

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozat alapjául szolgáló kutatómunkában való részvételét és mindenre kiterjedő segítségét külön köszönöm Dr. Csörgő Bálintnak, akinek munkája alapjaiban járult hozzá dolgozatom elkészítéséhez.

Szeretném megköszönni továbbá témavezetőmnek, Dr. Pál Csabának, illetve Dr. Pósfai Györgynek kutatómunkám támogatását, ötleteiket, valamint, hogy a dolgozat megírása során nyújtott észrevételeikkel nagyban hozzájárultak munkám elkészítéséhez.

Köszönöm továbbá Nagy Istvánnak, Latinovics Dórának és Horváth Baláznak a SOLiD™ szekvenálás és a hozzá kapcsolódó adatanalízis elvégzését, illetve Dr. Szamecz Bélának a törzsek növekedési rátájának meghatározása során nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom a Kísérleti Evolúcióbíológiai Csoport és a Genommérnöki Csoport összes tagjának is. Köszönöm, hogy a mindennapi munka során aktívan segítettek munkámat, és hogy mindig bizalommal fordulhattam hozzájuk különböző kérdésekkel, kérésekkel.



A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretei között valósult meg.

7. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Nyerges Ákos a dolgozatomban a leírt munkafolyamatok közül a :

- szakirodalmi áttekintést
- MAGE módszer gyakorlatba ültetését laboratóriumunkban
- MAGE háttér-mutációs folyamataiból adódó probléma felvetését
- MAGE hőmérséklet érzékeny mutánsokkal történő, a dolgozatban feltüntetett módosításának elméleti kidolgozását és a folyamat gyakorlati optimalizálását
- kísérletek tervezését
- részben a kísérletek kivitelezését

végeztem el.

Nyerges Ákos

Szeged, 2014. április 21.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Esvelt,K.M. and Wang,H.H. (2013) Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Mol. Syst. Biol.*, 9.
2. Wang,H.H., Isaacs,F.J., Carr,P.A., Sun,Z.Z., Xu,G., Forest,C.R. and Church,G.M. (2009) Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature*, 460, 894–898.
3. Wang,H.H., Kim,H., Cong,L., Jeong,J., Bang,D. and Church,G.M. (2012) Genome-scale promoter engineering by coselection MAGE. *Nat. Methods*, 9, 591–593.
4. Sandoval,N.R., Kim,J.Y.H., Glebes,T.Y., Reeder,P.J., Aucoin,H.R., Warner,J.R. and Gill,R.T. (2012) Strategy for directing combinatorial genome engineering in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109, 10540–10545.
5. Isaacs,F.J., Carr,P.A., Wang,H.H., Lajoie,M.J., Sterling,B., Kraal,L., Tolonen,A.C., Gianoulis,T.A., Goodman,D.B., Reppas,N.B., et al. (2011) Precise Manipulation of Chromosomes in Vivo Enables Genome-Wide Codon Replacement. *Science*, 333, 348–353.
6. Lajoie,M.J., Rovner,A.J., Goodman,D.B., Aerni,H.-R., Haimovich,A.D., Kuznetsov,G., Mercer,J.A., Wang,H.H., Carr,P.A., Mosberg,J.A., et al. (2013) Genomically Recoded Organisms Expand Biological Functions. *Science*, 342, 357–360.
7. Ellis,H.M., Yu,D., DiTizio,T. and Court,D.L. (2001) High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 6742–6746.
8. Yu,D., Sawitzke,J.A., Ellis,H. and Court,D.L. (2003) Recombineering with overlapping single-stranded DNA oligonucleotides: Testing a recombination intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 7207–7212.

9. Costantino,N. and Court,D.L. (2003) Enhanced levels of λ Red-mediated recombinants in mismatch repair mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 15748–15753.
10. Schaaper,R.M. and Dunn,R.L. (1987) Spectra of spontaneous mutations in *Escherichia coli* strains defective in mismatch correction: the nature of in vivo DNA replication errors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 6220–6224.
11. Sawitzke,J.A., Costantino,N., Li,X., Thomason,L.C., Bubunenko,M., Court,C. and Court,D.L. (2011) Probing Cellular Processes with Oligo-Mediated Recombination and Using the Knowledge Gained to Optimize Recombineering. *J. Mol. Biol.*, 407, 45–59.
12. Wang,H.H., Xu,G., Vonner,A.J. and Church,G. (2011) Modified bases enable high-efficiency oligonucleotide-mediated allelic replacement via mismatch repair evasion. *Nucleic Acids Res.*, 39, 7336–7347.
13. Carr,P.A., Wang,H.H., Sterling,B., Isaacs,F.J., Lajoie,M.J., Xu,G., Church,G.M. and Jacobson,J.M. (2012) Enhanced multiplex genome engineering through co-operative oligonucleotide co-selection. *Nucleic Acids Res.*, 40, e132–e132.
14. Hong,E.S., Yeung,A., Funchain,P., Slupska,M.M. and Miller,J.H. (2005) Mutants with temperature-sensitive defects in the *Escherichia coli* mismatch repair system: Sensitivity to mispairs generated in vivo. *J. Bacteriol.*, 187, 840–846.
15. Fehér,T., Karcagi,I., Gy\Horfy,Z., Umenhoffer,K., Csörgo, B. and Pósfai,G. (2008) Scarless engineering of the *Escherichia coli* genome. In *Microbial Gene Essentiality: Protocols and Bioinformatics*. Springer, pp. 251–259.
16. Muyrers,J.P.P., Zhang,Y., Testa,G. and Stewart,A.F. (1999) Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res.*, 27, 1555–1557.
17. Sergueev,K., Court,D., Reaves,L. and Austin,S. (2002) *E. coli* Cell-cycle Regulation by Bacteriophage Lambda. *J. Mol. Biol.*, 324, 297–307.

18. Foster,P.L. (2006) Methods for Determining Spontaneous Mutation Rates. *Methods Enzymol.*, 409, 195–213.
19. Sarkar,S., Ma,W.T. and Sandri,G. v H. (1992) On fluctuation analysis: a new, simple and efficient method for computing the expected number of mutants. *Genetica*, 85, 173–179.
20. Hall,B.M., Ma,C.-X., Liang,P. and Singh,K.K. (2009) Fluctuation AnaLysis CalculatOR: a web tool for the determination of mutation rate using Luria-Delbr?ck fluctuation analysis. *Bioinformatics*, 25, 1564–1565.
21. Warringer,J. and Blomberg,A. (2003) Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 20, 53–67.
22. Warringer,J., Ericson,E., Fernandez,L., Nerman,O. and Blomberg,A. (2003) High-resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 15724–15729.
23. Lamers,M.H., Perrakis,A., Enzlin,J.H., Winterwerp,H.H.K., de Wind,N. and Sixma,T.K. (2000) The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G•T mismatch. *Nature*, 407, 711–717.
24. Ban,C. and Yang,W. (1998) Crystal Structure and ATPase Activity of MutL: Implications for DNA Repair and Mutagenesis. *Cell*, 95, 541–552.
25. Yu,D., Ellis,H.M., Lee,E.-C., Jenkins,N.A., Copeland,N.G. and Court,D.L. (2000) An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 5978–5983.
26. Lee,H., Popodi,E., Tang,H. and Foster,P.L. (2012) Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109, E2774–E2783.

27. Wang,H.H. and Church,G.M. (2011) Multiplexed Genome Engineering and Genotyping Methods. In *Methods in Enzymology*. Elsevier, Vol. 498, pp. 409–426.

28. Swingle,B., Markel,E., Costantino,N., Bubunenko,M.G., Cartinhour,S. and Court,D.L. (2010) Oligonucleotide Recombination in Gram-Negative Bacteria. *Mol. Microbiol.*, 75, 138–148.

29. Pijkeren,J.-P. van and Britton,R.A. (2012) High efficiency recombineering in lactic acid bacteria. *Nucleic Acids Res.*, 40, e76–e76.

30. Brachman,E.E. and Kmiec,E.B. (2003) Targeted Nucleotide Repair of *cyc1* Mutations in *Saccharomyces cerevisiae* Directed by Modified Single-Stranded DNA Oligonucleotides. *Genetics*, 163, 527–538.

31. DiCarlo,J.E., Conley,A.J., Penttilä,M., Jäntti,J., Wang,H.H. and Church,G.M. (2013) Yeast Oligo-mediated Genome Engineering (YOGE). *ACS Synth. Biol.*, 10.1021/sb400117c.

32. Rios,X., Briggs,A.W., Christodoulou,D., Gorham,J.M., Seidman,J.G. and Church,G.M. (2012) Stable Gene Targeting in Human Cells Using Single-Strand Oligonucleotides with Modified Bases. *PLoS ONE*, 7, e36697.

33. Argueso,J.L., Smith,D., Yi,J., Waase,M., Sarin,S. and Alani,E. (2002) Analysis of Conditional Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* *MLH1* Gene in Mismatch Repair and in Meiotic Crossing Over. *Genetics*, 160, 909–921.

34. Muirers, J P, Y Zhang, G Testa, and A F Stewart. “Rapid Modification of Bacterial Artificial Chromosomes by ET-Recombination.” *Nucleic Acids Research* 27, no. 6 (March 15, 1999): 1555–57.

35. Datsenko, Kirill A., and Barry L. Wanner. “One-Step Inactivation of Chromosomal Genes in *Escherichia Coli* K-12 Using PCR Products.” *PNAS* 97, no. 12 (June 6, 2000): 6640–45.

36. G., Roman, Kathrin Blank, and Thorsten Wille. "Site-Directed Mutagenesis Using Oligonucleotide-Based Recombineering." In Genetic Manipulation of DNA and Protein - Examples from Current Research, edited by David Figurski. InTech, 2013.
37. Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1972.
38. Szybalski, W. In Vivo and in Vitro Initiation of Transcription, (A. Kohn and A. Shatkey (Eds.), Control of Gene Expression), 411–2, 415–7. New York: Plenum Press, 1974.
39. Sambrook J, Fritsch, E.F., Maniatis, T.: Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1987.
40. Cameron, D. Ewen, Caleb J. Bashor, James J. Collins: A Brief History of Synthetic Biology. Nature Reviews Microbiology (doi:10.1038/nrmicro3239) April 2014.

9. FÜGGELÉK

1. KIEGÉSZÍTŐ TÁBLÁZAT

2. KIEGÉSZÍTŐ TÁBLÁZAT

Törzs	Referenci a nukleotid pozíció	Eltérés típusa	Vad típusú allél	Mutáns allél	Annotáció	Kódoló régiót érintő változás	Aminosav csere (másértelmű mutáció esetén)
dMUTS1	198053	SNV	C	T	Gene: bamA, CDS: bamA, Mature peptide	126C>T	
	500989	SNV	C	T	Gene: ybaL, CDS: ybaL	1474G>A	Gly492Ser
	809211	SNV	G	A	Gene: bioB, CDS: bioB	645G>A	
	856275	SNV	A	G	Gene: ybiT, CDS: ybiT	1090A>G	Thr364Ala
	1266980	SNV	G	A	Gene: ychA, CDS: ychA	438G>A	
	1511304	SNV	T	C	Gene: ydcT, CDS: ydcT	464T>C	Val155Ala
	1723026	SNV	A	G	Gene: ydhF, CDS: ydhF	631T>C	Cys211Arg
	1969189	SNV	T	C	Gene: tar, CDS: tar	1527A>G	
	2177201	SNV	T	C	Gene: yegT, CDS: yegT	359T>C	Val120Ala
	2357301	SNV	T	C	Gene: rhmT, CDS: rhmT	874A>G	Thr292Ala
	2481492	Deletion	A	-			
	3090053	SNV	G	A	Gene: gshB, CDS: gshB	154G>A	Ala52Thr
	3454941	SNV	A	G	Gene: gspD, CDS: gspD	543A>G	Ile181Met
	3534326	SNV	C	T	Gene: ompR, CDS: ompR	281G>A	Gly94Asp
	3535473	SNV	G	A	Gene: yhgF, CDS: yhgF	67G>A	Ala23Thr
	3844792	SNV	G	A	Gene: uhpT, CDS: uhpT	399C>T	
	4190408	SNV	A	G	Gene: thiG, CDS: thiG	251T>C	Leu84Pro
	1707433	Insertion	-	C	Gene: rsxD, CDS: rsxD	267_268insC	Pro90 fs
dMUTS2	516333	SNV	A	G	Gene: ybbM, CDS: ybbM	527A>G	Asp176Gly
	1099170	SNV	C	T	Gene: ycdY, CDS: ycdY	308C>T	Ala103Val
	1141087	SNV	G	A	Gene: rne, CDS: rne	2504C>T	Pro835Leu
	1152009	SNV	C	T	Gene: fabF, CDS: fabF	848C>T	Ala283Val
	1211304	Insertion	-	C			
	1348135	SNV	C	T			
	1463917	SNV	G	A	Gene: ydbA, CDS: ydbA	502G>A	Ala168Thr
	1816568	Deletion	C	-			
	2142854	SNV	G	A	Gene: yegE, CDS: yegE	1565G>A	Arg522Gln
	2273825	SNV	A	G	Gene: yejE, CDS: yejE	531A>G	
	3092810	SNV	G	A	Gene: yggR, CDS: yggR	293C>T	Ser98Leu
	3248018	SNV	G	A	Gene: yqjE, CDS: yqjE	314G>A	Arg105His
	3534292	Insertion	-	T	Gene: ompR, CDS: ompR	315_316insA	Pro106 fs
	3968050	Insertion	-	G	Gene: wzzE, CDS: wzzE	996_997insG	Gly333 fs
dMUTS3	72811	SNV	A	G	Gene: thiQ, CDS: thiQ	117T>C	
	337498	SNV	C	T	Gene: yahF, CDS: yahF	1497C>T	
	473782	SNV	C	T	Gene: tesB, CDS: tesB, Mature peptide	604G>A	Ala202Thr
	839090	SNV	A	G	Gene: fiu, CDS: fiu	1665T>C	
	1526035	SNV	C	T	Gene: rhsE, CDS: rhsE	110C>T	Thr37Met
	1699258	SNV	G	A	Gene: malY, CDS: malY	278G>A	Gly93Asp
	1705146	SNV	C	T	Gene: rsxC, CDS: rsxC	204C>T	
	2055694	Insertion	-	C			

	2332434	SNV	T	C	Gene: yfaT, CDS: yfaT	548A>G	Lys183Arg
	2697672	SNV	T	C			
	2938371	SNV	G	A	Gene: rlmM, CDS: rlmM	895C>T	Arg299Cys
	3132618	SNV	C	T	Gene: yghT, CDS: yghT	466C>T	His156Tyr
	3212090	SNV	T	C	Gene: rpoD, CDS: rpoD	1022T>C	Leu341Pro
	3392101	SNV	T	C	Gene: yhdP, CDS: yhdP	2180A>G	Asn727Ser
	3482189	SNV	G	A	Gene: yheT, CDS: yheT	966G>A	Trp322 STOP
	3534246	SNV	G	A	Gene: ompR, CDS: ompR	361C>T	Arg121Cys
	3571638	SNV	C	T			
	3805846	SNV	T	C	Gene: rfaQ, CDS: rfaQ	276A>G	
	3957957	SNV	C	T			
	4285209	Insertion	-	G	Gene: acs, CDS: acs	186_187insC	Gly63 fs
	4350904	SNV	C	T			
	4516166	SNV	T	C	Gene: fecl, CDS: fecl	93A>G	
dMUTS4	133663	SNV	T	C	Gene: acnB, CDS: acnB	2049T>C	
	808413	Insertion	-	G	Gene: bioA, CDS: bioA	68_69insC	Pro23 fs
	1046492	SNV	C	T	Gene: gfcD, CDS: gfcD	677G>A	Gly226Glu
	1434260	SNV	A	G	Gene: ompN, CDS: ompN, Mature peptide	658T>C	Ser220Pro
	1511304	SNV	T	C	Gene: ydcT, CDS: ydcT	464T>C	Val155Ala
	1535969	SNV	G	A	Gene: narY, CDS: narY	909C>T	
	2385471	SNV	G	A			
	2584224	SNV	G	A	Gene: narQ, CDS: narQ	472G>A	Gly158Ser
	2764644	SNV	T	C	Gene: rnlA, CDS: rnlA, cryptic prophage CP4-57	705T>C	
	3143698	SNV	G	A	Gene: hybO, CDS: hybO, Mature peptide	586C>T	His196Tyr
	3478236	SNV	A	G	Gene: kefB, CDS: kefB	394T>C	
	3534326	SNV	C	T	Gene: ompR, CDS: ompR	281G>A	Gly94Asp
	3949063	SNV	A	G	Gene: ilvG, CDS: ilvG	481A>G	Ile161Val
	3957957	SNV	C	T			
	4531516	SNV	C	T	Gene: yjhQ, CDS: yjhQ	292G>A	Gly98Arg
dMUTS5	297040	SNV	A	G	Gene: paoD, CDS: paoD	911T>C	Val304Ala
	297847	SNV	A	G	Gene: paoD, CDS: paoD	104T>C	Leu35Pro
	967391	SNV	A	G	Gene: msbA, CDS: msbA	1548A>G	
	991336	SNV	C	T	Gene: pepN, CDS: pepN	1492C>T	Pro498Ser
	1039457	SNV	C	T	Gene: appB, CDS: appB	939C>T	
	1258131	SNV	C	T	Gene: ychH, CDS: ychH	118C>T	Gln40 STOP
	1303942	SNV	C	T	Gene: oppF, CDS: oppF	155C>T	Thr52Ile
	1338764	SNV	G	A	Gene: yciM, CDS: yciM	183G>A	Met61Ile
	1368919	SNV	G	A	Gene: ycjM, CDS: ycjM	680G>A	Arg227His
	1528263	SNV	A	G	Gene: ydcD, CDS: ydcD	318A>G	
	1538289	SNV	A	G	Gene: narZ, CDS: narZ	2326T>C	Ser776Pro
	2071792	SNV	G	A	Gene: flu, CDS: flu, cryptic prophage CP4-44	2230G>A	Val744Ile
	2090357	SNV	G	A	Gene: hisD, CDS: hisD, Mature peptide	1237G>A	Ala413Thr
	2765461	Insertion	-	C	Cryptic prophage CP4-57		
	2841559	SNV	T	C	Gene: hycG, CDS: hycG	674A>G	Gln225Arg
	2867747	SNV	G	A	Gene: surE, CDS: surE	550C>T	Gln184 STOP
	2930610	SNV	A	G	Gene: fucO, CDS: fucO	426T>C	
	3021284	SNV	C	T	Gene: xdhD, CDS: xdhD	1947C>T	
	3284177	Deletion	G	-	Gene: agaD, CDS: agaD	678delG	Met226 fs

	3390059	SNV	C	T			
	3395171	SNV	G	A	Gene: rng, CDS: rng, Mature peptide	647C>T	Ala216Val
	3534338	SNV	T	C	Gene: ompR, CDS: ompR	269A>G	Asp90Gly
	3957957	SNV	C	T			
	3987065	SNV	C	T	Gene: hemX, CDS: hemX	25G>A	Ala9Thr
	4233215	SNV	C	T	Gene: pgi, CDS: pgi	1435C>T	Pro479Ser
	4405349	SNV	G	A	Gene: rnr, CDS: rnr, Mature peptide	673G>A	Asp225Asn
	4480647	SNV	A	G	Gene: valS, CDS: valS	1214T>C	Val405Ala
	4599861	SNV	A	G	Gene: yjjB, CDS: yjjB	260T>C	Val87Ala
tMMR1	3990080	SNV	A	G	Gene: cyaA, CDS: cyaA	905A>G	Tyr302Cys
tMMR2	389627	SNV	A	T	Gene: yaiT, CDS: yaiT	153A>T	
	3533981	SNV	C	T	Gene: ompR, CDS: ompR	626G>A	Arg209His
tMMR3	287981	SNV	C	T	Gene: yagI, CDS: yagI, cryptic prophage CP4-6	406G>A	Ala136Thr
	1962479	SNV	T	C	Gene: flhA, CDS: flhA	596A>G	Asp199Gly
	3533981	SNV	C	T	Gene: ompR, CDS: ompR	626G>A	Arg209His
	3957957	SNV	C	T			
tMMR4	1963018	SNV	C	T	Gene: flhA, CDS: flhA	57G>A	Trp19 STOP
	1986454	SNV	T	C	Gene: yecR, CDS: yecR	209T>C	Val70Ala
	3533981	SNV	C	T	Gene: ompR, CDS: ompR	626G>A	Arg209His
	3957957	SNV	C	T			
tMMR5	3532875	SNV	C	A	Gene: envZ, CDS: envZ	1016G>T	Arg339Leu
	3707579	Insertion	-	C	Gene: eptB, CDS: eptB	920_921insG	Gly307 fs
	3800849	SNV	G	A	Gene: rfal, CDS: rfal	233C>T	Ala78Val
	3989698	SNV	G	A	Gene: cyaA, CDS: cyaA	523G>A	Gly175Ser