az is, hogy a *Streptomyces* differenciálódás és antibiotikum kutatás két doyenje, Keith Chater és Sueharu Horinouchi^{1†}, akik kooperációs partnereink de egyben versenytársaink is, évekkal Szabó professzor úr halála után, egy, a témával foglalkozó összefoglaló cikküket a streptomycesek differenciálódásában szerepet játszó autoregulátorok felfedezőinek, Khokhlov és Szabó professzorok emlékének ajánlották (Chater és Horinouchi, 2003).

¹ Horinouchi professzor a disszertáció előkészítése során, 2009 nyarán elhunyt. Távozása a *Streptomyces* kutatás nagy vesztesége.

1.2. AZ A-FAKTOR FELFEDEZÉSE ÉS HATÁSMÓDJÁNAK VIZSGÁLATA

A *Streptomyces griseus* által termelt autoreglátor faktort (A-faktor) Khokhlov és munkatársai tíz évvel az első ilyen jellegű közlemény (Dondero és Scotti, 1957) megjelenése után 1967-ben fedezték fel 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). Az A-faktor hatásának tanulmányozása során kimutatták, hogy az nemcsak a streptomycin bioszintézisét fokozta, hanem enzimátikus (Voronina és mtsai, 1982; Vasilenko és mtsai, 1983) és morfológiai változásokat is kiváltott (Khokhlov és mtsai, 1973; Zaslavskaya és mtsai, 1979). Rendkívüli erőfeszítést igényelt az A-faktor tiszta formában való előállítása, és szerkezetének meghatározása, mivel koncentrációja a fermentlében igen alacsony. Tisztítását a fermentlé kloroformos extrakciójával, s különböző kromatográfiás eljárásokkal (cellulóz, szilikagél) és mobil fázisokkal (benzol, dietil-éter, kloroform) oldották meg. Ily módon, mintegy 500 liter fermentléből 40 mg tiszta A-faktort nyertek, melynek szerkezetét 2-izokapriloil-(3R)-hydroximetil- γ -butirolaktonként határozták meg (Kleiner és mtsai, 1976). Az A-faktor kémiai szintézisét 1977-ben oldották meg (Kleiner és mtsai, 1977), ami megnyitotta az utat az A-faktor hatásmechanizmusának vizsgálatához, hiszen rendelkezésre állt egy standard A-faktor preparátum. Az A-faktor hatásmechanizmusának molekuláris felderítése nem az A-faktort felfedező szovjet-orosz, hanem egy japán kutatócsoport nevéhez fűződik.

Az A-faktor termelése életciklusfüggő, s a hatásának kifejtéséhez szükséges kritikus koncentrációt fokozatosan emelkedve, az exponenciális növekedés során éri el a tápfolyadékban. Ez a koncentráció igen alacsony, mindössze 1-20 nM. Az A-faktor lipidoldékony kis molekula, s mint ilyen szabadon átdiffundál a membránon, illetve szabadon diffundál a többmagvú hifafonalakon belül, ezáltal szinkronizálni képes a morfológiai differenciálódást és a szekunder metabolizmust szilárd táptalajon, egy telepen belül, folyékony táptalajon pedig a teljes tenyészetben. Ezért „mikrobiális hormonnak” tekinthető. Az A-faktorhoz hasonlóan, Gram negatív baktériumokban az acil-homoszerin, Gram pozitív baktériumokban pedig oligopeptidek szolgálnak szignálmolekulaként a sejtek közötti kommunikációban (Bassler és Losick, 2006; Camilli és Bassler, 2006).

A-faktor termelésére nem képes *S. griseus* mutánsok sem szekunder metabolitok (pl. streptomycin) szintézisére, sem pedig légmicélium és spóráképzésre nem képesek. Ha

azonban tenyészetükhöz exogén A-faktort adnak 1 nM koncentrációban, morfológiai differenciálódásuk és szekunder metabolit képzésük egyaránt helyreáll, ami az A-faktornak a szabályzó szerepe mellett a differenciálódás és antibiotikum szintézis közös regulációjára is utal (Horinouchi és Beppu, 1994; Horinouchi, 2002).

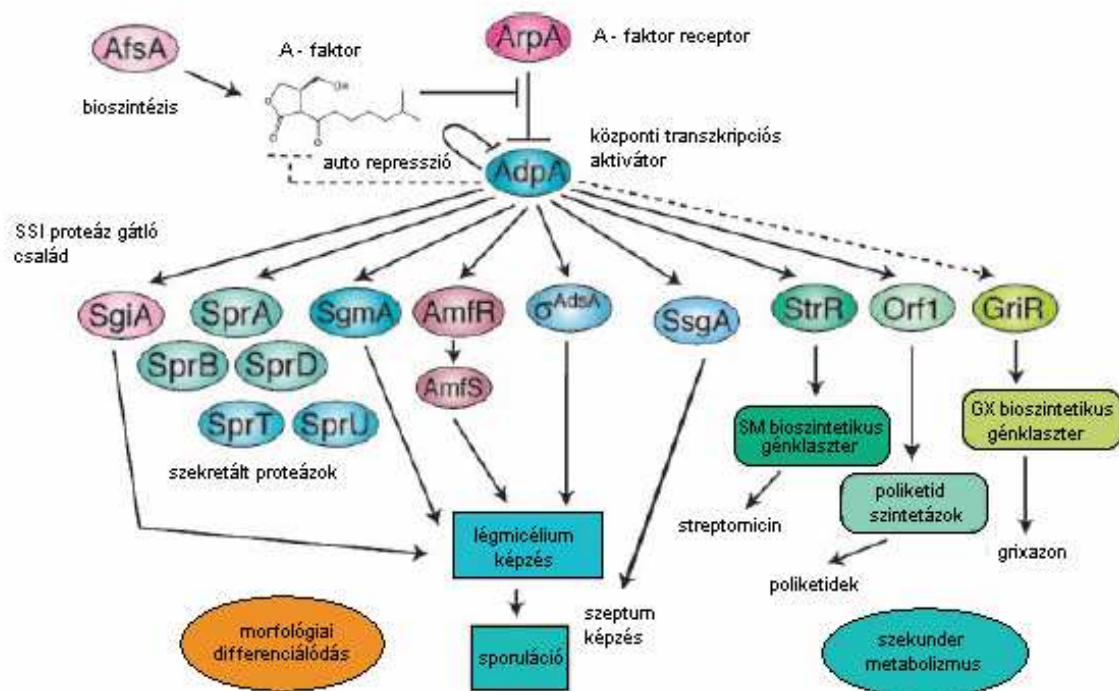
S. griseus-ban az A-faktor hatására az A-faktor regulációs kaszkád indukálódik, melynek molekuláris eseményei röviden az alábbiak szerint foglalhatók össze: Amikor az A-faktor koncentrációja eléri a kritikus szintet (1 nM) a sejteken belül, hozzákapcsolódik specifikus receptorához, az A-faktor receptor fehérjéhez (ArpA). Az ArpA represszor fehérje, mely alaphelyzetben az *adpA* gén expresszióját gátolja, amely gén egy A-faktor függő fehérje (AdpA) szintéziséért felelős. Az A-faktor kötődésének hatására az ArpA represszor ledisszociál az *adpA* operátoráról (Ohnishi és mtsai, 1999), s ezzel megindulhat az *adpA* gén átírása. Az *adpA* az egyetlen ismert gén melynek működését az ArpA fehérje szabályozza (Kato és mtsai, 2004).

Az *adpA* gén transzkripciót kódol, amely számos, a morfológiai differenciálódásban és szekunder metabolizmusban résztvevő gén transzkripcióját aktiválja. Az ismert gének, amelyeket az AdpA aktivál, azaz tagjai az AdpA regulonnak a következők:

- *strR*, a streptomycin bioszintézis specifikus transzkripciót aktivátorának génje (Vujaklija és mtsai, 1993) amely aztán további, a streptomycin bioszintézisben résztvevő géneket aktivál (Ohnishi és mtsai, 1999).
- *adsA* (A-factor dependent sigma factor), extracitoplazmatikus funkciójú (ECF) szigma faktor (σ^{AdsA}) génje, amely a légmicélium képzésben játszik szerepet (Yamazaki és mtsai, 2000).
- *ssgA*, kis molekulatömegű savas karakterű fehérje génje, amely a spóra szeptum képzésben játszik szerepet (Yamazaki és mtsai, 2003a), s amelyet eredetileg sporulációs szuppresszorként izoláltak *S. griseus*-ból, s erre utal a neve is (suppression of sporulation and fragmented growth) (Kawamoto és mtsai, 1997).
- *amfR* (aerial mycelium formation), amely egy reszponz-regulátor típusú fehérje génje, s a légmicélium képzésben van szerepe (Yamazaki, 2003b).
- *sgmA*, *Streptomyces griseus* metallo-endopeptidáz génje, melynek szerepe a légmicélium képzés során a szubsztrátmicélium apoptózisában van (Kato és mtsai, 2002).
- *sprT* és *sprU*, két tripszin típusú proteáz génjei (Kato és mtsai, 2005). Ezeknek az enzimeknek feltehetően a szubsztrátmicélium fehérjéinek emésztésében, s ezáltal a fejlődő légmicélium tápanyaggal való ellátásában lehet szerepük.

- *sprA*, *sprB* és *sprD*, három kimotripszin típusú proteáz génjei (Tomono és mtsai, 2005a). Ezeknek az enzimeknek, feltehetően ugyancsak a szubsztrátmicélium fehérjéinek emésztésében, s ezáltal a fejlődő légmicélium tápanyaggal való ellátásában lehet szerepük.
- *sgiA*, egy *Streptomyces subtilisin* inhibitor gén, melynek a légmicélium képzésben van szerepe (Hirano és mtsai, 2006).

A fentieket összefoglalóan a 4. ábra mutatja.



4. ábra. Az A-faktor regulon (Horinouchi, 2007).

2009 augusztusában újabb közlemény jelent meg, mely a *S. griseus* IFO13350 törzs, és $\Delta adpA$ mutánsának extracelluláris proteomját tanulmányozza, és amelyben további AdpA regulált fehérjéket azonosítottak. Ezek részben lebontó anyagcsere utak enzimeit, részben pedig proteázokat, glikozil hidrolázokat és észterázokat (Akanuma és mtsai, 2009). Ezek részletezésére az eredményeim tárgyalása során térek ki. Az AdpA regulonhoz tartozó gének meghatározására irányuló mikroarray analízis, melyet ugyancsak a közelmúltban közöltek, azt mutatta, hogy 74 transzkripciós egység 152 génjének expressziója fokozódott A-faktor hatására. Ezek jelentős része ismeretlen funkciójú, ami arra utal, hogy az A-faktor hatása az eddig ismertnél lényegesen szélesebb körű és bonyolultabb (Hara és mtsai, 2009).

A *S. griseus*ban található A-faktorhoz hasonló szerkezetű és funkciójú butirolakton típusú autoregulátorokat más *Streptomyces* fajokban is leírtak, amelyek a differenciálódást, antibiotikum termelést, vagy mindkettőt szabályozzák. Érdekes, hogy nem csak a különböző törzsek A-faktor-szerű molekulái nagyon hasonlóak, hanem receptor fehérjék is nagyfokú homológiát mutatnak, de biológiai szerepük eltérő lehet. *S. coelicolor*ban az SCB1 (*S. coelicolor* butirolakton), az actinorhodin és undecylprodigiosine, valamint egy kriptikus poliketid szintáz génklaszter bioszintézisében tölt be szabályzó szerepet (Takano és mtsai, 2001; Takano és mtsai, 2005); *S. virginiae*ben a virginiae butanolid a virginiamicin bioszintézist szabályozza (Nakano és mtsai, 1998); *S. tendae*ben a nikkomycin bioszintézist szabályozza egy γ -butirolakton (Engel és mtsai, 2001); *S. pristinaespiralis*ban egy γ -butirolakton a pristinamicin bioszintézis szabályozásában vesz részt (Folcher és mtsai, 2001); *S. lavendulae*ban az IM-2 több szekunder metabolit szintézisét szabályozza (Kitani és mtsai, 2008); *S. fradiae*ban a sporulációt és tylosin termelést egyaránt egy γ -butirolakton szabályozza (Cundliffe és mtsai, 2001; Stratigopoulos és mtsai, 2002).

Érdekes módon, a streptomycesekhez nagyon hasonló élőhely igényű és életciklusú fonalas gombákban is előfordulnak γ -butirolakton gyűrűt tartalmazó molekulák. Ilyen az aspulvinone *Aspergillus terreus*ban (Takahashi és mtsai, 1978), a γ -dekalakton *Sporobolomyces odorus*ban (Turner és Aldridge, 1983), a lachnumlactone A *Lachnum papyraceum*ban (Shan és mtsai, 1996), és a multicolansav *Penicillium multicolor*ban Turner és Aldridge, 1983). Ezeknek a vegyületeknek a funkciója azonban nem ismert. Az *A. terreus*ban előforduló butyrolacton I funkciója jobban tanulmányozott. Kimutatták, hogy az eukarióta ciklin függő cdk1 és cdk2 kináz specifikus inhibitora (Kanemitsu és mtsai, 1998; Nishio és mtsai, 1996), s hasonlóan a streptomycesekben előforduló γ -butirolaktonhoz, morfológiai differenciálódást, spóráképzést indukál, és fokozza a szekunder metabolitok, többek között a koleszterinszint-csökkentőként alkalmazott lovastatin termelését (Schimmel és mtsai, 1998).

Annak a 3.13 fejezetben tárgyalt ténynek az ismeretében, miszerint nemcsak A-faktor, hanem C faktor homológok is előfordulnak különböző fonalas gomba fajokban ez különösen érdekes, s felveti, hogy ezek a molekulák a fonalas gomba és fonalas baktérium fajokban hasonló funkcióval rendelkeznek, s horizontális géntranszferrel terjedtek. A különböző *Streptomyces* fajok *afsA* és *arpA* homológjairól a közelmúltban írták le, hogy *Streptomyces* törzsekben feltehetőleg plazmid közvetítésével terjedtek (Nishida és mtsai, 2007).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során célul tűztem ki az Intézetünkben korábban felfedezett és a *S. griseus* differenciálódásában a jelenség szintjén leírt regulációs szerepet játszó autoregulátor C faktor azonosítását, tiszta formában történő előállítását, s a differenciálódásban betöltött szerepének molekuláris szinten történő analízisét.

Ennek során 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 deléciója 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. coli*-ban, 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.
9. Annak felismerése után, hogy a C faktor génje csak bizonyos *Streptomyces* törzsekben, néhány baktérium fajban és fágjaikban fordul elő, a gén elterjedésére hipotézis felállítása.
10. 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.
11. Az A-faktor és C faktor által indukált regulációs útvonalak, illetve azok esetleges kölcsönhatásainak vizsgálata.
12. A C faktor szekunder metabolizmus szabályozásában betöltött szerepének vizsgálata.
13. 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.
14. Mivel a C faktor termelő *Streptomyces* törzs eredete kezdettől fogva kétséges volt, a törzs taxonómiai besorolásának megerősítése, vagy helyes taxonómiai besorolása 16S rDNA szekvencia alapján.

3. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

3.1. A C FAKTOR TERMELŐ TÖRZS TAXONÓMIAI ÁTSOROLÁSA

A fejezethez tartozó saját közlemény:

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 Syst Evol Microbiol 58, 1029-1031 (2008).

A C faktor termelő *S. griseus* 45H jelű törzset az ipari streptomycin termelő *S. griseus* 52-1 jelű törzs spóráinak 8 mg ml⁻¹ koncentrációjú mustár-nitrogénes kezelésével nyerték, melynek során genetikailag stabil, streptomycint nem termelő mutánsokat kívántak izolálni. 1387 megvizsgált individuális izolátumból 33 nem termelt streptomycint, de csak 2 bizonyult stabilan nem termelőnek a sorozatos átoltások során. Ezek közül az egyiket *S. griseus* 45H-nak nevezték, és részletesen összehasonlították a „szülői” *S. griseus* 52-1 törzzsel (Szabó és mtsai, 1960; Szabó és mtsai, 1961). Azt találták, hogy néhány tulajdonságuk eltérő.

Ilyen volt az arabinóznak és citrátnak szénforrásként történő hasznosítása. A „szülői” 52-1 jelű törzs citráton nőtt, míg a „mutáns” *S. griseus* 45H jelű nem. Ez elvileg könnyen magyarázható azzal, hogy a mutáció, vagy mutációk egyike a citrát hasznosításhoz szükséges valamely gént érintette. Fordított volt a helyzet az arabinóz hasznosítással. Míg a „szülői” törzs nem volt képes arabinózt hasznosítani, addig a „mutáns” kiválóan nőtt arabinózon. Eme tulajdonság genetikai hátterének magyarázata, bár nem lehetetlen, de nem is könnyű. Eltérést találtak továbbá a szilárd táptalajon képzett spórák alakjában. A „szülői” törzs spórái cilindrikus, hordó alakúak voltak, míg a „mutáns” spórái oválisak. Lényeges különbséget észleltek továbbá a törzsek életciklusában, folyékony tenyészetben. A streptomycin termelő „szülői” törzs a növekedés korai szakaszában hosszú, ritkán elágazó hifafonalakként nőtt, s csak a növekedés késői szakaszában volt jellemző az elágazás, de folyékony tenyészetben spórát nem képzett (3b. ábra). A „mutáns” viszont rövid életciklussal rendelkezett, korán gyakori elágazásokat hozott létre, s mintegy 24 óra után spórákat is képzett (3a. ábra). A folyékony tenyészetben való spóráképzés különösen figyelemreméltó, mivel nem általánosan jellemző a *Streptomyces* törzsekre. Két további különbség a törzsek között, hogy a „szülői” törzs termelt A-faktort, ami a *S. griseus* törzsek jellemzője, míg a „mutáns” A-faktort nem termelt. Termelt viszont egy sejtdifferenciálódást kiváltó anyagot (amit C faktornak nevezték

el), amelyet a „szülői” törzs nem termelt, de amely annak folyékony tenyészetéhez adva reprodukzív típusú fonalak képződését váltotta ki, de spórát ekkor is csak kis számban képzett.

A lényeges különbségek felvetették a két törzs genetikai rokonságának (azaz a „mutáns” eredetének) kérdését is, amelyet az akkori technikai lehetőségek színvonalán meg is próbáltak kísérletesen megválaszolni DNS-DNS filterhibridizációs módszerrel (Fehér és Szabó, 1978). Az eredmények azonban nem adtak egyértelmű választ, s a szerzők felvetik, hogy a mutáns származhat laboratóriumi kontaminációból is. Ennek lehetősége könnyen adott volt, hiszen a különböző törzsekkel való munkákhoz, bár alapos takarítás és csírátlantítás után, de ugyanazt a „steril szobát” használták. A ma használatos lamináris box-ok még ismeretlenek voltak.

Egyértelműen azonban az, hogy a *S. griseus* 45H jelű törzs nem származhat a *S. griseus* 52-1 jelű törzsből csak akkor derült ki, amikor a C faktor génjét klónoztuk, s Southern hibridizációval kimutattuk, hogy a gén a „szülői” törzsben nincs meg (Birkó és mtsai, 1999). Mustárnitrogénes mutagén kezelés során pedig egy törzs géneket veszíthet, de új génekre nem tesz szert, azaz a *S. griseus* 45H jelű törzs nem származhat a *S. griseus* 52-1 jelű törzsből. Ugyanez a kísérlet azt is megmutatta, hogy a *S. griseus* 52-1 és *S. griseus* 45H törzsek genomi DNS-ének restrikciós mintázata eltérő, illetve, hogy a *S. griseus* 45H és a *S. flavofungini* törzsek restrikciós mintázata nagymértékben hasonló.

Mindezek alapján úgy döntöttünk, hogy a törzsek rokonságát 16S riboszómális RNS gén szekvencia analízissel vizsgáljuk (Kiss és mtsai, 2008). Meghatároztuk a *S. griseus* 52-1, *S. griseus* 45H és a *S. flavofungini* törzsek 16S rRNS génjeinek szekvenciáját. A szekvenciák a GenBank adatbázisban az EF571001-EF571003 számon hozzáférhetőek. A *S. griseus* 52-1 törzs 16S rDNS szekvenciája megegyezik a *S. griseus* 2247 törzs rDNS operonok rna-E (GenBank azonosító AB030567-AB030572) szekvenciáival, és más *S. griseus* törzsek szekvenciájával, azaz a törzs valóban *S. griseus*.

A *S. griseus* 45H és *S. flavofungini* törzsek 16S rDNS szekvenciái egymással teljesen azonosak, de hasonlóságuk a *S. griseus* 52-1 törzsszel csak 96%-os. Ugyancsak eltérnek a típus-törzs *S. flavofungini* NRRL B-12307^T (AY999792) és NBRC 13371 (AB184359) szekvenciáitól is, azokkal csak 97,21% és 97,40% az azonoságuk. Teljesen azonosak viszont a *S. albidoflavus* csoport 16S rDNS szekvenciáival (GenBank DQ855477, DQ978978, stb.).

A *S. griseus* 45H, *S. flavofungini* és *S. griseus* 52-1 törzsek filogenetikai elhelyezkedését a streptomycesek törzsfáján meghatároztuk s azt az 5. ábrán mutatom be. Eredményeink egyértelműen azt mutatták, hogy a *S. griseus* 45H és *S. flavofungini* törzseink azonosak, s a *S. albidoflavus* csoportba tartoznak, ezért Southern hibridizációval vizsgáltuk a

C faktor gén meglétét a *S. albidoflavus* csoport fajaiban. Négy vizsgált törzs közül háromban (*S. canescens* ICSSB 1002^T, *S. odorifer* ICSSB 1004^T és *S. sampsonii* ICSSB 1011^T) megtalálható a gén. Egyedül a *S. albidoflavus* Rossi Doria 1891 törzsben nincs meg a C faktor gén, amely törzs relative távoli rokona a csoport tagjainak (Ferguson és mtsai, 1997).

Eredményeink azt valószínűsítik, hogy a C faktor termelő törzs nem a *S. griseus* 52-1 jelű, streptomycin termelő törzs mutánsa, hanem az ugyanebben az időszakban, ugyanabban a laboratóriumban tanulmányozott flavofungin termelő *S. flavofungini* törzsszel (Úri és Békési, 1958), melyet véletlen laboratóriumi kontaminációként izoláltak.

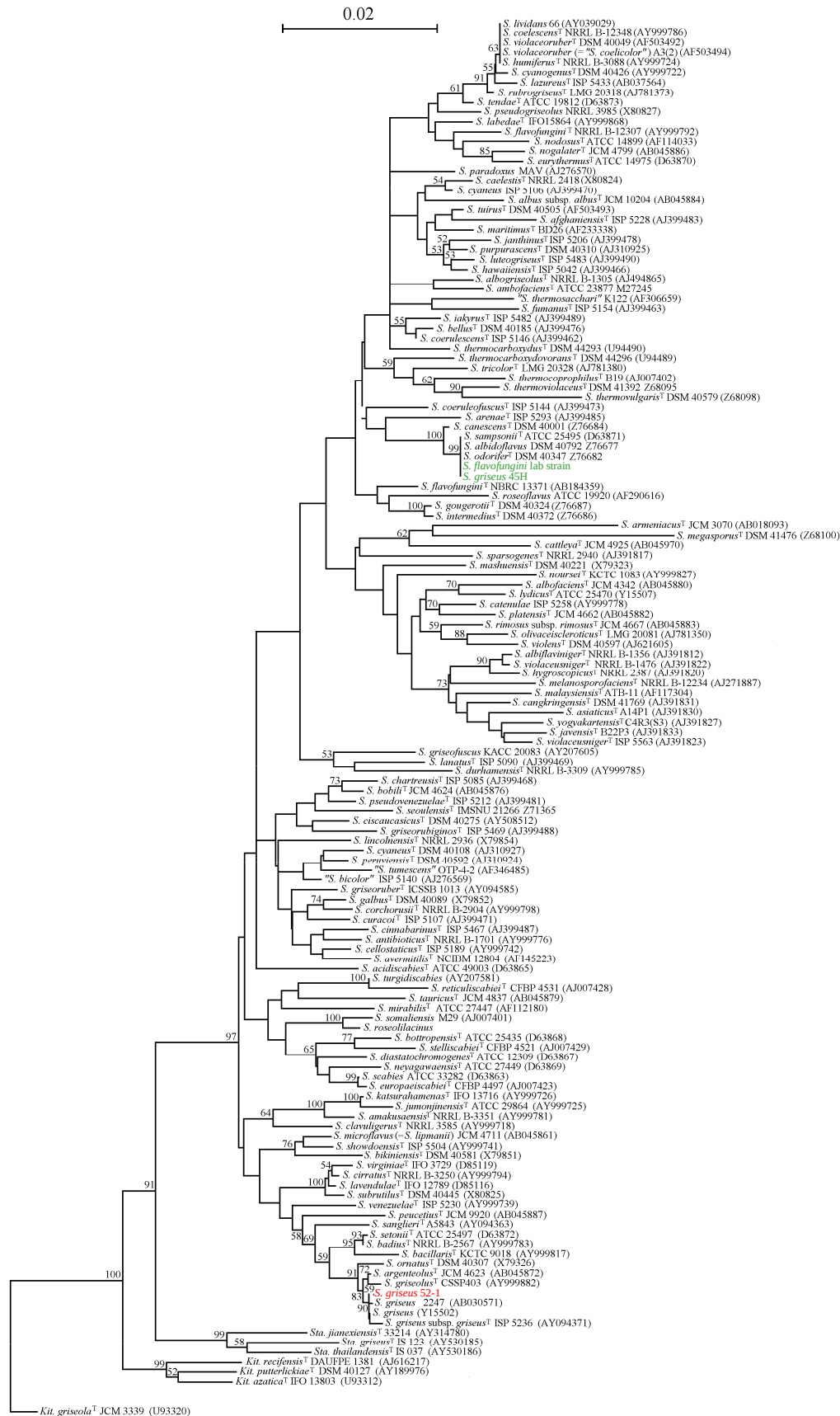
Eredményeink alapján a C faktor termelő törzs elnevezését *S. albidoflavus* 45H-ra javasoltuk megváltoztatni. Az elnevezés változást azonban, tekintettel arra, hogy a törzs a korábbi közleményeinkben *S. griseus* 45H-ként szerepel, a disszertációban nem használom, a törzset mindvégig *S. griseus* 45H néven említem, a taxonómiai átsorolás hallgatólagos tudomásulvételét kérve.

5. ábra. A *S. griseus* 45H, *S. griseus* 52-1 és *S. flavofungini* törzsek elhelyezkedése a streptomycesek törzsfáján, illetve a *S. griseus* és *S. albidoflavus* csoporton belül, a 16S rDNS szekvenciák összehasonlítása alapján. Az összehasonlítás „Neighbour-joining” módszerrel történt (Saitou és Nei, 1987) a Jukes and Cantor távolságmatrix felhasználásával (Jukes és Cantor, 1969).

Root: *Kitasatospora griseola*.

Bootstrap értékek (>50 %) 1000 ismétlés után %-ban vannak kifejezve.

A vonal 0,02 szubsztitúciót jelent nukleotid pozícióként.



5. ábra.

3.2. A C FAKTOR EGY 34500 DA MOLEKULATÖMEGŰ FEHÉRJE

A fejezethez tartozó saját közlemény:

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).

Amint az 1.1. fejezetben leírtam, a C faktor felfedezése a *S. griseus* 45H törzs fermentlevében megtörtént, s a sejtdifferenciálódásban kifejtett hatását is részletesen vizsgálták. Ezután a fehérje tiszta formában való előállítása és jellemzése jelentette a legnagyobb feladatot. A feladat nagyságának megértéséhez két dolog ismerete szükséges. Az egyik, hogy a C faktort a termelő törzs fermentlevében azonosították, s annak mennyisége a fermentlében ng ml^{-1} koncentrációjú, azaz csak több tíz liter fermentléből tudtunk néhány mg anyagot izolálni. A másik, hogy a C faktor hatásának detektálására, azaz a tisztítás egyes lépéseinek nyomon követésére egy biológiai teszt szolgált. Ennek lényege, hogy a fehérje tisztítás különböző fázisaiból származó vizsgálandó mintákat kloroformmal csíramentesítettük, és megfelelően standardizált körülmények között 3 ml szűrt szójas táptalajra frissen leoltott tesztörzs, a *S. griseus* 52-1 tenyészetéhez adtuk. Minden vizsgált mintából 2-2 párhuzamos leoltást végeztünk. A tenyésztést 72 óráig folytattuk. 24, 48 és 72 óras korban a tenyészetek növekedését makroszkóposan ellenőriztük, s a 72 óras tenyészetekből glutáraldehydes fixálással mikroszkópi vizsgálatra mintát vettünk. Ezek növekedési sajátosságait fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk. Könnyen belátható, hogy a különböző tisztítási lépések során kapott nagyszámú frakció ilyen módon való tesztelése rendkívül lassú volt. Mindezek, egy labilis fehérje tisztítása során, együttesen, az izolálást meglehetősen lelassítják. Végül is 1980-ban közöltük a C faktor tisztítását, és a fehérje néhány jellegzetességének leírását (Biró és mtsai, 1980).

A tisztítás lépései során különböző proteáz gátlókat használtunk, hiszen a streptomycesek sokféle extracelluláris proteázt termelnek (lásd alább), amelyek a rendkívül kis mennyiségben termelt C faktor fehérjét elbonthatták volna. A tisztítás kezdeti lépései során, amikor a térfogat még nagy (több liter) volt, csak a metalloproteázokat gátló EDTA-t, majd később, kisebb térfogatok esetén N-etil-maleinimidet (cisztein proteáz gátló) és fenilmetil-szulfonil-fluoridot (szerin proteáz gátló) is használtunk.

A tisztítás első két lépése Whatman P-1 cellulose foszfáton történő ioncsere kromatográfia volt. Az ioncserélőhöz való kikötés pH=4,5 értéken történt, az elúciót pedig magas koncentrációjú pH=6,5 nátrium foszfát pufferrel végeztük. Ezen lépések során a C

faktor kinyerés hatékonysága 100% volt, ami részben a metalloproteázok gátlásának (a teljes proteáz aktivitás 50%-a volt EDTA-val gátolható), részben pedig feltehetően a fermentlében lévő természetes proteáz gátlóknak, illetve az alkalmazott alacsony pH-nak volt köszönhető.

A tisztítás harmadik és negyedik lépése DNS-agaróz affinitás kromatográfia volt. Az eljárást Schaller leírása alapján adaptáltuk (Schaller és mtsai, 1972). A Whatman P-1 ioncserélőről származó biológiailag aktív frakciókat összegyűjtöttük, és dializáltuk 5% glicerinnel tartalmú, 0,01 M pH=7,1 nátrium foszfát pufferrel szemben, s ezt kötöttük a DNS-agaróz oszlopra. Erről a felkötődött fehérjét kálium klorid gradienssel eluáltuk, s a lépést megismételtük. Ebben a lépésben jelentős (90%) volt a veszteségünk, de a kapott termék a későbbi poliakrilamid gél elektroforézisek során egységesnek bizonyult. Érdekesség, hogy a C faktor glicerinnel mentes pufferben nem kötődött a DNS-agaróz oszlopra, ami arra utal, hogy a glicerinnel a C faktor fehérje konformációját befolyásolta, s esetleg még alkalmasabb pufferrel dolgozva ennek a lépésnek a vesztesége is csökkenthető lett volna.

SDS-poliakrilamid gél-elektroforézissel meghatároztuk a fehérje molekulatömegét, ami 34500 Daltonnak adódott. Ez az érték jó egyezést mutat a későbbiekben a fehérje génjének szekvenciája alapján számított értékkel. Poliakrilamid gradiens gél-elektroforézis ugyancsak azt mutatta, hogy a tisztított termék egységes, s a gélből visszaizolált fehérje biológiailag aktív.

Számításokat végeztünk a C faktor hatásosságára. 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 24 órás korban fejti ki, a növekedésnek ebben a stádiumában mintegy 10 molekula C faktor esik genomkvivalensenként. Ezek az adatok mindenképpen a C faktor molekula és a C faktor biológiai hatás rendkívüli hatékonyságára és specifikusságára utalnak.

Összegzésül elmondható, hogy a C faktorról egyértelműen igazoltuk, hogy egy szekrécióra kerülő 34500 Da molekulatömegű fehérje.

3.3. A C FAKTOR GÉN 324 AMINOSAVAT KÓDOL

A fejezethez tartozó saját közlemények:

Birkó Z, Sümegi A, Vinnai A, 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).

Szeszák F, Vitális S, Biró S, Dalmi L. Amino acid sequence homology of factor C produced by *Streptomyces griseus* with regulatory proteins of zinc finger type. Acta Biol Acad Sci Hung 48, 265-273 (1997).

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).

A C faktor fehérje génjének klónozása során a tisztított fehérje N-terminális aminosav szekvenciája alapján tervezett degenerált PCR primerpár által amplifikált DNS fragmentum szekvenálása után a primerek által közrefogott 39 bp-nyi oligonukleotidot használtuk egy mini-génbank screenelésére. Ennek lépései a következők voltak:

a./ Meghatároztuk a folyékony tenyészet felülúszójából izolált, azaz szekretált C faktor fehérje N-terminális 29 aminosavának szekvenciáját, amely a következőnek adódott:

Ala-Val-Pro-Ala-Thr-Lys-Arg-Phe-Ser-Leu-Thr-Glu-Pro-Ser-His-(Asp/Phe)-Leu-Phe-Arg-**His-Ala-Lys-Leu-His-Asp-(Gly/Ala)**-Arg-Val-Gln.

A 16. aminosav (Asp/Phe) és a 26. aminosav (Gly/Ala) nem voltak egyértelműen azonosíthatóak, ezért ezeket a primer tervezés során nem vettük számításba.

b./ PCR primerpár tervezése:

Az aláhúzott és kövéren nyomtatott aminosavak képezték a primerpár tervezésének alapját. Mivel az összes glicin és alanin triplet első bázisa G, a bizonytalan Gly/Ala tripletből egy G-t figyelembe vettünk a reverz primer tervezésekor. Az előremutató (forward) primer öt, a reverz primer pedig két pozícióban volt degenerált. A degenerációkat a streptomycesek kodonhasználata alapján terveztük, amely szerint a streptomycesek 72-75% GC tartalmának megfelelően a tripletok harmadik pozíciójában mintegy 95% gyakorisággal G vagy C található (Bibb és mtsai, 1984).

Ez alapján az alábbi primerpárt terveztük:

Forward primer: 5'-GC(GC)GT(GC)CC(GC)GC(GC)AC(GC)AAG-3'

Reverz primer: 5'-CGTCGT(CG)AGCTT(GC)GCGTG-3'

A zárójelben lévő bázisok az adott pozícióban a degenerációt jelzik.

c./ A C faktor gén 5'-végének amplifikálása a fenti primerpárral, és a felszaporított fragment szekvenálása:

A PCR reakcióban a várt 76 bp fragmentum felszaporodott, melynek szekvenciáját ellenőriztük, s az megfelelt a C faktor ismert N-terminális aminosav szekvenciájának.

d./ A C faktor gén (*facC*) klónozása:

A felszaporított PCR fragmentum szekvenálása alapján ismertté vált a primerek által közrefogott, s a kromoszómális génnel 100%-ban megegyező 39 bp-nyi szekvencia, amelyet digoxigenin jelölés után egy ún. mini-génbank screenelésére használtunk. A mini-génbankot a *facC* génnel hibridizáló, kb. 2,9 kb méretű, gélből visszaizolált *Sac*II kromoszómális DNS fragmentum populációból hoztuk létre pBluescript II KS+ (Stratagene) vektorban, és transzformáltuk *E. coli* XL-1 Blue törzsbe. Az ampicillin rezisztens telepek közül telephibridizáció alapján azonosítottunk egy klónt (pBZ3), amely a későbbi szekvenálás alapján valóban a C faktor fehérje génjének bizonyult.

e./ A C faktor gén azonosítása és analízise:

Az azonosított klónban lévő inszert DNS mindkét szálát szekvenáltuk, s FramePlot 2.2.1 programmal (Ishikawa és Hotta, 1999) analizáltuk. Azonosítottunk egy 975 bp, tipikus *Streptomyces* nyitott leolvasási keretet (ORF), mely a tripletok harmadik pozíciójában 96,9%-ban tartalmazott G vagy C bázist, az átlagos GC tartalma 70,7% volt. Az ORF 324 aminosavat kódol, s az általa meghatározott fehérje számított molekula tömege 34523Da. Az N-terminális aminosav szekvencia analízise egy szekréciós szignál szekvenciát azonosított, melyen belül potenciálisan két szignál peptidáz hasítóhelyet jelölt meg (Ser-Ala-Ala-Ala-/Ala-/Val-Pro-Ala), melyeket / jelöl. Mivel korábban a fehérje N-terminális szekvenciájának meghatározása Ala-Val-Pro- szekvenciát eredményezett, a potenciális hasítóhelyek közül az elsónél történik a hasítás, s a fehérje egy 38 aminosavból álló szignál szekvenciát tartalmaz. Az érett fehérje 286 aminosav hosszúságú és számított molekulatömege 31038 Da, ami jól egyezik a korábban SDS-poliakrilamid gél elektroforézissel meghatározott 34500 Da-nal, főleg ha figyelembe vesszük a fehérje erősen bázikus voltát. A fehérje számított izoelektromos pontja 9,59, ami ugyancsak jól egyezik a korábban kísérletesen meghatározott 9,9 értékkel (Szeszák és mtsai, 1991).

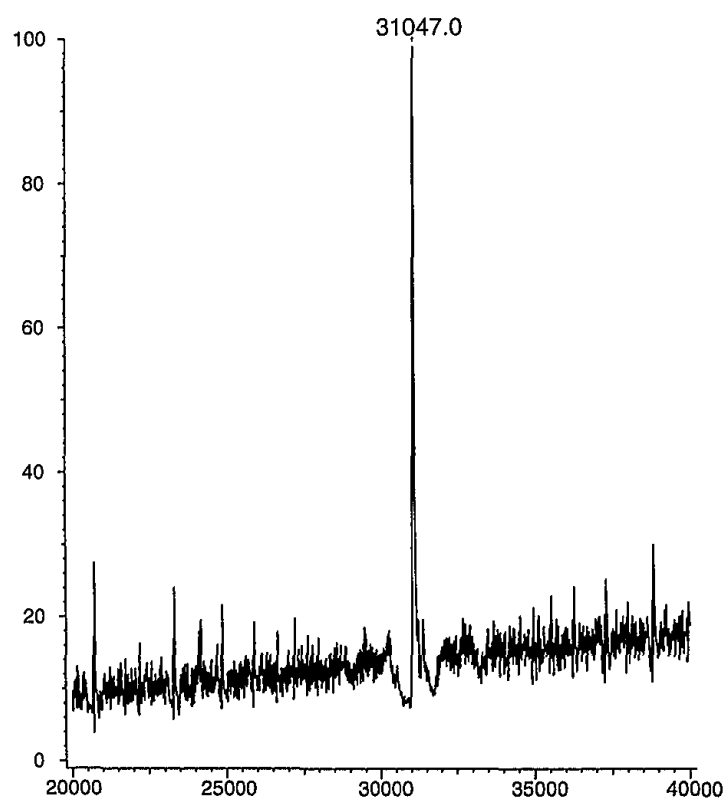
Az érett C faktor fehérje korábban ismert 29 aminosav hosszúságú N-terminális szekvenciája adatbázisokkal összehasonlítva cink-ujj típusú fehérjékkel mutatott homológiát.

Ismert volt az is, hogy a C faktor kötődik egyszálú és kétszálú DNS-hez, továbbá hogy a C faktor citomorfológiai hatása fokozható 10^{-6} M cink ion koncentrációval (Biró, nem közölt adatok).

Ezzel összhangban, a C faktort cink affinitás kromatográfiával tisztítani lehetett, s így tudtuk a legnagyobb specifikus aktivitású fehérje preparátumot előállítani (Szeszák és mtsai, 1997). Ezért korábban feltételeztük, hogy a C faktor egy cink-ujj típusú regulátor. A DNS szekvencia alapján meghatározott aminosav sorrend azonban ezt nem igazolta. Mivel a DNS szekvencia analízise azt mutatta, hogy egy hipotetikus 1 nt inszerció olyan kereteltolást eredményez, hogy a képződő (hasonló molekulatömegű) fehérje 5-6 aminosavnyi távolságban egymástól mintegy 20 hisztidint tartalmaz, bár ebben a leolvasási keretben a triplet használat nem volt tipikus streptomycesekre jellemző, ennek ellenére fontosnak tartottuk a C faktor fehérje tömegspektrometriás vizsgálatát.

f./ A C faktor fehérje tömegspektrometriás vizsgálata:

A C faktor fehérje molekula tömegét tömegspektrometriásan meghatároztuk (Szabó és mtsai, 1999). Ez az érett, szekréciós szignállal nem rendelkező fehérje tömegét 31047 Daltonnak mérte, ami kiváló egyezés a DNS szekvencia alapján számított 31038 Daltonnal (6. ábra.)



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

Ugyanebben a kísérletsorozatban HPLC-ESI- MS-MS készülékkel meghatároztuk a C faktor fehérje 11 triptikus fragmentjének aminosav szekvenciáját, amelyek tökéletesen megfeleltek a DNS szekvencia alapján vártaknak.

Elmondható tehát, hogy a DNS bázissorrend alapján meghatározott fehérje szekvencia helyes. A fehérje cinkkel való aktiválhatósága és cink affinitás kromatográfiával való tisztíthatósága esetlegesen egy másik fehérjével való kölcsönhatásával magyarázható.

g./ Homológ fehérjék keresése adatbázisokban:

A C faktor fehérje aminosav sorrendje 1999-ben egyetlen ismert fehérjével mutatott alacsony fokú homológiát. Ez a *Bacillus subtilis tagC* fehérjeje volt, melyet a teichoinsav bioszintézisben résztvevő fehérjének gondoltak. Mivel a gén expressziója sporuláció specifikus (Mauël és mtsai, 1991; Mauël és mtsai, 1994), ez egy érdekes homológiának tűnt. Később azonban a teichoinsav bioszintézisben való részvételét megkérdőjelezték, s ma, mint „DNA damage inducible” fehérjét (DinC) az SOS regulon részeként tartják számon (Cheo és mtsai, 1991; Cheo és mtsai, 1993). A C faktor fehérjével homológ fehérjét ma már nagy számban ismerünk, s ezeket később tárgyalom. A homológiára vonatkozó rövid megjegyzést itt annak illusztrálására használom, hogy az utóbbi 10 évben milyen elképesztő mennyiségű genomi szekvencia adat halmozódott fel.

A C faktornak streptomycesekben való előfordulását később tárgyalom. Érdekességgént megemlítem, hogy a spekuláció szintjén már 1999-ben felmerült, hogy a C faktor a folyékony táptalajon való spóráképzésben játszhat szerepet, hasonlóan az *ssgA* gén termékéhez (Kawamoto és Ensign, 1995; Kawamoto és mtsai, 1997). Erről a génről később kiderült, hogy az A-faktor regulon része (Horinouchi, 2007). A C faktor pedig helyreállítja egy A-faktor képzésére nem képes mutáns A-faktor termelését, s ezzel együtt az A-faktor regulonba tartozó fehérjék bioszintézisét (Birkó és mtsai, 2007; Birkó és mtsai, 2009).

h./ A C faktor gén szubklónozása *Streptomyces* plazmidba:

A klónozott génnek *Streptomyces* törzsekbe való transzformálásához a gént az *E. coli* plazmid pBZ3 vektorból átvittük *Streptomyces*ben (is) replikálódó plazmidokba. Két különböző plazmidot használtunk erre a célra. Az egyik a pHJL401 plazmid (*E. coli*-*Streptomyces* ingázó vektor) származéka, melybe egy olyan 2,1 kb DNS fragmentumot klónoztunk, amely a teljes *facC* gént és a kódoló régió előtti mintegy 1000 bp-t, illetve a kódoló régió utáni 200 bp-t tartalmazza. Ennek a plazmidnak a kópiaszáma 2-10 sejtenként. A plazmid jele pSGF4.

A nagy kópiaszámú *facC* hordozó plazmid pedig a pWHM3 plazmid származéka, melybe ugyancsak a fenti 2,1 kb DNS fragmentumot szubklónoztuk. Ennek kópiaszáma sejtenként néhány száz. A plazmid jele pSGF5. A pSGF4 és pSGF5 jelű plazmidokban a *facC* saját promoteréről fejeződik ki.

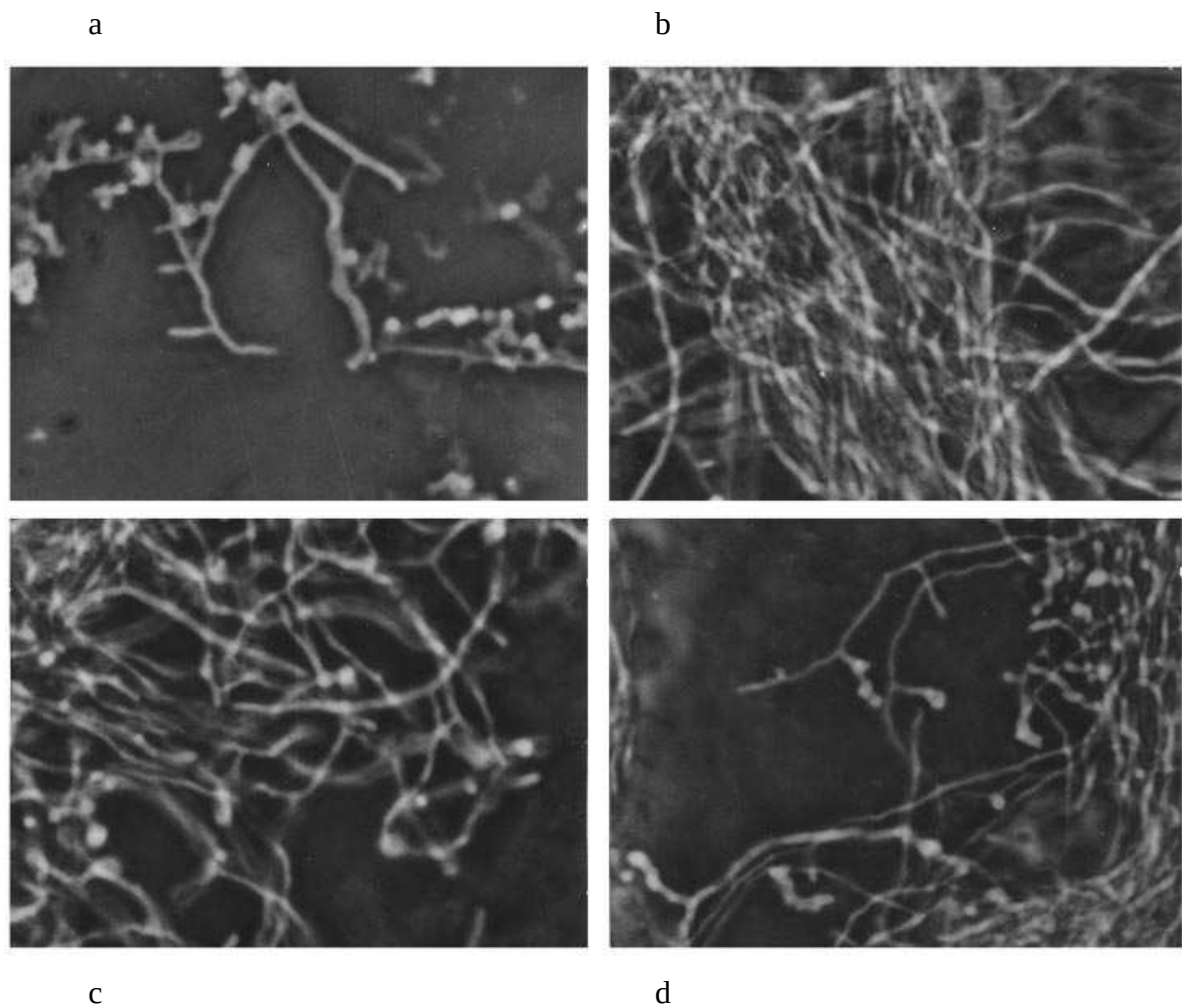
3.4. A KLÓNOZOTT GÉN HATÁSA *S. GRISEUS* 52-1 TÖZSBEN MEGEGYEZIK AZ EXOGÉN HOZZÁADOTT FEHÉRJE HATÁSÁVAL

A fejezethez tartozó saját közlemény:

Birkó Z, Sümegi A, Vinnai A, 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).

A klónozott C faktor gén birtokában kíváncsiak voltunk, hogy a *S. griseus* 52-1 tesztörzsünkben kifejeztetve a gént, van-e hatása a törzs differenciálódására. Ezért vizsgáltuk, a gént hordozó kis kópiaszámú plazmiddal (pSGF4) transzformált tesztörzs növekedését, morfológiáját folyékony tenyészetben. Biológiai tesztrendszerünkben a tesztörzs *S. griseus* 52-1 hosszú, egyenes nem elágazó hifafonalat hoz létre. Spórát, illetve reproduktív, gyakran elágazó, bunkós formájú fonalat nem képez (7b. ábra). A spóra- és reproduktív fonalak képzése a C faktor termelő *S. griseus* 45H törzsre jellemző (7a. ábra). Ehhez nagymértékben hasonló képet kaptunk, ha a *S. griseus* 52-1 törzs tenyészetéhez exogén C faktort adtunk (7c. ábra), de ugyanilyen a növekedése és citomorfológiai képe a C faktor gént néhány kópiában hordozó transzformáns *S. griseus* 52-1 törzsnek is (7d. ábra).

Mindezek alapján feltételeztük, hogy a C faktor a streptomycesek differenciálódásában, feltehetőleg a folyékony tápközegben történő sporuláció iniciációjában játszik fontos szerepet.



7. ábra. A vizsgált *Streptomyces* törzsek 72 órás folyékony tenyészeinek citomorfológiai képe negatív fáziskontraszt mikroszkópi felvételen. (a) *S. griseus* 45H, (b) *S. griseus* 52-1, (c) *S. griseus* 52-1 exogén C faktor adásakor, (d) *S. griseus* 52-1 transzformálva pSGF4 plazmiddal, mely a C faktor gént kis kópiaszámban hordozza. 1700-szoros nagyítás.

3.5. A C FAKTOR GÉN EGYETLEN PROMOTERRŐL, ÉLETCIKLUS FÜGGŐEN FEJEZŐDIK KI

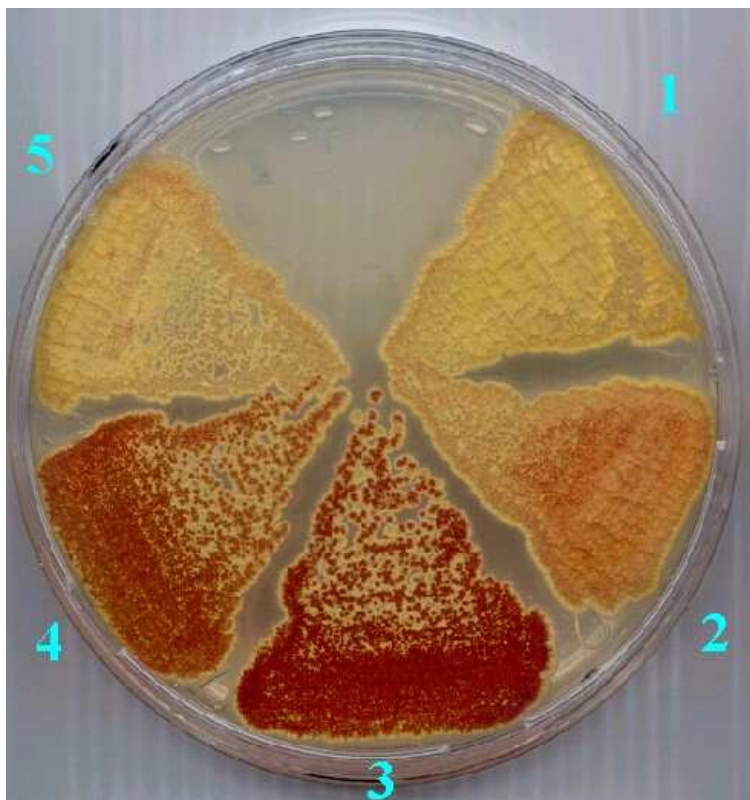
A fejezethez tartozó saját közlemény:

Biró S, Birkó Z, van Wezel GP. 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).

Mivel eddigi adataink arra utaltak, hogy a C faktor a *S. griseus* sejtdifferenciálódásának szabályozásában résztvevő fehérje, vizsgáltuk expresszióját a differenciálódás során, egyrészt *in vivo* a gén promoter régiójának promoter próba vektorba való klónozásával, másrészt a transzkripció kezdetének pontos meghatározására alkalmas S1 nukleáz térképezéssel.

a./ A *S. griseus facC* gén promoterének vizsgálata *S. coelicolor*ban

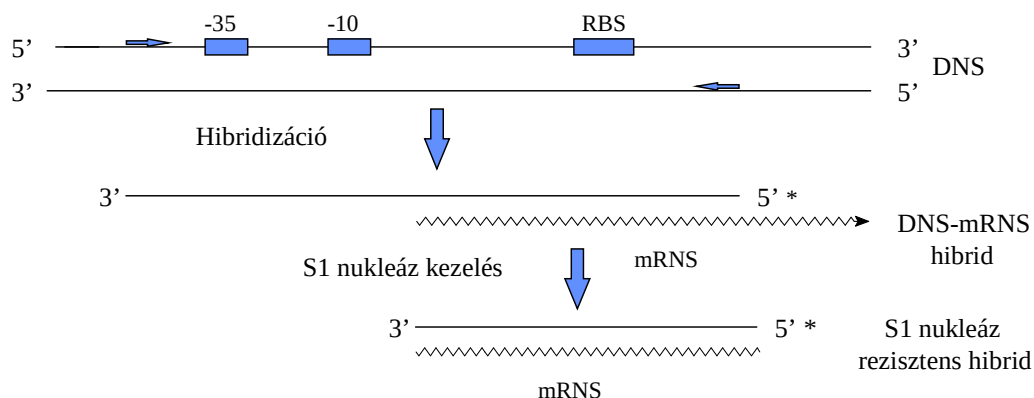
A *facC* promoterét hordozó fragmentum hozzávetőleges elhelyezkedésének meghatározásához a *redD* gént mint riportert tartalmazó pIJ2587 vektort használtuk, amely a piros színű antibiotikum, az undecylprodigiosin transzkripciós aktivátorát kódolja (Narva és Feitelson, 1990). Amennyiben a promoter nélküli *redD* elé promoter szekvenciát klónozzunk a *S. coelicolor* M512 törzsben (M145Δ*redD*, Δ*actII*-ORF4), az RedD termelést és a *red* génklaszter aktiválását, azaz piros pigment termelését váltja ki. A piros pigment termelése teljes mértékben a bevitt promoter működésének függvénye (van Wezel és mtsai, 2000). 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 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 (8. 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.



8. 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.

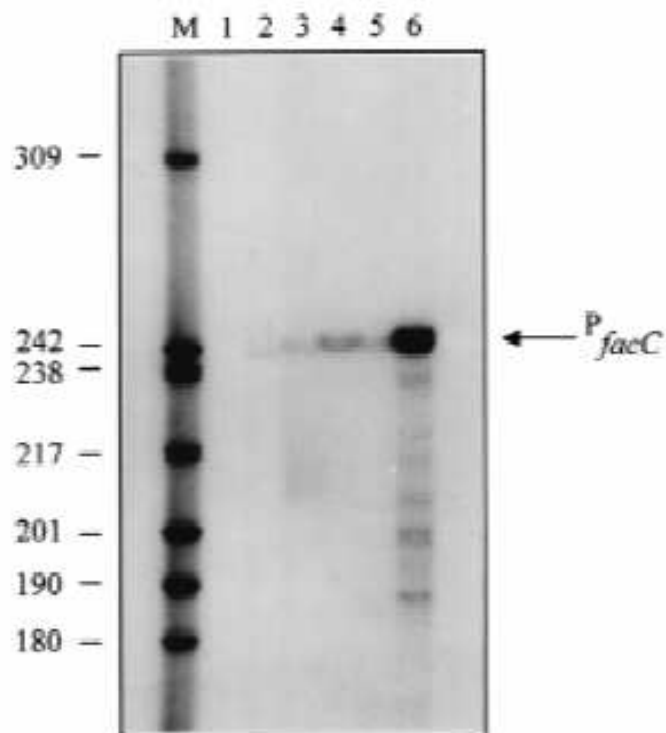
b./ A transzkripció starthely meghatározása S1 térképezéssel

A transzkripció starthely pontos meghatározását S1 nukleáz térképezéssel végeztük. Ehhez a C faktor N-terminálisának első 57 aminosavát kódoló, és az azt megelőző, összesen mintegy 600 bp-nyi, ^{32}P -végjelölt DNS fragmentumot használtuk (9. ábra).



9. ábra. Az S1 nukleáz térképezés vázlata. (RBS = riboszóma kötőhely)

Amennyiben a térképezéshez az mRNS-t trypton-szójakivonaton, vagy minimál folyékony táptalajon nőtt tenyészetből izoláltuk, egyáltalán nem, vagy nagyon gyenge szignált kaptunk, azaz ezekben a tenyészetekben a C faktor gén nem, vagy csak nagyon gyengén íródott át. Mivel az *in vivo* promoter próba kísérlet arra utalt, hogy a C faktor gén a differenciálódás későbbi szakaszában fejeződik ki, s kifejeződése egybeeshet a sporuláció kezdetével, ezért ún. „shift-down” kísérletet végeztünk. A *S. griseus* 45H törzset folyékony trypton-szójakivonaton növesztettük 0,7 OD₅₅₀ értékig, majd minimál táptalajjal kimostuk és szénforrásként mannitolt tartalmazó folyékony minimál táptalajba vittük át. A transzfer időpontjában, s azt követően 30, 60, 120, 240 és 420 perccel mintákat vettünk, és mRNS-t izoláltunk. A transzfer után 60 perccel egy igen gyenge szignál már megjelent, időben lassan erősödött, s igen intenzívvé 420 perc után vált (10. ábra). A tenyészetben a „shift-down” után 60-120 perccel spóraszerű képletek jelentek meg, 4 óra után már érett spórák voltak láthatóak, ami arra utal, hogy a C faktor valóban a sporuláció iniciációjában és/vagy a spóra érésében játszik szerepet, mind folyékony, mind szilárd táptalajon.



10. 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.

A kísérlet alapján azonosítottuk a transzkripció kezdőpontját, s az azt megelőző -35 és -10 promoter régiókat. A -35 régió (TGGACA) nagymértékben megegyezik a konszenzus bakteriális promoter régióval (TTGACA; Hawley és McClure, 1983), melyet *S. coelicolor*-ban a fő (vegetatív) szigma faktor a σ^{hrdB} ismer fel (Brown és mtsai, 1992). A -10 régió (AACGAT) azonban csak alacsony fokú hasonlóságot mutat a konszenzus -10 régióval (TATAAT). Ez arra utalhat, hogy a C faktor promoterét *S. griseus*-ban nem a fő (vegetatív) szigma faktor ismeri fel. Ez megfelelhet a differenciálódásban betöltött szerepének és késői expressziójának.

3.6. A C FAKTOR HELYREÁLLÍTJA A *STREPTOMYCES GRISEUS* NRRL B-2682 TÖRZS KOPASZ MUTÁNSAINAK SPÓRAKÉPZÉSÉT

A fejezethez tartozó saját közlemény:

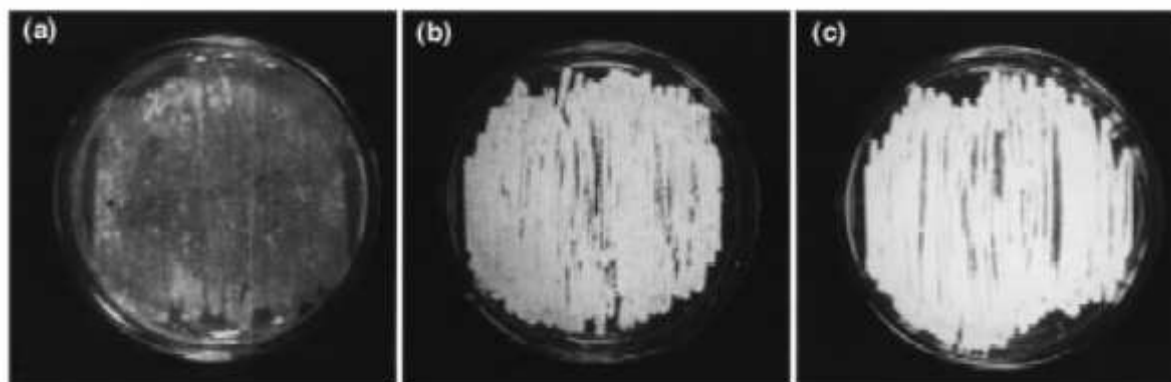
Biró S, Birkó Z, van Wezel GP. Transcriptional and functional analysis of the gene for factor C, an extracellular signal protein involved in cytodifferentiation of *Streptomyces griseus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 78, 277-285 (2000).

Mivel intézetünk, a streptomycesek szilárd és folyékony tenyészetben történő spóráképzésének tanulmányozása kapcsán a C faktor és A-faktor hatásával és esetleges összefüggésükkel egyaránt foglalkozott, a C faktor gén birtokában kézenfekvő volt a két útvonal esetleges kölcsönhatásának vizsgálata. Ezért vizsgáltuk a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs két kopasz mutánsának és a C faktor gént kis és nagy kópiaszámban tartalmazó transzformánsaiknak a fenotípusát (11. ábra). Az egyik mutáns (B-2682 AFN) A-faktor képzésére nem képes, míg a másik (B-2682 AFP) A-faktor termelése ellenére kopasz (Penyige, nem közölt adatok). A szülői *S. griseus* NRRL B-2682 törzs szilárd és folyékony tenyészetben egyaránt gyorsan és jól spórázik, és természetesen A-faktort termel.

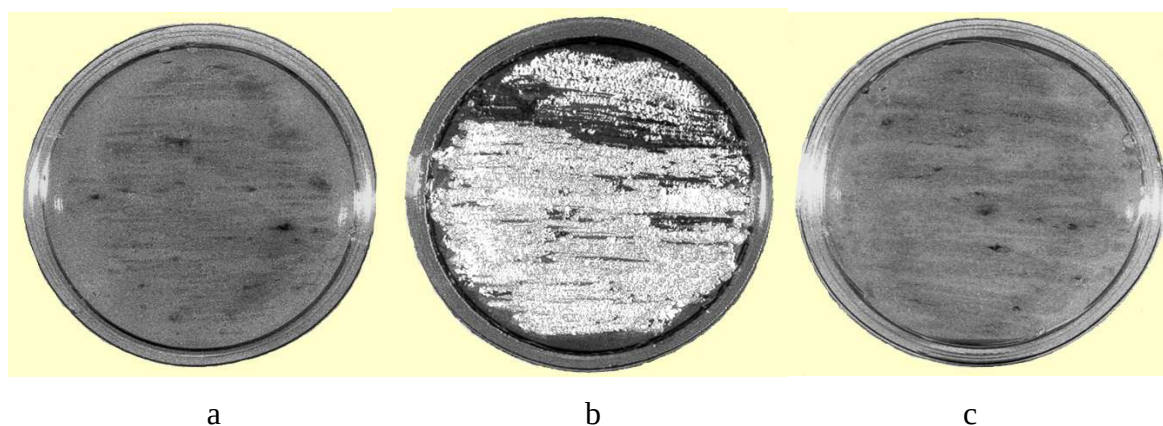
A kis kópiaszámú *facC* hordozó plazmid a pSGF4, melynek kópiaszáma 2-10 sejtenként.

A nagy kópiaszámú *facC* hordozó plazmid a pSGF5, melynek kópiaszáma néhány száz sejtenként.

Amint a 11. ábrán látható, a B-2682 AFN mutánsba transzformált *facC* kis és nagy kópiaszámban egyaránt helyreállította a törzs spóráképzését. Kissé eltérő a helyzet a B-2682 AFP törzs esetében. Ennek spóráképzését a kis kópiaszámban bejuttatott C faktor gén helyreállította, a nagy kópiaszámú nem (12. ábra). A transzformánsok spóráképzése bőséges, s a spórák mikroszkóposan nem különböztethetők meg a vad típusú törzs spóráitól. Ez különösen azért érdekes, mert sem a mutánsokban, sem a *S. griseus* NRRL B-2682 vad típusú törzsben nincs C faktor gén. Ez a C faktor és A-faktor regulációs útvonalak közötti kölcsönhatásra utal.



11. ábra. (a) A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs A-faktort nem termelő kopasz mutánsának (B-2682 AFN) és (b) a C faktor gént kis kópiaszámban (B-2682 AFN/pSGF4) illetve (c) nagy kópiaszámban (B-2682 AFN/pSGF5) hordozó transzformánsainak növekedése szilárd táptalajon 7 napos korban.



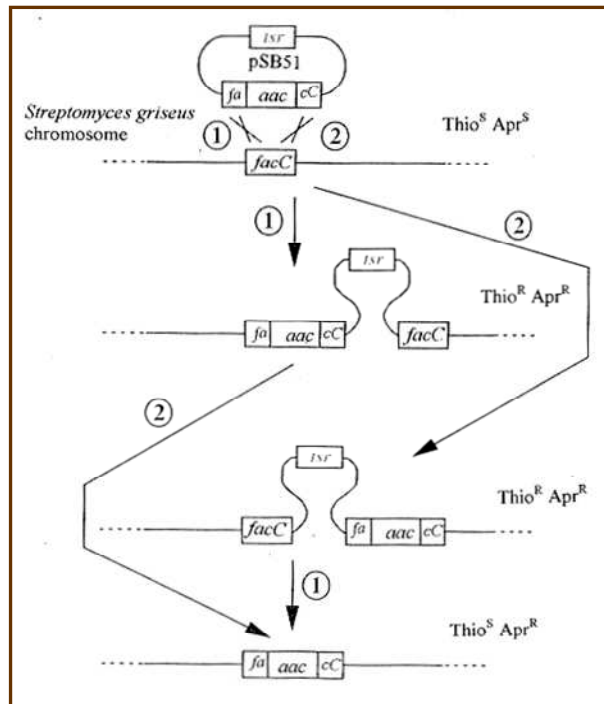
12. ábra. (a) A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs A-faktort termelő kopasz mutánsának (B-2682 AFP) és (b) a C faktor gént kis kópiaszámban (B-2682 AFP/pSGF4) illetve (c) nagy kópiaszámban (B-2682 AFP/pSGF5) hordozó transzformánsainak növekedése szilárd táptalajon 7 napos korban.

3.7. A C FAKTOR GÉN DELÉCIÓJA KOPASZ (BLD) FENOTÍPUST EREDMÉNYEZ

A fejezethez tartozó saját közlemény:

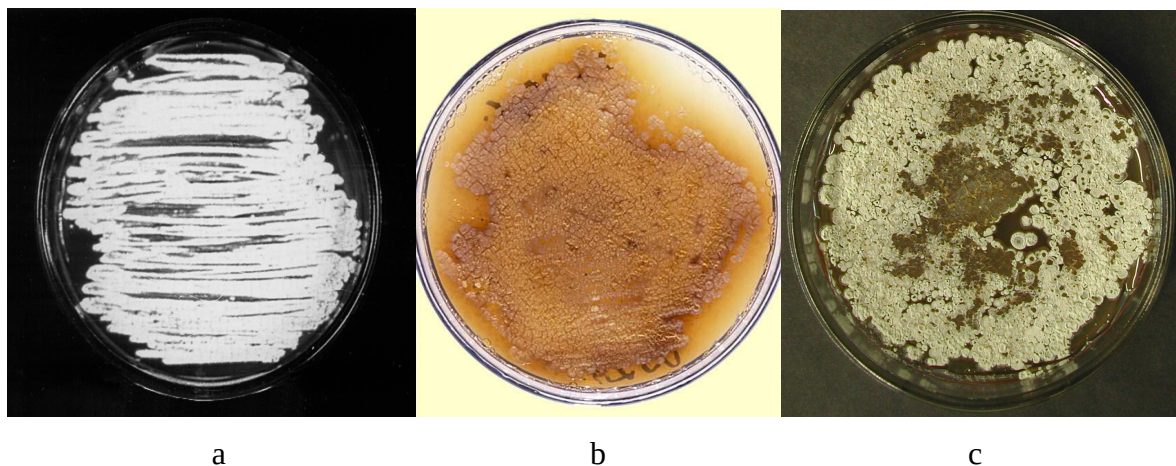
Kiss Z, Dobránszki J, Hudák I, Birkó Z, Vargha G, Biró S. The possible role of factor C in common scab disease development. Acta Biol Acad Sci Hung, közlésre elfogadva.

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 (inszerciós inaktiválás) C faktort nem termelő „null” mutánst kívántunk előállítani oly módon, hogy a C faktor génben lévő *Sma*I hasító helyre a pHP45Ωaac vektorból származó, apramycin (Apr) rezisztenciát kódoló aminoglikozid acetiltranszferáz gént [*aac*(3)IV], mint szelekciós markert beültetjük (Prentki és Hirsch, 1984), s ezt egy thioestreptont (Thio) mint második markert tartalmazó, *Streptomyces*ben nem replikálódó *E. coli* vektorba juttatjuk be. Ennek a plazmidnak a jele pSB51. Ezt technikailag az *aac* génnek az *E. coli-Streptomyces* ingázó vektorban lévő *facC* génbe (pSGF4) való klónozásával, s ezt követően az SCP2 *Streptomyces* replikációs origónak az eltávolításával oldottuk meg. Ezzel a plazmiddal transzformálva a C faktort termelő *S. griseus* 45H törzset, a plazmid csak úgy maradhat fenn, ha integrálódik homológ rekombinációval a kromoszómális C faktor génbe. A második (thioestrepton) marker felhasználható a kettős cross-over termék azonosítására, amelyben a genomi C faktor gént az *in vitro* megszakított gén lecseréli (13. ábra). Azok a telepek, amelyekben a kettős crossing over lejátszódott, Apr^R és Thio^S fenotípusúak.

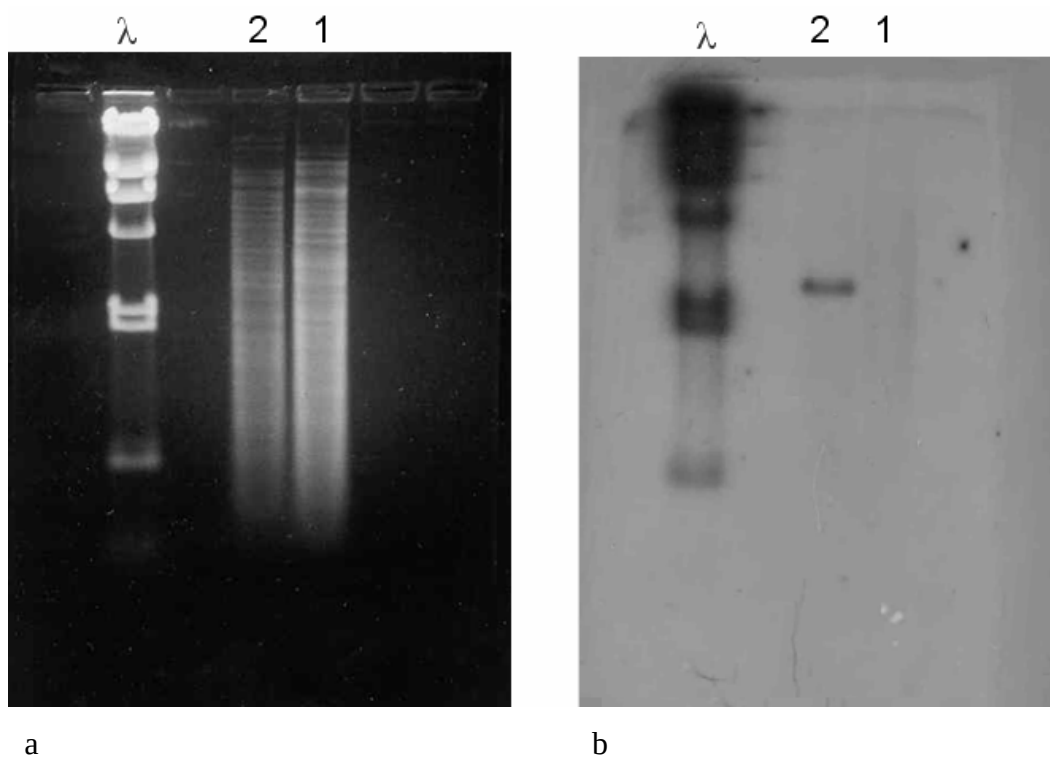


13. ábra. A C faktor „null” mutáns génmegszakítással történő előállításának tervezett sémája.

Az így előállított mutáns, várakozásunknak megfelelően kopasz fenotípusú (14.b ábra), ami arra utal, hogy a C faktor a szilárd táptalajon folyó normál sporulációban elengedhetetlenül fontos. A kopasz fenotípusú *S. griseus* 45H mutáns törzs sporulációját a *facC* génnek pSGF4 kis kópiaszámú plazmidon való bejuttatása helyreállította (14c. ábra). Érdekes módon azonban, amikor a génmegszakítás megtörténtét Southern hibridizációval ellenőriztük, kiderült, hogy az nem a tervezett módon valósult meg. Tíz függetlenül felszedett és analizált kopasz fenotípusú telep egyike sem adott ugyanis az alkalmazott jelölt C faktor próbával szignált, azaz a várt homológ rekombináció helyett a gén deléciója játszódtott le (15. ábra). Ezért a törzset *S. griseus* 45H $\Delta facC$ -nek neveztük el.



14. ábra. A *S. griseus* 45H (a), a *S. griseus* 45H $\Delta facC$ (b), és a *S. griseus* 45H $\Delta facC/pSGF4$ (c) törzsek növekedése szilárd táptalajon.



15. ábra. A *S. griseus* 45H és *S. griseus* 45H $\Delta facC$ törzsek Southern hibridizációja a ^{32}P -jelölt C faktor génnel. (a) A kromoszómális DNS *SacII* enzimmel emésztve és etidium bromiddal festve. (b) Autoradiogram a hibridizáció után. λ , *HindIII* enzimmel emésztett λ fág DNS molekulaméret marker, 1, *S. griseus* 45H $\Delta facC$, 2, *S. griseus* 45H. A kísérletben ^{32}P -jelölt fág DNS-sel is hibridizáltunk.

3.8. AZ *E. COLI* BAN KIFEJEZTETETT C FAKTOR FEHÉRJE BIOLÓGIAILAG AKTÍV

A fejezethez tartozó saját közlemény:

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 Ni²⁺ affinity column chromatography. FEMS Microbiol Lett 196(2), 223-227 (2001).

A C faktor fehérjét a *S. griseus* 45H törzs az életciklus egy meghatározott szakaszában, adataink szerint a reproduktív növekedési fázis kezdetén termeli. Szerepe mind folyékony, mind pedig szilárd táptalajon nőtt tenyészetekben a spóráképzés iniciációjában és/vagy a spóra érésében van. Mint endogén autoregulátor, az A-faktorhoz hasonlóan rendkívül specifikus, és hatását igen alacsony koncentrációban (1 ng) fejti ki. Éppen ezért, koncentrációja a termelő törzs fermentlevében rendkívül alacsony, ami nagy mennyiségben történő izolálását nehézkessé teszi. A C faktor génjének klónozása, szekvenálása és transzkripciójának vizsgálata új lehetőséget teremtett, hiszen a klónozott gént elvileg lehetséges más *Streptomyces* törzsben, nagy kópiaszámú plazmidról is kifejeztetni és izolálni.

Ehhez PCR amplifikálással létrehoztuk a C faktort az N-terminális szekréciós szignál szekvenciájával, és a C terminális végén a fehérje tisztítását megkönnyítő hexa-hisztidin farokkal kódoló DNS fragmentumot. Klónozó vektornak a pIJ702 plazmidot választottuk (Katz és mtsai, 1983), amely korábbi kísérleteinkben a *S. griseus* 45H, *S. griseus* 52-1 törzseinket, és a *S. lividans* TK64 jelű törzset egyaránt transzformálta. Ezt a vektort 1983-ban történt megszerkesztése óta több száz *Streptomyces* gén kifejeztetésére használták sikeresen. A gént a pIJ702 plazmid melanin termelésért felelős *melC* operon promoterének kontrollja alá helyeztük a *melC1* gén helyére, annak transzlációs start kodonja által meghatározott leolvasási keretben. A plazmid jele pSB9. Azt reméltük, hogy a plazmidot hordozó transzformáns *Streptomyces* törzsekben a C faktor termelése a termelő törzsének sokszorosa lesz, hiszen a pIJ702 plazmid kópiaszáma sejtenként néhány száz.

A hisztidin farokkal ellátott C faktor gént hordozó plazmidot a C faktor termelő *S. griseus* 45H, és a C faktort nem termelő *S. griseus* 52-1 és *S. lividans* TK64 törzsekbe próbáltuk transzformálni. Meglepetésünkre, annak ellenére, hogy a pIJ702 plazmid mindhárom törzset transzformálta, a *facC* gént hordozó változatát nem tudtuk a *S. griseus* 45H törzsbe bejuttatni. Ez megfelelt annak a korábbi tapasztalatunknak, mely szerint egy másik nagy kópiaszámú replikonon alapuló vektorban sem tuduk a gént a törzsbe

transzformációval bejuttatni. Kiskópiaszámú plazmidon a bejuttatás sikerült, de a transzformánsok nem voltak életképesek (Biró, nem közölt adatok).

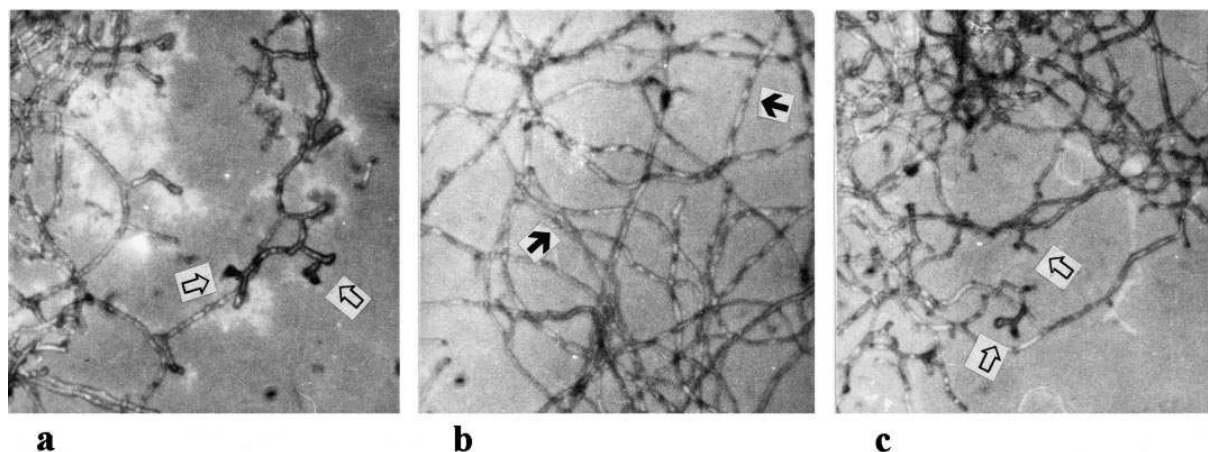
A pSB9 plazmiddal sikeresen transzformáltuk a *S. griseus* 52-1 és *S. lividans* TK64 törzseket. Várakozásunkkal szemben azonban ezekben a transzformánsokban a C faktor termelése alacsony maradt. Érdekes módon a fermentlében egyáltalán nem, a feltárt sejtextraktumban pedig csak Ni-NTA affinitás oszlopon való kikötés és elúció után volt detektálható SDS-PAGE-Western blot immunofestéssel.

Ezeknek az eredményeknek a magyarázata nem egyszerű. Különösen azért nem, mivel kísérleteink publikálása után néhány évvel vált ismertté, hogy a pIJ702 plazmid *melC* génjének az AdpA fehérje a pozitív regulátora (Zhu és mtsai, 2005). A *S. griseus* 52-1 törzs ugyanis termel A-faktort, s feltehetőleg az A-faktor regulon normálisan működik. Az egyetlen lehetséges magyarázat, hogy a sejtek nem tolerálják a *facC* nagyfokú expresszióját, ami feltehetőleg magas C faktor koncentrációt eredményez. Erre utal az a korábbi tapasztalatunk, hogy a külsőleg a *S. griseus* 52-1 törzshöz adott C faktor, koncentráció-függő módon, részleges növekedésgátlást okoz, sőt nagy koncentráció esetén (1000 ng ml^{-1}) a teljes növekedésgátlás is bekövetkezik.

Ekkor határoztunk úgy, hogy megpróbálkozunk a C faktor gén kifejeztetésével olyan heterológ gazdában, melyben a C faktor fehérje nem funkcionál. Ehhez gazdaként *E. coli* sejtet, vektorként pedig a Qiagen pQE70 expressziós plazmid vektorát választottuk. A plazmidba a C faktor érett formáját, a szekréciós szignál nélküli fehérjét kódoló DNS fragmentumot klónoztuk, mely a C-terminális végén hexa-hisztidin farkat is tartalmaz. Technikai okokból, a fehérje N-terminális vége a természetes Ala-Val-Pro- szekvencia helyett két aminosavval hosszabb, Met-Pro-Ala-Val-Pro- aminosavakkal kezdődik, de feltételeztük, hogy ez nem befolyásolja a fehérje biológiai aktivitását. A plazmidban (melynek jele pSB90) a C faktor gén az igen erős T5 fág promoterről íródik át, s az indukálható *lac* operátor kontrollja alatt áll, ami nagymértékű expressziót biztosít. A késői exponenciális fázisban lévő sejteket IPTG-vel indukáltuk, s mintegy 4 óra múlva a sejtek feltárásával az oldható citoplazmatikus frakcióból a C faktort Ni-NTA affinitás kromatográfiás oszlopra kötöttük és imidazol koncentráció gradienssel eluáltuk.

A tisztított fehérjét egérből származó, a hisztidin farkat specifikusan felismerő monoklonális antitesttel és anti-egér IgG-alkalikus foszfatázzal konjugált másodikkal, illetve C faktor ellenes monoklonális antitesttel (Szeszák és mtsai, 1990) egyaránt detektáltuk. Ezzel az eljárással egyetlen tisztítási lépésben tipikusan 5-10 mg, 90-95%-os tisztaságú C faktor fehérjét nyertünk 1 liter *E. coli* tenyészetből. Az, hogy a fehérjét mind a C faktor

ellenes, mind pedig a hisztidin farkok ellenes antitest felismerte arra utal, hogy az így tisztított fehérje feltehetőleg megfelelő konformációval rendelkezik. Erről a fehérjének a biológiai tesztrendszerünkben történő vizsgálatával is meggyőződünk. Amint a 16. ábrán látható, az *E. coli* tenyészetből izolált, C-terminális végén hisztidin farkat, N-terminális végén pedig két extra aminosavat hordozó C faktor biológiai hatása teljes mértékben megegyezik a *S. griseus* 45H törzsből izolált C faktor hatásával.



16. ábra. A vizsgált *Streptomyces* törzsek 72 órás folyékony tenyészeinek citomorfológiai képe negatív fáziskontraszt mikroszkópi felvételen. (a) C faktor termelő *S. griseus* 45H, (b) tesztörzs *S. griseus* 52-1, (c) *S. griseus* 52-1 *E. coli*ban termelt, exogén, C-terminálisan hisztidin farkazott C faktor adásakor. A nyilak a gyakran elágazó, spóráképző hifafonalakra (a és c ábra), illetve az elágazást nem tartalmazó jellegzetes vegetatív fonalakra (b ábra) mutatnak. 1700-szoros nagyítás.

A fehérje specifikus aktivitása ugyancsak megegyezik a *S. griseus* 45H törzsből nyert fehérje specifikus aktivitásával, hiszen már 0,5 ng fehérje kiváltotta a jellegzetes citomorfológiai hatást.

A C faktor a *S. griseus* 45H törzsben egy ún. Tat szekréciós szignállal rendelkezik. A Tat szekréciós útvonalra az jellemző, hogy a fehérjét, általában valamely kofaktorukkal együtt, a sejtben kialakult háromdimenziós térszerkezetük megtartásával juttatja ki (Berk és mtsai, 2005). Az a tény, hogy az *E. coli*ban kifejeztetett fehérje biológiailag aktív, valószínűleg arra utal, hogy térszerkezete, megfelelő miliőben, spontán is ki tud alakulni.

3.9. A C FAKTOR INDUKÁLJA AZ A-FAKTOR REGULONT *STREPTOMYCES GRISEUS* NRRL B-2682 TÖRZSBEN

A fejezethez tartozó saját közlemény:

Birkó Z, Bialek S, Buzás K, Szájli E, Traag BA, Medzihradszky KF, Rigali S, Vijgenboom E, Penyige A, Kele Z, van Wezel GP, Biró S. The Secreted Signalling Protein Factor C Triggers the A-factor Response Regulation in *Streptomyces griseus*. Mol Cell Proteomics 6.7, 1248-1256 (2007).

Igen meglepő és érdekes az a 3.6 fejezetben leírt kísérleti eredményünk, mely szerint a klónozott C faktor gén helyreállítja olyan *S. griseus* kopasz törzsek normál sporulációját, amelyek C faktor génnel egyáltalán nem rendelkeznek. Ez az eddig ismert két, szerkezetében erősen eltérő autoregulátor, az A-faktor és a C faktor általi szabályozás komplex kölcsönhatására utal. A C faktor hatásának, a szabályzási útvonalak kölcsönhatásának jobb megismerése, a sejtek közötti kommunikáció, s az extracelluláris reguláció mechanizmusának felderítése érdekében extracelluláris proteomikai összehasonlító vizsgálatokat végeztünk. A kísérletekben három *S. griseus* törzs, a vad típusú, jól spórázó és A-faktort termelő *S. griseus* NRRL B-2682 jelű törzset (B-2682), annak kopasz, A-faktort nem termelő *S. griseus* NRRL B-2682 AFN jelű mutánsát (B-2682 AFN), s a mutáns olyan *facC* transzformánsát vizsgáltuk, mely a *facC* gént kis kópiaszámban tartalmazta, s normál sporulációja helyreállt. Ez utóbbi törzs jele *S. griseus* NRRL B-2682 AFN/pSGF4 (B-2682 AFN/pSGF4).

Kísérleteink elkezdésében szerepet játszott az a tény, hogy tudtunk a *S. griseus* genomi szekvenálás előrehaladott voltáról, s ígéretünk volt arra, hogy az hamarosan hozzáférhető is lesz. Később kiderült, hogy ez a vártnál sokkal később, csak 2008-ban, proteomikai eredményeink egy részének publikálása után történt meg. A kísérletek eredményének kiértékelését ez a tény nehezítette, hiszen csak a *S. coelicolor* és *S. avermitilis* adatbázisok álltak rendelkezésre, s egyetlen aminosav csere már meggátolta a *S. griseus* ortológ fehérjék triptikus fragmentumainak iontömeg szerinti azonosítását. 2D-gélelektroforézissel, majd a gélek szemikvantitatív kiértékelésével (PDQuest 2D analysis software, BIORAD) azt vizsgáltuk, melyek azok a fehérjék, amelyeknek szintézise a kopasz mutánsban szignifikánsan eltér a vad típusú törzsből észlelt szinttől, s amelyek szintje a transzformánsban visszaáll a vad típus szintjére. Szignifikánsnak az eltérést akkor tekintettük, ha a fehérje szintek közötti különbség legalább kétszeres volt. Azokat a fehérjéket, melyek a fenti kritériumnak megfeleltek, a gélből kivágtuk, és triptikus emésztés után MALDI-TOF-MS analízissel

próbáltuk azonosítani. Összesen 50 fehérjét vizsgáltunk, melyek közül 9 volt egyértelműen azonosítható (1. táblázat). Ezek közül 6 a kopasz mutánsban (B-2682 AFN) 72 órás tenyészetben egyáltalán nem volt kimutatható, s 96 órás korban is csak némelyik mutatott igen alacsony szintű expressziót, azaz expresszióra egyáltalán nem, vagy csak jelentős késéssel kerülnek. Ezek a következők voltak: tripszin-szerű proteáz (SprU; Kato és mtsai, 2005); cink karboxipeptidáz prekursor (Cpase SG; Narashi, 1990); aminopeptidáz (SGAP; Maras és mtsai, 1996); az *sprA* gén terméke a streptogrizin A prekursor, kimotripszin-szerű proteáz (SGPA; Tomono, 2005a); cink metallo-endopeptidáz (SgmA; Kato és mtsai, 2002); a streptomycin bioszintézisben résztvevő NADP-függő oxido-reduktáz (StrU; Tomono és mtsai, 2005b).

Az SprU, SGPA, SgmA és StrU fehérjéket korábban az AdpA regulon által szabályzott fehérjeként leírták (Ohnishi és mtsai, 2005). A Cpase SG pedig a *Bacillus sphaericus* sporulációs cink peptidázához (Hourdou és mtsai, 1993) nagy mértékben hasonló, ami ugyancsak a sporulációban betöltött szerepre utal. Az *sprA*, *sgmA* és *sprU* génekről ugyancsak kimutatták, hogy a növekedés késői szakaszában íródnak át (Kato és mtsai, 2005; Tomono és mtsai, 2005a; Kato és mtsai, 2002). Ezeknek a hidrolázoknak a differenciálódás során a szubsztrátmicélium lizálásában, s ezáltal a képződő légmicélium tápanyaggal való ellátásában lehet szerepe (Miguélez és mtsai, 1999). Ugyancsak érdekes a 3.11 fejezetben tárgyalt StrU fehérje expressziójának fokozása, mivel ez a fehérje ugyancsak AdpA regulon által szabályzott, s a streptomycin bioszintézisben vesz részt.

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. Ezek közül a karboxi-peptidázt kódoló *scpD*, az aminopeptidázt kódoló *sgaP*, a foszfát kötő fehérjét kódoló *pstS* és a szuperoxid dizmutázt kódoló *sodF* génekről nem volt ismert, hogy az AdpA regulonhoz tartoznak.

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

ID No.	SSP ^a		Adatbázis azonosító	Fehérje jelölése	Elnevezés	Egyezés ^b	Lefedettség ^c	MW ^d	PSD vagy CID ^e megerősítés
	72 h	96 h							
1	9301	9301	BAD24662	SprU	Tripszin-szerű szerin proteáz	11/24	28%	26 kDa	¹⁰³ VLQAPGYNGTGKDWALIK ¹²⁰
2	5403	5503	CAA46635	Cpase SG	Karboxi-peptidáz	27/34	41%	49 kDa	⁴⁰⁵ SASGGGFYPPDEVIER ⁴²⁰
3	4701	4603	BAD67179	SGAP	Amino-peptidáz	15/28	37%	36 kDa	²⁷⁹ WGGTAGQAFDR ²⁸⁹
4	0102	0102	CAA01746	SGPA	Proteáz A	6/21	46%	18 kDa	⁴⁷ TGTSFPNNNDYGIIR ⁶⁰
5	3801	4701	BAC21011	SgmA	Metallo-endo-peptidáz	9/17	13%	70 kDa	³¹⁸ SGIRGDGVGAYSR ³³⁰
6	4202	4302	CAH94303	StrU	NAD(P) függő oxidoreduktáz	13/14	31%	45 kDa	³⁹⁸ DSVLGYADVTLPGR ⁴¹²
7	2402	3501	CAB65418	PstS	Foszfát kötő fehérje	18/47	38%	39 kDa	³⁵³ ILTDAGYAPIPAEINAK ³⁶⁹
8	3201	4201	AAD30139	SodF	Szuperoxid dizmutáz	19/36	37%	23 kDa	¹²¹ AAATTQGSGWGVLAYEPVSGK ¹⁴¹
9	4201	4203	AAD30139	SodF	Szuperoxid dizmutáz	13/35	34%	23 kDa	⁵² DKEAWGAINGLQK ⁶⁴

a A PDQuest program által automatikusan adott azonosító szám

b Az azonos és észlelt triptikus fragmentek száma

c Szekvencia lefedettség

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

e PSD vagy CID analízissel megerősített szekvenciák.

2. táblázat. Cisz elhelyezkedésű AdpA fehérje-kötő szekvenciák a mutánsban eltérő expressziót mutató fehérjék génjei előtti régióban

ID	A gén NCBI azonosítója	Gén	A fehérje neve	cis szekvencia	Pozíció ^b	Score	Megerősítés ^c
1	AB182576	<i>sprU</i>	Tripszin-szerű szerin proteáz	TGGCCGAAAA	- 300	6.84	Kato és mtsai, 2005
2	X65719	<i>scpD</i>	Karboxipeptidáz	TGGCCGGAAC	-98	8.23	<i>in silico</i> adat
3	AB125217	<i>sgaP</i>	Aminopeptidáz	CGGCCGGATC	- 72	7.51	<i>in silico</i> adat
				TGTCCGGTTT	- 171	7.23	
4	A24972	<i>sprA</i>	Proteáz A	AGGCCGGATT	- 149	6.59	Tomono és mtsai, 2005a
				TTGCTACCTT	- 382	0.62	
5	AB085745	<i>sgmA</i>	Metallo-endorpeptidáz	TGGCCGGTTT	-100	8.89	Kato és mtsai, 2002
				TGGCCAGATT	-300	8.56	
6	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	
7	AJ243674	<i>pstS</i>	Foszfát-kötő fehérje	CGTCCGAAAT	- 107	4.59	<i>in silico</i> adat
				CGGCGGCTTC	-130	4.48	
8,9	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.

A foszfát-kötő fehérje prekursor PstS (Diaz és mtsai, 2005) és a szuperoxid dizmutáz (Folcher és mtsai, 2001) két izoformájának expressziója (melyek poszttranszlációs módosítás eredményei) a kopasz mutánsban (B-2682 AFN) magasabb volt, mint a vad típusú törzsben (B-2682), vagy a mutáns *facC* transzformánsában (B-2682 AFN/pSGF4). Mindkét fehérjéről ismert a differenciálódásban betöltött szerepe. A *pstS* mutánsok morfogenezise felgyorsul (Diaz és mtsai, 2005), a *sodF* pedig *S. pristinaespiralis* törzsekben az A-faktor homológ γ -butirolakton regulációja alatt áll (Folcher és mtsai, 2001).

További közös tulajdonságuk ezeknek a fehérjéknek, hogy többségük (Cpase SG, SGAP, SgmA, StrU, SodF) kofaktort igényel működéséhez, ami leggyakrabban cink, továbbá szekréciójuk az ún. Tat (twin arginine translocation pathway) útvonalon megy végbe (Cpase SG, SGAP, SGPA, SgmA, StrU, PstS). Ez a szekréciós út a fehérjéket kofaktorukkal együtt háromdimenziós térszerkezetük megtartása mellett juttatja át a membránon (Lee és mtsai, 2006). Egyébként maga a C faktor fehérje is hatékonyan köt cinket (Szeszák és mtsai, 1997), s biológiai aktivitása cinkkel fokozható, továbbá a sejtből való kijutása is valószínűleg a Tat útvonalon megy végbe (Chater és mtsai, közlésre elfogadva).

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

A fejezethez tartozó saját közlemény:

Birkó Z, Bialek S, Buzás K, Szájli E, Traag BA, Medzihradszky KF, Rigali S, Vijgenboom E, Penyige A, Kele Z, van Wezel GP, Biró S. The Secreted Signalling Protein Factor C Triggers the A-factor Response Regulation in *Streptomyces griseus*. Mol Cell Proteomics 6.7, 1248-1256 (2007).

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. Ennek vizsgálatára két, egymástól teljesen független utat választottunk: az A-faktor biológiai detektálását (Ochi, 1987) és az A-faktor tömegspektrometriás detektálását és mennyiségi meghatározását. A biológiai detektálásban tesztörzsként a *S. griseus* HH1 (Horinouchi és mtsai, 1984) és a *S. griseus* B-2682 AFN törzseket használtuk.

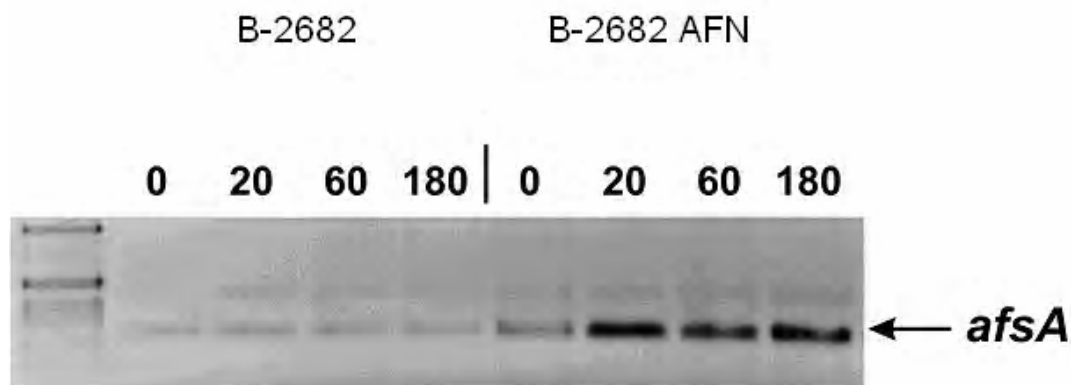
Az autentikus A-faktor preparátum (Funakoshi Co.Ltd. Code number KA106) és a *S. griseus* B-2682 valamint a B-2682 AFN/pSGF4 transzformánsból nyert sejtexteraktum egyaránt helyreállította a *S. griseus* HH1 és a *S. griseus* B-2682 AFN mutáns spóráképzését. A *S. griseus* 45H sejtexteraktum egyik törzs esetén sem volt hatással a sejtdifferenciálódásra. Ezek az eredmények azt sugallták, hogy a *facC* gén helyreállította a *S. griseus* B-2682 AFN törzs A-faktor termelését.

Ezt a feltételezésünket megerősítette az autentikus A-faktor, valamint a vizsgált törzsek sejtexteraktumának 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 sejtexteraktumban; Birkó és mtsai, 2007) 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.

Az A-faktor bioszintézisre vonatkozó hipotézis (Kato és mtsai, 2007) szerint abban az egyetlen, a bioszintézisre specifikus gén, az *afsA* (Horinouchi és mtsai, 1989). Annak eldöntésére, hogy az A-faktor szintézis elmaradása a *S. griseus* B-2682 AFN mutánsban az *afsA* 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 (17. ábra). 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.



17. 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.

3.11. A C FAKTOR FOKOZZA A *S. GRISEUS* STREPTOMYCIN TERMELÉSÉT

A fejezethez tartozó saját közlemény:

Birkó Z, Bialek S, Buzás K, Szájli E, Traag BA, Medzihradszky KF, Rigali S, Vijgenboom E, Penyige A, Kele Z, van Wezel GP, Biró S. The Secreted Signalling Protein Factor C Triggers the A-factor Response Regulation in *Streptomyces griseus*. Mol Cell Proteomics 6.7, 1248-1256 (2007).

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 és B-2682 törzsek, bár eltérő mennyiségben, streptomycint termelnek. Ebben a kísérletsorozatban arra kerestük a választ, hogy ezeknek a törzseknek a C faktort 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. Az antibiotikum koncentrációt agar diffúziós módszerrel, szűrt szójás táptalajon növesztett 48, ill. 72 órás tenyészetek fermentlevéből határoztuk meg.

Az első sorozatban *S. griseus* 45H törzsben, melyből a C faktor tisztítása történt, a C faktort nem termelő *S. griseus* 52-1 törzsben és annak két transzformánsában: a C faktort kis kópiaszámban tartalmazó *S. griseus* 52-1/pSGF4-ben és a C faktort nagy kópiaszámban tartalmazó *S. griseus* 52-1/pSGF5-ben határoztuk meg a streptomycin koncentrációt. A mérési eredmények összefoglalása a 3. táblázat A. részében van. Az antibiotikum koncentrációkat összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a C faktor gént nem tartalmazó, viszont streptomycint jól termelő *S. griseus* 52-1 törzs, illetve a C faktort mind kis, mind nagy kópiaszámban hordozó transzformánsainak fermentlevében a fent említett antibiotikum koncentrációja nem mutat nagy különbségeket.

A második mérési sorozatban pedig a C faktort szintén nem termelő *S. griseus* NRRL B-2682 vad típusú törzs, A-faktort nem termelő kopasz mutánsának (B-2682 AFN), illetve a kopasz mutáns C faktort kis kópiaszámban (*S. griseus* NRRL B-2682 AFN/pSGF4) és nagy kópiaszámban (*S. griseus* NRRL B-2682 AFN/pSGF5) tartalmazó transzformánsainak antibiotikum termelését határoztuk meg. A mérési eredmények összefoglalása a 3. táblázat B. részében van. Ebben az esetben sem a vad típusú törzs, sem pedig a *bald* mutánsa nem termel

detektálható mennyiségű streptomycint. A *bald* mutáns C faktort tartalmazó mindkét transzformánsának fermentlevében körülbelül azonos mértékben, jelentősen megnövekedett a streptomycin szintje.

A harmadik sorozatban ugyanazt a vad típusú *S. griseus* törzset használtuk, mint az előző esetben, viszont most egy olyan kopasz mutánsát (*S. griseus* NRRL B-2682 AFP) választottuk, mely termel A-faktort. A kopasz mutáns transzformánsai: *S. griseus* NRRL B-2682 AFP/pSGF4 és *S. griseus* NRRL B-2682 AFP/pSGF5 a C faktor gént kis illetve nagy kópiaszámban tartalmazzák. A kapott antibiotikum koncentrációk értékei az 3. táblázat C. részében vannak feltüntetve. A vad típusú *S. griseus* törzs és A faktort termelő kopasz mutánsa nem szintetizál ezzel a módszerrel kimutatható mennyiségű streptomycint. A C faktort kis példányszámban hordozó transzformás esetén mind a 48, mind pedig a 72 órás tenyészet fermentlevében jelentősen megnőtt az antibiotikum koncentráció, míg a C faktort nagy példányszámban tartalmazó transzformáns fermentlevében antibiotikum nem mutatható ki. Figyelemre méltó, hogy ez az eredmény egybeesik azzal a korábban leírt eredménnyel, miszerint a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs A faktort termelő kopasz mutánsának (*S. griseus* B-2682 AFP) a normális sporulációját csak a kis kópiaszámú C faktor gén volt képes helyreállítani.

3. táblázat. Szűrt szójas táptalajon növesztett különböző *Streptomyces* törzsek 48 órás illetve 72 órás tenyészetének fermentlevéből agar-diffúziós módszerrel meghatározott streptomycin koncentráció.

A

<i>S. griseus</i> törzs neve	48 órás tenyészet	72 órás tenyészet
<i>S. griseus</i> 45H	nd	nd
<i>S. griseus</i> 52-1	14 $\mu\text{g ml}^{-1}$	11.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$
<i>S. griseus</i> 52-1/pSGF4	7.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$	5.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$
<i>S. griseus</i> 52-1/pSGF5	10 $\mu\text{g ml}^{-1}$	12 $\mu\text{g ml}^{-1}$

B

<i>S. griseus</i> törzs neve	48 órás tenyészet	72 órás tenyészet
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682	nd	nd
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682 AFN	nd	nd
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682 AFN/pSGF4	8.2 µg ml ⁻¹	11 µg ml ⁻¹
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682 AFN/pSGF5	11 µg ml ⁻¹	12 µg ml ⁻¹

C

<i>S. griseus</i> törzs neve	48 órás tenyészet	72 órás tenyészet
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682	nd	nd
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682 AFP	nd	nd
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682 AFP/pSGF4	12 µg ml ⁻¹	11.5 µg ml ⁻¹
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682 AFP/pSGF5	nd	nd

nd= nem detektálható

3.12. AZ A-FAKTOR HIÁNYOS MUTÁNSBAN A TÁPANYAG FELVÉTELLEN ÉS STRESSZ VÁLASZBAN RÉSZTVEVŐ FEHÉRJÉK TÚLTERMELÉSE FIGYELHETŐ MEG

A fejezethez tartozó saját közlemény:

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 8.10, 2396-2403 (2009).

A 3.9. fejezetben leírt kísérletek kiértékelésekor, a *S. griseus* genomi szekvencia adatbázis hiányában, csak azokat a fehérjéket sikerült azonosítani, amelyek az akkor rendelkezésre álló *S. coelicolor* és *S. avermitilis* genomszekvenálások eredményeként hozzáférhető fehérje adatbázisok alapján, vagy egyedi gének adatbázisban lévő szekvenciái alapján azonosíthatóak voltak. Ez annak ellenére, hogy a különböző *Streptomyces* törzsek fehérje szekvenciáinak összehasonlításával megállapítható, hogy az egyes fajokban az ortológ fehérjék nagyfokú hasonlóságot mutatnak, az egyes fehérjék azonosítását nagymértékben gátolta, hiszen egyetlen (akárcsak konzervatív, azaz a funkciót valószínűleg nem befolyásoló) aminosav csere a fehérje iontömeg alapján való azonosítását lehetetlenné teszi.

Új helyzetet teremtett a *S. griseus* IFO 13350 törzs genom-szekvencia közzététele 2008-ben (Ohnishi és mtsai, 2008). Ez annak ellenére, hogy az általunk vizsgált *S. griseus* NRRL B-2682 törzs nem azonos a szekvenált *S. griseus* IFO1350 törzsszel, a fehérjék azonosíthatóságának esélyét nagyságrendekkel megnövelte. Mivel az előző proteomikai analízis során elsősorban olyan fehérjéket azonosítottunk, melyeknek expressziója a kopasz mutánsban csökkent, vagy egyáltalán nem is fejeződött ki, ebben a kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, melyek azok a fehérjék, melyeknek expressziója a kopasz mutánsban (B-2682 AFN) nagyobb, mint a vad típusú törzsben (B-2682), vagy a mutáns *facC* transzformánsában (B-2682 AFN/pSGF4). A mutánsban ugyanis elmarad az AdpA regulonba tartozó különböző extracelluláris hidrolázok termelése, melyek a differenciálódó telep szubsztrátmicéliumának hidrolízisével, egy kvázi-apoptotikus folyamat során, a fejlődő légmicéliumot látják el tápanyaggal (Miguélez és mtsai, 1999). Ez nyilvánvalóan egy stressz helyzet a differenciálódó telepnek, amely valamiféle kompenzációs folyamatot vált ki. Az ebben résztvevő fehérjéket kívántuk azonosítani, megismerni.

16 olyan fehérje foltot azonosítottunk, melyek a vad típusú törzsben (B-2682) és a kopasz mutáns transzformánsában (B-2682 AFN/pSGF4) egyáltalán nem voltak

detektálhatók, vagy mennyiségük a mutánshoz viszonyítva erősen lecsökkent. Ezek összesen 10 különböző fehérjének feleltek meg. Egyes fehérjék ugyanis két (SGR3109, SGR1737, SGR5280) vagy több (SGR1498) izoformában is jelen voltak, amelyek vagy molekulatömegükben (SGR3109), vagy izoelektromos pontjukban (SGR1502), vagy pedig mindkét tulajdonságukban különböztek, s ennek megfelelően a 2D gélen pozíciójuk eltérő volt. Ezen fehérjék expressziós mintázata 72 és 96 órás korban is hasonló volt, s mennyiségük mindkét időpontban jelentősen meghaladta a vad típusú törzs (B-2682) és a mutáns *facC* transzformánsában (B-2682 AFN/pSGF4) észlelt expressziót. A fehérjék listája és néhány fontosabb adatuk az 4. táblázatban van összefoglalva.

Érdekes módon, egy olyan fehérjét is azonosítottunk (SodA mangán szuperoxid dizmutáz), amely a szekvenált genomú *S. griseus* IFO 13350 törzsben nem található meg. A SodA kivételével (amely nem található meg *S. coelicolor*ban és *S. avermitilis*ben sem) a fehérjék mindegyike változó, de általában nagymértékben konzervált a két annotált genomú *Streptomyces*ben, a *S. coelicolor*ban és a *S. avermitilis*ben, ám ugyanez elmondható az ugyancsak hozzáférhető, de még nem befejezett *Streptomyces* genomi szekvenciák (*S. clavuligerus*, ATCC 27064, *S. species* Mg1, *S. sviveus* ATCC 29083, *S. pristinaespiralis* ATCC 25486, *S. species* SPB74, *S. scabies*) esetében is. Ez, mivel a fehérjék kifejeződése életciklus függő, valószínűleg arra utal, hogy ezek a fehérjék a *Streptomyces* differenciálódásban fontos szereppel bírnak.

A fehérjék mindegyike stressz fehérje, s két csoportba sorolhatók: egyesek a környezet változásaira adott válasz kialakításában, mások pedig, a tápanyaggal való ellátásban vesznek részt. Ez alól látszólag az SGR5704, a *Bacillus subtilis* spo0M fehérje ortológja kivétel, de mivel a sporuláció a vegetatív micélium autolitikus lebontásával jár, ma már ezt is stressz mechanizmusnak tartják (Gonzalez-Pastor és mtsai, 2003; Rigali és mtsai, 2008). A gén mutációja vagy delécioja *B. subtilis*ben a sporuláció elmaradását okozza (Han és mtsai, 1998). Az első csoportba tartozik az SGR1460, amely feltételezetten egy ATP/GTP kötő fehérje, s az *E. coli* OsmC fehérje homológja, mely az ozmotikus stresszválaszban játszik szerepet. A SodN és SodA szuperoxid dizmutázok pedig az oxidatív stresszválaszban vesznek részt. Ezek a fehérjék nem rendelkeznek N-terminális szekréciós szignál szekvenciával, tehát citoplazmatikus lokalizációt várnánk. Az SGR4906 SodF szuperoxid dizmutázról ismert, hogy szekréciós szignál szekvencia nélkül ún. autotranszporttal kerül ki a sejtől (Henderson és mtsai, 2000; Birkó és mtsai, 2007). Mivel ezeket a fehérjéket a tápfolyadékban találtuk, feltételezzük, hogy ugyancsak szignál szekvencia nélkül kerülnek szekrécióra.

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

ID No.	SSP ^a	Adatbázis azonosító	Elnevezés	Egyezés ^b	Lefedettség ^c	Mr ^d (kDa)	PSD vagy CID megerősítés ^e	Sec ^f	ADP-riboszilációs szekvencia ^g	Ortológok SCO/SAV ^h
1	3002	SGR1460	Osm C-szerű ATP/GTP-kötő fehérje	4/9	24%	14.5	⁶ VAHTNWEGLIEGK ¹⁹ ²⁰ GVVTFDSSGIGDHPVSWPAR ³⁹	nincs	nincs	SCO6531 (83%), SAV1862 (84%)
2	0004	SGR2245	szuperoxid dizmutáz SodN	11/15	32%	15	⁸⁵ YPELHQLINDTLK ⁹⁷	nincs	nincs	SCO5254 (87%), SAV2988 (86%)
3	4603	SGR3109	feltételezett aminosztransferáz	31/43	51%	39.4	² ADIQIPADIKPADGR ¹⁶ ²²⁶ HIPEFFSLPTAIDNSLK ²⁴²	nincs	nincs	SCO4366 (87%), SAV3883 (87%)
4	4507	SGR3109	feltételezett aminosztransferáz	13/29	37%	39.4	² ADIQIPADIKPADGR ¹⁶ ²²⁶ HIPEFFSLPTAIDNSLK ²⁴²	nincs	nincs	SCO4366 (87%), SAV3883 (87%)
5	1502	SGR1498	xylóz ABC transzporter szubsztrát-kötő fehérje	32/34	56%	38.8		1-27	²¹ LAACG ²⁵	SCO6009 (78%), SAV2247 (77%)
6	2402	SGR1498	xylóz ABC transzporter szubsztrát-kötő fehérje	22/27	39%	38.8	⁴⁷ IGLLLPENQATAR ^{58 125} AKDAGIPVVAFDR ¹³⁷ ²⁵⁴ GAGISPLPPVTGQDAELAGVQR ²⁷⁵	1-27	²¹ LAACG ²⁵	SCO6009 (78%), SAV2247 (77%)
7	2405	SGR1498	xylóz ABC transzporter szubsztrát-kötő fehérje	41/49	56%	38.8	⁴⁷ IGLLLPENQATAR ^{58 127} DAGIPVVAFDR ¹³⁷ ²⁵⁴ GAGISPLPPVTGQDAELAGVQR ²⁷⁵	1-27	²¹ LAACG ²⁵	SCO6009 (78%), SAV2247 (77%)
8	2404	SGR1498	xylóz ABC transzporter szubsztrát-kötő fehérje	31/41	44%	38.8	⁴⁷ IGLLLPENQATAR ^{58 127} DAGIPVVAFDR ¹³⁷ ²⁵⁴ GAGISPLPPVTGQDAELAGVQR ²⁷⁵	1-27	²¹ LAACG ²⁵	SCO6009 (78%), SAV2247 (77%)
9	8202	SGR5704	Spo0M sporulációs kontrol fehérje	16/24	29%	28.5	³⁸ IQGGSVAQIEGLNVGLQAR ³⁷ ¹⁹² GLHQVELTFVADDR ²⁰⁵	1-17	nincs	SCO1793 (81%), SAV6485 (83%)
10	4305	SGR2237	feltételezett arginin-, ornitin-kötő fehérje	34/47	69%	33.5	¹⁷⁸ SIEDLCGKPAAVQR ¹⁹¹ ²³¹ SGGSVAGVNDYPVAVDLAR ²⁴⁹ ²⁸⁶ EAVDAIHADGSYQK ²⁹⁹	1-25	²⁹ LTACG ³³	SCO5260 (58%), SAV2982 (58%)
11	6701	SGR5275	Maltóz-kötő fehérje MalE	21/45	43%	44.8	⁷³ YVNVPGDAQNK ^{84 87} NAAQAGDGAPDVIR ¹⁰⁰	1-29	¹⁸ ATACG ²²	SCO2231 (48%), SAV5977 (48%)
12	1307	SGR1737	glutamát ABC transzporter szubsztrát-kötő fehérje	33/35	55%	33	⁷⁷ ADQPYLGFEDQATK ^{90 149} QVGFAGPYK ¹⁵⁸ ¹⁹⁷ KPEYGASVVELAK ²⁰⁹	1-22	¹⁹ ATACG ²³	SCO5776 (40%), SAV2485 (55%)
13	1303	SGR1737	glutamát ABC transzporter szubsztrát-kötő fehérje	35/38	56%	33	⁷⁷ ADQPYLGFEDQATK ⁹⁰ ¹³¹ GQVDYVVGTYTINDER ¹⁴⁶ ¹⁴⁹ QVGFAGPYK ^{158 197} KPEYGASVVELAK ²⁰⁹	1-22	¹⁹ ATACG ²³	SCO5776 (40%), SAV2485 (55%)
14	4204		mangán szuperoxid dizmutáz SodA	9/14	56%	22.4	¹¹⁵ FKSDFAAAAAGR ¹²⁶	nincs	nincs	
15	2702	SGR5280	feltételezett α-amylase	21/25	27%	60.7	²⁹⁵ SAVFVDNHDTER ³⁰⁶ ⁴⁰⁶ AYVAINHEGSALTR ⁴¹⁹ ¹⁰³ AAFAAMVNTCHAAGVK ¹¹⁸ ²²⁹ LTNPNVYWK ²³⁷	1-35	nincs	SCO7020 (78%) SAV5981 (73%)
16	1803	SGR5280	feltételezett α-amylase	25/46	44%	60.7	²⁹⁵ SAVFVDNHDTER ³⁰⁶ ⁴⁰⁶ AYVAINHEGSALTR ⁴¹⁹	1-35	nincs	SCO7020 (78%) SAV5981 (73%)

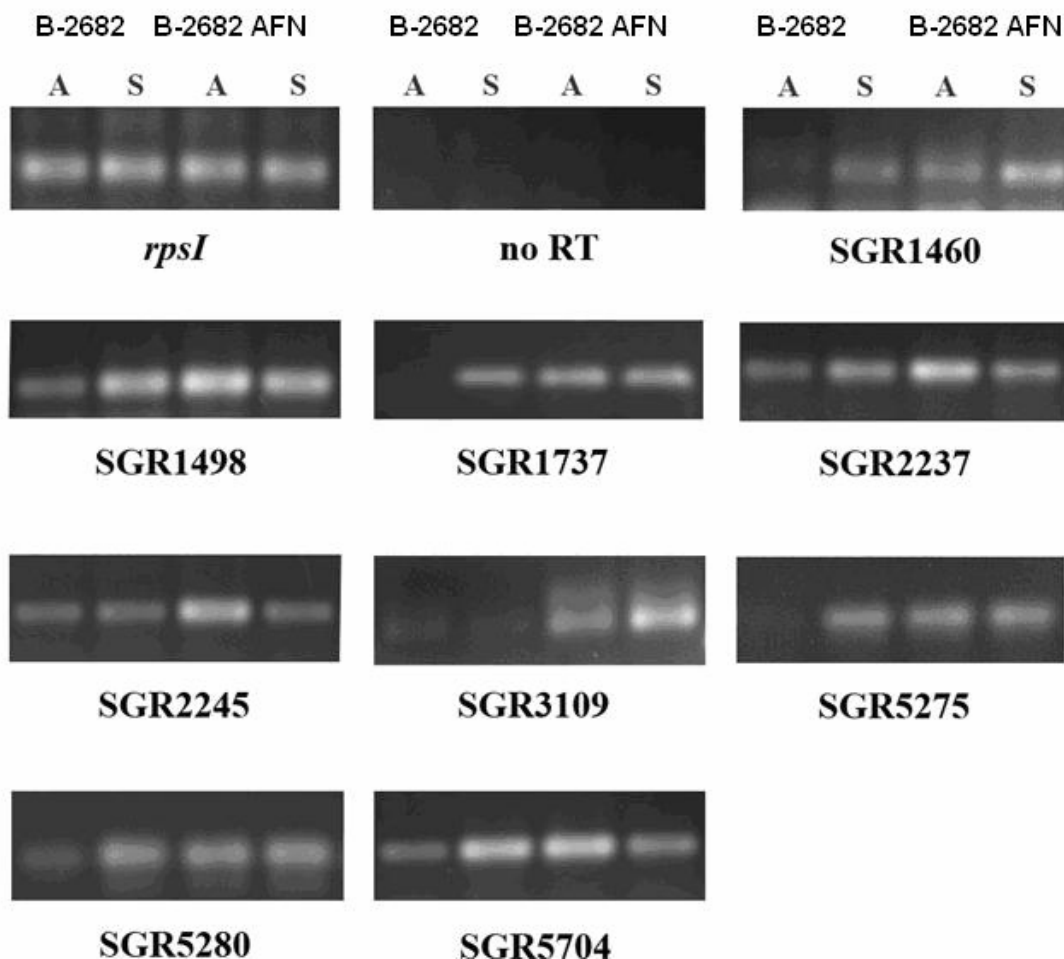
- a A PDQuest program által automatikusan adott azonosító szám.
- b Az azonos és észlelt triptikus fragmentek száma.
- c Szekvencia lefedettség.
- d Számított molekulatömeg. A poszttranszlációs modifikáció miatt lényegesen eltérhet az észlelt tömegtől.
- e PSD vagy CID analízissel megerősített szekvenciák.
- f A szekréción szignál szekvencia hossza.
- g Az ADP-riboszilációs szekvencia pozíciója.
- h A *S. coelicolor* (SCO) és *S. avermitilis* (SAV) ortológok azonosító száma és a hasonlóság mértéke.

A második csoportba tartozó fehérjék a differenciálódó, és valószínűleg tápanyaghiányos telep tápanyaggal való ellátásában játszanak szerepet. Az SGR3109 a *Mycobacterium tuberculosis* SerC foszfoszerin aminoszferázának ortológja, mely a B6 vitamin, valamint a glicin, szerin és treonin bioszintézisben játszik szerepet. Az SGR1498 a xilóz felvételében szerepet játszó ABC transzporter fehérje szubsztrát-kötő alegysége (Bertram és mtsai, 2004). Az SGR2237 egy arginin-, ornitin-kötő fehérje, mely valószínűleg a poláros aminosavak transzportjában vesz részt. Az SGR5275 maltóz-kötő fehérje, mely streptomycesekben a maltóz felvételében játszik szerepet (van Wezel és mtsai, 1997a; van Wezel és mtsai, 1997b). Az SGR1737 a glutamát ABC transzporter szubsztrát-kötő alegysége. Az SGR1498, SGR1737, SGR2237 és SGR5275 fehérjék mindegyike rendelkezik aminoszterminális szekréción szignál szekvenciával, és egy konzervált prokarióta membrán lipoprotein lipid kötőhellyel, amelyben megtalálható a szekréción szabályzó ADP-riboszilációban résztvevő konzervált cisztein.

A kopasz mutánsban (B-2682 AFN) túltermelt azonosított extracelluláris fehérjék egy része meglepetésünkre lipoprotein, melyek a sejtfelszínen lokalizálódnak, tehát a szekretomban észlelt koncentrációjuk nem feltétlenül tükrözi génjük transzkripción aktivitását. Ez természetesen igaz a szekretom összes fehérjéjére is, mivel a szintetizált fehérje mennyisége poszttranszkripcionálisan, valamint a transzlációs és poszttranszlációs lépések során is szabályozható. Ezért annak eldöntésére, hogy az észlelt fehérje túltermelés legalábbis részben a gének fokozott transzkripciónjának a következménye-e, vizsgáltuk a tenyészetekben a gének expresszióját szemi-kvantitatív RT-PCR módszerrel (18. ábra).

Eredményeink azt mutatták, hogy az összes vizsgált fehérje transzkripciónja 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.



18. ábra. A *S. griseus* B-2682 AFN törzsben túltermelt 9 ismert szekvenciájú 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.

Összegzésül elmondhatjuk, hogy az A-faktort nem termelő kopasz mutánsban (B-2682 AFN) a környezeti stresszhatásokra és a tápanyagellátásra reagáló fehérjék túltermelését állapítottuk meg, s ezek túltermelése — legalábbis részben — a gének megnövekedett expressziójával magyarázható. Az azonosított fehérjék egy része a környezet tápanyagellátottságának folytonos monitorozásában, továbbá a tápanyagok megkötésében és

felvételében szerepet játszó ABC transzporter fehérje szubsztrát-kötő alegysége. Ezekről a fehérjékről, és a foszfortranszferáz rendszerekről ismert, hogy lényegesen befolyásolják a sejtdifferenciálódás folyamatát (Colson és mtsai, 2008; Saito és Schrempf, 2004; Nothaft és mtsai, 2003, Kamionka és mtsai, 2002). Egy *in silico* analízis szerint *S. coelicolor*-ban 81 ABC transzporter fehérje van, melyek cukrok, oligopeptidek, és egyéb tápanyagok felvételében játszanak szerepet (Bertram és mtsai, 2004). Egy korábbi proteomikai vizsgálat (Kim és mtsai, 2005) ugyancsak azt mutatta, hogy *S. coelicolor*-ban a membrán-asszociált fehérjék nagy része – köztük a SCO5776, SCO2231, SCO6009, melyeknek ortológjait mi is azonosítottuk *S. griseus*-ban – ABC transzporter. Kísérleti eredményeink tehát jó összhangban vannak ezekkel a korábbi eredményekkel, illetve kiegészítik azokat.

A C faktor és A-faktor regulációs útvonalak összefüggését, és az általuk indukált differenciális génexpressziót proteomikai módszerrel vizsgáló dolgozataink a Molecular and Cellular Proteomics folyóiratban 2007. 03. 20.-án és 2009. 07. 22.-én jelentek meg. A második dolgozat megjelenése után rövidesen 2009. 08. 04.-én megjelent a Horinouchi munkacsoportnak egy proteomikai dolgozata (Akanuma és mtsai, 2009), mely logikájában és módszertanában megegyezik a mi publikációinkkal. Ebben a vad típusú *S. griseus* IFO 13350 törzs és *AdpA* deléciós mutánsának folyékony tenyészetbeli extracelluláris proteom összehasonlítását végzik el. Azonosítanak 38 szekretált fehérjét, köztük proteázokat és más hidrolázokat, melyek expressziója a vizsgált törzsekben eltérő. A csak a vad típusú törzsben azonosított fehérjék közül négy megegyezik az általunk korábban azonosított fehérjékkel (SGR2791 = Cpase SG karboxipeptidáz; SGR2095 = SgmA metallo-endopeptidáz; SGR5809 = SGAP aminopeptidáz; SGR3933 = Psts foszfát ABC transzporter szubsztrát-kötő alegység). Ezek expressziója a mi korábbi kísérleteink szerint is A-faktor függő, csak a vad típusú törzsben (B-2682) és az A-faktort nem termelő kopasz mutáns *facC* transzformánsában (B-2682 AFN/pSGF4) fejeződnek ki, vagy expressziójuk ezekben lényegesen magasabb, mint a kopasz mutánsban.

Azonosítottak továbbá a *AdpA* törzsben túltermelt fehérjéket is melyek közül négy olyan van (SGR3109 foszfoszerin aminotranszferáz; SGR1498 xilóz ABC transzporter szubsztrát-kötő alegység; SGR5704 Spo0M sporulációs kontroll fehérje ortológja; SGR2237 arginin-, ornitin ABC transzporter szubsztrát-kötő alegység), amelyeket korábban mi is azonosítottunk, mint az A-faktort nem termelő kopasz mutánsban (B-2682 AFN) túltermelődött fehérjét. Transzkriptom analízist is végeztek, melyben megállapítják, hogy majdnem minden *AdpA* függő fehérje fokozott expressziója megnövekedett transzkripció aktivitás eredménye.

Ezek az eredmények a mi korábbi eredményeink egyértelmű megerősítései.

A Horinouchi munkacsoport ugyancsak 2009-ben közölte egy DNS mikroarray analízisen alapuló transzkriptom vizsgálat eredményét (Hara és mtsai, 2009), amelyben a *S. griseus* IFO 13350 *AdpA* törzs génexpressziós profilját és annak A-faktor adására történő változását vizsgálták folyékony tenyészetben. Megállapítják, hogy 74 transzkripció egységbe tartozó 152 gén expressziója indukálható A-faktorral. Ebből 32 esetben az AdpA fehérjének a gén promoteréhez való kötődését is igazolták. A gének a *S. griseus* kromoszómán elszórtan helyezkednek el, s igen sok köztük a még ismeretlen funkciójú. Ez azt az egyébként nem meglepő üzenetet hordozza, hogy a streptomycesek differenciálódását szabályzó extracelluláris autoregulátorok még jó néhány eddig felderítetlen útvonalon keresztül fejtik ki hatásukat.

3.13. *facC* HOMOLÓGOK A STREPTOMYCESEK MELLETT ELŐFORDULNAK FONALAS GOMBÁKBAN, BAKTÉRIUMOKBAN ÉS BAKTERIOFÁGOKBAN IS

A fejezethez tartozó saját közlemény:

K. F. Chater, S. Biró, K. J. Lee, T. Palmer, H. Schrempf. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. FEMS Microbiol Rev. *Közlésre elfogadva*.

A C faktor fehérje génje streptomycesekben csak sporadikusan fordul elő, ami a gén horizontális géntranszferrel (HGT) való terjedésére utal. 19 hozzáférhető annotált vagy még nem véglegesen annotált *Streptomyces* genom közül csak a *S. albus* (98% szekvencia azonosság aminosav szinten) *S. scabies* (52%), *S. ambofaciens* (51%), *S. clavuligerus* (35%) és *Streptomyces* sp. Mg1 (27%) törzsekben fordul elő, míg *S. coelicolor*-ban, *S. avermitilis*-ben, és *S. griseus*-ban nem. Ez utóbbi tény is arra utal, hogy a C faktor termelő törzs valójában nem *S. griseus*, hanem *S. albidoflavus* (L. 3.1 fejezet). A *Saccharopolyspora erythraea* (korábbi taxonómiai besorolása *Streptomyces erythreus*) ugyancsak rendelkezik *facC* génnel (L. a disszertáció végén, Függelék, F1. táblázat). A *S. albus* fehérje valószínűleg a C faktor ortológja. A *S. scabies* és *S. ambofaciens* fehérje csak 52 illetve 51%-ban azonos a *S. griseus* 45H fehérjével, míg a háztartási gének termékei általában 80% fölött azonosak, a paralógok pedig jóval 50% alatt (Chater és Chandra, 2006). Ez arra utal, hogy a *S. scabies* és *S. ambofaciens* gének vagy nagyfokban divergált ortológjai, vagy pedig HGT-vel felvett paralógjai a *facC*-nek.

Amikor kiderült, hogy a C faktor termelő törzs nem *S. griseus*, hanem *S. albidoflavus*, vizsgáltuk a *facC* gén előfordulását a *S. albidoflavus* csoport törzseiben Southern hibridizációval. A négy vizsgált törzs közül háromban (*S. canescens*, *S. odorifer*, *S. sampsonii*) erős hibridizációs szignált kaptunk (Kiss és mtsai, 2008), ami arra utal, hogy ezekbe a törzsekbe a csoport kialakulásakor került a gén. Azt feltételezve, hogy 1% 16S rDNS szekvencia divergencia kb. 50 millió év alatt jön létre (Ochman és mtsai, 1999; AC Ward személyes közlés), ez kb. 140 millió évvel ezelőtt történt.

70 további hozzáférhető, részben vagy teljesen annotált *Actinomycetes* genomból (30 nemzetség, 56 faj) C faktor homológot mindössze kettőben találtunk. Ez a *Thermomonospora curvata* (52% szekvencia azonosság aminosav szinten) és a *Stackebrandtia nassauensis* három (37%, 35% és 26%) homológgal (F2. táblázat).

Adatbázis szekvencia analízissel további C faktor homológokat találtunk, főleg az alacsony GC tartalmú Gram pozitív baktériumokban (F3. táblázat) és fágjaikban (F4.

táblázat). A 68 bakteriális homológból 22 *Staphylococcus aureus* törzsekben található, de nem minden szekvenált genomú *Staphylococcus aureus* törzsben van meg, továbbá más *Staphylococcus* fajokban egyáltalán nem fordul elő. További 30 homológ különböző *Lactobacillus* fajokban, 4 pedig *Listeria monocytogenes* törzsekben található. A maradék elszórtan főleg Gram pozitív baktériumokban, de található *facC* homológ 3 Gram negatív baktériumban (*E. coli* és *Bacteroides* fajok) is. Ezekből a *Bacillus subtilis* TagC fehérjéje az egyetlen, amely a *facC* klónozása és szekvenálása időpontjában ismert volt, s funkcióját kromoszómális lokalizációja alapján a teichoinsav bioszintézisben gondolták, de később kiderült, hogy szerepe a DNS károsodással indukálható DNS javításban van (Mauël és mtsai, 1994).

A 38 homológ fágfehérjéből 37 *Staphylococcus* fágokban, 1 pedig *Lactobacillus* fágban fordul elő.

A C faktor homológok az alacsony GC tartalmú Gram pozitív baktériumokban és fágjaikban egy nagyobb fehérje egyik doménjét alkotják (PD397534 a ProDom adatbázis 2006.1). Mindegyikben megtalálható két ismeretlen funkciójú C-terminális domén, és egy vagy három ismeretlen funkciójú N-terminális domén.

A *Staphylococcus* fágokat részletesen tanulmányozták, s csoportosították morfológiai bélyegek és genom méret, illetve hasonlóság alapján (Iandolo és mtsai, 2002; Kwan és mtsai, 2005; Vybiral és mtsai, 2003; Yamaguchi és mtsai, 2000). Az általuk hordozott C faktor domén, illetve a C faktor domént hordozó fehérjék nagyon hasonlóak, s nincs összefüggésük a csoportba sorolással. A *Lactobacillus* fág homológ egy struktúrfehérje (Mikkonen és Alatassova, 1994), s bár nagy méretű, de csak egyetlen ismert doménje van (PD397534).

Meglepetésünkre, ugyancsak találtunk C faktor homológokat, összesen 15 fehérjét, fonalas gombákban is (F5. táblázat). Az *Aspergillus fumigatus* és *Neosartorya fisherii* törzsekben 2-2, kismértékben eltérő, s valószínűleg függetlenül felvett gén található. Megtalálható továbbá *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Ajellomyces dermatitidis*, *Ajellomyces capsulata*, *Paracoccoides brasiliensis*, *Podospora anserina* és *Aspergillus terreus* törzsekben is. (Ez utóbbi fehérje az annotálás szerint sokkal rövidebb a többi C faktor homológiánál, ami valószínűleg annotálási hibára utal.). Nincs ugyanakkor C faktor gén a részletesen tanulmányozott *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* és *Neurospora crassa* törzsekben. A gomba fehérjék, a *Streptomyces* fehérjékhez hasonlóan csak a C faktor domént (PD397534) tartalmazzák, és általában jobban hasonlítanak az *Actinomyces*-fonalas gomba csoport tagjaihoz (19. ábra), mint a bakteriális és fág fehérjékhez. Érdekes kivétel ez alól két

bakteriális bakteriocin (Joerger and Klaenhammer, 1990), amelyek mind a filogenetikai analízis szerint, mind pedig méretükben a *Streptomyces*-fonalas gomba alcsoport fehérjéihez hasonlóak (19. ábra).

További érdekesség, hogy a *Staphylococcus aureus* (NCTC 8325) törzs 2 db. (F3. táblázat, 7. és 26. fehérjék), a *Staphylococcus aureus* JH1 törzs három db. (F3. táblázat, 10. 17. és 23. fehérjék), a *Staphylococcus aureus* JH9 törzs 3 db. (F3. táblázat, 11. 16. és 25. fehérjék), a *Staphylococcus aureus* (Newman) törzs pedig ugyancsak 3 db. C faktor homológgal rendelkezik (F3. táblázat, 24. 27. és 28. fehérjék). Az egy törzsben előforduló C faktor homológok egymással különböző mértékben (87%, 44%, 43%) azonosak, de a különböző törzsekben található homológok egymással gyakran azonosak (L. F3. táblázat, 3. – 8. fehérjék; 10. – 13. fehérjék, stb), ami közös eredetre utal.

A C faktor homológok többszörös előfordulása a *Lactobacillus* fajokra is jellemző. A *L. crispatus* JV-V01 törzs 2 db. (F3. táblázat, 35. és 48. fehérje), a *L. ultunensis* DSM 16047 törzs ugyancsak 2 db. (F3. táblázat, 20. és 43. fehérje), a *L. buchneri* (ATCC 11577) törzs 6 db. (F3. táblázat, 33. 37. 52. 53. 56. és 58. fehérje, melyek közül 4 db. 300 aminosavnyi, 2 db. pedig 600 aminosavnyi hosszúságú), a *L. hilgardii* (ATCC 8290) ugyancsak 6 db. homológ fehérjével rendelkezik (F3. táblázat, 55. 57. 61. 63. 64. 65. fehérje, melyek mérete a 100 és 900 aminosavnyi tartományban változik). A *Lactobacillus* törzsekben található C faktor homológok azonosságának mértéke eltérő, s teljesen azonos nincs köztük.

Az ebbe az alcsoportba tartozó fehérjék valószínűleg szekrécióra kerülnek: a C faktor fehérje twin arginine transzlokációs (Tat) útvonalnak megfelelő szekréciós szignálját, amely a *Streptomyces* homológokban általános, a gomba fehérjékben és a helveticinekben egy a SignalP programmal (Bendtsen és mtsai, 2004) azonosítható szekréciós szignál helyettesíti. Ez arra utal, hogy ezek a fehérjék is kiválasztásra kerülnek, de nem háromdimenziós szerkezetük megtartásával. Térszerkezetüket az extracitoplazmatikus térben is képesek felvenni.

3.14. A *FACC* GÉN VALÓSZÍNŰLEG HORIZONTÁLIS GÉNTANSZFERREL TERJEDT

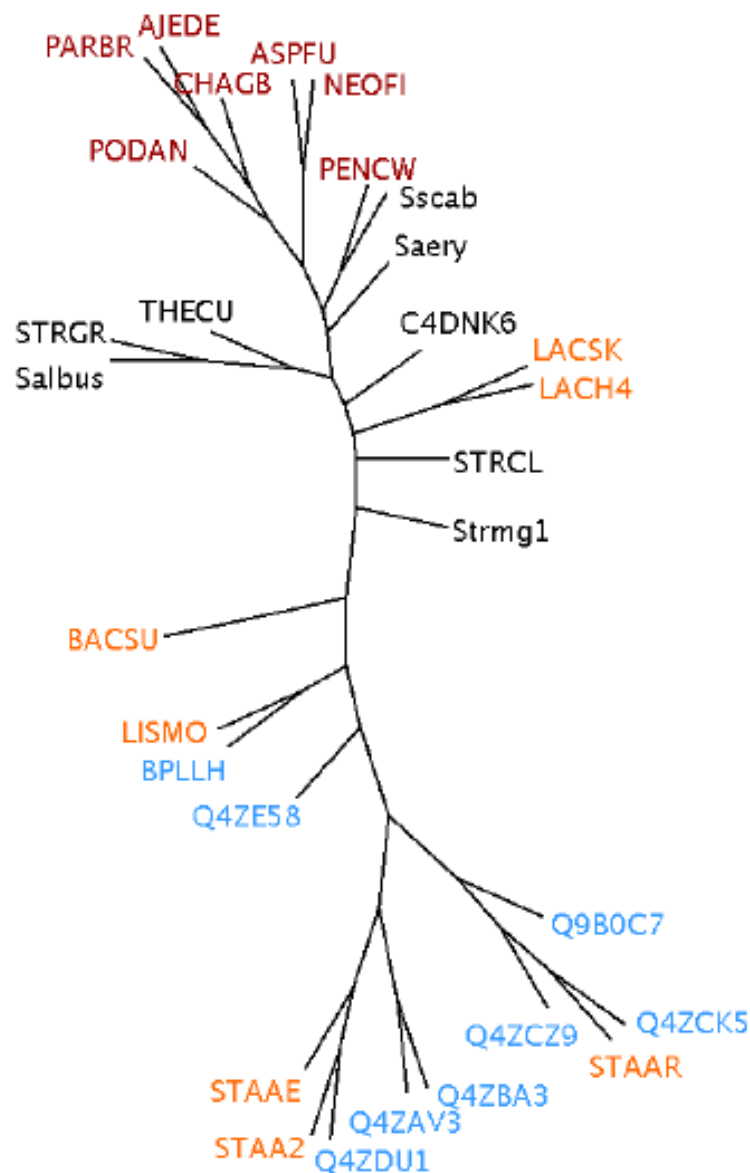
A fejezethez tartozó saját közlemény:

K. F. Chater, S. Biró, K. J. Lee, T. Palmer. The amazingly complex extracellular biology of *Streptomyces*. FEMS Microbiol Rev. Közlésre elfogadva.

Az előző fejezetben összefoglalt adatok, miszerint a C faktor gén előfordulása streptomycesekben és fonalas gombákban sporadikus, baktériumokban pedig csak bizonyos fajokban és fágjaikban fordul elő, arra utalnak, hogy a C faktor génje horizontális géntanszferrel terjedt a mikróbákban. Ez összhangban van azzal az öt hozzáférhető szekvenált genomú *Streptomyces* törzs genomjának összehasonlításán alapuló megállapítással, mely szerint a törzsek genomjának 20%-a egyedi, törzs-specifikus géneket kódol, melyek valószínűleg HGT-vel kerültek ezekbe a törzsekbe a szétválásuk után eltelt évmilliók során (Keith Chater és Govind Chandra, nem közölt adatok). A különböző mikroorganizmusokban előforduló C faktor homológok reprezentatív képviselőinek szekvenciái alapján szerkesztett filogenetikai fa ugyancsak laterális transzferre utal (19. ábra).

A törzsfa egyik jól elkülönült csoportja a *Staphylococcus aureus* törzsek és fágjaik csoportja. Ezek között a fágok által közvetített HGT-t feltételezni teljesen kézenfekvő.

A törzsfa másik jól elkülönült csoportja az *Actinomycetes*-fonalas gombák csoportja, amelyek érdekes módon egy csoportot alkotnak. Különösen a *S. scabies* és *Penicillium chrysogenum* fehérjék nagyfokú hasonlósága szembetűnő, ami egy nemrég bekövetkezett HGT-re utal a bakteriális és a gomba királyságok között. A fonalas gombák és streptomycesek közötti génátadást az is nagyban megkönnyítheti, hogy élőhelyük és ökológiai igényük közös. A streptomycesek rendelkeznek kitinázokkal, amelyek a gomba sejtfal emésztésére képesek, a fonalas gombák pedig sokféle β -laktám antibiotikumot termelnek, amelyek a bakteriális sejtfal bioszintézist gátolják. Ezekkel tehát képesek egymás életfolyamatainak gátlására s következésképpen egymás anyagainak felvételére is. A fonalas gombák β -laktám termelő képességéről egyébként úgy gondolják, hogy HGT-vel került a gombákba talajbaktériumokból, feltételezhetően streptomycesekből (Aharonovitz és mtsai, 1992)



19. ábra. A C faktor homológ fehérjék reprezentatív képviselőinek filogenetikai törzsfája.

A fehérjék neve eredetük szerint színesen van nyomtatva. Fekete: *Streptomyces* és egyéb micéliális növekedésű *Actinomycetes*. Sötétvörös: micéliális növekedésű gombák. Világos piros: Gram pozitív baktérium. Kék: Bakteriofágok.

A törzsfa szerkesztéséhez a függelék táblázataiban megadott szekvenciákból válogatott reprezentatív szekvenciákat használtuk. A *Bacillus subtilis* TagC fehérje volt a külső referencia az analízis során. A fehérje szekvenciákat a t-coffee programmal illesztettük (Notredame és mtsai, 2000). Használtuk továbbá a Philip programot (Felsenstein, 1989; Felsenstein, 2005), és a dendroscope programot (Huson és mtsai, 2007).

RÖVIDÍTÉSEK:

STRGR	<i>Streptomyces griseus</i>
Salbus	<i>Streptomyces albus</i>
Sscab	<i>Streptomyces scabies</i>
Saery	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> (<i>Streptomyces erythreus</i>)
STTRCL	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
Strmg1	<i>Streptomyces</i> sp. Mg1
C4DNK6	<i>Stackebrandtia nassauensis</i>
THECU	<i>Thermomonospora curvata</i>
ASPFU	<i>Aspergillus fumigatus</i>
NEOFI	<i>Neosartorya fischeri</i>
CHAGB	<i>Chaetomium globosum</i>
PENCW	<i>Penicillium chrysogenum</i> (Wisconsin)
AJEDE	<i>Ajellomyces dermatitidis</i>
PARBR	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PODAN	<i>Podospora anserina</i>
BACSU	<i>Bacillus subtilis</i>
LISMO	<i>Listeria monocytogenes</i>
STAAE	<i>Staphylococcus aureus</i> (Newman)
STAA2	<i>Staphylococcus aureus</i> (JH1)
STAAR	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA252)
LACSK	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carnosus</i> (DSM 15831)
LACH4	<i>Lactobacillus helveticus</i> (DPC 4571)
BPLLH	<i>Lactobacillus Delbrueckii</i> fág LLH
Q4ZE58	<i>Staphylococcus</i> fág 66
Q4ZDU1	<i>Staphylococcus</i> fág 69
Q4ZAV3	<i>Staphylococcus</i> fág 52A
Q4ZBA3	<i>Staphylococcus</i> fág 55
Q4ZCZ9	<i>Staphylococcus</i> fág 42E
Q4ZCK5	<i>Staphylococcus</i> fág 47
Q9B0C7	<i>Staphylococcus</i> fág PHISLT

3.15. A C FAKTOR GÉN, MINT LEHETSÉGES DIAGNOSZTIKAI MARKER ASZPERGILLÓZIS DETEKTÁLÁSÁBAN

A fejezethez tartozó saját közlemény:

Biró Sándor, Birkó Zsuzsanna és Paholcsek Melinda. Aszpergillózisos betegségek detektálására alkalmas diagnosztikai módszer. P0800722 alapszámú magyar szabadalmi bejelentés. 2008.

Az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó gombákkal környezetünkben bárhol találkozhatunk, de opportunistá patogénként csak legyengült immunrendszerű egyéneket fertőznek meg. A veszélyeztetett csoportba csak az immunodeprimált betegek (AIDS-esek, leukémiások, szerv- és csontvelő-transzplantáltak, kemoterápiás kezelés alatt álló betegek) tartoznak, mégis, a *Candida* fajok mellett az *Aspergillus* fajok felelősek a második leggyakoribb nozokomiális gombás betegségekért. Majd minden húszezredik ember érintett. Ennek magyarázatát minden bizonnyal a mesterséges immunszuppresszáns kezelések számának drasztikus mértékben történő növekedése adja.

A fertőzéseket az esetek döntő többségében az *Ascomycota* törzsbe tartozó *Aspergillus fumigatus* fonalas gomba okozza. Az elmúlt években azonban jelentősen emelkedett az *A. terreus* által okozott esetek gyakorisága is (Baddley *et al.*, 2003; Denning, 2006). Még az elmúlt évtized antifungális terápiájának rohamos fejlődése ellenére is az aszpergillózisos esetek továbbra is a fejlett országok magas morbiditással és mortalitással járó betegségei közé tartoznak.

A szervezetbe jutott gombák konídiospóráinak megtelepedésétől függően a mikózis többféle változatát különböztetjük meg. A krónikus forma az idő előrehaladtával, megfelelő kezelés hiányában és a fertőző ágens vérrendszer közvetítette szétterjedése révén, generalizálódik.

Az invazív mikózisok viszonylag magas morbiditási, valamint mortalitási aránya a megfelelő érzékenységű és specifitású diagnosztikai módszerek hiányával, valamint ebből adódóan a betegség korai, többnyire tünetmentes fázisában megkezdett antifungális terápia hiányával magyarázható, holott az utóbbi időben jelentős előrelépésről számoltak be a *Posaconazole*, és az orálisan és intravénásan is adható triazol, a *Voriconazol* antifungális szerek alkalmazásakor (Siwek *et al.*, 2006; Marco *et al.*, 1998). Antifungális terápia hiányában pedig a betegeknek semmi esélyük a túlélésre. A mortalitási arány 100% (Denning,

2006). Ezért könnyen belátható, hogy kiemelkedő fontossággal bírna egy költséghatékony, érzékeny és megbízható diagnosztikai módszer kidolgozása.

A megbízható diagnózis felállítása számos nehézségbe ütközik. A betegség tünetei egyáltalán nem specifikusak, illetve az okozó ágensek más fajokkal való együttes előfordulásából kifolyólag csak nehezen azonosíthatóak. Pedig fontos lenne species szintű detektálásuk, ami a célzott gombaellenes terápia előfeltétele. A megtámadott szövetekben a gombák jelenléte kellő biztonsággal csak a megfelelő helyről származó minták gombatenyésztéseinek elemzésével vagy hisztológiai vizsgálatával igazolható, azonban ilyen eljárásokra egyrészt majdnem kizárólag csak *post mortem* kerül sor, másrészt pedig csak ritkán alkalmasak speciesszintű azonosításra. A mikrobiológiai és hisztopatológiai vizsgálatok időigényesek és gyakran biopsziás mintavételt igényelnek, melyek a fennálló háttérbetegség(ek) kockázati tényezőiből adódóan nem minden esetben kivitelezhetőek. A különböző képalkotó eljárások, mint a röntgen-, CT-, MR-, vizsgálatok, valamint a köpetből, orrváladékból, BAL-ból (bronchoalveoláris mosófolyadék) stb. kitenyészthető fajok már ugyancsak a betegség előrehaladott voltát jelzik (White és mtsai, 2006; Erjavec és Verweij, 2002).

Napjainkban, a kereskedelmi forgalomban elérhető, aszpergillózisos esetek detektálására alkalmas diagnosztikai módszerek a tenyésztéseken és képalkotó eljárásokon kívül lehetnek:

1. szerológiaiak, mely esszék a plazmában keringő gombasejtfal alkotókat (1,3- β -D-glukán molekula 1,5- β -galaktofuranozil oldallánca, vagy egyéb poliszacharid komponens pl. a hőstabil galaktomannán) detektálják.
2. DNS alapúak,
3. valamint ezek kombinációja (Florent és mtsai, 2006; Denning; 2006; Williamson és mtsai, 2000). Ez utóbbi „hibrid” eljárás előnye abban áll, hogy ötvözi a PCR reakciók erősségét képező magasfokú (94-100%) specificitást és a szerológiai módszerekre jellemző nagy érzékenységet (85-100%) (Aquino és mtsai, 2007).

A szerológiai módszerek hatalmas előnye a gyors kivitelezhetőség. Szemben az időigényes tenyésztési folyamatokkal 3 órán belül eredményt szolgáltatnak (Aquino *et al.*, 2007), mivel azonban az élővilágban általánosan előforduló gombasejtfalalkotókra szűrnek, nagy hiányosságuk, hogy nem alkalmasak species szintű detektálásra. Ezért kombinálni kell őket más, gomba DNS detektálását célzó módszerekkel (fészkelt-PCR, kvantitatív valós idejű PCR). Ezeket többnyire a 28S riboszomális RNS gén konzervált szekvenciáihoz tervezik.

A DNS kimutatáson alapuló módszerek könnyű kivitelezhetőségük, időtakarékoságuk és jó reprodukálhatóságuk miatt rendkívül elterjedtek. A célgén minőségétől függően magasfokú specificitást (közel 100%) mutatnak (Aquino és mtsai, 2007).

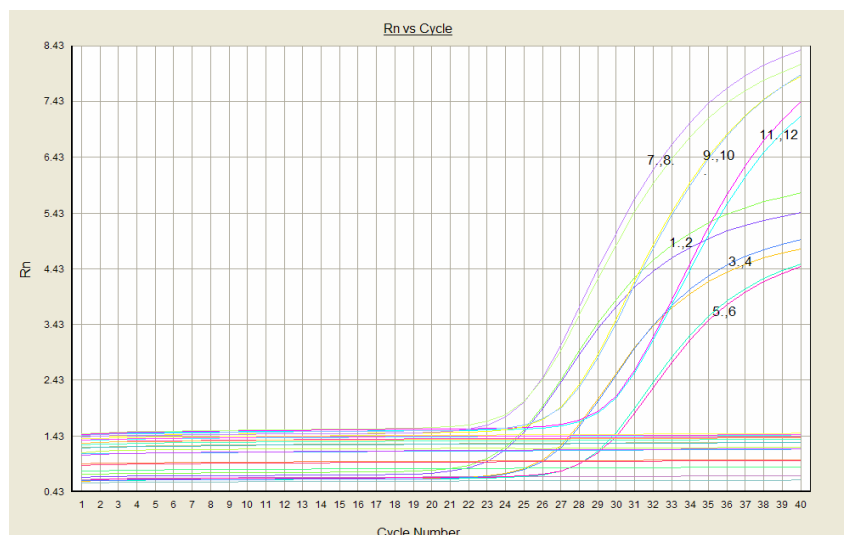
A szerológiai módszerekkel ellentétben, a megfelelően megtervezett esszék az *Aspergillus*ok fajszerű azonosításra képesek (Erjavec és Verweij, 2002). Fontos továbbá, hogy a nagy százalékban jelentkező fals-pozitív eredmények csak az imént taglalt módszerek (szerológiai, valamint DNS alapú) megfelelő kombinációjával és a kapott eredmények többszöri reprodukálásával zárhatóak csak ki. Szerológiai módszerek esetén a hamis-pozitív eredmények kiugróan magas száma (14%) olyan betegcsoportok esetében tapasztalható, akiket közvetlenül a diagnózist megelőzően Piperacillin-Tazobactam, Ampicillin-Sulbactam valamint Amoxicillin-Klavulánsav béta-laktám típusú antibiotikumok és béta-laktamáz gátlók együttes kombinációjával valamint egyéb antibiotikumokkal mint *Penicillin G*, *Ceftriaxon*, *Imipenem*, *Ciprofloxacin*, *Vancomycin*, *Gentamicin* stb. kezelték (Aquino és mtsai, 2007). Ezen esetek kontaminációra vezethetők vissza, ami azzal magyarázható, hogy egészséges szervezetűek esetén a mintaelőkészítés vagy feldolgozás során véletlenül, vagy egyes antibiotikum kezelés alatt álló egyének esetén mesterségesen szennyezőanyagok jutnak a véráramba (a béta-laktám típusú antibiotikumokat termelő *Acremonium* genusz sejtfalában szintén találhatóak galaktofuranózil oldalláncok) (Florent és mtsai, 2006). A real time rendszerben kivitelezett PCR-reakciók alkalmával pedig, melyek a gombákban általánosan jelenlévő riboszómális RNS gén kimutatásán alapulnak, még egészséges egyének esetében is elkerülhetetlen, hogy a felhasznált szérum-, köpet-, valamint a különböző testfolyadékokból (bronchoalveoláris folyadék) származó minták ne tartalmazzanak különböző, a környezetből származó és a szervezet védekező mechanizmusai által roncsolt, gomba eredetű nukleinsavakat (Bolehovska és mtsai, 2006).

A fentiekben taglaltak alapján elmondható, hogy egyértelmű és megbízható diagnózis felállítása a különböző diagnosztikai módszerek megfelelő kombinálását igényli, melyek jelentős idő-, energia- és költségvonzattal járnak. Ugyanakkor a veszélyeztetett csoportok szűrése a megelőző jellegű rutindiagnosztika részét kellene, hogy képezze.

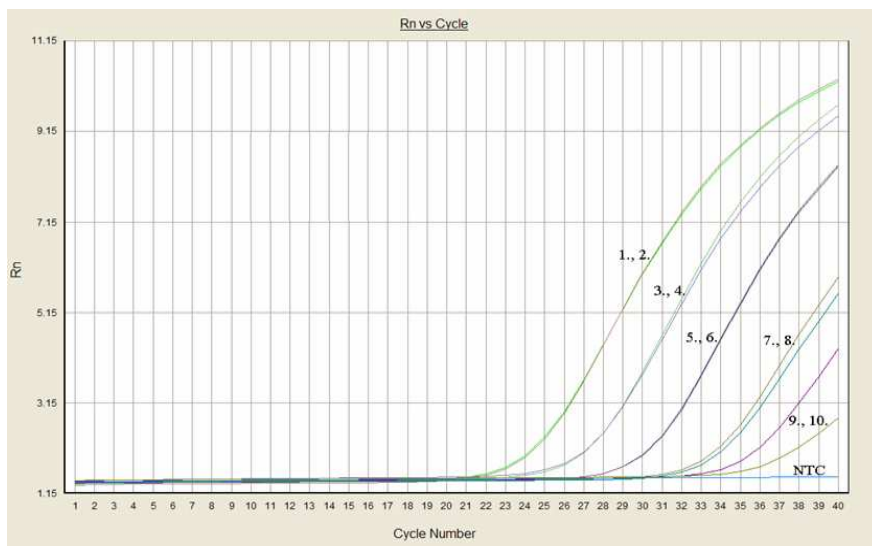
Ezért nagy jelentőséggel bír egy olyan diagnosztikai módszer beállítása, mely önmagában is, rövid idő alatt (egy napon belül), megbízható eredményeket szolgáltat, és a veszélyeztetett csoportba tartozó betegek megelőző jellegű szűrésével megoldást jelentene a késői diagnózis problémájára.

Az a 3.13 fejezetben leírt meglepő adat, miszerint az általunk felfedezett és részletesen tanulmányozott C faktor fehérje az aszpergillózist okozó *A. fumigatus*, *A. terreus*, és *Neosartorya fischerii* törzsekben, s még néhány további gomba fajban (*Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Ajellomyces dermatitidis*, *Ajellomyces capsulata*, *Paracoccoides brasiliensis*, *Podospora anserina*) megtalálható, de nem általános a gomba fajokban, felvetette annak lehetőségét, hogy a *facC* gén kimutatása felhasználható aszpergillózis diagnosztizálására kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakcióban (Q-RT-PCR). Mivel az egyes fajokban a gén szekvenciája divergált, elvileg az is lehetséges, hogy olyan fajspecifikus Q-RT-PCR reakció tervezhető, amely csak és kizárólag egyetlen faj (pl. *Aspergillus fumigatus*) DNS-ét képes detektálni.

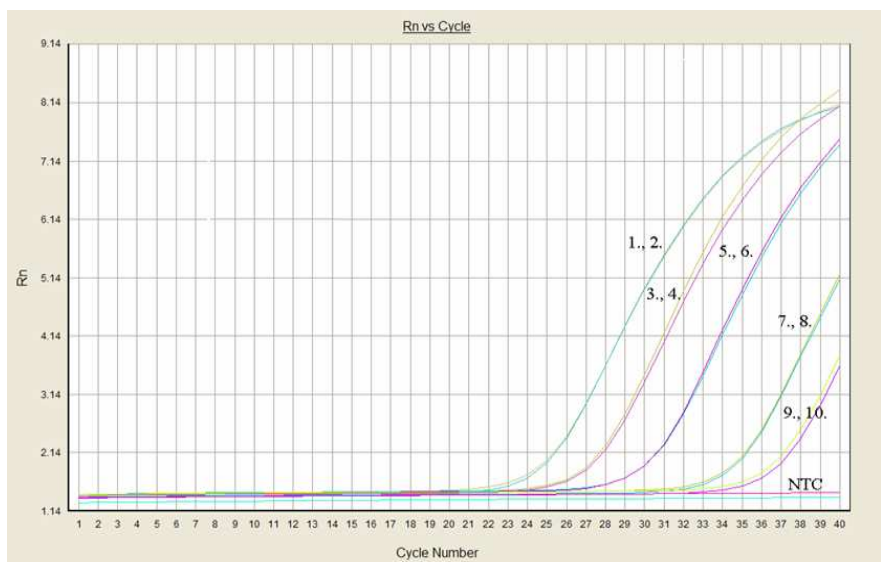
Ehhez első lépésben hagyományos PCR reakciókban vizsgáltuk, hogy tudunk-e olyan primerpárt és reakciókörülményeket alkalmazni, amelynél csak az egyik, vagy másik faj DNS-ével kapunk DNS amplifikációt. Mivel ez lehetséges volt az *A. fumigatus*, *A. terreus* és *Neosartorya fischerii* esetében is, továbbléptünk, s fajspecifikus TaqMan-MGB alapú Q-RT-PCR esszéket terveztünk az *A. fumigatus* és az *A. terreus* kimutatására. Az alkalmazott primerek és próbák szekvenciáit ezúttal nem tüntethetem fel, ezek szabadalmi bejelentés alatt állnak. Az esszék a kipróbálás során nagyon specifikusnak bizonyultak, nem mutattak semmiféle keresztreakciót más fajok DNS-ével (20. ábra). Vizsgáltuk továbbá az egyes esszék érzékenységét. Mind az *A. fumigatus* (21. ábra), mind pedig az *A. terreus* (22. ábra) esszé legalább a pikogrammos tartományig érzékeny. Az esszék nem keresztreakáltak humán eredetű DNS-sel (23. ábra), azaz amennyiben emberi testfolyadékából származó DNS mintákat vizsgálunk, és abban az esszével reagáló DNS van, az nem humán, hanem gomba eredetű.



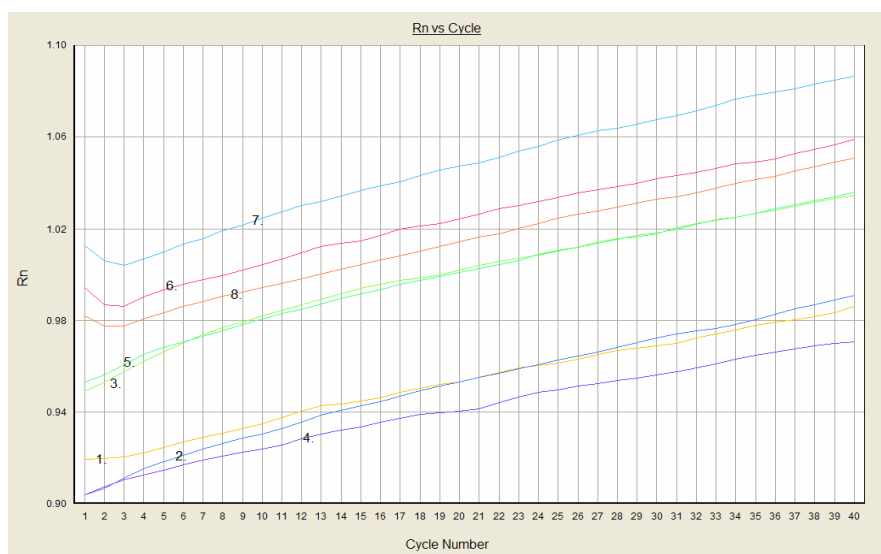
20. ábra. Az *Aspergillus fumigatus* és *A. terreus* esszéek vizsgálata saját és idegen gomba DNS-sel. Az 1. és 2. (4 ng); 3. és 4. (0.8 ng); 5. és 6. (0.16 ng) amplifikációs profilt a zárójelben megadott mennyiségű *A. fumigatus* templát és *A. fumigatus* specifikus esszé alkalmazásával kaptuk. A 7. és 8. (4 ng); 9. és 10. (0,8 ng); 11. és 12 (0,16 ng) amplifikációs profilt a zárójelben megadott mennyiségű *A. terreus* templát és *A. terreus* specifikus esszé használatakor kaptuk. Az *A. fumigatus* TaqMan esszé az *A. terreus* DNS-sel ill. fordítva nem adott amplifikációt (vízszintes lefutású, számozatlan görbék). Az ábra a normalizált fluoreszcencia intenzitást (Rn) mutatja a ciklusszám függvényében.



21. ábra. *Aspergillus fumigatus* TaqMan esszé érzékenységének meghatározása. NTC, templát DNS nélküli kontrol, 1. és 2. 4 ng, 3. és 4. 0,8 ng, 5. és 6. 0,16 ng, 7. és 8. 16 pg, 9. és 10. 1,6 pg DNS koncentráció esetében az amplifikációs profil. Az ábra a normalizált fluoreszcencia intenzitást (Rn) mutatja a ciklusszám függvényében.



22. ábra. *Aspergillus terreus* TaqMan esszé érzékenysége meghatározása. NTC, templát DNS nélküli kontrol, 1. és 2. 4 ng, 3. és 4. 0,8 ng, 5. és 6. 0,16 ng, 7. és 8. 16 pg, 9. és 10. 1,6 pg DNS koncentráció esetében az amplifikációs profil. Az ábra a normalizált fluoreszcencia intenzitást (Rn) mutatja a ciklusszám függvényében.



23. ábra. Az *Aspergillus terreus* esszé tesztelése humán genomiális DNS-el. Az 1. és 2., a 3. és 4., az 5. és 6. valamint a 7. és 8. számú görbék négy különböző egészséges ember véréből izolált humán DNS templát felhasználásával készültek. Ezekben a reakciókban nincs amplifikálás. Az ábra a normalizált fluoreszcencia intenzitást (Rn) mutatja a ciklusszám függvényében.

3.16. A C FAKTOR SZEREPET JÁTSZHAT A NÖVÉNYPATOGENITÁSBAN

A fejezethez tartozó saját közlemény:

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.

A streptomycesek a talaj baktériumpopulációjának jelentős részét alkotják (Janssen, 2006), s kapcsolatba kerülnek az állat és növényvilág egyedeivel. Megbetegedést azonban szerencsére csak nagyon ritkán okoznak, azaz nagyon kevés köztük a patogén.

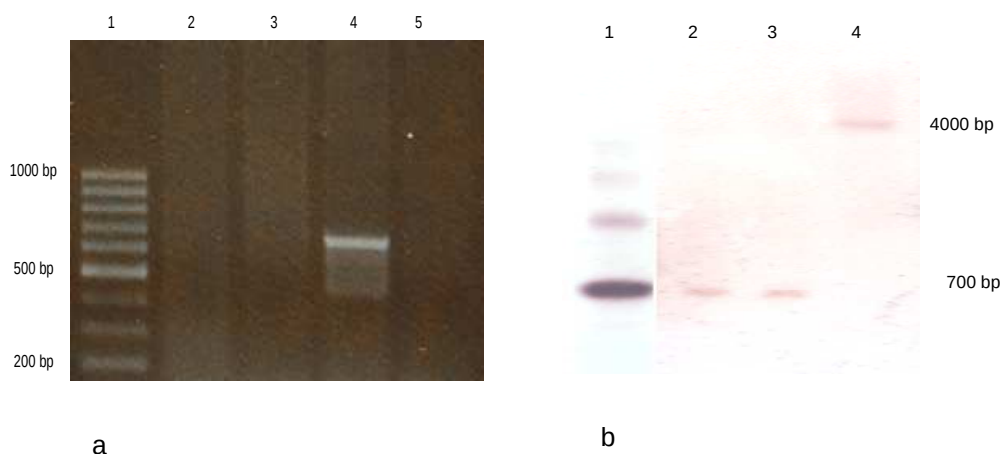
Mint a 3.13 fejezetben leírtam, a C faktor gén előfordulása streptomycesekben nem általános, csak kevés fajban található meg. Ezek közé tartozik a növénypatogén *S. scabies* is, amely a burgonya (és más gumós növények) varasodását, s ezáltal felbecsülhetetlen gazdasági károkat okoz.

A patogenitás egy rendkívül komplex, nagyfokú koordinációt feltételező, éppen ezért bonyolult regulációjú fenotípus, amely egyaránt magába foglalja a gazda megtámadását, a gazdaszervezetbe történő bejutást, az abban való elszaporodást, a gazda védekező rendszerének meggátolását stb. (Loria és mtsai, 2008; Joshi és mtsai, 2007a). A patogenitás kialakulásában horizontális géntranszfer játszik szerepet. A patogenitásért felelős gének egy ún. patogenitási szigeten (PAI) találhatóak. A bakteriális PAI-n elhelyezkedő virulencia gének általában a PAI-n elhelyezkedő specifikus regulátorok, valamint globális regulátorok szabályozása alatt állnak (Walthers és mtsai, 2007). Az egyik fontos virulencia faktor a ciklikus dipeptid fitotoxin thaxtomin, illetve a thaxtomin család tagjai, melyek a cellulóz bioszintézis gátlói. A thaxtomin bioszintetikus gének csak a burgonya varasodást okozó streptomycesekben fordulnak elő, s génmegszakítással a törzsek fertőzőképessége megszűnik (Healy és mtsai, 2000). A thaxtomin szintézis képessége egyedül nem elég a fertőzőképességhez, további virulencia faktorok (szekunder metabolitok és szekretált enzimek) koordinált együttműködése szükséges. Ilyen további fontos virulencia faktor a szintén a PAI-n elhelyezkedő *nec1* gén terméke a Nec1 nekrózis faktor. A *nec1* deléciója szintén a fertőzőképesség megszűnésével jár (Joshi és mtsai, 2007b). A fertőzésnek része továbbá a gumó külső védőrétegének a degradációja is, amelyet különböző hidrolitikus enzimek végeznek (Kolattukudy, 1985). Ilyen enzimek, például a növényi sejtfal egyik fontos komponensének, a szuberinnek a lebontásában részvevő extracelluláris észterázok ugyancsak ismertek (McQueen és Schottel, 1987; Schottel és mtsai, 1992). A *S. scabies* extracelluláris észterázáról leírták, hogy cink az aktivátora, és génje előtt egy fehérje-kötőhely található

(Babcock és mtsai, 1992), melyről megállapítottuk, hogy az nagymértékben azonos az AdpA konszenzus kötő-hellyel, ami azt valószínűsíti, hogy része az AdpA regulonnak. A C faktorról a 3.9 fejezetben leírtam, hogy olyan extracelluláris enzimek szintézisét szabályozza, melyek többsége cink kofaktorról működik, s génjük előtt AdpA kötőhely van, illetve a 3.10 fejezetben leírtam, hogy a C faktor a *S. griseus* B-2682 törzsben helyreállítja az A-faktor szintézisét. Ezek az ismeretek, továbbá az, hogy *S. scabies*-ben található egy, az A-faktor bioszintézisében kulcsszerepet játszó enzim, az AfsA génjének homológja, felvetették a C faktor lehetséges szerepét a növénypatogenitásban. Ezért, a Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum kutatóival együttműködve burgonya mikrogumó patogenitási vizsgálatokat végeztünk, illetve mértük a szekretált extracelluláris észteráz mennyiségét, továbbá a thaxtomin termelést és vizsgáltuk a *nec1* gén meglétét. Kísérleteinkbe a C-faktor termelő *S. griseus* 45H törzset, annak a 3.7 fejezetben leírt *ΔfacC* mutánsát, valamint pozitív kontrollként egy *S. europaeiscabiei*, negatív kontrollként pedig a *S. griseus* 52-1 törzsünket vontuk be.

1./ A *nec1* gén megtalálható a *S. griseus* 45H törzsben.

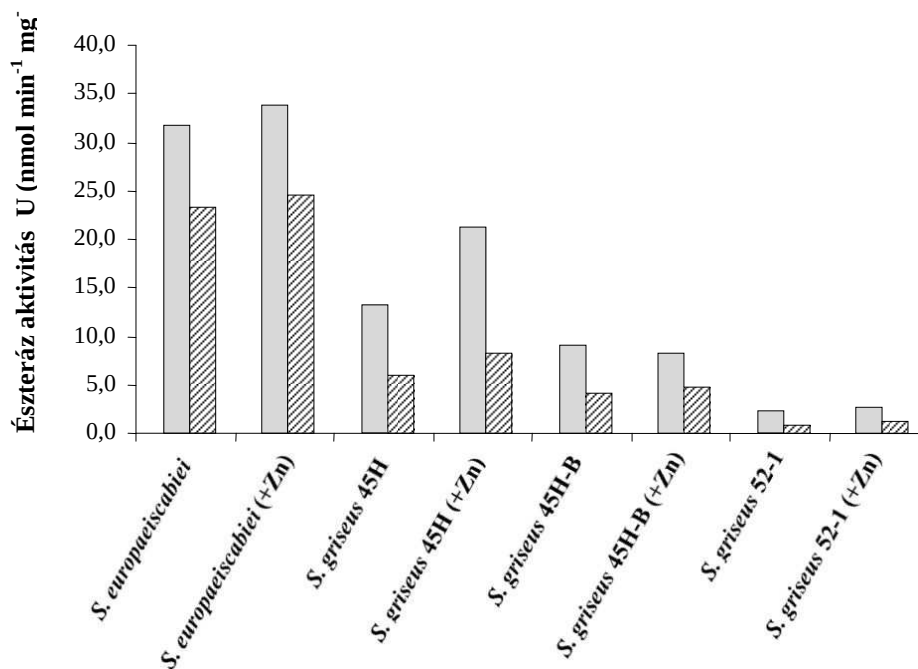
A *nec1* génről korábban kimutatták, hogy a nem patogén *S. lividans* törzsbe klónozva, azt patogénné transzformálta (Bukhalid és Loria, 1997). A *nec1* PCR detektálására leírt primer pár (Bukhalid és mtsai, 1998) felhasználásával vizsgáltuk törzseinket. A *S. europaeiscabiei* törzs esetében felszaporodott a várt méretű fragmentum, de a többi törzs esetében nem (24a. ábra). Ismeretes, hogy baktériumokban a PAI széleskörűen elterjedt, s hogy a különböző patogén törzsekben nagy fokban konzervált (Ritter és mtsai, 1995; Hacker és Carniel, 2001), mégis feltételeztük, hogy a filogenetikailag távolabbi *S. griseus* 45H törzsben a *nec1* szekvencia divergenciája lehet a negatív eredmény magyarázata. Ezért, a *S. europaeiscabiei*-ből PCR reakcióval felszaporított fragmentumot digoxigeninnel jelöltük, és használtuk a törzseink vizsgálatára Southern hibridizációban. Ezzel a módszerrel sikerült a gén jelenlétét kimutatni a *S. europaeiscabiei* mellett *S. griseus* 45H és annak *ΔfacC* mutánsában (24b. ábra), de a negatív kontroll *S. griseus* 52-1 törzsben nem. Ez alapján feltételezzük, hogy a PAI, de legalábbis annak egy része, megtalálható a *S. griseus* 45H törzsben, s a *facC* deléciója ezt a régiót nem érintette.



24. ábra. a. A *nec1* PCR amplifikálása a vizsgált törzsekben. 1. 100 bp DNS molekulasúly marker. 2. *S. griseus* 45H. 3. *S. griseus* 45H Δ *facC*. 4. *S. europaeiscabiei*. 5. *S. griseus* 52-1. b. A törzsek genomi DNS-ének Southern hibridizációja. 1. A PCR amplifikált *S. europaeiescabiei* fragmentum, mint pozitív kontroll. 2. *S. griseus* 45H DNS, *SacII* emésztés. 3. *S. griseus* 45H Δ *facC* DNS, *SacII* emésztés. 4. *S. europaeiescabiei* *PstI* emésztés.

2./ Az extracelluláris észteráz egyes törzsekben cinkkel aktiválható.

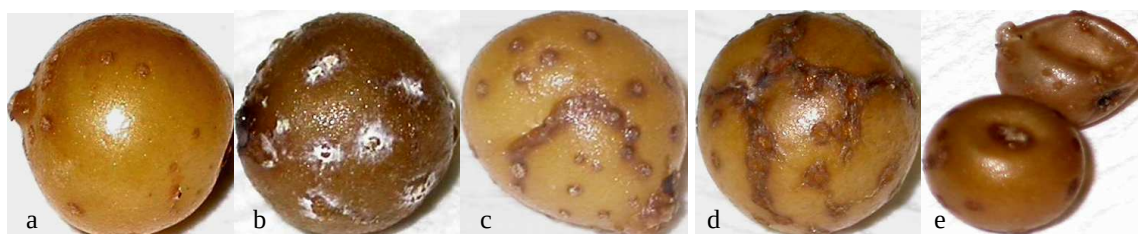
Az extracelluláris észteráz aktivitást spektrofotometriásan, p-nitrofenil-butirát szubsztrát felhasználásával mértük (McQueen és Schottel, 1987), párhuzamosan, 60 C°-on, 10 percig hőkezelt mintákban, amely kezelés a nem hőstabil észteráz aktivitást megszünteti, és nem hőkezelt mintákban. Az aktivitást, 1 mg száraz micéliumra vonatkoztatva fejeztük ki nmol min⁻¹mg⁻¹ egységben. Három párhuzamos mérés alapján szórást, illetve t-teszt alapján szignifikancia analízist is végeztünk. Az észteráz aktivitás a *S. europaeiscabiei* és *S. griseus* 45H törzsekben magas, illetve közepes mértékű, és cinkkel indukálható volt. Alacsony, és lényegesen nem indukálható értékeket mértünk a *S. griseus* 45H Δ *facC*, és a *S. griseus* 52-1 törzsek esetében (25. ábra). A mért különbségek szignifikánsnak bizonyultak (p=0,05). Ez arra utal, hogy a *S. griseus* 45H törzs egy hőstabil, cinkkel indukálható extracelluláris észterázt termel.



25. ábra. A törzsek extracelluláris észteráz (□) és hőstabil extracelluláris észteráz (▨) aktivitásai cinkkel aktivált (+Zn) illetve nem aktivált minimál táptalajon mérve.

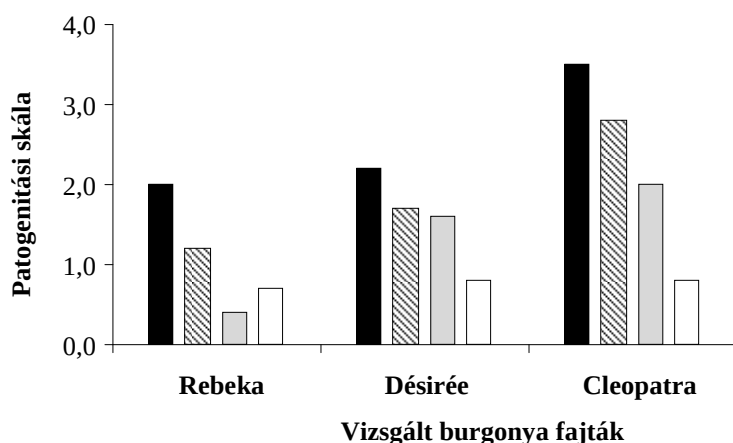
3./ Burgonya mikrogumó patogenitási teszt.

A *nec1* gén megléte, s a cinkkel indukálható hőstabil észteráz *facC* függő kifejeződése a *S. griseus* 45H törzsben felveti a törzs patogenitásának kérdését. Ezt burgonya mikrogumó patogenitási tesztel vizsgáltuk, egy 0-4 közötti skála felállításával (26. ábra).



26. ábra. A törzsek patogenitásának jellemzésére alkalmazott skála fokozatai: a. Tünetmentes (0 pont). b. Fehér foltok, telepek a lenti-sejtek körül (1 pont). c. Barna foltok, kezdődő varasodás a lenti-sejtek körül (2 pont). d. Kiterjedt varasodás (3 pont). e. Varasodás, rothadás (4 pont).

A patogenitási tesztet három különböző, a nagyüzemi termesztésben használt burgonyával végeztük el, a mikrogumók sejtszuszpenzióval történő kezelésével. Ezek közül, irodalmi adatok alapján a Cleopatra nagymértékben, a Désirée közepesen érzékenyek a Rebeka pedig rezisztens a burgonya varasodással szemben. A *S. europaeiscabiei* törzs mindegyik esetben varasodást okozott, s a *S. griseus* 52-1 egyik esetben sem. Némileg meglepő, de korábbi irodalmi adattal és a mi *nec1* és észteráz detektálási eredményeinkkel egybevágóan a *S. griseus* 45H nagyfokú varasodást okozott a Cleopatra, és közepes mértékben a Désirée és Rebeka esetében. A *S. griseus* 45H $\Delta facC$ törzs a Cleopatra és Désirée esetében közepes varasodást okozott, míg a Rebeka esetében nem okozott megbetegedést (27. ábra).



27. ábra. A *S. europaeiscabiei*(■), *S. griseus* 45H(▨), *S. griseus* 45H $\Delta facC$ (□), és a *S. griseus* 52-1 (□) törzsek patogenitása a különböző vizsgált burgonyák esetében.

Eredményeink alapján a *S. griseus* 45H valószínűleg tartalmazza a burgonya varasodásért felelős virulencia faktorokat kódoló PAI-t (vagy annak legalább egy részét), s a patogenitás kialakulásában ugyancsak szerepet játszó extracelluláris észteráz termelése pedig valószínűleg a C faktor regulációja alatt áll.

4. A LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A disszertáció a Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Általános Orvostudományi Kar, Humángenetikai Tanszékén (volt Debreceni Orvostudományi Egyetem, Biológiai Intézet) Szabó Gábor professzor és munkacsoportja által az 1960-as években felfedezett extracelluláris, pleiotróp hatású autoregulátor, a C faktor sejtdifferenciálódásban és antibiotikum termelésben betöltött szerepének molekuláris hátterét felderítő kísérleteinket foglalja össze. A *Streptomyces* differenciálódást tanulmányozó csoport munkájába én magam sokkal később kapcsolódtam be, s Szabó professzor úr halála után, az 1990-es évek vége óta vezetem. A disszertáció a saját és az általam vezetett munkacsoport eredményeit tartalmazza, s lektorált folyóiratban megjelent 12 dolgozaton, valamint 1 benyújtott szabadalmi bejelentésen alapul. A legfontosabb eredményeket az alábbiakban foglalom össze:

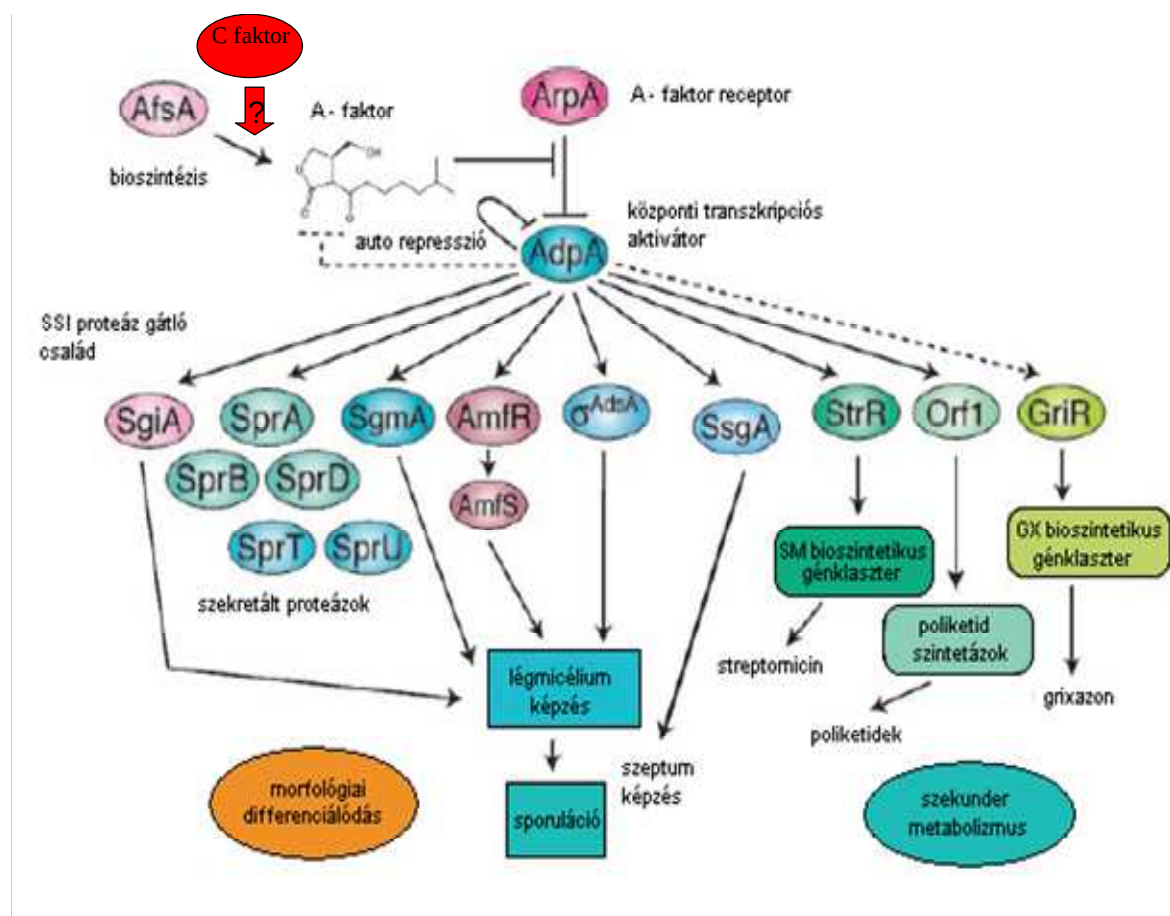
1. Tiszta formában izoláltuk a C faktor fehérjét *S. griseus* 45H törzs fermentlevéből. SDS-PAGE-val, illetve izoelektromos fókuszálással megállapítottuk, hogy a C faktor egy 34500 Dalton molekulatömegű, bázikus fehérje. Ezek a korábbi adatok nagyon jól egybeesnek a fehérje génjének ismeretében számítható molekulatömeg és izoelektromos pont értékekkel.
2. Megállapítottuk, hogy a C faktor rendkívül alacsony koncentrációban (ng ml^{-1}) kifejti jellegzetes citomorfológiai hatását. Ez a koncentráció a *S. griseus* 52-1 törzset használó biológiai tesztrendszerünkben mintegy 10 C faktor molekulát jelent *S. griseus* 52-1 sejtenként.
3. A C faktor volt az elsőként felismert fehérje természetű, streptomycesekben sejtdifferenciálódást kiváltó autoregulátor.
4. Klónoztuk és azonosítottuk a C faktor fehérjét kódoló gént. A gén 975 bp hosszúságú, s start kodonja 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.
5. A gén egy 324 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek molekulatömege 34523 Da. A kódolt fehérje N-terminális végén egy 38 aminosavat tartalmazó tipikus szekréción szignál szekvencia található, amely szekréció közben levágódik. Az érett C faktor fehérje 286 aminosavból áll, s molekulatömege 31038 Da. A fehérje számított izoelektromos pontja 9,59.

6. A gén szekvenálását, s a szekvencia alapján megállapított aminosav sorrendet a C faktor fehérje, illetve a fehérje triptikus fragmentjeinek electrospray-tömegspektrometriás analízisével erősítettük meg. A fehérje mért tömege 31047 Da, ami jól megegyezik a szekvencia alapján számított 31038 Daltonnal. Ugyancsak tökéletes az egyezés a 11 triptikus fragment esetében megállapított aminosav sorrend és a gén szekvencia alapján várható aminosav sorrend között.
7. A klónozott C faktor gént kis kópiaszámú, pSGF4 plazmidon bejuttatva a *S. griseus* 52-1 tesztörzsbe, ugyanolyan citomorfológiai hatást vált ki, mint az exogén hozzáadott C faktor fehérje. Ebben a plazmidban a gén saját promoteréről fejlődik ki.
8. 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.
9. Sikeresen kifejeztettük a C-terminálisan hexa-hisztidin farkat tartalmazó C faktor génjét a filogenetikailag távoli *E. coli*-ban. 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 törzsből izolált fehérje.
10. A C faktor gén S1 nukleáz térképezésével megállapítottuk, hogy a gén egyetlen promoterről, a differenciálódási program reproductív szakaszában kerül transzkripcióra, s promotertét valószínűleg nem az általános (a gének többségének felismerésében résztvevő σ^{hrdB}) szigma faktor ismeri fel.
11. Az így, S1 térképezéssel azonosított promotert promoter próba vektorba klónozva, *in vivo* egy reporter gén — ugyancsak sporuláció specifikus — kifejeződését váltotta ki, ami alátámasztja a C faktor gén sporuláció specifikus expresszióját.
12. A saját promoterről kifejeztetett klónozott C faktor gén helyreállítja differenciálódásában blokkolt, kopasz *S. griseus* NRRL B-2682 törzs A-faktor termelő (B-2682 AFP) és A-faktort nem termelő (B-2682 AFN) mutánsainak spóráképzését. Ez különösen érdekes felismerés, mivel a mutánsok, és szülői törzsük sem tartalmaz C faktor gént. Ez egyúttal azt is jelenti, hogy ezek a *S. griseus* törzsek tartalmazznak C faktorról kölcsönhatásba lépő, ez idáig azonosítatlan regulációs elemeket.
13. A klónozott C faktor gén kis kópiaszámú plazmidon bejuttatva (pSGF4) helyreállítja, illetve fokozza a *S. griseus* B-2682 AFN és B-2682 AFP törzsek streptomycin termelését.

14. A *S. griseus* B-2682 törzs, kopasz mutánsa (B-2682 AFN) és kis kópiaszámú C faktor génnel helyreállított sporulációjú transzformánsának proteóm analízise azt mutatta, hogy a mutánsban nem expresszáldó 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 *S. griseus*ban az A-faktor regulon által szabályozott.
15. A klónozott C faktor gén által helyreállított expressziójú gének mindegyike előtt sikerült az AdpA (A-faktor függő fehérje) kötőhelyét azonosítani, azaz azok a fehérjék, amelyekről nem volt ismert az A-faktor regulonba való tartozásuk, valószínűleg szintén A-faktor által szabályozottak.
16. A helyreállított expressziójú gének további közös jellemzője, hogy kofaktoruk van (ami többségükben cink) és a Tat (twin arginine translocation) útvonalon kerülnek szekrécióra.
17. A klónozott C faktor gén helyreállította a *S. griseus* B-2682 törzs AFN mutánsának A-faktor szintézisét. Ez különösen érdekes, mert a *S. griseus* B-2682 törzs és AFN mutánsa nem tartalmaz C faktor gént.
18. A *S. griseus* B-2682 AFN törzs nem az ismert A-faktor bioszintézisben résztvevő egyetlen specifikus gén, az *afsA* mutációja miatt nem termel A-faktort. A mutáns *afsA* génje, a regulációs régiókat is beleértve, ugyanis a kódoló régióban található egyetlen szinoním mutációtól eltekintve megegyezik a vad típusú génnel.
19. A *S. griseus* B-2682 AFN mutánsban az *afsA* transzkripcióra kerül, sőt expressziója fokozottabb, mint a vad típusú törzsben. Ez a fokozott génexpresszió valószínűleg az A-faktor hiányának kompenzálására irányuló sikertelen kísérlet.
20. Ezek az eredmények egyúttal, 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.
21. A *S. griseus* B-2682 AFN törzsben ozmotikus és oxidatív stresszválaszban résztvevő fehérjék expressziója fokozódik a vad típusú, illetve a klónozott *facC* által komplementált törzsekhez viszonyítva.
22. A *S. griseus* B-2682 AFN törzsben a tápanyagfelvételben résztvevő ABC transzporter fehérjék szubsztrát-kötő alegységeinek expressziója fokozódik a vad típusú, illetve a klónozott *facC* által komplementált törzsekhez viszonyítva. Ez valószínűleg a hidrolitikus enzimek expressziójának elmaradása miatt előálló tápanyag hiány kompenzálására irányul, s a légmicélium (és sporogén hifa) tápanyag ellátását hivatott megoldani.

23. A *Streptomyces griseus* NRRL B-2682 törzsben azonosítottunk egy stresszválaszban résztvevő mangán-szuperoxid dizmutázt, amely az eddig szekvenált genomú *Streptomyces* törzsekben nem fordul elő.

24. A fokozott expressziójú fehérjék mindegyikéről kimutattuk, hogy a fokozott expresszió, emelkedett szintű transzkripciójuk következménye. Ez arra utal, hogy a bakteriális génexpresszió szabályozása döntő módon a transzkripció szintjén valósul meg.



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

25. 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 (28. ábra), melyet a *S. griseus* B-2682 törzs és AFN mutánsának genomi szekvenálásával, s a mutáció azonosításával kívánunk megválaszolni.

26. 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.
27. A C faktor gén fonalas gombákban való előfordulása alapján az emberben aszpergillózist okozó *Aspergillus fumigatus* és *A. terreus* törzsek humán eredetű mintákban (vér, bronchoalveoláris folyadék, stb) való kimutatására alkalmas, rendkívül érzékeny és specifikus RT-qPCR esszéket dolgoztunk ki, amelyek alkalmasak diagnosztikai célú kitek kifejlesztésére (a szabadalmi igénybejelentés megtörtént).
28. Eredményeink alapján a burgonya varasodás kialakulásában szerepet játszó extracelluláris észteráz termelése ugyancsak a C faktor regulációja alatt áll.
29. 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.

5. 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.

6. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- Aharonowitz Y, Cohen G, Martin JF. Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution. *Annu Rev Microbiol* 46, 461-495 (1992).
- Akanuma G, Hara H, Ohnishi Y, Horinouchi S. Dynamic changes in the extracellular proteome caused by absence of a pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces griseus*. *Mol Microbiol* 73, 898-912 (2009).
- 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).
- Aquino VR, Goldani LZ, Pasqualotto AC. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathologia* 163, 191-202 (2007).
- Babcock MJ, McGew M, Schottel JL. Identification of a protein binding sequence involved in expression of an esterase gene from *Streptomyces scabies*. *J Bact* 174, 4287-4293 (1992).
- Baddley JW, Pappas PG, Smith AC, Moser SA. Epidemiology of *Aspergillus terreus* at an university hospital. *J Clin Microbiol* 41, 5525-5529 (2003).
- Barabás G, Szabó G. Comparison of cell wall composition of *Streptomyces griseus* strains. *Archiv Mikrobiol* 50, 156-163 (1965).
- Bassler BL, Losick R. Bacterially speaking. *Cell* 125, 237-246 (2006)
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340, 783-795 (2004).
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141-147 (2002).
- Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* 58, 1-26 (2005).
- Berks BC, Sargent F, Palmer T. Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathways. *Trends Microbiol* 13, 175-180 (2005).

- Bertram R, Schlicht M, Mahr K, Nothaft H, Saier MH Jr, Titgemeyer F. *In silico* and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Bacteriol 186, 1362-1373 (2004).
- Bibb MJ, Findlay PR, Johnson MW. The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein coding sequences. Gene 30, 157-166 (1984).
- Birkó Z, Bialek S, Buzás K, Szájli E, Traag BA, Medzihradszky KF, Rigali S, Vijgenboom E, Penyige A, Kele Z, van Wezel GP, Biró S. The Secreted Signalling Protein Factor C Triggers the A-factor Response Regulation in *Streptomyces griseus*. Mol Cell Proteomics 6.7, 1248-1256 (2007).
- 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 Ni²⁺ affinity column chromatography. FEMS Microbiol Lett 196(2), 223-227 (2001).
- Birkó Z, Sümegi A, Vinnai A, 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).
- 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 8.10, 2396-2403 (2009).
- 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).
- Biró S, Birkó Z, van Wezel GP. 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).
- Bolehovska R, Pliskova L, Buchta V, Cerman J, Hamal P. Detection of *Aspergillus* spp. in biological samples by real-time PCR. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 150, 245-248 (2006).
- Brown KL, Wood S, Buttner MJ. Isolation and characterization of the major vegetative RNA polymerase of *Streptomyces coelicolor* A3(2); renaturation of a sigma subunit using GroEL. Mol Microbiol 6, 1133-1139 (1992).

- Bukhalid RA, Chung SY, Loria R. *Nec1*, a gene conferring a necrogenic phenotype, is conserved in plant pathogenic *Streptomyces* spp. and linked to a transposase pseudogene. *Mol Plant-Microbe Interact* 11, 960-967 (1998).
- Bukhalid RA, Loria R. Cloning and expression of a gene from *Streptomyces scabies* encoding a putative Pathogenicity factor. *J Bacteriol* 179, 7776-7783 (1997).
- Camilli A, Bassler BL. Bacterial small-molecule signalling pathways. *Science* 311, 1113-1116 (2006).
- Chater KF, Biró S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* in press.
- Chater KF, Chandra G. The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol Rev* 30, 651-672 (2006).
- Chater KF, Chandra G. The use of the rare UUA codon to define "expression space" for genes involved in secondary metabolism, development and environmental adaptation in *Streptomyces*. *J Microbiol* 46, 1-11 (2008).
- Chater KF, Horinouchi S. Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species. *Mol Microbiol* 48, 9-15 (2003).
- Chater KF, Losick R. The mycelial life-style of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its relatives. In: *Bacteria as multicellular organism*, pp. 149-182. Edited by Shapiro JH, Dworkin M. Oxford University Press. New York, N. Y. (1997).
- Chater KF, Merrick MJ. Streptomycetes. In: *Developmental biology of Prokaryotes*. Oxford, Blackwell, 93-114 (1979).
- Chater KF. Developmental decisions during sporulation in the aerial mycelium in *Streptomyces*. In: *Prokaryotic development*, Edited by Brun YV, Shimkets LJ. Washington DC. American Society for Microbiology pp. 33-48 (2000).
- Chater KF. Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Curr Opin Microbiol* 4, 667-673 (2001).
- 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).
- Cheo DL, Bayles KW, Yasbin RE. Cloning and characterization of DNA damage-inducible promoter regions from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 173, 1696-1703 (1991).

- Cheo DL, Bayles KW, Yasbin RE. Elucidation of regulatory elements that control damage induction and competence induction of the *Bacillus subtilis* SOS system. *J Bacteriol* 175, 5907-5915 (1993).
- Colson S, van Wezel GP, Craig M, Noens EE, Nothhaft H, Mommaas AM, Titgemeyer F, Joris B, Rigali S. The chitobiose-binding protein, DasA, acts as a link between chitin utilization and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiol* 154, 373-382 (2008).
- Cundliffe E, Bate N, Butler A, Fish S, Gandecha A, Merson-Davies R. The tylosin-biosynthetic genes of *Streptomyces fradiae*. *Van ie Leeuwenhoek* 79, 229-234 (2001).
- Denning DW. Aspergillosis. *Shering-Plough Corporation*. (2006).
- Diaz M, Esteban A, Fernandez-Abalos JM, Santamaria RI. The high-affinity phosphate-binding protein PstS is accumulated under high fructose concentrations and mutation of the corresponding gene affects differentiation in *Streptomyces lividans*. *Microbiology* 151, 2583-2592 (2005).
- Dondero NC, Scotti T. Excretion by streptomycetes of factors causing formation of aerial hyphae by old cultures. *J Bacteriol* 73, 584-585 (1957).
- Engel P, Scharfenstein LL, Dyer JM, Cary JW. Disruption of a gene encoding a putative gamma-butyrolactone-binding protein in *Streptomyces tendae* affects nikkomycin production. *Appl Microbiol Biotechnol* 56, 414-419 (2001).
- Erjavec Z, Verweij PE. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. *Drug Resistance Updates* 5, 3-10 (2002).
- Fehér Z, Szabó G. Genetic relatedness between streptomycin-producing and non-producing strains of *Streptomyces griseus*, studied by means of DNA-DNA hybridization. *Acta Biol Acad Sci Hung* 29, 165-172 (1978).
- Felsenstein, J. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5, 164-166 (1989).
- Felsenstein, J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle (2005).
- Ferguson EV, Ward AC, Sangler JJ, Goodfellow M. Evaluation of *Streptomyces* species groups by pyrolysis mass spectrometry. *Zbl Bakteriell* 285, 169-181 (1997).
- Florent M, Katsahian S, Vekhoff A, Levy V, Rio B, Marie JP, Bouvet A, Cornet M. Prospective Evaluation of a Polymerase Chain Reaction-ELISA Targeted to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* for the Early Diagnosis of Invasive

- Aspergillosis in Patients with Hematological Malignancies. *J Infect Dis* 193, 741-747(2006).
- Folcher M, Gaillard H, Nguyen LT, Nguyen KT, Lacroix P, Bamas-Jacques N, Rinkel M, Thompson CJ. Pleiotropic functions of a *Streptomyces pristinaespiralis* autoregulator receptor in development, antibiotic biosynthesis, and expression of a superoxide dismutase. *J Biol Chem* 276, 44297-44306 (2001).
- González-Pastor JE, Hobbs EC, Losick R. Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* 301, 510-513 (2003).
- Hacker J, Carniel E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial Pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* 2, 376-381 (2001).
- Han W-D, Kawamoto S, Hosoya Y, Fujita M, Sadaie Y, Suzuki K, Ohashi Y, Kawamura F, Ochi K. A novel sporulation-control gene (spo0M) of *Bacillus subtilis* with a σ^H -regulated promoter. *Gene* 217, 31-40 (1998).
- Hara H, Ohnishi Y, Horinouchi S. DNA microarray analysis of global gene regulation by A-factor in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* 155, 2197-2210 (2009).
- Hawley DK, McClure WR. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 11, 2237-2255 (1983).
- Healy FG, Wach M, Crasnoff SB, Gibson DM, Loria R. The *txtAB* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Mol Microbiol* 38, 794-804 (2000).
- Henderson IR, Cappello R, Nataro JP. Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion: response. *Trends Microbiol* 8, 534-535 (2000).
- Hirano S, Kato JY, Ohnishi Y, Horinouchi S. Control of the *Streptomyces* subtilisin inhibitor gene by AdpA in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 188, 6207-6216 (2006).
- 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).

- Horinouchi S, Beppu T. *Streptomyces* genes involved in aerial mycelium formation. FEMS Microbiol Lett 141, 1-9 (1996).
- Horinouchi S, Kumada Y, Beppu T. Unstable genetic determinant of A-factor biosynthesis in streptomycin producing organisms: cloning and characterization. J Bacteriol 158, 481-487 (1984).
- Horinouchi S, Suzuki H, Nishiyama M, Beppu T. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *Streptomyces griseus* gene (*afsA*) responsible for A-factor biosynthesis. J Bacteriol 171, 1206-1210 (1989).
- Horinouchi S. γ -Butyrolactones that control secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomyces*. In: Cell-Cell Signaling in Bacteria. Edited by Gray M, Dunny M, Vinans SC. Washington D.C. American Society for Microbiology pp. 193-207. (1999).
- Horinouchi S. A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. Front Biosci 7, d2045-d2057 (2002).
- Horinouchi S. Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*. Biosci Biotechnol Biochem 71, 283-299 (2007).
- Hourdou ML, Guinand M, Vacheron MJ, Michel G, Denoroy L, Duez C, Englebert S, Joris B, Weber G, Ghuysen JM. Characterization of the sporulation-related gamma-D-glutamyl-(L)meso-diaminopimelic-acid-hydrolysing peptidase I of *Bacillus sphaericus* NCTC 9602 as a member of the metallo(zinc) carboxypeptidase A family. Modular design of the protein. Biochem J 292, 563-570 (1993).
- Huson DH, Richter DC, Rausch C, DeZulian T, Franz M, and Rupp R. Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. BMC Bioinformatics. 8, 460 (2007).
- Iandolo JJ, Worrell V, Groicher KH, Qian Y, Tian R, Kenton S, Dorman A, Ji H, Lin S, Loh P, Qi S, Zhu H, Roe BA. Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages phi 11, phi 12 and phi 13 of *Staphylococcus aureus* 8325. Gene 289, 109-118 (2002).
- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Omura S. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. Nat Biotechnol 21, 526-531 (2003).
- Ishikawa J, Hotta K. FramePlot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein coding regions in bacterial DNA with high GC content. FEMS Microbiol Lett 174, 251-253 (1999).

- Janssen PH. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 72, 1719-1728 (2006).
- Joerger MC, Klaenhammer TR. Cloning expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *J Bact* 172, 6339-6347(1990).
- Joshi M, Rong X, Moll S, Kers J, Franco C, Loria R. Plant pathogenic streptomycetes secrete a novel virulence protein, Nec1, which facilitates infection. *Mol Plant Microbe Interact* 20, 599-608 (2007b)
- Joshi MV, Bignell DRD, Johnson EG, Sparks JP, Gibson DM, Loria R. The AraC/XylS regulator TxtR modulates thaxtomin biosynthesis and virulence in *Streptomyces scabies*. *Mol Microbiol* 66, 633-642 (2007a).
- Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. In: Munro HN, ed. *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York. pp. 21-123 (1969).
- Kamionka A, Parche S, Nothaft H, Siepelmeyer J, Jahreis K, Titgemeyer F. The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 269, 2143-2150 (2002).
- Kanemitsu MY, Jiang W, Eckhart W. Cdc2-mediated phosphorylation of the gap junction protein, connexin43, during mitosis. *Cell Growth Differ* 9, 13-21 (1998).
- 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, Miyahisa I, Mashimo M, Ohnishi Y, Horinouci S. A single target is sufficient to account for the biological effects of the A-factor receptor protein of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 186, 2206-2211 (2004).
- Kato JY, Funa N, Watanabe H, Ohnishi Y, Horinouchi S. Biosynthesis of gamma-butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 2378-2383 (2007).
- Kato JY, Suzuki 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).
- Katz E, Thompson CJ, Hopwood DA. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J Gen Microbiol* 129, 2703-2714 (1983).

- Kawamoto S, Ensign JC. Cloning and characterization of a gene involved in regulation of sporulation and cell division in *Streptomyces griseus*. *Actinomycetes* 9, 136-151 (1995).
- Kawamoto S, Watanabe H, Hesketh A, Ensign JC, Ochi K. Expression analysis of the *ssgA* gene product, associated with sporulation and cell division in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* 143, 1077-1086 (1997).
- Khokhlov AS, Anisova LN, Tovarova II, Kleiner EM, Kovalenko IV, Krasilnikova OI, Kornitskaya EY, Pliner SA. Effect of A-factor on the growth of asporogenous mutants of *Streptomyces griseus*, not producing this factor. *Z Allg Mikrobiol.* 13, 647-55 (1973).
- 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).
- Khokhlov AS. Microbial Autoregulators. Harvard Academic Publishers, pp. 37-42 (1991).
- Kim DW, Chater KF, Lee KJ, Hesketh A. Effect of growth phase and the developmentally significant *bldA*-specified tRNA on the membrane-associated proteome of *Streptomyces coelicolor*. *Microbiol* 151, 2707-2720 (2005).
- 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*.
- 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 Syst Evol Microbiol* 58, 1029-1031 (2008).
- Kitani S, Iida A, Izumi TA, Maeda A, Yamad Y, Nihira T. Identification of genes involved in the butyrolactone autoregulator cascade that modulates secondary metabolism in *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *Gene* 425, 9-16 (2008).
- Kleiner EM, Onoprienko VV, Pliner SA, Soifer VS, Khokhlov AS. Synthesis of racemic A-factor – a bioregulator from *Streptomyces griseus* (*Actinomyces streptomycini*). *Sov J Bioorg* 3, 323 (1977).
- Kleiner EM, Pliner SA, Soifer VS, Onoprienko VV, Balashova TA, Rozynov BV, Khokhlov AS. Structure of the A-factor – a bioregulator from *Streptomyces griseus*. *Sov J Bioorg Chem* 2, 825 (1976).
- Kolattukudy PE. Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 23, 223-250 (1985).

- Kwan T, Liu J, DuBow M, Gros P, Pelletier J. The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 5174-5179 (2005).
- Lee PA, Tullman-Erczek D, Georgiu G. The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu Rev Microbiol* 60, 373-395 (2006).
- Loria R, Bignell DRD, Moll S, Huguet-Tapia JC, Joshi MV, Johnson EG, Seipke RF, Gibson DM. Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* 94, 3-10 (2008)
- 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).
- Maras B, Greenblatt HM, Shoham G, Spungin-Bialik A, Blumberg S, Barra D. Aminopeptidase from *Streptomyces griseus*: primary structure and comparison with other zinc-containing aminopeptidases. *Eur J Biochem* 236, 843-846 (1996).
- Marco F, Pfaller MA, Messer S, Jones RN. Antifungal activities of voriconazole (UK-109,496) and four other antifungal agents against 394 clinical isolates of *Candida* spp. *Antimicrob Agents Chemoter* 42, 161-3 (1998).
- Mauël C, Young M, Kawamoto D. Genes concerned with synthesis of poly(glycerolphosphate), the essential teichoic acid in *Bacillus subtilis* strain 168, are organized in two divergent transcription units. *J Gen Microbiol* 137, 929-941 (1991).
- Mauël C, Young M, Monsutti-Grecescu A, Mariott SA, Karamata D. Analysis of *Bacillus subtilis* tag gene expression using transcriptional fusions. *Microbiology* 140, 2279-2288 (1994).
- McQueen DAR, Schottel JL. Purification and characterization of a novel extracellular esterase from pathogenic *Streptomyces scabies* that is inducible by zinc. *J Bact* 169, 1967-1971 (1987).
- Miguélez EM, Hardisson C, Manzanal MB. Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *J Cell Biol* 145, 515-255 (1999).
- Miguélez EM, Rueda B, Hardisson C, Manzanal MB. Colony development in *Streptomyces carpinensis*: a streptomycete with substrate mycelium spores. *FEMS Microbiol Lett* 157, 103-107 (1997).

- Mikkonen M, Alatasova T. Characterization of the genome region encoding structural proteins of *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* bacteriophage LL-H. *Gene* 151, 53-59 (1994).
- Nakano H, Takehara E, Nihira T, Yamada Y. Gene replacement analysis of the *Streptomyces virginiae barA* gene encoding the butyrolactone autoregulator receptor reveals that BarA acts as a repressor in virginiamycin biosynthesis. *J Bacteriol* 180, 3317-3322 (1998).
- Narahashi Y. The amino acid sequence of zinc-carboxypeptidase from *Streptomyces griseus*. *J Biochem (Tokyo)* 107, 879-886 (1990).
- Narva KE, Feitelson JS. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *redD* locus of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 172, 326-333 (1990).
- Nishida H, Ohnishi Y, Beppu T, Horinouchi S. Evolution of γ -butyrolactone synthases and receptors in *Streptomyces*. *Environ Microbiol* 9, 1986-1994 (2007).
- Nishio K, Ishida T, Arioka H, Kurokawa H, Fukuoka K, Nomoto T, Fukumoto H, Yokote H, Saijo N. Antitumor effects of butyrolactone I, a selective cdc2 kinase inhibitor, on human lung cancer cell lines. *Anticancer Res* 16, 3387-3395 (1996).
- Nothaft H, Dresel D, Willimek A, Mahr K, Niederweis M, Titgemeyer F. The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is biased for N-acetylglucoseamine metabolism. *J Bacteriol* 185, 7019-7023 (2003).
- Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302, 205-217 (2000).
- Ochi K. Metabolic initiation of differentiation and secondary metabolism by *Streptomyces griseus*: significance of the stringent response (ppGpp) and GTP content in relation to A-factor. *J Bacteriol* 169, 3608-3616 (1987).
- Ochman H, Elwyn S, Moran NA. Calibrating bacterial evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 12638-12643 (1999).
- Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M, Horinouchi S. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol* 190, 4050-4060 (2008).
- Ohnishi Y, Kameyama S, Onaka H, Horinouchi S. The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol Microbiol* 34, 102-111 (1999).
- Ohnishi Y, Yamazaki H, Kato JY, Tomono A, Horinouchi S. AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development

- and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. Biosci Biotechnol Biochem 69, 431-439 (2005).
- Oliynyk M, Samborsky M, Lester JB, Mironenko T, Scott N, Dickens S, Haydock SF, Leadlay PF. Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 23338. Nat Biotechnol 25, 447-53 (2007).
- Prentki P, Hirsch HM. *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. Gene 29, 303-313 (1984).
- Rigali S, Titgemeyer F, Barends S, Mulder S, Thomae AW, Hopwood DA, van Wezel GP. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. EMBO Rep 9(7), 670-675 (2008).
- Ritter A, Blum G, Emödy L, Kerényi M, Böck A, Neuhiel B, Rabsch W, Scheutz F, Hacker J. tRNA genes and pathogenicity islands: influence on virulence and metabolic properties of uropathogenic *Escherichia coli*. Mol Microbiol 17, 109-121 (1995).
- Saito A, Schrempf H. Mutational analysis of the binding affinity and transport affinity for N-acetylglucosamine of the novel ABC transporter Ngc in the chitin-degrader *Streptomyces olivaceoviridis*. Mol Gen Genomics 271, 545-553 (2004).
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4, 406-425 (1987).
- Schaller H, Nüsslein C, Bonhoeffer FJ, Kurz C, Nietzschmann I. Affinity chromatography of DNA-binding enzymes on single-stranded DNA-agarose columns. Eur J Biochem 26, 474-481 (1972).
- Schimmel TG, Coffman AD, Parsons SJ. Effect of butyrolactone I on the producing fungus, *Aspergillus terreus*. Appl Environ Microbiol 64, 3707-3712 (1998).
- Schottel JL, Hale V, Babcock MJ. Regulation and secretion of an extracellular esterase from *Streptomyces scabies*. Gene 115, 27-31 (1992).
- Shan R, Stadler M, Sterner O, Anke H. New metabolites with nematocidal and antimicrobial activities from the ascomycete *Lachnum papyraceum* (Karst) Karst. VIII Isolation, structure determination and biological activities of minor metabolites structurally related to mycorrhizin A. J Antibiot 49, 447-452 (1996).
- Siwek GT, Pfaller MA, Polgreen PM, Cobb S, Hoth P, Magalheas-Silverman M, Diekema DJ. Incidence of invasive aspergillosis among allogenic hematopoietic stem cell transplant patients receiving voriconazole prophylaxis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 55, 209-212 (2006).

- 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).
- Stratigopoulos G, Gandeche AR, Cundliffe E. Regulation of tylosin production and morphological differentiation in *Streptomyces fradiae* by TylP, a deduced gamma-butyrolacton receptor. *Mol Microbiol* 45, 735-744 (2002).
- 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, Barabás G, Vályi-Nagy T. Comparison of *Streptomyces griseus* strains which produce streptomycin and those which do not. *Arch Microbiol* 40, 261-274 (1961).
- Szabó G, Békési I, Vitális S. Mode of action of factor C, a substance of regulatory function in cytodifferentiation. *Biochim Biophys Acta* 145, 159-165 (1967).
- Szabó G, Vályi-Nagy T, Barabás G, Bassler G. Comparison of strains of *Streptomyces griseus* which produce streptomycin and those which do not. *Nature* 188, 4748-4749 (1960).
- 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 (1967).
- 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, Vitális S. Sporulation without aerial mycelium formation on agar medium by *Streptomyces bikiniensis* HH1, an A-factor-deficient mutant. *J Gen Microbiol* 138, 1887-1892 (1992).
- Szabó G, Vitális S, Szeszák F, Biró S. Phenotypic heterogeneity of the progeny of *Streptomyces griseus* conidia. *Acta Biol Acad Sci Hung* 48, 45-65 (1997).
- 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 G. A *Streptomyces griseus* differenciálódását befolyásoló anyag izolálása és hatásmódjának tanulmányozása. Akadémiai Doktori értekezés. (1970).
- 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).

- Szeszák F, Szabó G. Alteration of RNA synthesis *in vitro* with an endogenous regulating factor of cytodifferentiation of *Streptomyces griseus*. Acta Biol Acad Sci Hung 24, 11-17 (1973).
- Szeszák F, Vitális S, Biró S, Dalmi L. Amino acid sequence homology of factor C produced by *Streptomyces griseus* with regulatory proteins of zinc finger type. Acta Biol Acad Sci Hung 48, 265-273 (1997).
- Szeszák F, Vitális S, Szabó G. Factor C, a regulatory protein of *Streptomyces griseus* induces release of potassium from the mycelium. J Basic Microbiol 29, 233-240 (1989).
- Szeszák F, Vitális S, Szabó G. Presence of factor C in streptomycetes and other bacteria. In: Genetics and Product Formation in *Streptomyces*. Edited by Baumberg S, Krüger H, Noack D. New York, Plenum pp. 11-18. (1991).
- Szeszák F, Vitális S, Tóth F, Valu G, Fachet J, Szabó G. Detection and determination of factor C - a regulatory protein - in *Streptomyces* strains by antiserum and monoclonal antibody. Arch Microbiology 154, 82-84 (1990).
- Takahashi I, Ojima N, Ogura K, Seto S. Purification and characterization of dimethylallyl pyrophosphate:aspuvinone dimethylallyl transferase from *Aspergillus terreus*. Biochem 17, 2696-2702 (1978).
- Takano E, Chakraborty R, Nihira T, Yamada Y, Bibb MJ. A complex role for the gamma-butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Mol Microbiol 41, 1015-1028 (2001).
- Takano E, Kinoshita H, Mersinias V, Bucca G, Hotchkiss G, Nihira T, Smith CP, Bibb M, Wohlleben W, Chater K. A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a pathway-specific regulatory gene in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. Mol Microbiol 56, 465-479 (2005).
- 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 (2005a).
- Tomono A, Tsai Y, Yamazaki H, Ohnishi Y, Horinouchi, S. Transcriptional control by A-factor of StrR, the pathway-specific transcriptional activator for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. J Bacteriol 187, 5595-5604 (2005b).
- Turner WB, Aldridge DC. Polyketides. In: Fungal metabolites II. Academic Press, New York, N Y. pp. 55-223 (1983).

- Úri J, Békési I. Flavofungin, a new crystalline antifungal antibiotic: origin and biological properties. *Nature* 181, 908 (1958).
- van Wezel GP, White J, Bibb MJ, Postma PW. The malEFG gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): characterization, disruption and transcriptional analysis. *Mol Gen Genet* 254, 604-608 (1997b).
- van Wezel GP, White J, Hoogvliet G, Bibb MJ. Application of *redD*, the transcriptional activator gene of the undecylprodigiosin biosynthetic pathway, as a reporter for transcriptional activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2, 551-556 (2000).
- van Wezel GP, White J, Young P, Postma PW, Bibb MJ. Substrate induction and glucose repression of maltose utilization. *Mol Microbiol* 23, 537-549 (1997a).
- Vasilenko TI, Tovarova II, Khokhlov AS. Effect of the A-factor on the adenylate level in *Streptomyces griseus* Prikl Biokhim Mikrobiol 19, 356-361 (1983).
- Vitális S, Szabó G, Vályi-Nagy T. Comparison of the morphology of streptomycin-producing and nonproducing strains of *Streptomyces griseus*. *Acta Biol Acad Sci Hung* 14, 1-15 (1963).
- Vitális S, Szabó G. Cytomorphological effect of factor C in submerged cultures on the hyphae of *Streptomyces griseus* strain No. 52-1. *Acta Biol Acad Sci Hung* 20, 85-92 (1969).
- Vitális S. A *Streptomyces griseus* differenciálódása és enzimszintézisének szabályozása. Kandidátusi értekezés. (1979).
- Voronina OI, Novikova GV, Khokhlov AS. Changes in NADP-glycohydrolase activity in the process of *Actinomyces streptomycini* development. *Izv Akad Nauk SSSR Biol* 4, 620-624 (1982).
- Vujaklija D, Ueda K, Hong SK, Beppu T. Identification of an A-factor-dependent promoter in the streptomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces griseus*. *Mol Gen Genet* 229, 119-128 (1991).
- Vujaklija D, Horinouchi S, Beppu T. Detection of an A-factor responsive protein that binds to the upstream activation sequence of *strR*, a regulatory gene for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 175, 2652-2661 (1993).
- Vybiral D, Takac M, Loessner M, Witte A, von Ahsen U, Blaesi U. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of two lytic *Staphylococcus aureus* phages: 44AHJD and P68. *FEMS Microbiol Lett* 219, 275-283 (2003).
- Walthers D, Carrol RK, Navarre WW, Libby SJ, Fang FC, Kenney LJ. The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and

- counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol Microbiol* 65, 477-493 (2007).
- White PL, Barton R, Guiver M, Linton CJ, Wilson S, Smith M, Gomez BL, Carr MJ, Kimmitt PT, Seaton S, Rajakumar K, Holyoake T, Kibbler CC, Johnson E, Hobson RP, Jones B, Barnes RA. A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis: a United Kingdom-Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections. *The Journal of Molecular Diagnosis* 8, 376–384 (2006).
- 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).
- Williamson EC, Oliver DA, Johnson EM, Foot AB, Marks DI, Warnock DW. *Aspergillus* antigen testing in bone marrow transplant recipients. *J Clin Pathol* 53, 362–366 (2000).
- Yamaguchi T, Hayashi T, Takami H, Nakasone K, Ohnishi M, Nakayama K, Yamada S, Komatsuzawa H, Sugai M. Phage conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 38, 694-705 (2000).
- Yamazaki H, Ohnishi Y, Horinouchi S. An A-factor-dependent extracytoplasmic function sigma factor (σ^{AdSA}) that is essential for morphological development in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 182, 4596–4605 (2000).
- Yamazaki H, Ohnishi Y, Horinouchi S. Transcriptional switch on of *ssgA* by A-factor, which is essential for spore septum formation in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 185, 1273–1283 (2003a).
- Yamazaki H, Takano Y, Ohnishi Y, Horinouchi S. *amfR*, an essential gene for aerial mycelium formation, is a member of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *Mol Microbiol* 50, 1173–1187 (2003b).
- Zaslavskaya PL, Zhukov VG, Kornitskaya EY, Tovarova II, Khokhlov AS. Influence of A-factor on the ultrastructure of the A-factor deficient mutant of *Streptomyces griseus*. *Microbios* 25, 145-153 (1979).
- Zhu D, He X, Zhou X, Deng Z. Expression of the *melC* operon in several *Streptomyces* strains is positively regulated by AdpA, an AraC family transcriptional regulator involved in morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 187, 3180-3187 (2005).

7. FÜGGELÉK

F1. táblázat. *Streptomyces* C faktor homológok.

A *S. albus* fehérje nincs meg az UNIPROT adatbázisban, a *S. scabies* fehérje pedig még nincs annotálva. Az összeállítás a 2009. augusztus 20.-i állapotot tükrözi.

Sor-szám	UNIPROT azonosító	A fehérje neve és a termelő törzs	Hossza aa	Azonosság %	Hasonlóság %	E érték
1	Q9Z4K0_STRGR	Factor C, <i>Streptomyces griseus</i> (<i>Streptomyces albidoflavus</i>)	324	100	100	1e-102
2	ZP 04703994	Teichoinsav bioszintézis fehérje C <i>Streptomyces albus</i> J1074	336	98	98	1e-102
3	A4FHG8_SACEN	Teichoinsav bioszintézis fehérje C <i>Saccharopolyspora erythraea</i> (NRRL 23338)	332	54	68	1e-91
4	A3KIF3_STRAM	Factor C, <i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877	346	51	66	1e-89
5	Nincs annotálva	Factor C, <i>Streptomyces scabies</i>	325	52	65	8.7e-71
6	B5GVY5_STRCL	Teichoinsav bioszintézis fehérje C <i>Streptomyces clavuligerus</i> ATCC 27064	340	35	50	4e-61
7	B4V276_9ACTO	Teichoinsav bioszintézis fehérje C <i>Streptomyces</i> sp. Mg1	331	27	41	5e-45

F2. táblázat. Actinomycete C faktor homológok.
Az összeállítás a 2009. augusztus 20.-i állapotot tükrözi.

Sor-szám	UNIPROT azonosító	A fehérje neve és a termelő törzs	Hossza aa	Azonosság %	Hasonlóság %	E érték
1	UNIPROT:C2ACI6_THECU	Feltételezett fehérje Thermomonospora curvata DSM 43183	336	52	65	4e-77
2	UNIPROT:C4DNK6_9ACTO	Feltételezett fehérje Stackebrandtia nassauensis DSM 44728	348	37	53	1e-74
3	UNIPROT:C4DE97_9ACTO	Feltételezett fehérje Stackebrandtia nassauensis DSM 44728	337	35	49	1e-64
4	UNIPROT:C4DD77_9ACTO	Feltételezett fehérje Stackebrandtia nassauensis DSM 44728	327	26	43	3e-52

F3. táblázat. Bakteriális C faktor homológok.
Az összeállítás a 2009. augusztus 20.-i állapotot tükrözi.

Sor-szám	UNIPROT azonosító	A fehérje neve és a termelő törzs	Hossza aa	Azonosság %	Hasonlóság %	E érték
1	TAGC_BACSU	Feltételezett teichoinsav bioszintézis fehérje C <i>Bacillus subtilis</i>	442	28	44	1e-58
2	A8SIA4_9FIRM	Feltételezett fehérje <i>Parvimonas micra</i> ATCC 33270	285	19	33	5e-46
3	Q8NWL2_STAAW	Feltételezett fehérje MW1386 <i>Staphylococcus aureus</i> (MW2)	636	20	36	9e-45
4	Q6GGR8_STAAR	Feltételezett fág fehérje <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA252)	636	20	36	9e-45
5	Q6GAJ8_STAAS	Feltételezett fág fehérje <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA476)	636	20	36	9e-45
6	Q5HIY2_STAAC	Feltételezett fehérje <i>Staphylococcus aureus</i> (COL)	636	20	36	9e-45
7	Q2FYD2_STAA8	SLT orf 636-szerű protein <i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 8325)	636	20	36	9e-45
8	Q2FGU2_STAA3	PhiSLT ORF636-szerű protein <i>Staphylococcus aureus</i> (USA300)	636	20	36	9e-45
9	Q03FH5_PEDPA	Feltételezett fehérje <i>Pediococcus pentosaceus</i> (ATCC 25745 / 183-1w)	796	17	31	9e-45
10	A6U0I3_STAA2	Feltételezett fehérje <i>Staphylococcus aureus</i> (JH1)	636	20	36	9e-45
11	A5IRQ2_STAA9	Feltételezett fehérje <i>Staphylococcus aureus</i> (JH9)	636	20	36	9e-45
12	C2K860_STAAU	Struktúr fehérje <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MN8	636	20	36	9e-45
13	C2GAZ0_STAAU	Struktúr fehérje <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> TCH60	636	20	36	9e-45
14	C0F0L1_9FIRM	Feltételezett fehérje <i>Eubacterium hallii</i> DSM 3353	323	23	39	2e-44
15	Q2YTS9_STAAB	Feltételezett fág fehérje <i>Staphylococcus aureus</i> (RF122 / ET3-1)	636	17	35	5e-44
16	A5IR82_STAA9	Feltételezett fehérje <i>Staphylococcus aureus</i> (JH9)	636	18	36	5e-43
17	A6U010_STAA2	Phi ETA orf 56-szerű protein <i>Staphylococcus aureus</i> (JH1)	636	18	36	5e-43

Sor-szám	UIPROT azonosító	A fehérje neve és a termelő törzs	Hossza aa	Azonosság %	Hasonlóság %	E érték
18	C2L6R0_LACSK	Bacteriocin helveticin Lactobacillus sakei subsp. carnosus DSM 15831	325	13	28	1e-42
19	C2K5X2_STAAU	Struktúr fehérje Staphylococcus aureus subsp. aureus MN8	632	17	35	1e-42
20	C2EL19_9LACO	Bacteriocin helveticin Lactobacillus ultunensis DSM 16047	325	13	28	1e-42
21	Q931W8_STAAM	Phi ETA orf 56-szerű protein Staphylococcus aureus (Mu50 / ATCC 700699)	636	16	35	1e-42
22	A7X0A2_STAA1	Feltételezett fehérje Staphylococcus aureus (Mu3 / ATCC 700698)	636	16	35	1e-42
23	A6TYG1_STAA2	Phi ETA orf 56-szerű protein Staphylococcus aureus (JH1)	632	16	35	1e-42
24	A6QI67_STAAE	Feltételezett fehérje Staphylococcus aureus (Newman)	636	16	35	1e-42
25	A5IPP1_STAA9	Feltételezett fehérje Staphylococcus aureus (JH9)	632	16	35	1e-42
26	Q2FX68_STAA8	Phi ETA orf 56-szerű protein Staphylococcus aureus (NCTC 8325)	636	17	34	3e-42
27	A6QG21_STAAE	Feltételezett fehérje Staphylococcus aureus (Newman)	636	17	34	3e-42
28	A6QDZ5_STAAE	Feltételezett fehérje Staphylococcus aureus (Newman)	632	17	34	3e-42
29	Q5FIU1_LACAC	Bacteriocin helveticin J Lactobacillus acidophilus	325	13	27	6e-42
30	C2HQZ0_LACAC	Bacteriocin helveticin J Lactobacillus acidophilus ATCC 4796	325	13	27	6e-42
31	A5Z649_9FIRM	Feltételezett fehérje Eubacterium ventriosum ATCC 27560	388	16	29	7e-40
32	A8YWF7_LACH4	Bacteriocin helveticin Lactobacillus helveticus (DPC 4571)	325	13	27	9e-40
33	C0WMG8_LACBU	Feltételezett fehérje Lactobacillus buchneri ATCC 11577	318	16	27	1e-39
34	Q045J8_LACGA	Bacteriocin helveticin Lactobacillus gasseri (ATCC 33323 / DSM 20243)	331	10	23	3e-39
35	C2KE48_9LACO	Bacteriocin helveticin Lactobacillus crispatus JV- V01	325	14	28	3e-39

Sor-szám	UNIPROT azonosító	A fehérje neve és a termelő törzs	Hossza aa	Azonosság %	Hasonlóság %	E érték
36	C4VPQ7_9LACO	Bacteriocin helveticin Lactobacillus gasseri 202-4	331	11	23	3e-39
37	C0WR08_LACBU	Feltételezett fehérje Lactobacillus buchneri ATCC 11577	323	16	26	1e-38
38	B3K5F5_9BACI	Feltételezett fehérje Geobacillus sp. Y412MC10	330	15	27	2e-38
39	C2CYG5_LACBR	Feltételezett fehérje Lactobacillus brevis subsp. gravesensis ATCC 27305	324	15	27	4e-38
40	C2FNY3_LACPL	Feltételezett fehérje Lactobacillus plantarum subsp. plantarum ATCC 14917	804	16	31	5e-38
41	C0XD38_9LACO	Bacteriocin helveticin Lactobacillus gasseri JV-V03	331	12	24	5e-38
42	C2LDA0_LACSK	Bacteriocin helveticin-J Lactobacillus sakei subsp. carnosus DSM 15831	331	11	26	6e-38
43	C2EQB5_9LACO	Bacteriocin helveticin-J Lactobacillus ultunensis DSM 16047	331	11	26	6e-38
44	Q74KQ5_LACJO	Feltételezett fehérje Lactobacillus johnsonii	331	10	24	5e-37
45	A0AKM6_LISW6	Listeria welshimeri szerotípus 6b (ATCC 35897 / DSM 20650 / SLCC5334)	431	22	37	5e-37
46	C2E7S3_LACJO	Bacteriocin helveticin Lactobacillus johnsonii ATCC 33200	352	9	24	9e-37
47	B1DCH3_9BACL	Feltételezett fehérje Paenibacillus sp. JDR-2	330	14	25	2e-36
48	C2KEL7_9LACO	Bacteriocin helveticin-J Lactobacillus crispatus JV-V01	311	13	26	6e-36
49	C1KX74_LISMC	Feltételezett fehérje Listeria monocytogenes szerotípus 4b (Clip81459)	431	21	38	1e-35
50	Q4EL74_LISMO	Feltételezett fehérje Listeria monocytogenes str. 4b H7858	431	21	38	1e-35
51	B8DGT9_LISMH	Feltételezett fehérje Listeria monocytogenes szerotípus 4a (HCC23)	423	20	39	4e-35
52	C0WR04_LACBU	Feltételezett fehérje Lactobacillus buchneri ATCC 11577	320	14	27	5e-35
53	C0WTC3_LACBU	Possible minor structural protein gp89 Lactobacillus buchneri ATCC 11577	659	19	36	7e-35
54	HVTJ_LACHE	Bacteriocin helveticin-J Lactobacillus helveticus	333	11	25	1e-34

Sor-szám	UNIPROT azonosító	A fehérje neve és a termelő törzs	Hossza aa	Azonosság %	Hasonlóság %	E érték
55	C0XGL3_LACH	Feltételezett fehérje Lactobacillus hilgardii ATCC 8290	320	14	27	1e-34
56	C0WR85_LACBU	Struktúr fehérje gp89 Lactobacillus buchneri ATCC 11577	662	20	38	1e-34
57	C0XGT8_LACHI	Struktúr fehérje gp89 Lactobacillus hilgardii ATCC 8290	662	20	38	6e-34
58	C0WR10_LACBU	Feltételezett fehérje Lactobacillus buchneri ATCC 11577	301	15	28	4e-30
59	A8YWK1_LACH4	Helveticin Lactobacillus helveticus (DPC 4571)	345	10	22	1e-29
60	C4G0S8_ABIDE	Feltételezett fehérje Abiotrophia defectiva ATCC 49176	392	14	29	8e-28
61	C0XFN8_LACHI	Feltételezett fehérje Lactobacillus hilgardii ATCC 8290	885	13	30	7e-26
62	A9KPK2_CLOPH	Feltételezett fehérje Clostridium phytofermentans (ATCC 700394 / DSM 18823 / ISDg)	344	15	30	1e-24
63	C0XIQ4_LACHI	Feltételezett fehérje Lactobacillus hilgardii ATCC 8290	188	15	30	1e-17
64	C0XGL6_LACHI	Feltételezett fehérje Lactobacillus hilgardii ATCC 8290	205	16	27	9e-13
65	C0XIQ3_LACHI	Feltételezett fehérje Lactobacillus hilgardii ATCC 8290	119	17	27	5e-08
66	Q072Q6_ECOLX	Feltételezett fehérje Escherichia coli BL21(DE3)	319	15	27	9e-35
67	B0NT38_BACSE	Feltételezett fehérje Bacteroides stercoris ATCC 43183	463	17	30	7e-29
68	B7AMB2_9BACE	Feltételezett fehérje Bacteroides eggerthii DSM 20697	370	17	30	1e-28

F4. táblázat. Bakteriofág C faktor homológok.
Az összeállítás a 2009. augusztus 20.-i állapotot tükrözi.

Sor-szám	UNIPROT azonosító	A fehérje és a hordozó bakteriofág neve	Hossza aa	Azonosság %	Hasonlóság %	E érték
1	A8Z271_STAAT	Feltételezett fág fehérje Staphylococcus aureus (USA300 / TCH1516)	636	20	36	9e-45
2	Q9B0C7_9CAUD	Orf636 Staphylococcus fág phiSLT	636	20	36	9e-45
3	Q8SDN9_9CAUD	SLT orf 636-szerű fehérje Staphylococcus fág phi 12	636	20	36	9e-45
4	Q4ZCZ9_9CAUD	ORF002 Staphylococcus fág 42E	636	20	36	9e-45
5	Q4ZCK5_9CAUD	ORF004 Staphylococcus fág 47	636	20	36	9e-45
6	B7T0K5_9CAUD	Gp54 Staphylococcus fág phiSauS-IPLA35	636	20	36	9e-45
7	B5WZQ7_9VIRU	Feltételezett fehérje Staphylococcus fág phi2958PVL	636	20	36	9e-45
8	A7TWK5_9VIRU	Feltételezett fehérje Staphylococcus fág tp310-2	636	20	36	9e-45
9	Q4ZCS3_9CAUD	ORF 004 Staphylococcus fág 3A	636	20	35	2e-44
10	B7T0E3_9CAUD	Gp53 Staphylococcus fág phiSauS-IPLA88	636	17	35	5e-44
11	Q4ZA90_9CAUD	ORF003 Staphylococcus fág X2	632	16	35	2e-43
12	Q4ZDU1_9CAUD	ORF002 Staphylococcus fág 69	636	18	36	5e-43
13	Q4ZBA3_9CAUD	ORF002 Staphylococcus fág 55	632	18	36	5e-43
14	Q4ZAV3_9CAUD	ORF002 Staphylococcus fág 52A	632	18	36	5e-43
15	A9CRC4_9CAUD	Feltételezett struktúrfehérje Staphylococcus fág phiMR11	632	18	36	5e-43
16	A7YGW5_9CAUD	Feltételezett struktúrfehérje Staphylococcus fág 80	632	18	36	5e-43
17	Q9FZY9_9CAUD	ORF56 Staphylococcus fág phiETA	632	16	35	7e-43
18	Q4ZB26_9CAUD	ORF002 Staphylococcus fág 29	632	17	35	9e-43
19	Q4ZDD6_9CAUD	ORF002 Staphylococcus fág 85	636	16	35	1e-42
20	Q4ZBX7_9CAUD	ORF002 Staphylococcus fág 96	632	16	35	1e-42
21	A1KXA9_9CAUD	Feltételezett fehérje Staphylococcus fág phiETA3	632	17	35	1e-42
22	A1KX41_9CAUD	Staphylococcus fág phiETA2 litikus fehérje	636	16	35	1e-42
23	A0EWM6_9CAUD	Feltételezett fehérje Staphylococcus aureus fág phiNM1	636	16	35	1e-42
24	Q8SDT4_BPPHA	Phi ETA orf 56-szerű fehérje Staphylococcus fág phi11	636	17	34	3e-42
25	Q4ZBQ2_9VIRU	ORF002 Staphylococcus fág ROSA	632	17	34	3e-42
26	Q4ZBH8_9CAUD	ORF002 Staphylococcus fág 71	632	17	34	3e-42
27	Q4ZAN7_9CAUD	ORF002 Staphylococcus fág 88	632	17	34	3e-42

Sor-szám	UNIPROT azonosító	A fehérje és a hordozó bakteriofág neve	Hossz a aa	Azonosság %	Hasonlóság %	E érték
28	Q4ZAG3_9CAUD	ORF002 Staphylococcus fág 92	632	17	34	3e-42
29	B2ZYZ7_9CAUD	Feltételezett struktúrfehérje Staphylococcus fág phiMR25	636	17	34	3e-42
30	A0EX75_9CAUD	Feltételezett fehérje Staphylococcus fág phage phiNM4	632	17	34	3e-42
31	A0EWU2_9CAUD	Feltételezett fehérje Staphylococcus aureus fág phiNM2	636	17	34	3e-42
32	Q4ZDL3_9CAUD	ORF002 Staphylococcus fág 53	636	17	34	1e-41
33	A4ZFC7_9CAUD	Struktúrfehérje Staphylococcus fág 80alpha	636	17	34	1e-41
34	Q859K8_9CAUD	Struktúrfehérje Staphylococcus fág 44AHJD	647	20	34	2e-41
35	Q859I6_9CAUD	Struktúrfehérje Staphylococcus aureus fág P68	647	20	34	2e-41
36	Q4ZE58_9CAUD	ORF002 Staphylococcus fág 66	647	20	34	2e-41
37	A8D3T0_9CAUD	Struktúrfehérje Staphylococcus fág SAP-2	647	20	35	1e-40
38	Q38354_BPLLH	Struktúrfehérje gp89 Lactococcus fág LL-H (Lactobacillus delbrueckii fág LLH)	796	16	29	9e-37

F5. táblázat. Gomba C faktor homológok.
Az összeállítás a 2009. augusztus 20.-i állapotot tükrözi.

Sor-szám	UNIPROT azonosító	A fehérje neve és a termelő törzs	Hossza aa	Azonosság %	Hasonlóság %	E érték
1	Q4WZ07_ASPFU	FacC-szerű extracelluláris szignal protein, <i>Aspergillus fumigatus</i>	315	56	70	4e-93
2	B0XZT7_ASPFC	FacC-szerű extracelluláris szignal protein, <i>Aspergillus fumigatus</i>	315	56	70	4e-93
3	A1D5S9_NEOFI	Feltételezett fehérje <i>Neosartorya fischeri</i>	315	56	70	2e-92
4	Q2GNH8_CHAGB	Feltételezett fehérje <i>Chaetomium globosum</i>	321	57	69	1e-85
5	Q4WDT0_ASPFU	FacC-szerű extracelluláris szignal protein, <i>Aspergillus fumigatus</i>	310	50	63	3e-83
6	B0Y182_ASPFC	FacC-szerű extracelluláris szignal protein, <i>Aspergillus fumigatus</i>	310	50	63	3e-83
7	A1D0U9_NEOFI	Feltételezett protein <i>Neosartorya fischeri</i>	310	50	63	1e-81
8	B6HVZ0_PENCW	Pc22g15320 protein <i>Penicillium chrysogenum</i>	312	48	61	4e-81
9	C5GXR9_AJEDE	Teichoinsav bioszintézis protein C <i>Ajellomyces dermatitidis</i>	282	46	59	3e-76
10	B2APH4_PODAN	Feltételezett fehérje <i>Podospora anserina</i>	297	53	68	4e-76
11	C5K0V0_AJEDE	Teichoinsav bioszintézis protein C <i>Ajellomyces dermatitidis</i>	263	41	53	1e-63
12	C1HDC7_PARBR	Feltételezett fehérje <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	322	42	54	1e-56
13	Q0CRZ8_ASPTN	Feltételezett fehérje <i>Aspergillus terreus</i>	128	58	71	6e-23
14	C0RXY5_PARBP	Feltételezett fehérje <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	199	54	70	9e-08
15	C0NDU5_AJECG	Teichoin sav bioszintézis protein C <i>Ajellomyces capsulata</i>	106	35	52	1e-06

8. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

A megjelenés évének vagy a legutolsó évnek az impakt faktorával és hivatkozási adatokkal

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

- A.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. Hiv. 59.
- A.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.
- A.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. Hiv. 3.
- A.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. Hiv. 8.
- A.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 Hiv. 6.
- A.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. Hiv. 3.
- A.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. Hiv. 4.
- A.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. Hiv. 5.

- A.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. Hiv. 2.
- A.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.
- A.11 Chater KF, **Biró S,** Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. The extracellular biology of *Streptomyces*. FEMS Microbiol Rev accepted. If. 7.963.
- A.12 **Biró S,** Birkó Z, és Paholcsek M. P0800722 alapszámú magyar szabadalmi bejelentés. Aszpergillózisos betegségek detektálására alkalmas diagnosztikai módszer. (2008)
- A.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.

Összesített if. 42.897. Hivatkozás: 90.

A témához kapcsolódó további közlemények

- B.1 **Biró, S,** Vitális S, Szabó G. Detection and changes of nucleotide pyrophosphotransferase activity of *Streptomyces griseus* strains in submerged culture. Acta Biol Acad Sci Hung 30, 41-45 (1979). if. 0,305. Hiv. 2.
- B.2 **Biró S,** Vitális S, Szabó G. Detection and changes of nucleotide pyrophosphotrasferase activity in cultures of *Streptomyces griseus* strains on solid media. Acta Biol Acad Sci Hung 30, 381-386 (1979). if. 0,305. Hiv. 5.
- B.3 **Biró S,** Vitális S, Szabó G. Nucleotide pyrophosphotransferase in *Streptomyces* strains. Actinomycetes and related organisms 14, 48-56 (1979). if 0. Hiv. 4.
- B.4 Vitális S, **Biró S,** Vargha G, Békési I, Szabó G. Differentiation and its regulation in submerged culture of *Streptomyces griseus*. In: *Actinomycetes*. (Zbl. Bkt. Suppl. 11,

- 153-156) (1981). Schall KP, Pulverer G, eds., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. Zbl. Bakt. Parazit. (Int. J. of Medical Microbiology. Elsevier). If. 0,530. Hiv. 3.
- B.5 Szabó G, Vitális S, Békési I, **Biró S**, Valu G. Różnicowanie szczepów *Streptomyces griseus*. Antibiotiky, Zuzanna Kowszky-Gindifer, Woljciecha Sobiczewskiego (pod redakcja). Prezdiebiorstwo Wydawnictw i Wystaw, Prezenyslu Chemisznego i Lekkiego, Warsawa, pp. 45-61 (1983).
- B.6 Szabó G, **Biró S**, Trón L, Valu G, Vitális S. Mode of action of factor C upon the differentiation process of *Streptomyces griseus*. Proc. Int. Symp. on Actinomycetes Biology Eds. Ortiz-Ortiz, L., Bojalil, L.F. & Yakoleff, V. Acad. Press, London-New York-San Francisco, pp. 197-214 (1984). Hiv. 2.
- B.7 **Biró S**, Smith CP, Chater KF. The molecular genetics of glycerol utilization in *Streptomyces*. In: Bilogical, Biochemical and Biomedical aspects of *Actinomycetes*. Eds. Szabó G, Biró S, Goodfellow M. Akadémiai Kiadó Budapest pp. 117-120 (1986).
- B.8 Valin C, Rodrigez R, Ramos A, Alonso E, **Biró S**. Increased oxytetracycline production in *Streptomyces rimosus* after protoplast fusion. Biotechnology Letters 8, 343-344 (1986). if. 1,177. Hiv. 2.
- B.9 **Biró S**, Chater KF. Cloning of *Streptomyces griseus* and *Streptomyces lividans* genes for glycerol dissimilation. *Gene* 56, 79-86 (1987). if. 3,844. Hiv. 16.
- B.10 Hutchinson CR, Bibb MJ, **Biró S**, Collins JF, Motamedi H, Shafiee A, Puneekar N. Genetic and enzymological basis of polyketide antibiotic biosynthesis. In: Biology of Actinomycetes '88. Eds. Okami H, Beppu T, Ogawara S. Japan Scientific Societies Press Tokyo pp. 76-81 (1988). Hiv. 4.
- B.11 Szabó G, Békési I, **Biró S**, Szeszák F, Vitális S. Autoregulators of secondary metabolite-producing *Streptomyces*. In: Microbial physiology and manufacturing industry. Eds. Ratledge C, Szentirmai A, Barabás G, Kevei F. OMIKK, Budapest, 177-189 (1988).
- B.12 Bibb, MJ, **Biró S**, Motamedi H, Collins JF, Hutchinson, CR. Analysis of the nucleotide sequence of the *Streptomyces glaucescens tcmI* genes provide key information about the enzymology of the polyketide antibiotic biosynthesis. The EMBO Journal, 8(9) 2727-2736 (1989). 11,881. Hiv. 216.
- B.13 Bolotin A, **Biró S**. Nucleotide sequence of the putative regulatory gene and major promoter region of the *Streptomyces griseus* glycerol operon. *Gene* 87, 151-152 (1990). if. 3,172. Hiv. 11.

- B.14 Szabó G, Vitális S, Szeszák F, **Biró S**. Developmental heterogeneity of *Streptomyces griseus* conidia. Sekundärmetabolismus bei Mikroorganismen. Eds. by Willi Khun und Hans-Peter Fiedler. Attempto Verlag, Tübingen, pp. 109-122 (1995).
- B.15 Sümegi A, Birkó Z, Szeszák F, Vitális S, **Biró S**. A short GC-rich sequence involved in deletion formation of cloned DNA in *E. coli*. Acta Biol Acad Sci Hung 48(3), 275-279 (1997). if. 0.
- B.16 Hwang Y-S, Kim E-S, **Biró S**, Choi C-Y. Cloning and analysis of a DNA fragment stimulating avermectin production in various *Streptomyces avermitilis* strains. Applied and Environmental Microbiology 69(2) 1263-1269 (2003). If. 3,820 Hiv. 10.
- B.17 Analysis and identification of ADP-ribosylated proteins of *Streptomyces coelicolor* M145. Penyige A, Keserű J, Fazakas F, Schmelcz I, Szirák K, Barabás G, **Biró S**. J Microbiol 47, 549-556 (2009). If. 1,385

Összesített if. 26,419. Hivatkozás: 275.

A+B if. 69,316. Hiv. A+B= 365.

Egyéb közlemények

- C.1 Szabó G, **Biró S**. Genetics in Hungary back into the normal track. Acta Biol Acad Sci Hung 48(1), 43 (1997).
- C.2 Sándor E, Pusztahelyi T, Karaffa L, Karányi Z, Pócsi I, **Biró S**, Szentirmai A, Pócsi I. Allosamidin inhibits fragmentation of *Acremonium chrysogenum* but does not influence the cephalosporin-C production of the fungus. FEMS Microbiol Lett 164 231-236 (1998). if. 1,581. Hiv. 27.
- C.3 Sándor E, Szentirmai A, **Biró S**, Karaffa L. Specific cephalosporin production of *Acremonium chrysogenum* is independent of the culture density. Biotechnol Techniques 13, 443-445 (1999). If. 0,613. Hiv. 5.
- C.4 Karaffa L, Váczy KZ, Sándor E, **Biró S**, Szentirmai A, Pócsi I. Cyanide resistant alternative respiration is strictly correlated to intracellular peroxide levels in *Acremonium chrysogenum*. Free Radical Research, 34, 405-416 (2001). if. 2,735. Hiv. 12.
- C.5 Nagy Z, Kiss T, Szentirmai A, **Biró S**. β -galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification and characterization of the enzyme. Prot Expr Purif 21, 24-29 (2001). if. 1,497. Hiv. 23.

- C.6 Nagy Z, Keresztessy Z, Szentirmai A, **Biró S**. Carbon source regulation of β -galactosidase biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. J Basic Microbiol 41(6), 351-362 (2001). if. 0,421. Hiv. 2.
- C.7 Fekete E, Karaffa L, Sándor E, Seiboth B, **Biró S**, Szentirmai A, Kubicek CP. Regulation of formation of the intracellular β -galactosidase of *Aspergillus nidulans*. Arch Microbiol 179, 7-14 (2002). if. 1,903. Hiv. 11.
- C.8 Bartha I, Dinya T, Seres I, Paragh G, Ross C, Hayden MR, **Biró S**, Vargha G. Acute Hypertriglyceridemic Pancreatitis during Pregnancy due to Homozygous Mutation of Lipoprotein Lipase Gene. Clin Chim Acta 400, 137-138 (2009). If. 2,960.

Összesített if. 11,71. Hivatkozás: 80

A+B+C if. 81,026 Hivatkozás A+B+C = 445

Dolgozataim összesített impakt faktora: 81,026

Első és utolsó szerzős cikkeim impakt faktora 43,873.

A disszertáció alapját képező dolgozatok (13) impakt faktora 42,897.

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

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

A publikációkra kapott hivatkozások száma: 445, ebből független 325.

**9. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ NYOMTATÁSBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK
MÁSOLATAI**

TERJEDELMI OKOKBÓL A MELLÉKELT CD-N CSATOLOM A DOLGOZATBAN FELHASZNÁLT,
KÖZLÉSRE ELFOGADOTT, DE NYOMTATÁSBAN MÉG MEG NEM JELENT ALÁBBI CIKKEKET

FEMS MICRIBIOL REV (KÖZLÉSRE ELFOGADVA)

ACTA BIOL ACAD SCI HUNG (KÖZLÉSRE ELFOGADVA)

TERJEDELMI OKOKBÓL UGYANCSAK CD-N CSATOLOM A

MOL CELL PROTEOMICS 6.7, 1248-1256 (2007)

MOL CELL PROTEOMICS 8,10, 2396-2403 (2009)

CIKKEKHEZ KAPCSOLÓDÓ, A FOLYÓIRAT HONLAPJÁN HOZZÁFÉRHETŐ „SUPPLEMENTARY
MATERIAL” C. FÁJLOKAT