

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biokémiai Intézet

XXXII. OTDK Biológia Szekció

**Precíz bakteriális genommodosítás kondicionális DNS
hibajavítási mutánsok segítségével**

Nyerges Ákos

Biológus MSc szakos hallgató

II. évfolyam

Témavezető: Dr. Pál Csaba

Belső konzulens: Dr. Boros Imre

2014

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3
2. CÉLKITŰZÉSEK	9
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	10
3.1. Felhasznált táptalajok	10
3.2. Felhasznált szintetikus ssDNS oligonukleotidok tervezése és tulajdonságai.....	10
3.3. Törzsek létrehozása	11
3.4. P1 fágtranszdukció	15
3.5. Optimalizált MAGE folyamata	16
3.6. Rekombináns sejtek genotípusának analízise	17
3.7. Mutációs ráta mérése	20
3.8. Hőmérséklet hatása az MGλ-tMMR törzs növekedési tulajdonságaira	21
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	22
4.1 Az MMR rendszer átmeneti inaktiválása a MAGE során.....	22
4.2. Az Escherichia coli endogén MMR rendszerének hőmérséklet érzékeny mutánsai	22
4.3. DNS hibajavítás átmeneti inaktiválása a MAGE folyamata során.....	24
4.3.1 MG λ -tMMR törzs alkalmazásának optimalizálása a MAGE folyamata során..	24
4.3.2 Multiplex Automatikus Genommérnökség optimalizálása MG λ -tMMR törzs alkalmazásával.....	27
4.3.3 A módosított és tradicionális MAGE hatásfokának összehasonlítása.....	28
4.4 A módosított és tradicionális MAGE folyamat háttér-mutációs eseményeinek összehasonlítása	30
5. ÖSSZEFOGLALÁS	34

1. BEVEZETÉS

Tudományos tevékenységem során nagy-átfutóképességű szintetikus biológiai eljárások fejlesztésével foglalkozom, annak érdekében, hogy a rendszerbiológiai és evolúciobiológiai kérdések laboratóriumi vizsgálatát elősegítsem. A szintetikus biológia szókapcsolat megalkotása Wacław Szybalski lengyel genetikus nevéhez köthető, aki 1974-ben elsőként fogalmazta meg, milyen lehetőségek várnak a kor kutatóira, amint a molekuláris biológiai kutatások léptéke kiterjed a sejt teljes genomjára és lehetővé teszi új sejtes funkciók tudatos tervezését (Szybalski, W. 1974.). Ezen gondolatok éppen 40 éve hangzottak el, mely alatt Szybalski felvetése a biológia frontvonalát adó tudományterületté teljesedett ki (Cameron, D.E. és mtsai. 2014.). Az elmúlt négy évtized során a klasszikus genetikai, biokémiai, molekuláris biológiai kutatások több más szakterülettel karöltve együttesen segítették elő, hogy részletesen megismerjük a biológiai rendszerek működését, és ezen információk alapján az organizmusok életfolyamatait akár céltudatosan is befolyásolhassuk. Ennek alapvető feltétele azonban az örökítő anyag célzott, precíz módosításának lehetősége, mely egyben új kihívások elé is állítja korunk kutatóit. A hagyományos, gyakorta munka és időigényes molekuláris genetikai módszerek nem teszik lehetővé a teljes genom szintű kutatások költséghatékony kivitelezését. Ennek következtében új genommérnöki stratégiákra és új eszközkészlet kifejlesztésére van szükség, hogy a biológiai rendszerek behatóbb vizsgálata vagy éppen célzott módosítása érdekében a szükséges átalakításokat tervszerűen végrehajthassuk.

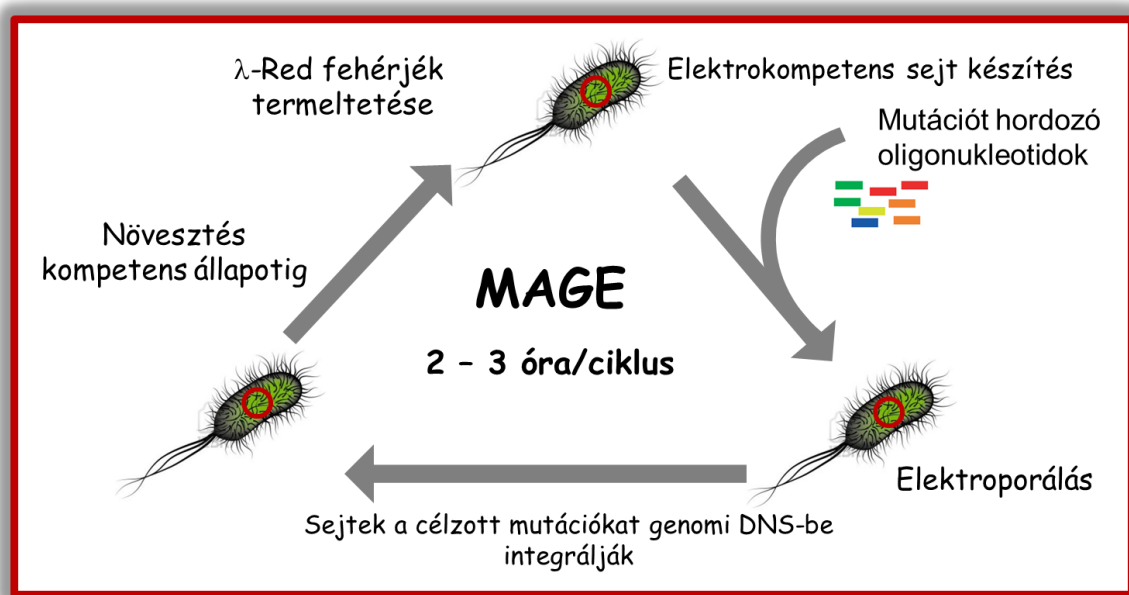
Ennek elérésében hatalmas lehetőséggel kecsegtet a homológ rekombináción alapuló DNS mérnökség, a recombineering folyamatának az *in vitro* DNS szintézissel és az újgenerációs DNS szekvenálással való összekapcsolása. A három módszer fúziója átfutóképességével és sebességével egyedülálló technológiát képvisel a molekuláris genetika módszertani repertoárjában (Esvelt, K.M. és mtsai. 2013.).

Mindez alapjául szolgáló, a Lambda bakteriofágból származó λ -Red és a hasonló, λ -C profág kódolta RecET homológ rekombinációs rendszer régóta felhasznált mód *Escherichia coli* modellorganizmus esetén célzott genom módosítási feladatok elvégzésére. (Datsenko és mtsai. 2000.; Muirers, J.P. és mtsai. 2004.). Ezek közül a gyakorlatban előnyös tulajdonságai miatt a λ -Red rendszer alkalmazása jobban elterjedt. Utóbbi működése három, az Exo, Beta és Gam λ fág fehérje aktivitásán alapul. Ezek közül az Exo 5'-3' exonukleáz aktivitásával képes a kettősszalú DNS (dsDNS) emésztésére és ez által 3' túlnyúló, rekombinációra képes egyes szálú végek kialakítására. A Beta fehérje ezt

követően egyes szálú DNS (ssDNS) kötő képessége révén képes a kialakított egyszálú DNS szakaszok komplementer genomi szekvenciához történő hibridizációját elősegíteni. A hibridizált DNS lánc végül a sejt saját DNS polimeráz és ligáz aktivitásának hatására a genomba épül. Ezen folyamat alatt pedig a Gam a sejt saját, DNS degradációért felelős RecBCD aktivitását *in vivo* képes meggátolni. Ennek következtében a λ -Red fehérjerendszer mind egyes szálú, mind kettősszálú lineráris DNS molekulák genomi célszekvenciára történő beépítését elősegíteni. Ezen beépülő DNS elemek mesterséges tervezése útján pedig akár új szekvencia módosításokat, köztük nukleotid cseréket, inszerciákat és deléciókat is beépíthetünk. Ezek közül a kettősszálú DNS alapú recombineering folyamata mindhárom említett λ -Red fehérje működését igényli, és hatékonysága optimális esetben sem haladja meg a bejuttatást túlélő sejtek 0,1%-ét. Ezzel szemben egyes szálú DNS oligonukleotidokkal végzett recombineering esetén, a feltételek optimalizálásával akár nagyságrendekkel magasabb beépülési hatásfokot is elérhetünk a túlélő sejtek esetén, a beépülési eseményekre való szelekció nélkül is. Ennek oka, hogy a sejtekbe juttatott kettősszálú DNS molekulák a rekombinációs esemény megelőzően teljes egészében egyes szálú DNS-sé alakulnak az Exo magas emésztési sebessége következtében, utóbbi átmeneti forma létrehozása pedig egyes szálú DNS közvetlen sejtekbe juttatásával nagyobb hatásfokkal hajtható végre. Mivel a rekombinációs folyamat hatásfokot befolyásoló lépése elsősorban a sejtbe jutó DNS molekula genomi célszekvenciához viszonyított relatív moláris aránya, így az egyes szálú DNS alapú recombineering során bejuttatható nagyobb anyagmennyiség révén magasabb beépülési (allélcicserélési) hatásfok érhető el. Később azt is felismerték (Ellis, H.M., és mtsai. 2001.), hogy az enzimatis folyamat eredményeként képződött egyes szálú DNS molekula a genom replikáció során az Okazaki-fragments kialakulásához hasonlóan épül be a replikációs villa követő szálára. Ezen kívül az is bizonyítást nyert, hogy egyes szálú DNS molekulák beépítéséhez elegendő csupán a Beta fehérje jelenléte a λ -Red fehérjerendszer tagjai közül. A folyamat hatásfokának maximuma pedig a Beta fehérje-DNS kölcsönhatás miatt 70-90 nukleotid hosszú ssDNS oligonukleotidok esetén érhető el. A gazdasejt eredetű DNS hibajavítás tanulmányozása során derült fény végül arra, hogy a sejt endogén metiláció-függő DNS hibajavító (MMR) folyamatai képesek a beépítendő, mutációt hordozó oligonukleotidot hibridizációja után hatékonyan felismerni, és így meggátolni a célzott mutáció beépülését. Végül a folyamat során bekövetkező DNS hibajavításért felelős fehérjerendszer (MutS-MutL-MutH) eltávolításával sikerült a módszer hatásfokát

nagyságrendekkel megemelni és elérni akár a 30 - 40%-os allélcicserélési frekvenciát is *Escherichia coli* sejtekben. (Costantino,N. és mtsai. 2003.)

A rekombináción alapuló genommérnökség fejlődése vezetett el végül 2009-ben a Multiplex Automatikus Genommérnökség (MAGE: Multiplex Automated Genome Engineering) megalkotásához. Ez a korábban felvázolt, egyszálú DNS alapú λ -Red allélcicserélési folyamat automatizálható, ciklikus változata. Segítségével a kijelölt sejt genomján *in vivo* egyidejűleg több, célzott módosítást hajthatunk végre. Mindezt pedig minden korábbi módszernél magasabb hatásfokkal és áteresztőképességgel. A folyamat robusztussága egyszerűségén és a kiaknázott recombineering magas hatásfokán alapul. Felhasználásának széleskörűségét pedig jól demonstrálja, hogy az elv működését nem csak *E. coli* sejtekben, de más bakteriális modellszervezetekben, sörélesztőben, illetve humán sejtvonalakban is bizonyították (Pijkeren,J.-P., 2012.; DiCarlo,J.E., 2013.; Swingle,B., 2010., Rios,X., 2012.).



1. Ábra: A Multiplex Automatikus Genommérnökség (MAGE) ciklikus folyamatának bemutatása

A MAGE ciklusai során a sejteket először DNS felvételére képes, kompetens állapotig növesztjük gazdag tápfolyadékban, majd a λ -Red fehérjék termelésére kényszerítjük őket. **(1. Ábra)** A folyamat során elengedhetetlen az indukálható λ -Red fehérje túltermelésre képes expressziós rendszer alkalmazása mellett, a már említett MMR rendszer inaktiválása is. Ezt követően, a hatékony DNS bejuttatás érdekében elektrokompetens sejteket készítve a vizsgált sejtekből, elektroporáció segítségével juttatjuk be a célzott mutációkat hordozó,

mesterségesen tervezett és szintetizált ssDNS oligonukleotidokat. A sejteket újra táptalajba helyezve az elektroporáció sokkhatását túlélő sejtek gyorsan osztódásnak indulnak. Ennek során pedig, a genom replikáció során, a Beta fehérjék által katalizálva Okazaki fragmensként genomjukba integrálják a bejuttatott ssDNS oligonukleotidokat. A sejtek folyamatos osztódásuk eredményeként végül újra elérik a kompetens állapotot, amikor is újra transzformálhatókká válnak az alkalmazott oligonukleotidokkal. Így a ciklus újra ismételhető, megközelítőleg 2-3 óránként.

A ciklusok során a megcélzott genomi szakaszokra a bejuttatott ssDNS oligonukleotidok által, előre meghatározott mutációk építhetők be, optimális körülmények között akár ciklusonként 35%-os hatásfokkal. A MAGE kimagasló előnye, hogy a beépülő mutációs események egymástól teljes egészében függetlenül játszódnak le, ezért egyszerre több célszekvencia esetén ezek mindegyike párhuzamosan azonos hatásfokkal módosítható. Ezáltal pedig a MAGE lehetőséget ad a kombinatorikus mutáció beépítésre is. Több genomi régió egyidejű célzása esetén a ciklusról-ciklusra a sejtekben egyre több célzott mutáció halmozódik fel, véletlenszerű kombinációban. Adott számú MAGE ciklus segítségével így elérhető akár az is, hogy a sejtpopuláció egyedei szinte kivétel nélkül egyedi mutáció kombinációkkal rendelkezzenek. Ezáltal a MAGE-nek alávetett sejtpopuláció egy mutáns sejtkönyvtárat hoz létre, melynek tagjai ezután a kísérlet céljának megfelelően vizsgálhatók. Utóbbi tulajdonsága révén, nagy áteresztőképességű sejtvizsgálati eljárásokkal kombinálva kiválóan alkalmas mutáció kombinációk élettani hatásának vizsgálatára, ezáltal pedig evolúciós folyamatok tanulmányozására is.

A MAGE alkalmazása így magas hatásfoka, robosztussága révén a genommérnökség forradalmasításával kecsegtet. A módszer első leírt alkalmazása a biotechnológiai felhasználást demonstrálta. Célzott mutációk bevitelével az iparilag fontos anyagcsere útvonalak enzimeinek termelődése könnyedén szabályozható, ezáltal pedig az adott anyagcsere termék előállítása is optimalizálható. Így a 24 génes likopin bioszintézis útvonalát a folyamatban résztvevő kulcsgének riboszómakötő (RBS) helyeinek finomhangolásával sikerült alig pár nap alatt úgy optimalizálni, hogy a kapott törzs a kiindulási törzsnél ötször több likopint állítson elő (Wang,H.H. és mtsai. 2009.).

A későbbiekben pedig a MAGE alkalmazásával került sor az első genetikailag rekódolt *E. coli* sejt előállítására, melynek genomját teljes egészében megfosztottak a TAG stop kodonoktól, TAA-ra cserélve azokat. Ezáltal pedig lehetőséget biztosítottak nem-természetes aminosavak fehérjébe építésére, illetve vírusrezisztencia kialakítására. (Isaacs,F.J. és mtsai. 2011.; Lajoie,M.J. és mtsai. 2013.)

Azonban a módszer felhasználása, a mutációk hatásának kombinatorikus tanulmányozásán keresztül, az evolúcióbiológiai kutatásokban is ígéretes. A MAGE felhasználásával az evolúciós folyamatok során bekövetkező mutációs események gyorsan modellezhetők. Hiszen a MAGE folyamata megfelelően megtervezett, degenerált, célzó oligonukleotidok felhasználásával lehetővé teszi véletlenszerű mutációk beépítését is a genom kiválasztott pozícióiba. Ennek következtében ezeken a területeken gyakorlatilag fénysebességre gyorsíthatjuk a mutációk kialakulását, a természetes folyamatok sebességéhez viszonyítva. Ezáltal pedig egyszerűen és gyorsan tanulmányozhatjuk különféle evolúciós folyamatok lehetséges lefolyását. Ezen kívül olyan evolúciós újítások megjelenését is megfigyelhetjük melyek a természetes evolúció során, elfogadható laboratóriumi időlépték alatt, nem következhetnének be.

A MAGE tehát egy igen robusztus és sokoldalú eljárás, azonban felhasználása komoly hátránnyal jár. A magas hatásfok és egyenletes mutáció beépítés eléréséhez a folyamat során elengedhetetlen a sejtek endogén metiláció-függő DNS hibajavító (MMR) folyamatainak blokkolása. Ezt hagyományosan az MMR rendszer kulcsfehérjéjét kódoló gén, a *mutS* eltávolításával érték el, mely teljes egészében megszüntette a sejtek MMR aktivitását is. De hasonló hatást biztosított az MMR rendszer bármely másik kulcsfehérjéjének (*MutL*, *MutH*) eltávolítása is. (Costantino, N. és mtsai. 2003.) Utóbbi azonban természetes körülmények között a sejt saját genomreplikációja során képződő mutációk elleni védelmet szolgálja, eltávolítása így drasztikus mutációs ráta emelkedést idéz elő az osztódások során, a DNS szemikonzervatív replikációja során bekövetkező spontán hibák miatt (Schaaper, R.M. és mtsai 1987.). A mutációs ráta emelkedésének mértéke ennek következtében akár a vad típusú sejtekben mért érték százszorosát is eléri, ami a MAGE ciklusok során számos nem-célzott, háttér-mutáció kialakulásához vezet. A probléma súlyosságát jól szemlélteti az, hogy a korábban említett TAG stop kodon mentes *E. coli* létrehozása során a végrehajtott 25-30 MAGE ciklus során a 321 célzott módosítás mellett 355 háttér-mutáció is megjelent. Ezek a mutációk pedig könnyedén elfedhették a célzott mutációk valódi fenotípusos hatását. Az emelkedett háttér-mutációs ráta okozta probléma ennek következtében a MAGE folyamatának Achilles sarkát képviseli. Ennek látszólagos megoldására több alternatív stratégiát is felvázoltak, ezen módszerek azonban vagy újabb módszertani problémákat idéztek elő, vagy jelentős költségnövekedést okoztak.

A bemutatott próbálkozások közé tartozott az MMR rendszer kulcsfehérjéinek, elsősorban a *MutL* fehérjének átmeneti eltávolítása a sejtek adenin analóg 2-aminopurinnal történő kezelése útján, mely az előidézett nagyszámú háttér-mutáció révén átmenetileg

kititrálta a sejt saját MutL fehérje készletét, a célzott mutációkat hordozó oligonukleotidok beépítésének idejére. Ez azonban súlyos háttér-mutációs ráta emelkedést eredményezett, illetve hatásfoka is elmaradt a szükségestől. Hasonlóan nem vezetett eredményre hibás nukleotid párosodást tartalmazó dsDNS ko-elektroporálása sem, a vizsgált mutációt hordozó oligonukleotiddal (Costantino, N. és mtsai. 2003.).

A mutációk bevitelét lehetővé tevő ssDNS oligonukleotidok megfelelő módosítása szintén ígéretes eljárásnak tűnt az MMR rendszer átmeneti kikerülésének érdekében. Ennek alapjául részben az szolgált, hogy a kémiai módosított DNS nukleotid analógok és természetes DNS nukleotidok bázispárosodása során fellépő DNS száltorzulás MMR rendszer általi felismerhetősége nagyban eltér természetes nukleotid párok okozta hatástól. Így a célzott mutációt végrehajtó nukleotid megfelelő kémiai módosításával, funkcióképes MMR rendszer mellett is, képesek voltak magas beépítési hatásfok elérésére. Ez azonban általában nem érte el az MMR rendszer eltávolításával mérhető értékeket, továbbá a szükséges *in vitro* DNS szintézis költségeit is jelentősen megemelte. Továbbá a bejuttatott DNS toxikus hatása is jelentősebbnek bizonyult (Wang, H.H. és mtsai. 2011.). Ezen a fronton második alternatívaként a célzott mutáció mellett elhelyezett C:C hibás bázispárosodás kialakítása jelentette, mely gátolta az MMR rendszer MutS DNS-hibafelismerő fehérjéjének helyi kapcsolódását. Ezen stratégia alkalmazása azonban újabb mutáció beépítését követelte a célzott szekvenciába, így nem volt általánosan alkalmazható (Sawitzke, J.A. és mtsai. 2011.).

Sikeresebb próbálkozásnak bizonyult a funkcionálisan aktív MMR fehérjék (MutS, MutL, MutH) mennyiségének szabályozása a gazdasejtben. Ez egyrészt elérhető az említett fehérjék szintjének transzkripcionális szabályozásával, indukálható expressziós rendszer felhasználásával. Ebben az esetben azonban a szükséges fehérjeindukció sebessége, illetve a megtermelt fehérjemennyiség sejtosztódások során történő kihígulásának ideje, mind-mind a MAGE ciklusok hosszát növeli. Másik alternatíva az adott fehérje átmeneti eltávolítása a MAGE során, célzott nonszensz mutáció beépítésével a MAGE kísérlet első ciklusában, majd a nonszensz mutáció vad típusra javítása az utolsó MAGE ciklus esetén. Ez a megközelítés azonban a ciklusok során bekövetkező sejtosztódások során nem küszöbölte ki a magas mutációs rátát, továbbá többlet ciklusokat igényelt az expresszió hatékony kikapcsolásának érdekében (Carr, P.A. és mtsai. 2012.). Ennek következtében a MAGE során a sejtek MMR rendszerének megfelelő szabályozása továbbra is megoldatlan maradt.

Ezen ismeretek tükrében olyan, nagy-áteresztőképességű és hatékony genommérnöki eljárás kidolgozására volt szükség, melynek alkalmazása nem jár nagyszámú háttér-mutáció felhalmozódásával, ezáltal pedig nagypontosságú célzott módosítások elvégzésére képes a kijelölt sejt örökítő anyag állományában.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk fő célkitűzését egy olyan genommérnöki eljárás kidolgozása képviselte, mely magas hatásfokú, nagy pontosságú, célzott genommodosítására képes a vizsgált modellorganizmus (*Escherichia coli*) örökítő anyagában, kiküszöbölve a káros háttér-mutációk felhalmozódását. Ennek elérése érdekében a Multiplex Automatikus Genommérnökség (MAGE) folyamatát úgy kívántuk módosítani, hogy a háttér-mutációk kialakulását okozó, magas mutációs rátájú állapotot csupán a célzott mutációkat hordozó oligonukleotidok beépülésének idejére korlátozzuk, a sejtek metiláció-függő DNS hibajavító (MMR) aktivitásának gyors, fehérje szinten történő szabályozása révén.

A folyamat kidolgozása során, az elvégzett kísérletek által a következő kérdésekre kívántunk választ kapni:

- Lehetséges-e a vizsgált *Escherichia coli* modellorganizmus MMR rendszerének gyors inaktiválása és újraaktiválása?
- Lehetséges-e az MMR rendszerének átmeneti inaktiválása a célzott mutációkat hordozó szintetikus oligonukleotidok beépülésének időintervallumára a MAGE során?
- Elősegíti-e a célzott mutációkat hordozó szintetikus oligonukleotidok beépülését, ha a MAGE során a sejtek MMR rendszerét átmenetileg, a célzott mutációk beépítésének időintervallumára, inaktiváljuk?
- Az MMR rendszer átmeneti inaktiválásával kombinált MAGE módszer jellemzői miként viszonyulnak a tradicionális MAGE módszerének paramétereire?
- Képes-e az MMR rendszer átmeneti inaktiválását tartalmazó MAGE módszer a genomi háttér-mutációs események számát valós alkalmazás esetén csökkenteni?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Felhasznált táptalajok

A kísérletek során az *Escherichia coli* sejtek általános növesztéséhez gazdag táptalajt, folyékony és szilárd (1,5% agar tartalmú) Luria-Bertani-Lennox (LB^L) táptalajt (összetétel 1 liter táptalajra vonatkoztatva: 10 g tripton, 5 g élesztőkivonat, 5 g nátrium-klorid) használtunk. A sejtszám meghatározásához és egyéb, általános sejtmnipulálási folyamatok során 20 µg/ml tetraciklinnel kiegészített LB^L táptalajt alkalmaztunk. Az *rpsL* génben bekövetkező Str^R rezisztencia fenotípust előidéző célzott mutáció beépülésének frekvenciáját 50 µg/ml streptomocinnal kiegészített LB^L táptalajon vizsgáltuk. A *lacZ*, *araB* illetve *malK* gének, színszelekción alapuló aktivitását 20 µg/ml tetraciklinnel kiegészített MacConkey agar alap segítségével vizsgáltuk, melyhez a vizsgált géntermék funkciója alapján a következő fermentálható szénforrást biztosítottuk: *lacZ* esetén laktózt, *malK* esetén maltózt és *araB* enzimaktivitás mérése esetén arabinózt 1%-os végkoncentrációban.

A többszörös célzott *lacZ*, *malK*, *araB* nonszensz mutációt és *rpsL* Str^R mutációt együttesen tartalmazó sejteket, kihasználva a fermentálható szénforrás és streptomycin rezisztencia együttes vizsgálhatóságát, mindhárom szénforrást és 50 µg/ml streptomocint tartalmazó MacConkey táptalajon végeztük.

Az elektroporálást követően pedig a transzformált sejtek kezdeti inkubálása, a maximális túlélés elérése érdekében TB (Terrific Broth) (összetétel 1 liter táptalajra vonatkoztatva: 10 g tripton, 12 g élesztőkivonat, K₂HPO₄ 9,4 g, KH₂PO₄ 2 g) folyékony táptalajban történt (Sambrook és mtsai. 1989.).

3.2. Felhasznált szintetikus ssDNS oligonukleotidok tervezése és tulajdonságai

A dolgozat során PCR reakciók során primerként alkalmazott oligonukleotidokat, illetve a MAGE ciklusok során a célzott allélcicserélésekhez alkalmazott szintetikus DNS oligonukleotidokat kisózással tisztított formában állítottuk elő (Integrated DNA Technologies).

A MAGE során alkalmazott, célzott mutáció beépítésére szolgáló oligonukleotidok tervezése során az alábbi alapelveket vettük figyelembe (Wang, H.H. és mtsai. 2011.):

A tervezett ssDNS oligonukleotidok az *Escherichia coli* genomjának replikációja során megfigyelhető követő szállal komplementer szekvenciájúak voltak. Másodlagos szerkezetük hibridizációs energiája (ΔG) nem lehetett alacsonyabb mint -12kcal/mol (MFold algoritmus alapján meghatározva). Mind 3', mind 5' végükön 2-2 foszforothioát kötéssel rendelkeztek. Szekvencia hosszukat tekintve pedig kivétel nélkül 90 nukleotid hosszúságú DNS oligonukleotidokat terveztünk.

A szintetikus oligonukleotidok végeinek foszforothioát kötésekkel történő lezárása a sejtbe juttatott oligonukleotidok lebontására irányuló, exonukleáz hatás kivédése ellen volt szükséges. A célzott mutációk bejuttatására szolgáló oligonukleotidokból 100 μM végkoncentrációjú oldatot készítettünk steril TE puffer (Sambrook és mtsai. 1989.) felhasználásával, majd a DNS mintákat felhasználásig -20°C-on tároltuk.

A PCR reakciók során felhasznált oligonukleotidokat 20 μM -os végkoncentrációban szuszpendáltuk fel TE puffer felhasználásával.

3.3. Törzsek létrehozása

A kísérletek során az *Escherichia coli* vad típusú K-12 MG1655 törzséből kiindulva létrehozott törzseket alkalmaztunk (1. Táblázat).

Törzs megnevezése	Genotípus	Leírás
<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655	vad típus	vad típus
MG1655 tMutS	<i>mutS401C>T</i>	Kondicionális MutS(A134V) mutáns
MG1655 tMMR	<i>mutS401C>T</i> ; <i>mutL184G>A</i>	Kondicionális MutS(A134V) és MutL(G62S) mutáns
MG1655 ΔmutS	ΔmutS	<i>mutS</i> delécióval inaktivált MMR rendszerű törzs
MG λ	MG1655 gal490 <i>nadA::Tn10 pgl</i> Δ 8 [λ cI857 Δ (<i>cro-bioA</i>)]	λ -Red túltermelő törzs, vad típusú MMR rendszerrel
MG λ -tMMR	MG λ <i>mutS401C>T</i> ; <i>mutL184G>A</i>	λ -Red túltermelő törzs, hőmérséklet érzékeny MMR rendszerrel
MG λ - ΔmutS	MG λ ΔmutS	λ -Red túltermelő, inaktivált MMR rendszerű törzs
LT521	MG1655 gal490 <i>nadA::Tn10 pgl</i> Δ 8 [λ cI857 Δ (<i>cro-bioA</i>)]	λ profág alapú λ -Red túltermelő rendszer forrása

1.Táblázat: A kísérletek során alkalmazott *Escherichia coli* törzsek táblázatos áttekintése

A kondicionális metiláció-függő DNS hibajavítási rendszer mutáns MG λ -tMMR törzs létrehozása két lépcsőben történt. Ennek során a szakirodalomban korábban leírt és jellemzett hőmérséklet érzékeny, kondicionális MutS(A134V) és MutL(G62S) fehérjevariánsoknak megfelelő pontmutáns alléleket (*mutS*401C>T, illetve *mutL*184G>A) rekonstruáltuk vad típusú *Escherichia coli* sejtekben (Hong, E.S., és mtsai. 2005.).

Elsőként ennek érdekében a sejt endogén MutS fehérjéjének kódolásáért felelős *mutS* génben hoztunk létre pontmutációt, mely a fehérje 134. alaninjának valin aminosavra való cseréjét idézi elő. Ennek során a kutatócsoportunk által korábban kidolgozott, öngyilkos-plazmid alapú stratégiát alkalmaztuk (Fehér, T., és mtsai. 2008.). Ennek során elsőként belső pontmutációt bevívó primer pár és segítségükkel történő fúziós PCR segítségével készítettük el a *mutS* gén említett variánsát, majd a kapott lineáris PCR terméket pST76A vektorba klónoztuk. Ezen plazmid tulajdonsága, hogy replikációja csak 30°C-on lehetséges a gazdasejtben. Vad típusú sejtekbe transzformálva a plazmidot és 42°C-ra emelve a hőmérsékletet a plazmidon található Ap^R rezisztencia fenotípusra való szelekció mellett olyan telepeket izoláltunk, melyek esetén a genomi *mutS* génbe, a plazmidon található *mutS* mutáns allél homológ szekvenciája alapján, a plazmid beépült. Ezáltal a plazmid fennmaradása szempontjából nem-permisszív hőmérsékleten is megtartották antibiotikum rezisztenciájukat. A plazmid genomi DNS-be való integrációját ezt követően, telep-PCR segítségével mutattuk ki. A genomra integrált plazmid konstrukció eltávolítása, és ez által a *mutS* célzott pontmutáns alléljának létrehozását pSTKST plazmid segítségével hajtottuk végre. A pSTKST plazmid az ISce-I meganukleáz enzim indukálható túltermelését képes biztosítani az azt tartalmazó sejtekben, mely enzim 18bp-os felismerő helyének megfelelő pozícióban kettősszalú DNS törést indukál. A meganukleáz felismerő helyét a rendszer kizárólagosan csak a pST76A plazmidon, illetve bakteriális genomba való épülését követően és genomra épült változatán tartalmazza, így az enzimátikus hasítás a genomot kizárólag a beintegrált plazmidon érinti. A sejt belső homológ rekombinációs útvonalai ezután a plazmidon hordozott, pontmutáns *mutS* és a korábbi érintetlen genomi *mutS* gén között homológ rekombinációt katalizálva, a plazmid szekvencia elvesztését idézik elő. Ennek eredményeként pedig 50%-os valószínűséggel vagy a vad típusú, vagy az adott pontmutációt tartalmazó allél jön létre. Ezt követően a sejtekben a keresett pontmutáció jelenlétét szekvenálással határoztuk meg. A MutS(A134V) fehérje variánst termelő törzset MG1655 tMutS törzsnek neveztük el.

Második lépésben a MutS(A134V) és a MutL hőmérséklet érzékeny, MutL(G62S) variánsát termelő törzset hoztuk létre, a korábbiakban elkészült MG1655 tMutS törzsből

kiindulva. A MutL(G62S) fehérje variáns termelését előidéző pontmutációt a törzsben a λ -Red fehérjerendszer által katalizált, ssDNS oligonukleotid segítségével történő recombineering segítségével hoztuk létre. Ennek folyamata és elméleti háttere a MAGE korábban felvázolt ciklusaival egyezett meg, a λ -Red túltermeltető rendszer típusát kivéve. Utóbbi céljára pBAD $\alpha\beta\gamma$ plazmid alapú, L-arabinóz indukálható λ -Red konstrukciót alkalmaztunk, mely lehetővé tette a plazmid és a túltermeltető rendszer későbbi eltávolítását, illetve cseréjét a további vizsgálatok érdekében (Muyrers, J.P.P. és mtsai. 1999.). A *mutL* génben, a fent említett aminosavcsere elérése érdekében egy G:T (kromoszómális nukleotid: szintetikus ssDNS oligonukleotid) hibás nukleotidpárosodás átmeneti létrehozására volt szükség, a pontmutáció bevitelére során. Ezen DNS párosodási hibatípust a sejtek endogén MMR rendszere magas hatásokkal képes felismerni és eltávolítani, ezért a mutáció beviteléhez felhasználtuk a korábban, első lépésben elkészített MG1655 tMutS törzs azon tulajdonságát, hogy emelt hőmérsékleten (38°C) MutS fehérjéje hőmérsékleti érzékenységet mutat. Ezáltal a törzs MMR rendszerének inaktiválását valósítottuk meg a mutáció magasabb hatásfokú beépítésének érdekében. A folyamat során elsőként így a kiindulási MG1655 tMutS törzsbe pBAD $\alpha\beta\gamma$ plazmidot transzformáltuk, majd a plazmidot tartalmazó sejteket 100 mg/ml ampicillin tartalmú LB^L tápfolyadékban 250rpm rázatás mellett, a stacioner fázis eléréséig növesztettük. Az így kapott sejt kultúrával ezután 10 ml 100 mg/ml ampicillin tartalmú LB^L táptalajt oltottunk be, a sejtek 1:100 hígítása után. Ezt követően a sejteket OD₅₅₀=0.5-0.7 eléréséig növesztettük 38°C-on. Ezt követően a λ -Red fehérjék túltermeltetését 0,2% L-arabinóz hozzáadásával indítottuk be és végeztük 30 percen keresztül. A sejteket ezután jégre helyezve az így kapott sejtekből ismételt centrifugálással és hűtött desztillált vizes mosással elektrokompetens sejteket állítottunk elő. Végül a kapott elektrokompetens, λ -Red fehérjéket tartalmazó sejtek transzformációját 40 μ l térfogatban, 2,5 μ M MutL35_SNP szintetikus oligonukleotidot hozzáadása után, elektroporációval hajtottuk végre. (BioRad MicroPulser elektroporátor felhasználásával, az alábbi beállítások segítségével: 1800 V, 25 μ F, 200 Ω). A sejteket ezt követően azonnal 10ml, 38°C-ra előmelegített 100mg/ml ampicillin tartalmú LB^L táptalajban szuszpendáltuk fel. Majd az említett hőmérsékleten a sejt kultúrát egészen addig növesztettük, míg a korábban említett OD₅₅₀=0.5-0.7 sejt koncentrációt el nem érték osztódásuk során. Az elektroporálási ciklust ekkor a korábbiak szerint ismételtük meg.

A transzformált sejteket a stacioner fázis elérése után, megfelelő hígításban LB^L agar lemezre szélesztettük. A 30°C-on történő inkubálás és a telepek megjelenését követően a

kívánt *mutL* mutációt hordozó sejteket allél specifikus telep-PCR segítségével azonosítottuk. Ennek során MutL35ASP_fw and _rv primert alkalmazva, az alábbi PCR hőmérsékleti beállításokat alkalmaztuk: Hőinaktiválás és sejtlízis 96°C 5 perc, 30 ciklus: (95°C 30 s, 63.5°C 30 s és 72°C 40 s) végső DNS lánchosszabbítás 5 perc 72°C. A PCR során a keresett mutánsra specifikus PCR terméket adó telepekből ezután genomi DNS-t izolálva, a *mutL* gén PCR segítségével történő felsokszorozását követően, Sanger szekvenálással igazoltuk a helyes mutáció jelenlétét.

A MutS és MutL hőmérsékletérzékeny variánsát egyaránt tartalmazó törzset MG1655 tMMR-nek neveztük el és ezt használtuk fel a törzskonstrukció további fázisaiban.

A sejtek MMR rendszerének gendelációval történő, folyamatos inaktiválása érdekében a kiindulási, vad típusú sejtekből a *mutS* gént is eltávolítottuk. Ezen *Escherichia coli* MG1655 Δ *mutS* törzset szintén a korábban említett öngyilkos-plazmid alapú, pST76A-pSTKST rendszer segítségével készítettük el (Fehér,T., és mtsai. 2008.). Az ennek során felhasznált pST76A-*mutS* plazmid-konstrukció a korábbiaktól mindösszesen abban tért el, hogy a kiindulási pST76A plazmidba klónozott fúziós PCR termék a vad típusú *mutS* génből 1000 nukleotid eltávolítása útján létrejött deléciós variánsát hordozta.

A Lambda-Red fehérjék sejtekben történő túltermeltetéséhez a szakirodalomban leírt, Lambda profág alapú, genomi expressziós rendszert alkalmaztuk, mely a hőérzékeny *ci857* represszor által szabályozott pL operátor szabályzása alatt tartalmazza a λ -Red Exo, Bet és Gam géneket tartalmazó operonját (**2. Ábra**).



2. Ábra: A Lambda profág alapú, hőindukálható λ -Red fehérje expressziós rendszer felépítése (G., Roman és mtsai. 2013. alapján)

Az alkalmazott expressziós rendszer egyedi tulajdonsága, hogy a hőmérséklet érzékeny represszor 32°C alatt erősen represszált állapotban tartja az említett operon működését, ezáltal nem-induktív hőmérsékleten (<32°C) való növesztéssel kiküszöbölhető a λ -Red fehérjék sejtnövekedést gátló termelődése. Azonban a hőmérséklet 42°C-ra történő emelése a represszor pillanatszerű denaturálódását és a fehérjetermeletés gyors és erős megindulását eredményezi, mely segítségével a MAGE folyamatához szükséges λ -Red fehérjék sejtbeli megtermeltetése mindössze néhány perc indukció alatt lehetővé válik.

Köztes (32 – 42°C) hőmérsékleten a represszor és így a λ -Red operon részlegesen inaktivált állapotban helyezkedik el. Az említett profágot tartalmazó, szakirodalomban korábban leírt törzset *E. coli* LT521 (MG1655 gal490 *nadA::Tn10* pgl Δ 8 [λ cI857 Δ (*cro-bioA*)]) kérésre Donald L. Court, a National Cancer Institute (Frederick, USA) professzora bocsátotta rendelkezésemre a kísérletek elvégzéséhez. Az LT521 törzsben található Tn10, tetraciklin rezisztenciagént is hordozó transzpozonnal jelölt profágot ezután P1 fág transzdukcióval juttattuk át a vizsgált *E. coli* törzsekbe.

3.4. P1 fágtranszdukció

A P1 fágtranszdukciót standard protokoll alapján végeztük (Miller J.H. 1972.). A fáglizátum előállításához a donor *E. coli* LT521 törzsből 1 ml LB^L-ben 24 órán át rázatva növesztett starterkultúrát készítettünk. Ebből 100 μ l-t átoltottunk 10 ml LB^L tápoldatba, amelyet előzőleg 4 μ l 1 M MgSO₄-tal, 2 μ l 1 M CaCl₂-dal és 20 μ g/ml tetraciklinnel egészítettünk ki, majd OD₅₅₀=0,3 értékig növesztettünk 30°C-on rázás közben. Ebből 1 ml-t összekevertünk 2 μ l tisztított P1 bakteriofág szuszpenzióval. A baktérium-fág keveréket 37 °C-on 15 percig inkubáltuk. Ezután ebből 1 ml-t 10 ml, a fent leírt módon kiegészített LB tápoldatba oltottunk, és 30°C-on rázatva inkubáltunk a szuszpenzió látható feltisztulásáig, ami a donorsejtek lízisét mutatta. Ezután 50 μ l kloroformot adtunk hozzá, majd 1000 μ l sejt-vírus szuszpenziót centrifugálással (5 perc, 13000 rpm) illetve a felülúszó 0,22 μ m átmérőjű filteren való átszűrésével távolítottuk el a donor baktériumsejteket. A leírt módon elkészített fáguszuszpenziót 4 °C-on tároltuk a további felhasználásig.

A transzdukcióhoz a recipiens vad típusú *Escherichia coli* MG1655, *Escherichia coli* MG1655 Δ *mutS* és *Escherichia coli* MG1655 tMMR baktériumtörzsekből külön-külön 1 ml LB^L-ben 24 órán át rázatva növesztett starterkultúrát készítettünk. amelyhez előzetesen 4 μ l 1 M MgSO₄-ot, 2 μ l 1 M CaCl₂-ot adtunk. Ebből 100 μ l-t összekevertünk 2 μ l donor P1 bakteriofág szuszpenzióval, és 37 °C-on 15 percig állni hagytuk. Ehhez hozzáadtunk 500 μ l LB^L tápoldatot, 35 μ l 1 M trinátrium-citrátot, és 1 órán keresztül 32 °C-on inkubáltuk. Végül az így kapott sejtsuszuszpenziót 20 μ g/ml tetraciklinnel és 10 mM trinátrium-citrátot kiegészített LB^L agar lemezre szélesztettük és 24 órán keresztül 30°C-on inkubáltuk a tetraciklin rezisztens telepek megjelenéséig. A transzdukánsokat így a Tn10 tetraciklin rezisztenciagént is hordozó Tn10 transzpozon jelenlétének bizonyítása

után, a λ -Red operonra tervezett primer pár és telep-PCR segítségével szelektáltuk ki. Ennek eredményeként a vad típusú *Escherichia coli* MG1655 sejtekbe integrált profágot tartalmazó törzset MG λ -nak, az *Escherichia coli* MG1655 Δ mutS sejtekbe integrált profágot tartalmazó törzset MG λ - Δ mutS -nek, míg a MutS és MutL hőmérséklet érzékeny fehérjevariánst is tartalmazó *Escherichia coli* MG1655 tMMR törzsből származó transzdukánst MG λ -tMMR-nek neveztük el.

3.5. Optimalizált MAGE folyamata

A kísérletek során a célzott mutációk MAGE alapú létrehozására, illetve a módszer ciklikus allélcicserélő hatásának vizsgálatához az alábbi optimalizált eljárást alkalmaztuk. Ennek során a vizsgált *E. coli* törzs sejtjeit 20 μ g/ml tetraciklinnel kiegészített LB^L táplemezre szélesztettük és 30°C-on a telepek megjelenéséig inkubáltuk. Ezt követően egyetlen telepből LBL táptalajban 18 órán át történő rázatott (250rpm) felnövesztéssel stacioner állapotú sejt kultúrát állítottunk elő, majd kompetens sejt készítéshez ezen sejtekből indultunk ki. Ennek érdekében 10 ml 20 μ g/ml tetraciklinnel kiegészített LB^L táptalajt oltottunk be 1:100 hígításban a vizsgált sejt kultúrával, majd 32°C-on inkubálva OD₅₅₀=0,6 sejt koncentrációig növesztettük. Ezt követően a sejteket a λ -Red fehérjék túltermeltetése érdekében 42°C-on, vízfürdőben 300 rpm rázatás mellett 15 percig inkubáltuk. Majd a sejteket jégre helyezve és 0°C-ra hűtve azonnal megkezdtük az elektrokompetens sejtek készítését. Ennek során a sejteket, egymást követő két alkalommal, 10 ml jéghideg, steril desztillált vízzel mostuk át, ismételt óvatos felszuszpendálás és 3800 rpm-en 7 percig tartó hűtött centrifugálási lépések segítségével. A sejteket végül 160 μ l steril desztillált vízben szuszpendáltuk fel. A sejtek kezelése a folyamat teljes időtartama alatt hűtve, jégen történt, ami elengedhetetlen a sejtek életképességének megtartása és így a magas transzformálási hatások elérése érdekében.

A célzott mutációk beépítésére szolgáló oligonukleotid sejtbe juttatása érdekében 40 μ L elektrokompetens sejt szuszpenziót elektroporáltunk a kijelölt oligonukleotid vagy oligonukleotid keverék alkalmazásával. A szintetikus oligonukleotid alkalmazása 2,5 μ M végkoncentrációban történt, a sejtsuszpenzióhoz 1 μ l 100 μ M ssDNS hozzáadása révén. A minták elektroporálása ezt követően 1 mm-es VWR Signature előhűtött elektroporációs küvetákban BioRad MicroPulser (1800 V, 25 μ F, 200 Ω) elektroporátor felhasználásával történt. A sejteket ezt követően azonnal 5 ml előmelegített 36°C-os TB táptalajban

szuszpendáltuk fel, annak érdekében, hogy sejtfaluk integritását mielőbb visszanyerjék és hőmérsékletük elérje az MMR rendszer inaktiválásához szükséges emelt hőmérsékletet. Ezt követően a sejtek kezelése az alkalmazott *E. coli* törzstől függően dőlt el. Az MGλ-tMMR törzs sejteit az elektroporálást követően 60 percre 36°C-ra helyeztük, ezután pedig 5ml hűtött, 40 µg/ml tetraciklinnel kiegészített LB^L tápfolyadékot adtunk hozzá. Az MGλ-Δ*mutS* és MGλ sejteket az elektroporálást követően pedig azonnal 32°C-ra helyeztük. Ezt követően a sejteket, alkalmazott törzstől függetlenül, 32°C-on inkubáltuk a kísérlet céljának megfelelően vagy a stacioner fázis eléréséig, vagy az újabb MAGE ciklusban való alkalmazás érdekében, OD₅₅₀=0,6 sejtsűrűség elérésig. Utóbbi esetben a sejteket az említett sejtkoncentráció elérése után újabb indukálási-elektroporálási-növesztési ciklusnak vetettük alá, egészen a kijelölt ciklusszám eléréséig.

3.6. Rekombináns sejtek genotípusának analízise

A MAGE folyamata során bekövetkező célzott mutáció-beépülési események kimutatására és az allélcicserélési frekvencia mérésére markergén módosításon alapuló módszert alkalmaztunk. Ennek érdekében a vizsgált sejt genomján olyan, a sejt életműködése szempontjából az alkalmazott teljes táptalajban nem esszenciális géneket választottunk ki, melyek géntermékének jelenléte a sejtben egyszerűen vizsgálható, vagy a bekövetkező célzott mutáció egyszerűen kimutatható. Ezek alapján az első kategóriába tartozó *lacZ*, *malk*, *araB* szénforrás hasznosításért felelős anyagcsereút-kulcsgénekből bekövetkező nonszensz mutációs események az adott szénforrás felhasználási képességének megszűnése alapján könnyedén kimutathatók. Illetve a szintén kiválasztott *rpsL* génben bekövetkező másértelmű mutáció, ami Str^R fenotípust eredményez, sztreptomycin rezisztencia alapján könnyedén kimutatható. A második említett kategóriát pedig a *hisB* és *cycA* képviselték, melyekben a célzott mutációk megjelenését allél-specifikus PCR és szekvenálás felhasználásával határoztuk meg.

A fenotípus alapján könnyedén meghatározható gének (*lacZ*, *malk*, *araB*, *rpsL*) esetén az allélcicserélési frekvencia mérését oly módon végeztük, hogy a MAGE végeredményeként kapott, stacioner fázis eléréséig növesztett sejteket megfelelő hígításban szélesztettük az adott gén funkciójának vizsgálatára szolgáló táplemezre. A sejtek stacioner állapotig való növesztése a genotípus meghatározása előtt minden esetben szükséges volt, ennek oka az elektroporálás alatt a kompetens sejt készítest megelőző exponenciális fázisú sejtnövesztés

során bekövetkező kromoszómaszám emelkedés. Ennek oka, hogy a gyorsan osztódó sejtekben a kromoszóma replikáció és a fizikai sejtosztódás sebességbeli eltérése miatt akár 8 genomi másolat is előfordulhat. Ezeken pedig az allélcicserélődési események egymástól függetlenül bekövetkezhetnek, így míg a sejtosztódási lépések során ezen genomi másolatok nem különülnek el eltérő utódsejtekbe, telepképzés esetén szektoros fenotípusú telepeket kapunk. A fenotípuson alapuló genotípus meghatározásához *lacZ* esetén 1% laktózt, *malK* esetén 1% maltózt, *araB* esetén 1% arabinózt szénforrásként tartalmazó 20 µg/ml tetraciklinnel kiegészített MacConkey agart alkalmaztunk, míg az *rpsL* Str^R mutáció jelenlétét a sejtek növekedési képessége alapján LBL agar lemezen mutattuk ki. MacConkey agar felszínén az adott szénforrást nem fermentáló, a táptalaj pH értékét növelő sejtek, a táptalajban található neutrálvörös indikátor révén fehéres telepeket képeznek, így elkülöníthetők a fermentáló és ez által pH csökkenést előidéző, piros kolóniájú sejtektől. Az allélcicserélési frekvencia értékeket ezután a teljes sejtszám és a rekombináns telepek számának hányadosaként kaptuk meg százalékban kifejezve.

A táplemezen mutatott fenotípus alapján nem meghatározható *hisB* és *cycA* gének esetén az allélcicserélési frekvencia értékek meghatározását allél-specifikus telep PCR felhasználásával végeztük. Ennek érdekében a vizsgált sejtpopuláció LBL agar lemezen nőtt egysejt telepeit vizsgáltuk, mintánként 100 különálló telep esetén.

Az allél-specifikus PCR reakciók tervezése során mind a *hisB*, mind a *cycA* gént érintő célzott pontmutáció kimutatására 1-1 primer párt terveztük. Ezen primer pár forward primer tagja, követve az allél specifikus PCR tervezésének bevett módját, 3' végpontján a célzott mutációnak megfelelő nukleotidot hordozott, míg a reverse primer szekvenciája a vad típusú génszekvenciával egyezett meg. Így a PCR reakció során a forward primer szelektív hibridizációja és így a Taq polimeráz általi meghosszabbíthatósága alapján csupán a mutáns allél esetén volt PCR termék megfigyelhető. Ennek eléréséhez a PCR reakció működését átfogó optimalizálásnak vetettük alá, beleértve az alkalmazott ciklusszám és a hibridizációs paraméterek (hőmérséklet, időtartam) optimalizálását is.

A véletlenszerűen kiválasztott telepek esetén meghatározva a *hisB* és *cycA* célzott mutációt hordozó telepek számát, az allélcicserélési frekvencia értékeket az adott gén esetén a rekombináns telepek számának a vad típusú telepek számából származó hányados százalékban kifejezett értéke alapján kaptuk meg.

Az allél-specifikus telep-PCR mérési eseményeken kívül egyes esetekben indokolt volt a sejtek genotípusának szekvenálással történő meghatározása. Ezen szekvenálás során a

kísérlet céljától függően kapilláris Sanger-szekvenálást vagy újgenerációs SOLiD™ teljes genom újra-szekvenálást alkalmaztunk.

A kapilláris Sanger szekvenálás során a teljes genomszekvenálásra kijelölt sejtvonalak összes célzott mutációját és a *cycA* allél-specifikus PCR során vizsgált telepek célzott mutációt hordozó genomi régióinak analízisét végeztük. Ennek érdekében első lépésben telep-PCR és specifikus primer pár (**KIEGÉSZÍTŐ TÁBLÁZAT 1.**) felhasználásával az adott oligonukleotid által megcélzott célszekvenciát mindkét irányból 100-300 bázispárnyi külső szekvenciával együtt felszorzoztuk. A kapott PCR terméket pedig Viogene Gel/PCR DNA Isolation (Viogene) illetve ZR-96 DNA Clean-up (Zymo Research) Kit segítségével, a gyártó által mellékelt protokollnak megfelelően tisztítottuk. A kapott DNS mintát ezután, az adott PCR reakció során alkalmazott forward primer felhasználásával kapilláris szekvenálásnak vetettük alá, majd a célzott mutációk jelenlétét az *E. coli* K-12 MG1655 genomszekvenciájához (GenBank# NC000913; Version NC_000913.2 GI:49175990) hasonlítva határoztuk meg BLAST algoritmus segítségével.

A hosszútávú MAGE evolúciós kísérlet során kijelölt sejtvonalak teljes genom újraszekvenálásához és a MAGE folyamata során bekövetkező nem-célzott háttér-mutációs események számának meghatározásához SOLiD™ újgenerációs szekvenálási technológiát alkalmaztunk. A sejtek teljes genotípusának meghatározása érdekében a vizsgált 20 MAGE cikluson átesett sejtpopulációkból mind a 6 célzott mutációt hordozó sejtvonalatokat szelektáltunk ki, a későbbi vizsgálatok érdekében. Ennek első lépéseként a *lacZ*, *malK*, *araB* és *rpsL* Str^R mutációkat együttesen tartalmazó sejteket különítettük el. Ennek érdekében, kihasználva a szénforrás hasznosítás és streptomycin rezisztencia együttes vizsgálhatóságát, mindhárom szénforrást és streptomicint tartalmazó MacConkey táptalajra szélesztettük a vizsgált sejtpopulációt. A táplemezt ezt követően 30°C-on inkubáltuk a telepek megjelenéséig. A vizsgálat során fehér telepek csak abban az esetben jelentek meg, ha az adott telep mind a négy fent említett génben megfelelő mutációt hordozott, melynek eredményeként a streptomycin rezisztencia mellett, sem laktóz, sem maltóz, sem arabinóz fermentációjára nem volt képes. Második lépésként pedig, ezen 3 szénforrás felhasználására képtelen Str^R fenotípusú sejteket LB^L táplemezre oltottuk tovább. Ezt követően pedig ezen telepek közül válogattuk ki a *hisB* és *cycA* célzott mutációt is együttesen hordozó, hatszoros (*lacZ*, *malK*, *araB*, *rpsL*, *hisB*, *cycA*) célzott mutációval rendelkező sejtvonalatokat. Ezen mutációk pontos jelenlétét a korábban említett módon, Sanger szekvenálással is megerősítettünk.

A teljes genom újraszekvenálásra kijelölt sejtvonalakból, illetve az egyes populációk kiinduló állapotát képviselő MG λ - Δ mutS és MG λ -tMMR sejtekből, ezután 10 ml LB^L tápfolyadékba oltva és 30°C-on rázatva a sejteket stacioner állapot eléréséig növesztettük, majd GenElute™ Bacterial Genomic DNAKit (Sigma-Aldrich) felhasználásával, a gyártó által mellékelt protokoll alapján genomi DNS-t preparáltunk. Ezt követően a tisztított genomi DNS-t SOLiD 5500xl System (Life Technologies; LT) alapú, teljes genom szekvenálásnak vetettük alá, a gyártó által javasolt protokoll alapján. A szekvenálás során kapott nyers szekvencia adatokat ezután Genomics Workbench 6.0.1 szoftvercsomag felhasználásával értékeltük ki. Ennek során elsőként a kapott nyers, leolvasott szekvenciákat az *E. coli* K-12 MG1655 genomszekvenciájához (GenBank# NC000913; Version NC_000913.2 GI:49175990) illesztettük, majd a programcsomag felhasználásával kiértékelve a referenciagenomhoz viszonyított eltéréseket, SNV és INDEL analízist hajtottunk végre.

A vizsgálat során a meghatározott eltérések esetén azokat, melyek kizárólagosan a MAGE folyamatán átesett sejtek genomjában voltak megtalálhatók, de a kiindulási sejt genomjában nem, a MAGE során bekövetkezett nem-célzott háttér-mutációként értékeltük ki.

3.7. Mutációs ráta mérése

A sejtek DNS hibajavító folyamatainak vizsgálata érdekében a sejtek osztódása során mérhető mutációs ráta mértékét rifampicin rezisztencia alapú fluktuációs analízissel határoztuk meg (Foster, P.L. és mtsai. 2006.). Ennek során a vizsgált sejtek stacioner fázisig LB^L táptalajban növesztett folyadékkultúrájából 10⁴ sejtet oltottunk 12 független mérés során 1000 μ l LB^L tápfolyadékot tartalmazó tenyésztőedénybe. Ezt követően a sejteket a vizsgált hőmérsékleten a stacioner fázis eléréséig növesztettük. Ez megközelítőleg 24 órát vett igénybe, folyamatos 300 rpm ráztatás mellett. A sejt szuszpenziót ezután a sejtek koncentrációjának meghatározása érdekében LB^L táptalajra szélesztve, meghatároztuk a minták sejtkoncentrációját. Ezzel párhuzamosan, mind a 12 sejt kultúrából egyenlő mennyiséget 100 μ g/ml rifampicint tartalmazó LB^L táplemezre szélesztettük, majd a lemezeket 48 órán keresztül 30°C-on inkubáltuk. A telepek számának meghatározása után a mutációs ráta értékeket a Ma-Sandri-Sarkar módszer alapján a

FALCOR webes on-line alkalmazás segítségével értékeltük ki (Hall,B.M. és mtsai. 2009.) (Sarkar S, és mtsai. 1992.).

3.8. Hőmérséklet hatása az MG λ -tMMR törzs növekedési tulajdonságaira

A vizsgált *E. coli* K-12 MG1655 vad típusú és MG λ -tMMR sejtek növekedési rátáját LB^L tápfolyadékban való növesztéssel határoztuk meg. Ennek során az adott törzs stationer állapotig LB^L tápfolyadékban 30°C-on növesztett sejt kultúrájából, 1 μ l-t oltottunk 30 párhuzamos mérés során 100-100 μ l LB^L tápfolyadékba, 96-well microplateben. A tápfolyadékba oltott sejtek sejtkoncentrációjának változását az adott hőmérsékleten történő rázatott növesztés során Biotek microplate olvasó felhasználásával monitoroztuk. Ennek során az egyes sejt kultúrák OD₆₀₀ értékét 7 percenként 24 óráig mértük. Ezt követően a mért adatok alapján meghatároztuk az MG λ -tMMR sejtek vad típushoz viszonyított relatív növekedési rátáját, Warringer and Blomberg módszere alapján (Warringer,J és mtsa. 2003; Warringer,J és mtsai. 2003).

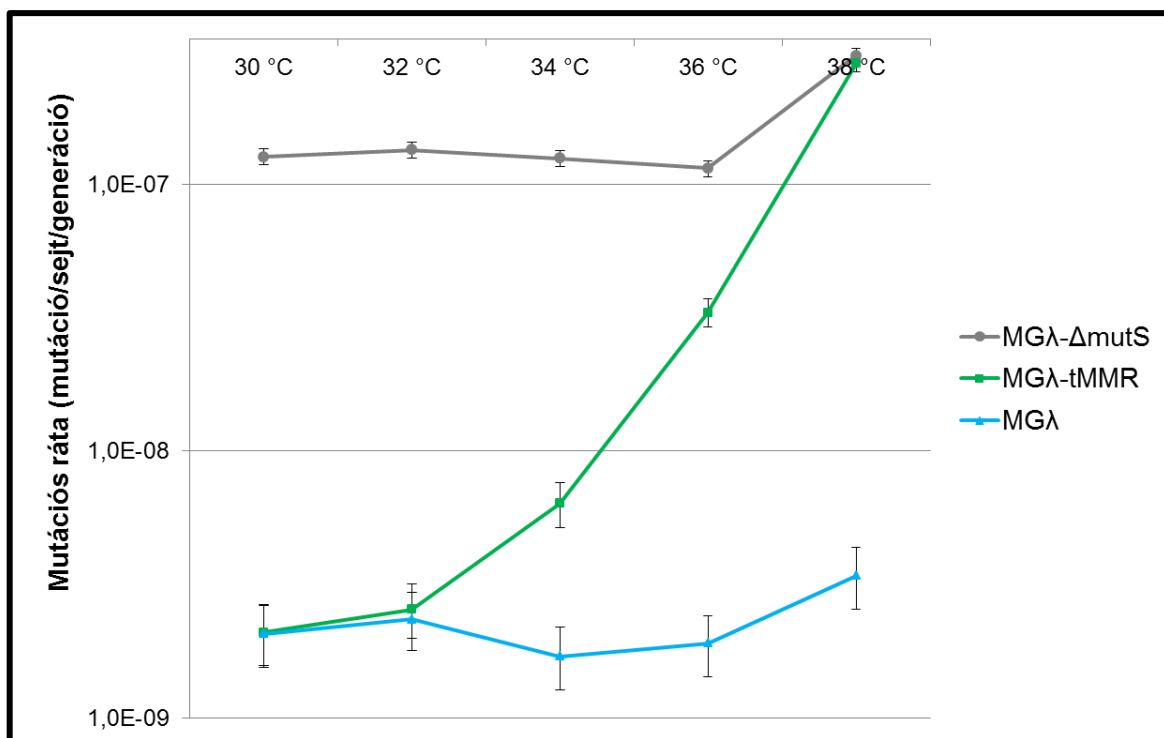
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

4.1 Az MMR rendszer átmeneti inaktiválása a MAGE során

A Multiplex Automatikus Genommérnökség folyamata során a magas hatásfokú, λ -Red rendszer katalizálta allélcicseréléshez elengedhetetlen a sejtek MMR rendszerének inaktiválása. A célkitűzések között szereplő magas hatásfok és pontosság elérése érdekében az MMR rendszer inaktiválását a sejtekben kizárólagosan a célzott mutációkat hordozó oligonukleotidok beépülésének idejére kívántuk korlátozni, annak érdekében, hogy elkerülhessük a káros háttér-mutációk felhalmozódását. Ennek elérése érdekében elsőként olyan elméleti stratégiát dolgoztunk ki, mely az *Escherichia coli* endogén MMR rendszerének átmeneti inaktiválását a sejt MMR rendszerének működése szempontjából esszenciális fehérjék (MutS és MutL) hőmérséklet érzékeny variánsainak felhasználásával valósítja meg. Ez, elméletünk szerint lehetőséget biztosít az MMR rendszer működésének közvetlen, fehérje szinten történő szabályozására, a sejtek hőmérsékletének szabályozásán keresztül. Ezáltal pedig egyszerűen megvalósítható az MMR rendszer átmeneti inaktiválása, kizárólagosan a célzott mutációkat hordozó oligonukleotidok beépülésének időintervallumára.

4.2. Az *Escherichia coli* endogén MMR rendszerének hőmérséklet érzékeny mutánsai

Vizsgálataink során elsőként a szakirodalomban leírt és részben jellemzett hőmérséklet érzékeny, kondicionális *E. coli* MutS(A134V) és MutL(G62S) fehérjevariánsokat a MAGE működését lehetővé tevő λ -Red fehérjerendszer túltermeltetését biztosító sejtekben rekonstruáltuk (MG λ -tMMR) (Hong,E.S., 2005.). Ezt követően megvizsgáltuk az MG λ -tMMR törzs DNS hibajavító rendszerének hőmérsékletfüggését. Ennek érdekében meghatároztuk a törzs mutációs rátáját, eltérő tenyésztési hőmérséklet esetén, melynek értéke szoros kapcsolatban áll a sejtek MMR rendszerének funkcióképességével (**3. Ábra**).



3. Ábra: Kondicionális *E. coli* MutS(A134V) és MutL(G62S) fehérjevariánsokat tartalmazó MGλ-tMMR törzs, illetve az MGλ és MGλ-ΔmutS törzsek mutációs rátájának hőmérsékletfüggése (n=3; 95%-os konfidencia intervallum feltüntetésével)

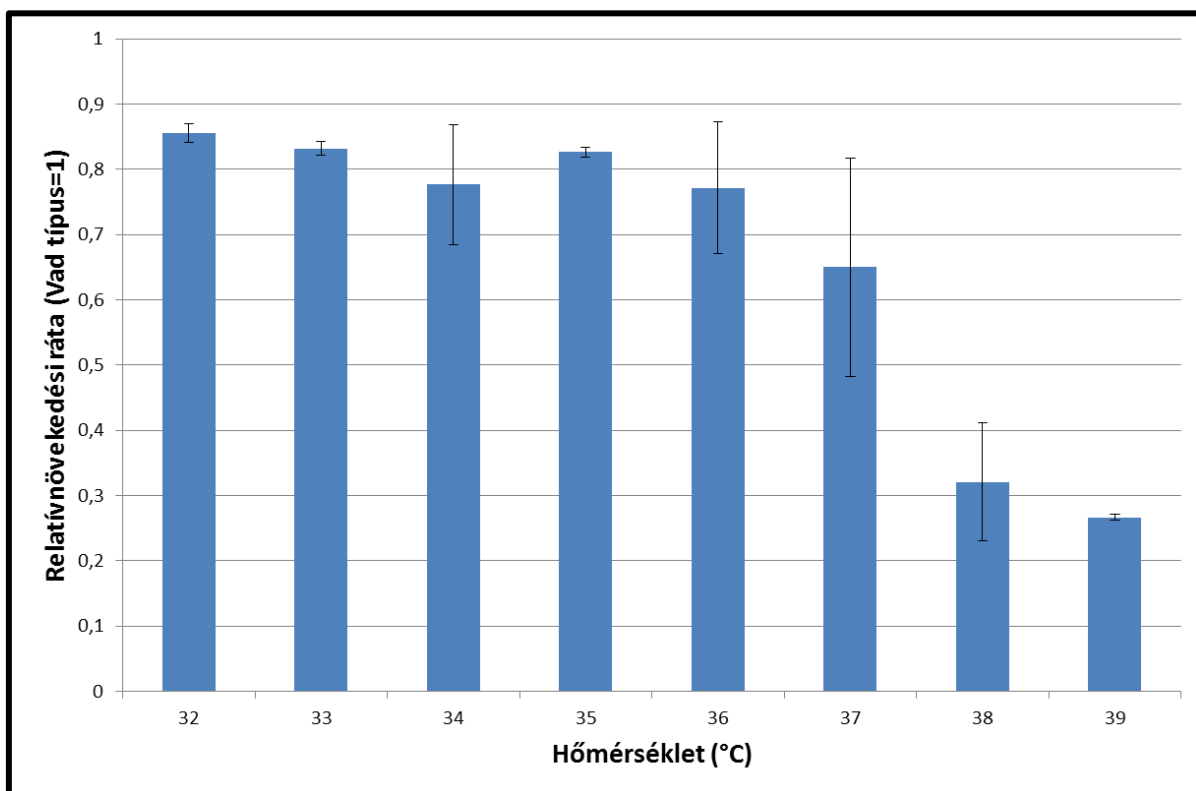
A sejtek mutációs rátájának mérése megmutatta, hogy a korábbi szakirodalomban bemutatott eredményekkel összhangban, az MGλ-tMMR törzs mutációs rátája 32°C alatt a vad típusú *E. coli* sejtekkel egyezik meg, jelezve az endogén MMR rendszer teljes funkcióképességét. A hőmérséklet emelése hatására azonban az MGλ-tMMR törzs mutációs rátája jelentős emelkedést mutatott, mindösszesen 6°C hőmérséklet emelkedés hatására elérte a géndelációval inaktivált MMR rendszerrel rendelkező sejtek (MGλ-ΔmutS) mutációs rátáját. A mérési eredmények alapján így a MutS és MutL fehérjéket érintő kondicionális fenotípust okozó aminosav cserék együttes hatására a sejtek MMR DNS hibajavító képessége 38°C környékén megszűnik. Ennek következtében pedig az MGλ-tMMR törzs segítségével, megfelelő időpontban történő hő sokk alkalmazásával, a sejtek endogén MMR aktivitása szabályozhatóvá válik.

4.3. DNS hibajavítás átmeneti inaktiválása a MAGE folyamata során

4.3.1 MG λ -tMMR törzs alkalmazásának optimalizálása a MAGE folyamata során

A kapott eredmények alapján az MG λ -tMMR törzs felhasználásával célul tűztük ki a korábban szakirodalomban leírt, tradicionális MAGE módszer optimalizálását. Annak érdekében, hogy a sejtek endogén MMR rendszerének működése a hőmérséklet átmeneti megemelésének segítségével a célzott mutációk beépülésének idejére kikapcsolható legyen.

Elsőként meghatároztuk az MG λ -tMMR törzs növekedésének hőmérsékletfüggését, a λ -Red fehérjék termelődésének és a hőérzékeny mutációk jelenlétének a sejtek életműködésére gyakorolt hatását (4. Ábra). Ennek meghatározása a nagysebességű MAGE ciklusok elérése és a háttér-mutációk számának minimálisra csökkentése szempontjából is elengedhetetlen volt. Ennek oka, hogy a túl alacsony tenyésztési hőmérséklet a sejtek osztódási sebességének csökkenésével és ez által az egyes ciklusok hosszának növekedésével járhat. Ezzel szemben a túl magas hőmérsékletű sejtnövesztés, a cI represszor részleges inaktiválásán keresztül, a λ -Red operon toxikus expressziója miatt stressz indukált mutáció képződést segíthet elő a sejtekben.



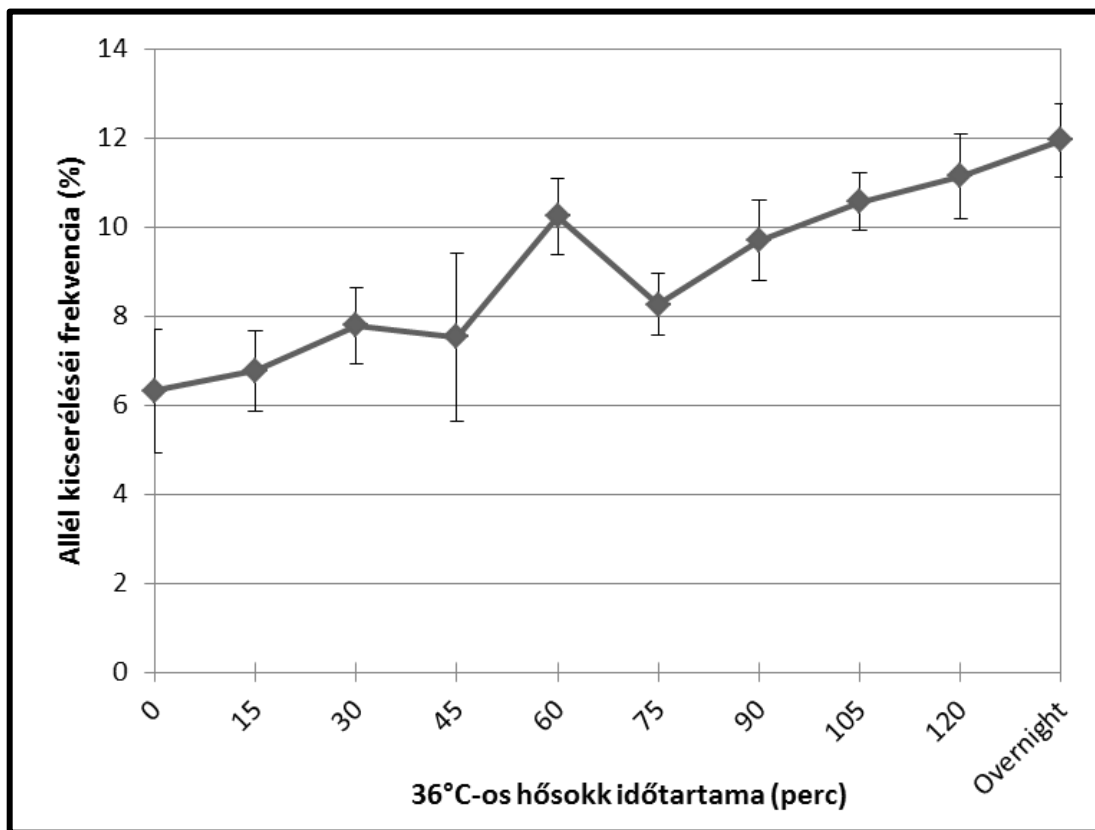
4. Ábra: MG λ -tMMR *E. coli* törzs relatív növekedési rátája a vad típusú, K-12 MG1655 sejtekéhez viszonyítva. (n=30; 95%-os konfidencia intervallum feltüntetésével)

A vizsgált *E. coli* K-12 MG1655 vad típusú sejtek növekedési rátájához viszonyítva az MG λ -tMMR sejtek növekedési üteme egészen 36°C-ig nem mutatott számottevő eltérést. Ezen eredmények összhangban állnak a sejtekben is előforduló cI represszor szabályzott *pL* promoter hő-indukciós kinetikájával, mely 32°C teljesen represszált állapotú, 32-36°C között enyhén szivárgó, magasabb hőmérsékleten azonban igen erős szivárgást mutat. Ez feltehetőleg a *pL* promoter szabályzott Lambda-Red operon toxikus K λ fehérje termelése révén erősen befolyásolja a sejtek túlélését. Ezt alátámasztja az a tény is, hogy az operon 15 percnél hosszabb 42°C-on történő indukciója erős sejtpusztító hatással bír (Yu, D és mtsai. 2000.).

Az MG λ -tMMR sejtek mutációs rátájának hőmérsékletfüggése és a sejtek emelt hőmérsékleten mutatott növekedési rátája alapján az MMR rendszer optimális inaktiválására 36°C-ot jelöltük ki, a további kísérletek során. Ennek oka, hogy ezen a hőmérsékleten az MMR rendszer aktivitása a sejt mutációs ráta mérései alapján már nem számottevő, illetve a megemelt hőmérsékletből adódó fehérje túltermelés sejtnövekedést gátló hatása sem jelentkezik.

Ezt követően arra a kérdésre kerestük a választ, vajon a MAGE folyamata során a hőmérséklet átmeneti 36°C-ra történő emelése képes-e a sejt MMR rendszerének átmeneti inaktiválására, célzott mutációt hordozó szintetikus oligonukleotid beépülésének idejére. Ennek érdekében egy, két nukleotid inszerciója által nonszensz mutációt előidéző oligonukleotid (LacZ_m10_v2lo) beépítését kíséreltük meg *lacZ* markergénbe (5. Ábra). Ezen DNS hibatípus korábbi kísérleteink és a szakirodalmi adatok alapján az MMR rendszer hibajavító aktivitása által magas hatásfokkal javítódik ki. Ennek következtében pedig kisebb mint 0,5 % allélcicserélési frekvenciát mutat vad típusú *E. coli* sejtekben, míg MG1655 Δ *mutS* sejtekben 20 %-nál magasabb hatásfokkal épül be. Ezáltal allélcicserélési frekvenciája erősen függ az MMR rendszer funkcióképességétől. A kísérlet során pedig azt vizsgáltuk, hogy miként alakul a vizsgált oligonukleotid allélcicserélési frekvenciája abban az esetben, ha a MAGE során a Lambda-Red fehérjék túltermeltetését biztosító 42°C-os inkubálás alatt a vizsgált MutS és MutL hőmérséklet érzékeny fehérjevariánsokat denaturáljuk és a sejteket az elektroporálási lépést követően azonnal 36°C-os TB gazdag tápfolyadékba helyezzük. Ezáltal pedig az MMR rendszert feltehetően inaktív állapotban tartjuk az elektroporálás és az azt követő oligonukleotid beépülés időtartama alatt. Ezt

követően pedig, az MMR rendszer újraaktiválása érdekében permisszív 32°C-os hőmérsékleten növesztjük tovább a sejteket.

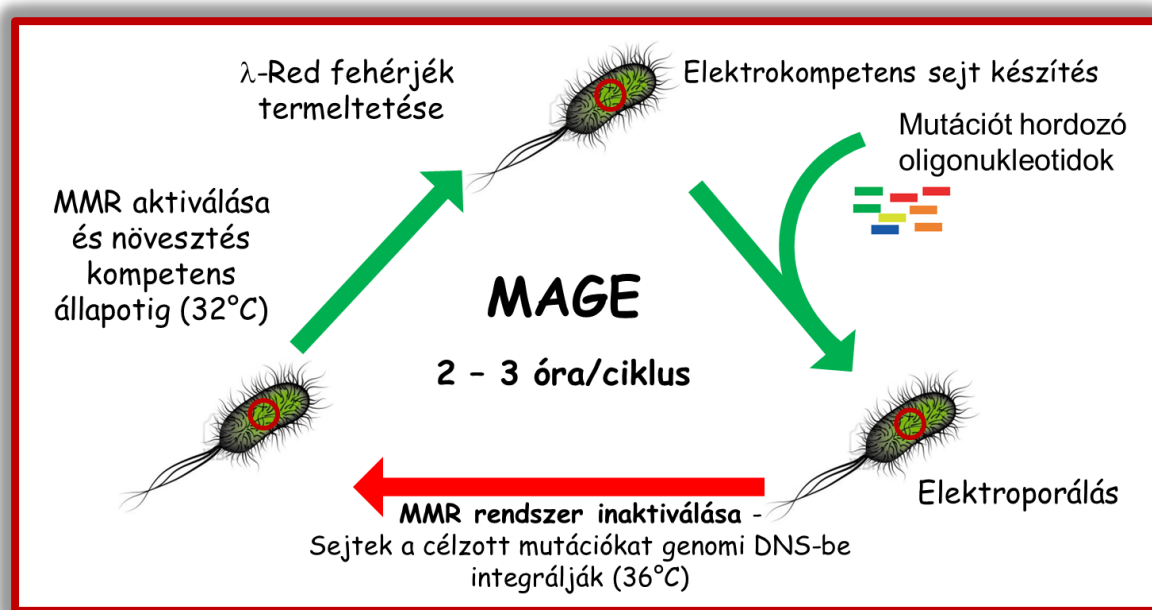


5. Ábra: LacZ_m10_v2lo oligonukleotid allélkicserélési frekvenciája, a 36°C-on történő hősokk idejének függvényében (n=4; 95%-os konfidencia intervallum feltüntetésével).

A kísérlet során az elért magas allélkicserélési frekvencia értékek bizonyították, hogy az oligonukleotid bejuttatást követően 36°C-ra helyezett sejtekben az MMR rendszer aktivitása lecsökkent, mert az MMR rendszer által egyébként hatékonyan felismert mutáció típus is magas hatásfokkal a genomra épülhetett. A kísérleti során megfigyelhető volt, hogy az MMR rendszer működését inaktíváló, emelt hőmérsékletű hősokk idejével arányosan nőtt a célzott mutáció beépülésének hatásfoka. Ezen eredményekből arra következtethetünk, hogy az elektroporálás, mint a sejteket ért stressz hatás, az exponenciális növekedési fázisban lévő, elektrokompetens sejtek növekedését leállítja, majd újra gazdag táptalajba kerülve a sejtek osztódása csak fokozatosan indul újra. Így a sejtről-sejtre eltérő időpontban újrainduló genomreplikáció következtében a bejuttatott oligonukleotidok fokozatosan növekvő aránya épül be a genom célzott régiójára, a populáció egészét tekintve.

4.3.2 Multiplex Automatikus Genommérnökség optimalizálása MG λ -tMMR törzs alkalmazásával

Az elvégzett kísérletek alapján az *E. coli* MG λ -tMMR törzs felhasználásával elvégeztük a MAGE protokoll optimalizálását, oly módon, hogy a ciklusok során a sejtek MMR rendszerét a célzott mutációkat hordozó oligonukleotidok beépülésének idejére inaktíváljuk (6. Ábra). Ennek során egy olyan folyamatot vázoltunk fel, mely a tradicionális MAGE módszerétől mindösszesen annyiban különbözött, hogy az említett törzs alkalmazásán kívül az allélkicserélő oligonukleotidok bejuttatását követően a sejteket 60 percre 36°C-ra helyeztük gazdag tápfolyadékban. Az emelt hőmérsékletű inkubációs periódus letelte után a sejtek tápfolyadékának hőmérsékletét pillanatszerűen lecsökkentettük, a hőmérsékletérzékeny mutánsok számára permisszív 32°C-os hőmérsékletre, ezáltal újra aktiváltuk az MMR rendszer működését. Utóbbi pedig a vad típusú sejtek mutációs rátájával egyező háttér-mutációs rátát eredményezett a MAGE ciklus sejtnövesztési fázisában. Ezáltal, elméletünk alapján, mindösszesen néhány sejtosztódásra korlátoztuk a sejtek MMR rendszerének eltávolítását és a sejtek ezzel együtt járó, emelkedett mutációs rátájú állapotát.



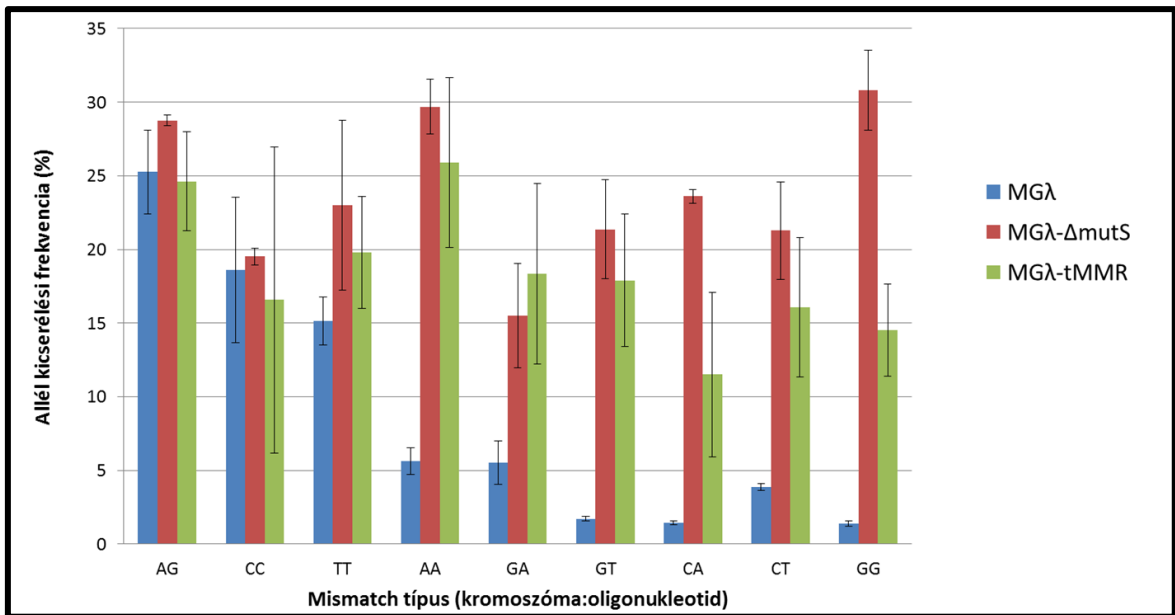
6. Ábra: A Multiplex Automatikus Genommérnökség (MAGE) módosított folyamatának vázlatos bemutatása. A folyamat részletes leírása elérhető az **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK** fejezetben.

4.3.3 A módosított és tradicionális MAGE hatásfokának összehasonlítása

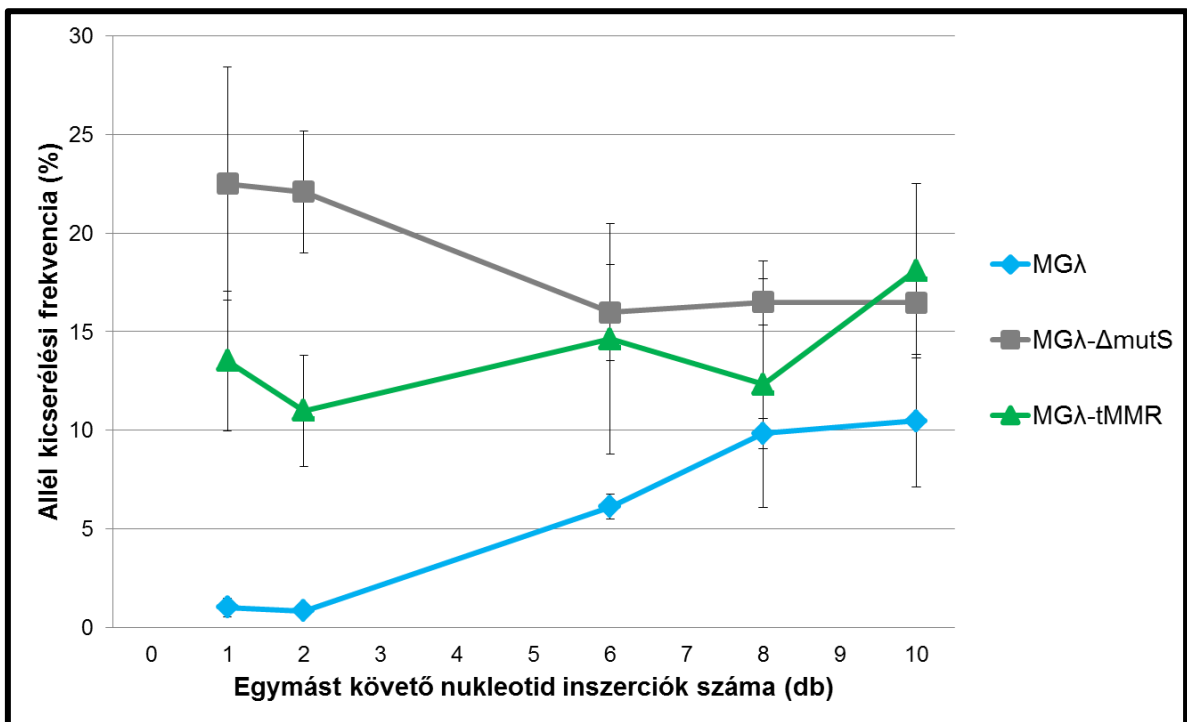
Célkitűzéseink között szerepelt az optimalizált MAGE folyamatának részletes összevetése a tradicionális módszer hatásfokával és jellemzőivel. Ezen információk részletes ismerete elengedhetetlen a módszer megbízható alkalmazása érdekében. Ennek elérése érdekében elsőként megvizsgáltuk, hogy a korábban a szakirodalomban részletesen jellemzett módszer célzott mutáció beépítési hatásfoka miként viszonyul az általunk kidolgozott, módosított eljárás hatásfokához.

A MAGE során a szintetikus oligonukleotid beépülésének következtében bekövetkező allélcicserélési események hatásfokának megállapítása érdekében kísérleteink során markergén inaktiválási rendszert alkalmaztunk. Ennek során a kijelölt markergén (*lacZ* vagy *malK*) esetén vizsgáltuk az egyes, eltérő típusú nukleotid csere révén képződő nonszensz mutáció beépülésének frekvenciáját. Annak érdekében, hogy a sejtek MMR rendszerének működését és allélcicserélési frekvenciára gyakorolt hatását minél részletesebben megvizsgáljuk, az összes lehetséges egyszeres nukleotid csere típus és eltérő hosszúságú inszerció bekövetkezési valószínűségét megállapítottuk (**7. és 8. Ábra**). A kísérlet során ennek érdekében megvizsgáltuk az MMR rendszer folyamatos hiánya és jelenléte esetén mérhető hatásfok adatok mellett, a kondicionális törzset alkalmazó MAGE módszer hatásfokát is.

A vizsgálat kivitelezése az **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK** fejezetben feltüntetett optimalizált MAGE protokoll alapján történt, a **KIEGÉSZÍTŐ TÁBLÁZAT 1**-ben feltüntetett *lacZ*, illetve *malK* markergén inaktiváló oligonukleotidok felhasználásával. A kísérlet során a feltüntetett allélcicserélő oligonukleotidok alkalmazásával egyetlen ciklus során vizsgáltuk meg az oligonukleotidok beépülésének frekvenciáját.



7. Ábra: Eltérő típusú nukleotid csere révén képződő nonszensz mutációt létrehozó oligonukleotidok allélkicserélési hatásfoka (n=2; standard hiba feltüntetésével)



8. Ábra: Eltérő hosszúságú inszerció révén képződő nonszensz mutációt létrehozó oligonukleotidok allélkicserélési hatásfoka (n=2; standard hiba feltüntetésével)

A kísérlet során a funkcióképes MMR rendszerrel rendelkező, vad típusú MGL törzsben végzett allélkicserélési események beépülési hatásfoka erős mutáció típustól való függést mutatott. A megfigyelt hatás oka, hogy a sejt endogén MMR rendszere eltérő mutáció típusokat eltérő hatásfokkal képes felismerni és ennek következtében meggátolni

beépülésüket a MAGE során. Ennek eredményeként pedig az eltérő mutációk eltérő hatásfokkal építhetők be a genomi célszekvenciába. Hasonló hatás volt megfigyelhető az eltérő hosszúságú inszerciók beépítése esetén is, mely esetén a funkcióképes MMR rendszer hatékonyan gátolta meg a rövid (<3 nukleotid) inszerciók beépülését. A kísérlet során az MMR rendszert gén delécióval inaktivált ($MG\lambda-\Delta mutS$) törzset alkalmazó tradicionális és a hőmérséklet érzékeny mutánst ($MG\lambda-tMMR$) alkalmazó optimalizált MAGE folyamata ezzel szemben mutáció típustól független, magas hatásfokú allélcicserélésre volt képes. Ez bizonyította, hogy a módosított MAGE módszer a tradicionális módszerhez hasonló hatásfokkal képes mutáció típustól függetlenül magas hatásfokú allélcicserélésre.

4.4 A módosított és tradicionális MAGE folyamat háttér-mutációs eseményeinek összehasonlítása

A MAGE folyamata során a módszer pontosságának mérése és a megcélzott genomi régiókon kívül eső véletlenszerű, nem-célzott mutációs események feltérképezése elengedhetetlen a módszer megbízható alkalmazása érdekében. Ezért a kutatás során kifejlesztett módszer működését valós alkalmazás esetén is jellemeztük. Ennek elérése érdekében a tradicionális és továbbfejlesztett MAGE folyamatát nagyléptékű, több MAGE ciklus elvégzését igénylő genommérnöki alkalmazás esetén is összehasonlítottuk. Ezt követően pedig, a folyamaton átesett sejtek esetén meghatároztuk a sejtekben bekövetkező, nemkívánt háttér-mutációs események gyakoriságát is. Utóbbi megállapítására teljes genom újraszekvenálást alkalmaztunk. Ennek során arra kerestük a választ, hogy az MMR rendszer inaktiválásának kizárólagosan a célzott mutációk beépítésének idejére való korlátozása képes-e a háttér-mutációs események számát csökkenteni a MAGE folyamata során.

Ennek vizsgálata érdekében mind a tradicionális, mind a továbbfejlesztett MAGE módszerének párhuzamos felhasználásával egy-egy sejtpopulációt 20, egymást követő MAGE ciklusnak vetettünk alá. A ciklusok során a sejtek célzott genommodosítását 6, a bakteriális kromoszómán szétszórt gén egyidejű megcélzásán és kijelölt mutációk beépítésének megkísérlésén keresztül hajtottuk végre. Az egyes megcélzott gének eltérő genomi pozíciójával azt kívántuk vizsgálni, hogy az egyes allélcicserélési események esetén befolyásolja-e a célszekvencia elhelyezkedése a bakteriális kromoszómán a vizsgált

oligonukleotid beépülésének hatásfokát (**2. Táblázat**). Ennek segítségével a módszer valós alkalmazás során mérhető hatásokat kívántuk részletesebben feltérképezni.

Gén	Genomi pozíció	Mutáció típusa	Felhasznált oligonukleotid
<i>araB</i>	69999	A:A	araB_AA
<i>lacZ</i>	364878	T:T	LacZ_TT_v7
<i>hisB</i>	2091657	G:T	hisB_GT
<i>rpsL</i>	3472447	A:C	rpsL_AC
<i>malK</i>	4245058	C:C	MalK_CC_v1
<i>cycA</i>	4428025 - 4428026	AA:AC	cycA_AAAC

2. Táblázat: Hosszú távú MAGE evolúciós kísérlet során alkalmazott célgének genomi pozíciója a megcélzott módosítás (kromoszómális nukleotid : szintetikus nukleotid), illetve a felhasznált MAGE oligonukleotid feltüntetésével

A kísérlet során az egymást követő MAGE ciklusok elvégzése során megvizsgáltuk a célzott mutációk beépülésének dinamikáját is. Ennek érdekében 10 és 20 ciklus után meghatároztuk az egyes mutációk allélkicserélési frekvencia értékeiket (**3. Táblázat**).

Allélkicserélési frekvencia (%)				
	10. MAGE ciklus		20. MAGE ciklus	
Célgén	MG λ - Δ mutS	MG λ -tMMR	MG λ - Δ mutS	MG λ -tMMR
<i>malK</i>	52.08	38.54	68.75	71.88
<i>cycA</i>	55.20	47.91	85.42	88.54
<i>araB</i>	40.62	23.95*	58.33	29.17**
<i>lacZ</i>	72.91	66.66	94.79	71.88**
<i>hisB</i>	59.37	62.50	89.58	89.58
<i>rpsL</i>	60.41	63.54	85.42	76.04

3. Táblázat: Hosszútávú MAGE evolúciós kísérlet során megfigyelhető allélkicserélési frekvencia értékek. Megfigyelhető eltérések statisztikai analízise: * P<0,05; ** P<0,01 (Fisher-féle egzakt próba alapján).

A vizsgálatok során minkét alkalmazott módszer esetén a célzott mutációk magas hatásfokkal épültek be a vizsgált sejtek genomjára. A két populáció között csupán az *araB* és *lacZ* géneket célzó mutáció bevitel esetén volt szignifikáns eltérés megfigyelhető. Ennek következtében kijelenthettük, hogy a tradicionális és továbbfejlesztett MAGE módszere

több célszekvencia párhuzamos módosítása esetén is megbízható és magas hatásfokkal történő genommérnökségre képes.

Annak eldöntésére pedig, hogy a több MAGE ciklusnak kitett sejtek háttér-mutációs eseményei miként alakulnak, meghatároztuk a sejtekben bekövetkező, háttér-mutációs események gyakoriságát is. Ennek érdekében mindkét vizsgált módszer esetén, a 20 MAGE cikluson átesett sejtpopulációból elsőként 5 olyan sejtvonalat szelektáltunk ki, melyek mind a 6 célzott mutációt tartalmazták. Ezt követően ezen sejtek genomját Applied Biosystems SOLiD™ új generációs szekvenálásnak vetettük alá és genom újraszekvenálással egybekötött mutációs analízist (SNP és INDEL) végeztünk az **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK** fejezetben leírtak alapján. Ennek eredményeként a kapott genomszekvencia adatokból meghatároztuk a MAGE folyamata során megjelenő háttér-mutációs események típusát és számát (**4. Táblázat**).

Háttérmutációs események jellemzői				
	MG λ - Δ mutS		MG λ -tMMR	
Tranzíciók	Száma (db)	Aránya (%)	Száma	Aránya
A:T > G:C	34	35.1	3	20
G:C > A:T	52	53.6	9	60
Transzverziók				
A:T > T:A	0	0	1	6.7
A:T > C:G	0	0	0	0
G:C > T:A	0	0	1	6.7
G:C > C:G	0	0	0	0
Inszerciók	8	8.2	1	6.7
Deléciók	3	3.1	0	0
Összesen	97		15	
Szubsztitúciók következménye				
Elhelyezkedés				
Nemkódoló	14	14.4	2	13.3
Kódoló	83	85.6	13	86.7
Kódoló szekvenciába eső				
Szinonim	21	25.3	1	7.7
Nemszinonim	62	74.7	12	92.3

4. Táblázat: Hosszútávú MAGE evolúciós kísérlet során megfigyelhető háttér-mutációs események analízise

A genomszekvenálási adatok alapján a 20 MAGE cikluson átesett és kiválasztott 5 *E. coli* sejt genomjában összesen az MG λ - Δ mutS esetén 97 db háttér-mutáció halmozódott fel

(SNP és INDEL) melyek összesen 76 fehérje kódoló gént érintettek (átlagosan 19,4 db pontmutáció sejtvonalként). Ezzel szemben az MG λ -tMMR sejtekkel végzett módosított MAGE folyamata során a vizsgált sejtvonalakban mindösszesen 15 db háttér-mutáció jelent meg (átlagosan 3 db pontmutáció sejtvonalként). Ez közel 85%-os háttér-mutációs ráta csökkenést eredményezett. Ezen adatok alapján az új MAGE módszer hatékonynak bizonyult a háttér-mutációs események számának csökkentésében. A kísérlet során azonosított háttér-mutációs eseményeket és jellemzőiket a **2. KIEGÉSZÍTŐ TÁBLÁZAT** tartalmazza.

A sejtek MMR rendszerének természetes mutáció felismerő képessége és a metiláció-függő DNS hibajavítás kiiktatásával járó mutációs események típusának figyelembevételével a szakirodalmi adatoknak megfelelően (Lee,H. és mtsai. 2012.) a tradicionális MAGE folyamata során az MG λ - Δ mutS sejtekben megjelenő mutációk döntő többsége A:T $\rightarrow$ G:C és G:C $\rightarrow$ A:T tranzíció volt. Ezen mutáció típusok szinte kivétel nélkül hiányoztak az MG λ -tMMR sejteket felhasználó, az MMR rendszer inaktiválását csak az allélcserélések időintervallumára szorító, módosított MAGE módszer esetén. Ez utóbbi és a módosított MAGE eljárás felhasználásával elért háttér-mutációs események alacsony száma bizonyította, hogy a sejtek endogén MMR rendszerének átmeneti inaktiválása a mutációkat hordozó oligonukleotidok beépítésének idejére, hatékonyan képes visszaszorítani a háttér-mutációk felhalmozódását a MAGE során.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A szintetikus biológia egyik legnagyobb kihívását a biológiai rendszerek működésének célzott befolyásolása képviseli, a hasznos cél elérése érdekében. Utóbbit vezetheti akár az élőlények életfolyamatainak tanulmányozása, biotechnológiai felhasználás, de akár az evolúciós folyamatok hátterének feltérképezése is. Új biológiai rendszerek (egyedi molekulák, teljes sejtek, sejtés struktúrák) létrehozásához, vagy a már létező biológiai rendszerek áttervezéséhez azonban elengedhetetlen a sejtek információhordozó rendszerének nagy pontosságú és költséghatékony módosítása.

A Multiplex Automatikus Genommérnökség (MAGE) robosztusságával és magas hatásfokával erre a technológiai kihívásra kínál megoldást. A módszer Achilles sarka, a hatékony működéssel együtt járó magas háttér-mutációs ráta, azonban ez idáig meggátolta széleskörű alkalmazását. Kutatásom során ezért egy olyan módosított MAGE eljárást kidolgozását tűztem ki célul, mely a módszer előnyös tulajdonságainak megtartása mellett képes kiküszöbölni a háttér-mutációk megjelenését és az ennek következtében fellépő hátrányos hatásokat.

Ennek megvalósítása érdekében elsőként olyan elvet fejlesztettünk ki, mely segítségével nagysebességgel szabályozhatóvá válik a sejtek metiláció-függő DNS hibajavító folyamatainak aktivitása. Ezt az MMR rendszer működése szempontjából kulcsfontosságú MutS és MutL fehérjék kondicionális, hőmérséklet érzékeny variánsainak alkalmazásával, és aktivitásuk hősokk segítségével történő szabályozása útján valósítottuk meg. Az említett fehérje variánsok működését *Escherichia coli* sejtekben jellemeztük és felhasználásukkal optimalizáltuk a Multiplex Automatikus Genommérnökség folyamatát. Ezáltal pedig lehetővé vált a MAGE folyamata során, kizárólagosan a célzott mutációk beépítésének időtartamára, inaktíválni az *Escherichia coli* sejtek metiláció-függő DNS hibajavító rendszerének működését.

Az optimalizált MAGE folyamatát ezt követően részletesen összevetettük a korábban a szakirodalomban leírt, tradicionális módszer paramétereivel. Ennek során a továbbfejlesztett eljárás bizonyította, hogy a vizsgált célzott mutáció típusok beépítése esetén, a tradicionális módszerhez hasonlóan, magas hatásfokú allélcicserélést tesz lehetővé.

Ezt követően hosszú távú MAGE evolúciós kísérletben is megvizsgáltuk az optimalizált folyamat hatásfokát, illetve a háttér-mutációs események gyakoriságát. A kísérlet során elvégzett 20 MAGE ciklus során, az optimalizált módszer hatásfoka és

sebessége a tradicionális módszerével közel megegyezett. A háttér-mutációs események száma a kísérlet során azonban az optimalizált eljárás esetén ~85%-kal alacsonyabbnak bizonyult a tradicionális eljárás során bekövetkező háttér-mutációs események számánál.

Eredményeink bizonyították, hogy a sejt metiláció-függő DNS hibajavító rendszerének működése az általunk kidolgozott eljárás alapján átmenetileg gátolható, a MAGE ciklusok célzott mutáció beépítésre szolgáló lépése során. Ezáltal a Multiplex Automatikus Genommérnökség előnyös tulajdonságainak megtartása mellett sikerült kiküszöbölni a tradicionális módszer működése során megfigyelhető káros háttér-mutációk felhalmozódását, így egy precíz, magas hatásfokú és nagy-áteresztőképességgel rendelkező genommérnöki eljárás jött létre. Ezen gyorsított evolúciós eljárás pedig lehetővé teszi akár az evolúcióbiológiai kérdések gyors és nagyléptékű tanulmányozását, továbbá a biotechnológiai alkalmazáson keresztül számos gyógyszerhatóanyag, ipari alapanyag, emberi felhasználás szempontjából értékes metabolit könnyebb és hatékonyabb előállítását is.