

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék



36. OTDK BIOLÓGIA SEKCIÓ

KIMÉRA AKTIVÁTOROK A *Salmonella* GENOMI SZIGET 1 ÉS AZ INCA/C PLAZMIDOK KONJUGATÍV TRANSZFERÉBEN



Mezőgazdasági Biotechnológiai
Kutatóintézet

Szerző:

Oláh Eszter

Biomérnök BSc, 4. évfolyam

Belső témavezető:

Dr. Bujna Erika

Egyetemi docens

Külső témavezető:

Dr. Kiss János

Tudományos főmunkatárs

Budapest, 2021

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	3
2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1. Az antimikrobiális rezisztencia és a <i>Salmonella</i>	4
2.2. Ugráló gének	4
2.2.1. Integronok, inzerciós szekvenciák, transzpozonok és bakteriofágok . . .	5
2.2.2. Konjugatív plazmidok	7
2.2.3. Genomi szigetek	8
2.3. Az IncA/C plazmidok jellemzői	8
2.4. A <i>Salmonella</i> Genomi Sziget 1	9
2.5. Az FlhDC-család mesterregulátorai	11
3. CÉLKITŰZÉSEK	15
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	16
4.1. Felhasznált tápközegek és oldatok	16
4.2. Kompetens sejtek készítése és transzformálás	18
4.3. DNS extrakciója és tisztítása	18
4.3.1. Plazmid DNS izolálása etanolos precipitációval	18
4.3.2. DNS izolálása fenol-kloroform extrakcióval	19
4.3.3. Plazmid DNS extrakciója alkalikus lízissel ("miniprep")	19
4.4. Polimeráz láncreakció	19
4.5. Fehérje expresszió vizsgálata poliakrilamid gélelektroforézissel	21
4.6. DNS ligálása és emésztése restrikciós endonukleázokkal	21
4.7. Konjugációs tesztek	22
4.8. Promoteraktivitás vizsgálata β -galaktozidáz méréssel	22
4.9. Oligonukleotid primerek	24
5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	25
5.1. AcaCD-deficiens R-plazmidot hordozó törzsek létrehozása konjugációval	25
5.2. Az Flh/Aca D és C alegységek kompatibilitásának vizsgálata	26
5.3. A vad típusú <i>acaCD</i> és <i>flhDC</i> , valamint az <i>flhD-acaC</i> és <i>acaD-flhC</i> fúziós operonok klónozása PCR-rel	27

5.4. Az R55 plazmidon végzett <i>acaCD</i> -deléció komplementációjának vizsgálata hibrid aktivátorokkal	29
5.5. A vad típusú és hibrid operonok klónozása pET16b vektorba és a fehérje exp- resszió vizsgálata	29
5.6. Az R-plazmid AcaCD-reszponzív promotereinek fúziója lacZ génnel	31
5.7. Az AcaCD-reszponzív promoterek aktivitásának vizsgálata β -galaktozidáz mé- réssel	32
6. DISZKUSSZIÓ	35
Irodalomjegyzék	36
A. Rövidítésjegyzék	39

1. BEVEZETÉS

Napjaink egyik legsürgetőbb egészségügyi problémája az antimikrobiális rezisztencia terjedése. Éves szinten több, mint egymillió ember hal meg multirezisztens baktérium-vagy gombafertőzés miatt, a fenyegetés minden egyént érint nemtől, kortól és egészségügyi állapottól függetlenül [1]. Az antimikrobiális rezisztencia elleni harc egyik kulcsfontosságú lépése az eltérő baktériumfajok között előforduló horizontális géntranszfer (HGT) mechanizmusának megértése. A gödöllői székhelyű, nemzetközi színvonalú infrastruktúrával rendelkező Genetika és Biotechnológia Intézet Gazda-patogén Interakció és Mikrobiális Genomika Csoportja által végzett kutatás elsődleges célja ennek a folyamatnak a mélyebb szintű feltárása a *Salmonella* spp. multirezisztens genomi szigetének, az SGI1-nek a tanulmányozásán keresztül.

A bakteriális kromoszómára integrálódott SGI1 kódol a konjugációhoz szükséges bizonyos elemeket, azonban HGT-re kizárólag a más, vele nem rokon integratív mobilizálható elemek transzferét is segítő IncA/C plazmidok közreműködésével képes. A sziget kivágódásért felelős génjét az IncA/C plazmidok transzferhez szükséges génjeit szabályozó AcaCD fehérjekomplex aktiválja, mely az FlhDC-típusú regulátorfehérjék közé sorolható. A folyamat során az SGI1 a plazmidok szekréciós rendszerének egyes komponenseit saját homológjaira cseréli, ezáltal magasabb konjugációs frekvenciával jut át az új gazdasejtekbe. A sziget saját, szintén az FlhDC-családba tartozó aktivátor-homológot is kódol, melyről tudjuk, hogy képes komplementálni a plazmid hiányzó aktivátorát. Munkám során a kétféle alegységből felépülő heterohexamer regulátorok között fennálló szekvenciabeli és funkcionális hasonlóság nyomán elindulva vizsgáltam az egyes komponensek kompatibilitását. Megmutattam, hogy kialakulhat olyan hibrid fehérjekomplex, mely szintén képes a komplementációra, emellett bizonyos mértékben aktiválja az AcaCD által irányított további gének expresszióját is mindkét mobilis genetikai elemen. A jelenségnek fontos szerepe lehet a konjugációs folyamat szabályozása során, hiszen az SGI1 egyértelműen befolyásolja valamilyen módon a plazmid natív aktivátorának hatását, az FlhDC-család további képviselői között pedig szintén találhatunk olyan heterohexamer regulátorokat, melyek komplex hierarchiával bíró regulációs hálózaton keresztül irányítják az általuk szabályozott gének transzkripcióját.

2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az antimikrobiális rezisztencia és a *Salmonella*

Az *Enterobacteriaceae* család *Salmonella* nemzetségének tagjai az egyik legismertebb élelmiszer eredetű, zoonózist okozó patogének. Képviselőik Gram-negatív, pálca alakú, nem spóraképző, peritrich csillózatú baktériumok. A *Salmonella*, mely nevét Daniel Elmer Salmonról (1850–1914), egy amerikai állatorvosról kapta, a mai napig az egyik leggyakrabban előforduló élelmiszer eredetű megbetegedés okozója. A szalmonellózis forrása a fertőzött állatokban, szárnyasokban, sertésben és szarvasmarhában, sőt, vadon élő énekesmadarakban is előforduló, onnan az emberi szervezetbe kerülő humán patogén, mely a bélrendszerbe jutva toxinféherjéket termel és komoly mérgezést okoz. A nemzetség két fajának, a *S. enterica*-nak és a *S. bongori*-nak hat főbb alfaját különböztetjük meg, melyek több, mint 2500 szerovariánsa közül csupán néhány felelős a humán fertőzések legnagyobb részéért [2]. Az emberi és állati mintákban leggyakrabban azonosított szerovariáns a *S. enterica* ser. Typhimurium DT104-es fágtypus, melyet már 1960-ban leírtak, azonban genomjában csak az 1980-as években jelent meg az öt antibiotikum elleni rezisztenciát kódoló régió, melyet mint *Salmonella* genomi sziget 1 (*Salmonella* Genomic Island 1, SGI1; GenBank: AF261825.2) azonosítottak [3, 4, 5, 6]. Az öt közül négy: a tetraciklinek, a béta-laktámok, az aminoglikozidok és a szulfonamidok az állatgyógyászatban szélesebb körben alkalmazott antibiotikum-osztályba tartoznak [7, 8]. Aggodalomra ad okot, hogy a szigetet azóta világszerte több szerovariánsban (Agona, Albany, Paratyphi B, Meleagridis, Newport, Derby, Cerro, Kiambu, Emek, Düsseldorf, Infantis), valamint *Morganella morganii*-ban és *Proteus mirabilis*-ben is azonosították [9, 10, 11, 12]. Az SGI1-ről kiderült, hogy a mobilis genetikai elemeken belül az integratív mobilizálható elemek csoportjába tartozik, melyek nem képesek autonóm módon terjedni, horizontális transzferük-höz szükségük van egy segítő elem, egy *helper* plazmid jelenlétére, ám a konjugációs folyamat pontos mechanizmusa nem teljesen ismert.

2.2. Ugráló gének

Mobilis genetikai elemek (*mobile genetic elements*, MGE), másnéven ugráló gének széles körben megtalálhatók prokarióták és eukarióták génállományában egyaránt, szervesen hozzájárulnak az egyes élőlények új környezeti hatásokhoz való adaptációjához és dinamikus genomi fejlődéséhez. Bakteriális szinten kulcsszerepük van a különböző szimbiotikus és virulencia-faktorok, alternatív metabolikus útvonalak és antibiotikum-rezisztenciák (ABR) terjedésében.

Megkülönböztetünk adott organizmusok genomján belüli transzpozícióra képes MGE-ket (intracelluláris MGE-k), valamint baktériumsejtek genomja közti helyváltoztatásra képes elemeket (intercelluláris MGE-k) [13]. Intracelluláris elemek például az inzerciós szekvenciák (*insertion sequence*, IS), integronok és a transzpozonok (transposon, Tn). Az intercelluláris elemek közé soroljuk a konjugatív és mobilizálható plazmidokat, bakteriofágokat és a genomi szigeteket (*genomic island*, GI). Legtöbb esetben a különböző MGE-k gyakran rokonságban nem álló organizmusok közti mozgásához köthető a direkt sejt-sejt kapcsolat [14, 15] során megvalósuló laterális vagy másnéven horizontális géntranszfer jelensége, mely nagyban hozzájárul a multidrog rezisztencia (MDR) és más adaptív tulajdonságok terjedéséhez.

2.2.1. Integronok, inzerciós szekvenciák, transzpozonok és bakteriofágok

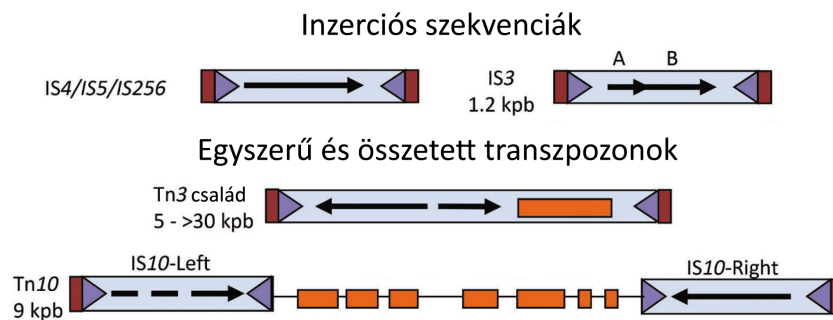
Az integronok olyan helyspecifikus rekombinációra képes operon-szerűen rendeződő mobilis génkazetták, melyeket elsőként az 1980-as évek vége felé írtak le, bár már sokmillió éve formálják a baktériumok genomját [16]. Genomi helyzetük alapján beszélhetünk kromoszomális integronokról és mobilis integronokról. Három fő szerkezeti egységük a 3' és az 5' konzervált szegmensek (*conserved segments*, 3'/5'-CS) és az általuk közrefogott nyitott leolvasási keret (*open reading frame*, ORF). A helyspecifikus rekombinációt a tirozin rekombinááz családba tartozó integron integráz enzim katalizálja, melyet az *intI* gén kódol [17], a rekombináció helye a cirkuláris génkazetta *attC* helye, mely az *attI* kapcsolódási helytől *downstream* tud beépülni. A génkazetták expressziójáért felelős promotor (P_C) és az *intI* az 5'-CS-en található (lásd: 1 ábra). Bár az integronok nem képesek önállóan fajok genomján belüli, vagy azok közötti transzpozícióra, gyakran képezhetik részét összetettebb inter-vagy intracelluláris mobilis genetikai elemeknek, például plazmidoknak és GI-knek, melyek így transzmissziós vektorként funkcionálva effektív segítők a génkazettákban összegyűlt ORF-ek által kódolt adaptív tulajdonságok fenntartásának és terjesztésének.



1. ábra. Az integronok általános felépítése (lila: integron integrázt kódoló gén; piros/zöld/kék: a génkazetták elhelyezkedése)[16]

Az IS elemek a legegyszerűbb transzpozábilis elemek (TE): rövid, nagyjából 700-2000 bp hosszúságú szekvenciák, melyek csak 1-3 ORF-et tartalmaznak, terminális részükön néhány 10 bp-es fordított ismétlődésekkel (*inverted repeat*, IR). Általában csak a transzpozíciójukhoz

szükséges transzpozáz (TPáz) gént kódolják [18, 19]. A Tn-ok hosszabb, néhány kbp nagyságú elemek, két nagy csoportjuk a retrotranszpozonok (RTn) és a DNS Tn-ok. A bakteriális Tn-ok általában a DNS Tn-ok közé sorolhatók, lehetnek egyszerű (*unit*), vagy összetett (*composite*) Tn-ok. Az egyszerű Tn-okat az IS elemekhez hasonlóan IR-ek határolják, míg az összetett Tn-okat IS elemek, közös vonásuk, hogy saját TPázukon kívül további, a gazdaszervezet számára hasznos géneket is kódolhatnak, például virulenciát vagy antibiotikum-rezisztenciát. Az integronokhoz hasonlóan ezek a TE-k sem kódolják a horizontális transzferhez szükséges molekuláris gépezet elemeit, így csak transzmissziós vektorok segítségével képesek arra.

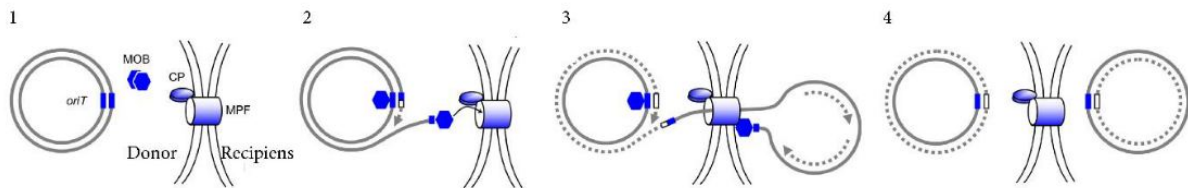


2. ábra. Az inzerció szekvenciák és a transzpozonok általános szerkezete (lila: terminális IR; piros: terminális DR; fekete nyilak: transzpozáz kódoló ORF; narancssárga: "elfogott" gének)([18] alapján)

A bakteriofágok 5-300 nm-es, baktériumokat fertőző vírusok, melyek nagy számban megtalálhatók változatos környezeti körülmények között, számos gazdaszervezetben. A fággenom lehet cirkuláris vagy lineáris, mérete 3,5-500 kb között mozog. A fágok két előfordulási formája a gazdasejten kívüli virion, illetve temperált fágok esetében a gazdasejt genomjába integrálódott vegetatív vírus vagy profág. A fág részecske fejből vagy kapszidból, farokból és az ahhoz kapcsolódó fehérjerostokból áll. A célsejt felületéhez kapcsolódva a virion a citoplazmába injektálja saját génkészletét, ahol az cirkularizálódik, majd a lizogén ciklusban a profág helyspecifikus rekombinációval a bakteriális kromoszómába épül és hozzájárulhat annak virulenciájához, patogenitásához. Sok bakteriofág csak litikus életciklussal rendelkezik, melynek során lezajlik a fággenom replikációja, transzlációja, az új vírusrészecskék szintézise, azok összeépülése és csomagolása, majd a gazdasejt lízise, melynek eredményeképpen az új virionok kiszabadulnak a környezetbe. A virionok összecsomagolódása közben előfordulhat, hogy a degradálódott bakteriális DNS-törmelék egy része a kapszidba kerül, ez a jelenség az általános transzdukció. A profág hibás kivágódása esetén a fággenom egy része helyett a gazdasejt genomjának egy része kerülhet a kapszidba, ezt speciális transzdukciónak nevezzük. A bakteriofág-mediált transzdukció szintén nagyban hozzájárulhat az ABR gének horizontális transzferéhez.

2.2.2. Konjugatív plazmidok

A plazmidok cirkuláris vagy lineáris, autonóm replikációra képes extrakromoszomális DNS molekulák, méretük a néhány ezer bp-tól akár 2 mbp-ig is terjedhet. Szerkezetük gyakran modúláris: a konzerválódott gerincen funkcionális blokkokba rendeződve találhatók a plazmid replikációjáért és kópiaszámáért, stabilitásáért, adaptációjáért és konjugatív plazmidok esetén a konjugációért felelős gének. Az adaptációs régió tartalmazza a változatos, a gazdasejt számára jellemzően nem esszenciális, de adott környezeti körülmények között előnyös tulajdonságokat hordozó géneket. A replikációért felelős modulban található a replikációs origó (*oriV*), valamint az iniciációért felelős Rep fehérjét és egyéb járulékos fehérjéket (pl. DnaA), vagy szabályozó faktorokat kódoló részek. A konjugációs transzfert a *tra* gének és a *cis* elem, a transzfer origója (*oriT*) biztosítja. Azon plazmidok, melyek alacsony kópiaszámban fordulnak elő a gazdasejtben, általában rendelkeznek egy partíciós (*partitioning*, Par) rendszerrel is, ami biztosítja a vertikális transzfert mindkét utódsejtbe a sejt osztódása során. [20, 21, 22]. A replikáció és



3. ábra. A konjugatív transzfer és a *rolling circle* replikáció folyamata az F-plazmid példáján bemutatva ([20] alapján)

a konjugáció folyamatához szükséges fehérjekomplex a relaxozóma, melynek egyik legfontosabb komponense a relaxázként (MOB) ismert helyspecifikus endonukleáz. A relaxáz a *tra* operon kódolja jellemzően az *oriT* közelében, szerepe a DNS-szál elhasítása transzészterifikációval a *nic* helyen. A folyamat kezdetén a relaxáz kovalensen kötődik az elhasított szál 5' végéhez, és különböző járulékos elemek közreműködése mellett, mint például a „coupling” fehérjék (*coupling protein*, CP), a szekréción rendszer MPF (*mating pair formation*) alegységéhez kapcsolódik. Az egyszálú DNS (ssDNS) transzfere a recipiens sejtbe egy IV-es típusú szekréción rendszeren keresztül történik (*type 4 secretion system*, T4SS)[23, 24], ezzel párhuzamosan a donor DNS gördülő gyűrű replikációval (*rolling circle replication*, RCR) ismét duplaszálúvá egészül ki. A folyamat végén a relaxáz recirkularizálja a recipiens sejtben a plazmidot, végül végbemegy a dsDNS szintézise a gazdasejt replikációs rendszerén keresztül. A konjugatív plazmidokat relaxázaik szekvenciaanalízise alapján 8 MOB családba sorolják (MOB_F, MOB_P, MOB_Q, MOB_V, MOB_C, MOB_H, MOB_T, MOB_{TcpM}), mely csoportok több esetben nem csak plazmidokat, hanem más konjugatív elemeket is magukba foglalnak. [25, 26, 27]

2.2.3. Genomi szigetek

A genomi szigetek (*genomic island*, GI) olyan kromoszomális DNS szegmensek, melyek laterális transzferrel terjednek és gazdaszervezet kromoszómájába integrálódva a profágokhoz hasonló módon, stabilan képesek fennmaradni, azzal együtt replikálódni és továbböröklődni az utódsejtekbe. Erre utal, hogy egy fajon belül csak bizonyos törzsekben találhatók meg, emellett a bakteriális genomhoz képest gyakran eltérő GC tartalom is jellemző rájuk. A GI-k által hordozott gének számos adaptív tulajdonságot kódolhatnak, ez alapján megkülönböztetünk szimbiózis, metabolikus, rezisztencia, fitness és patogenitási (PAI) szigeteket. Az integratív GI-k kódolhatják a konjugatív transzferükhöz szükséges géneket, ezeket integratív konjugatív elemeknek (*integrative and conjugative element*, ICE) hívjuk, egy részük pedig csak az integrációját tekintve autonóm, de más konjugatív elemek közreműködését igényli mobilizációjához, ezek az integratív mobilizálható elemek (*integrative and mobilizable element*, IME) [20, 13, 21, 28].

A GI-k kivágódásának iniciációjáért a *xis* (excizionáz) gén által kódolt rekombinációs szabályozó faktor (*recombination directionality factor*, RDF) felel. A helyspecifikus rekombinációval történő integrációt és a kivágódást az integráz (Int) enzim katalizálja, mely jellemzően egy tirozin rekombináz, de leírtak már szerin rekombinázt és DDE transzpozázt kódoló GI-t is. Az ICE-k és IME-k a konjugatív plazmidokhoz hasonlóan rendelkeznek saját *oriT*-vel, a relaxozómát és egyéb járulékos komponenseket kódoló génekkel, azonban a T4SS elemeit, a CP-t, illetve MPF-et csak az ICE-k hordozzák, az IME-k esetében a transzferhez szükséges egy olyan segítő MGE jelenléte, mely kompatibilis konjugációs apparátusán keresztül képes *in trans* mobilizálni őket [29]. Az ICE-k által kódolt konjugációs apparátus nagymértékű hasonlóságot mutat a plazmidok konjugációs rendszerével, és gyakran *helper* elemként szolgálnak az IME-k számára [26, 30]. Az utóbbi 10 év kutatásai rávilágítottak arra, hogy az IME-k jóval nagyobb gyakorisággal és diverzitással fordulnak elő, mint azt eredetileg gondoltuk [31].

2.3. Az IncA/C plazmidok jellemzői

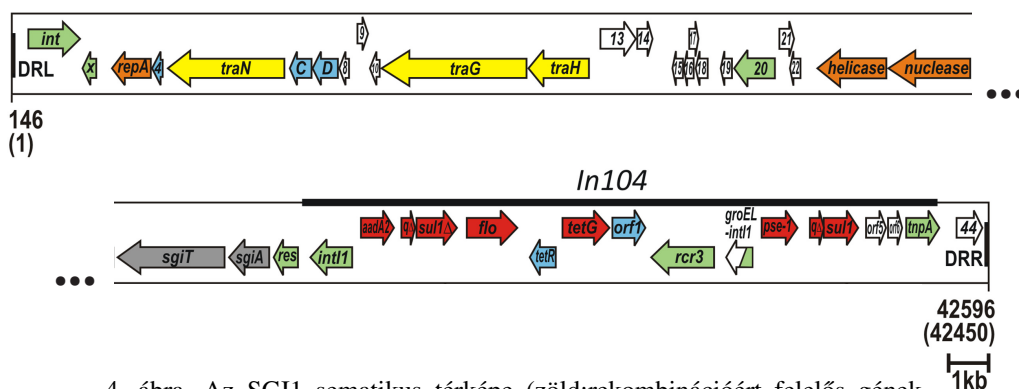
A plazmidokat különböző inkompatibilitási csoportokba (Inc) soroljuk replikációs és Par rendszerük alapján, mivel az azonos csoportba tartozók nem képesek ugyanazon törzsben egyszerre fennmaradni ezen rendszerek működésének interferenciája miatt [32]. Az IncA és IncC inkompatibilitási csoportok képviselői (pl. pRA1, pR55, pR16, pRST98, pTC2 stb.) széles gazdaspektrumú, elsősorban *Enterobacteriaceae* fajokban előforduló, nagyméretű (110-320 kb), alacsony kópiaszámú plazmidok, melyek fontos eszközei az ABR-gének terjedésének [33, 34, 35]. Az IncA/C plazmidokról kiderült, hogy köztük az ún. *entry exclusion* (Eex) jelensége áll

fenn, melynek során a donor sejt T4SS-ének TraG_C alegysége felismeri a recipiens sejt membránjába ágyazott EexC fehérjét (TraS_C) és blokkolja a DNS transzportját, amennyiben az már tartalmaz azonos vagy hasonló csoportba tartozó plazmidot [35, 36]. Az IncA/C plazmidok nagymértékben konzervált gerincét a fennmaradásért, replikációért, transzpozícióért, regulációs folyamatokért és stabil fennmaradásért felelős gének alkotják. A konzervált gerincet változatos, ún. antibiotikumrezisztencia-szigetek tarkítják (ARI-k), melyekben különböző virulenciafaktorokat, rezisztenciagéneket, többszörösen egymásba ágyazott integronokat, IS és Tn elemeket azonosítottak.

Az IncA/C plazmidok konjugációs apparátusát szabályozó mesterregulátor az FlhDC-családba tartozó AcaCD fehérjekomplex, mely a plazmid 27 promoterét aktiválja. Az aktivátor által felismert, nagy mértékben konzerválódott, szokatlanul hosszú szekvencia a "GCCCAAATGGGC" motívum. Az AcaCD-szabályozás alatt álló promoterek között találjuk például a konjugáció iniciációjához elengedhetetlen relaxázt (*traI*), vele egy operonban a relaxáz CP-jét (*traD*), egy feltételezett relaxoszóma-faktort (*mobI*) a transzferhez bizonyítottan szükséges komponenseket (*traN*, *traF*, *traG*, *traH*), a konjugációs folyamat *in silico* prediktált további elemeit kódoló géneket (*traDLEKBVACWUN*), egy *partitioning* fehérjét (P₁₅₂), egy 213 aminosavból álló, az AcaCD operontól *upstream* kötődő aktivátort (*acaB*), mely egy *feedback loop*-on keresztül pozitívan befolyásolja az *acaCD* expresszióját, valamint további, egyenlőre ismeretlen funkciójú géneket (pl. *S009*, *S067*) [37, 38].

2.4. A *Salmonella* Genomi Sziget 1

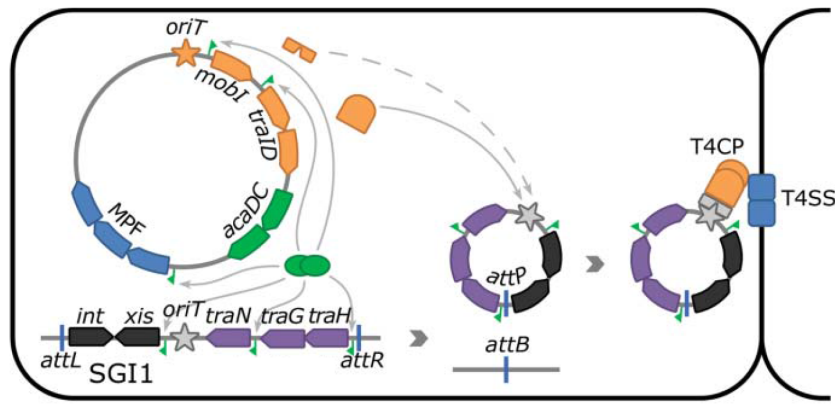
A *Salmonella* ser. Typhimurium DT104 MDR fenotípusú klónjainak kromoszómájára integrálódott *Salmonella* Genomi Sziget 1 egy 42.4 kb méretű IME, mely összesen 44 ORF-ből áll és beépült formájában 18 bp-nyi direkt ismétlődő (*direct repeat*, DR) szekvenciák határolják (DRL és DRR). Az SGI1 egy 14 kb méretű komplex integron régióban (In104) hordozza az ampicillin, kloramfenikol/florfenikol, streptomycin, sulfonamid és tetraciklin antibiotikumok elleni rezisztenciagéneket (ACSSuT fenotípus)[39, 40, 41]. A sziget elsődleges integrációs helye (*attB*) a *Salmonella thdF* génjének 3' végén található, melynek utolsó 18 bp-os szakaszából származtatható a DRR illeszkedési régió ([6, 42]). Más GI-khez hasonlóan az SGI1 is rendelkezik saját *oriT*-vel, Int, Xis és Rep fehérjékkel, valamint relaxoszóma-komponensekkel (MpsAB), azonban a T4SS elemei közül csupán néhány alegységet azonosítottak rajta.



4. ábra. Az SGI1 sematikus térképe (zöld:rekombinációért felelős gének, transzpozáz; narancssárga: replikációért felelős gének; kék: transzkripció-szabályozó; sárga: konjugációért felelős gének; szürke: toxin/antitoxin rendszer; piros: antibiotikum-rezisztenciagének; fehér: ismeretlen funkció)([37] alapján)

Korábbi kutatások során kimutatták, hogy az IncA/C plazmidok által kódolt AcaCD komplex indukálja az SGI1 kivágódását és mobilizációját a sziget *xis* génjének aktiválásával [43, 31], mely egy RDF-et kódol (excizionáz). Az AcaCD kulcsszerepét a folyamatban deléziós kísérletekkel igazolták, bebizonyították, hogy hiányában sem a sziget, sem a plazmid nem képes mobilizációra. Más inkompatibilitási csoportba tartozó konjugatív plazmidok (IncFI, FII, HI2, I1, L/M, N, P) annak ellenére nem képesek mobilizálni az SGI1-et, hogy természetes körülmények között gyakran megtalálhatóak MDR *Salmonella* és egyéb *Enterobacteriaceae* törzsekben is [42]. Kiderült, hogy az AcaCD további nem rokon IME-k, például az MGIVchHai6 (*V. cholerae*) és az MGIVmi1 (*V. mimicus*) *xis*-ét is képes aktiválni [44].

Az AcaCD a P_{xis} mellett további négy, az SGI1-en található gén promoterét aktiválja, ezek a *traN* (S005), *traH/traG* (S012-11), *S004* és *S018* régiók. A *tra* gének az IncC plazmidok konjugatív pilusának egyes elemeivel homológ fehérjéket kódolnak (MPF)[45], az *s003*-as ORF-el átfedő *S004* a replikáció iniciációjáért felelős, IncN plazmidokkal rokon RepA expresszióját szabályozó *leader* peptidet, az *S018* funkciója pedig egyelőre nem ismert [46]. Megfigyelték, hogy transzfere során a Tra fehérjék hasonlósága miatt az SGI1 az IncA/C plazmid T4SS-ének egyes fehérjéit (TraN, TraG, TraH) saját homológjaira cserélheti, ezáltal megnövelve konjugációs frekvenciáját a helper elemével szemben [45]. A sziget *S007-S006*-es ORF-je által kódolt fehérjék (FlhDC_{SGI1}) szintén az FlhDC-család képviselői, az AcaC és AcaD alegységekkel 89%, ill. 67%-os homológiát figyelhetünk meg. A konstitutív promoterről expresszáldó FlhDC_{SGI1} ugyancsak kötődik a *xis* promoteréhez, bár megközelítőleg háromszor gyengébben aktiválja a *xis* expresszióját, mint az AcaCD. A *traN*, *traH*, *traG*, *S004* és *S018* gének expresszióját szintén indukálja. Emellett kimutatták, hogy az FlhDC_{SGI1} képes in trans komplementálni az R16a plazmidon végzett Δ *acaCD* deléciót, helyreállítva mind a sziget, mind a helper plazmid konjugációját [47].



5. ábra. Az SGI1 mobilizációjának feltételezett mechanizmusa [34]

A transzfert segítő plazmid hiányában az SGI1 kromoszómára integrálódott formája nagymértékű stabilitást mutat: 17 *Salmonella* ser. Typhimurium variánsban vizsgálva 350 generáción keresztül csupán PCR-el kimutatható, minimális spontán vesztődését figyelték meg [48]. Ezt a sziget 5' végén kódolt, konstitutívan expresszáldó helyspecifikus integráz biztosítja (*int*). Stabil fennmaradását egy toxin/antitoxin (TA) rendszer is segíti (ORF *S025-S026*: *sgiAT*). IncA/C plazmid jelenlétében az SGI1 instabillá válik, a közvetlenül az *int* mellett kódolt, AcaCD-kontroll alatt álló RDF, a Xis termelődése a kivágódás irányába tolja el az integrázmédiált rekombinációs reakciót, ezzel nagyban megnövelve a sziget elvesztődésének esélyét. Kivágódott állapotában az SGI1 plazmid-szerű, cirkuláris formát vesz fel, mely a megfelelő konjugációs apparátus jelenlétében alkalmas a transzferre (lásd: 5. ábra). Az SGI1 saját funkcionális TraG homológot kódol (TraG_S; 37%-ban azonos a TraG_C-vel), melyet az EexC nem képes megkötni, ezáltal az IncA/C plazmidok és a sziget között nem érvényesül az Eex [49]. A sziget jelenlétében a helper plazmid is instabillá válik, szegregál, és kisebb gyakorisággal konjugál, mint maga az SGI1. Kimutatták, hogy az AcaCD által indukált kivágódott forma az IME-k esetében eddig egyedülálló módon képes replikálódni, mely folyamat sejtenként 4-8 cirkuláris kópiát eredményez [46, 50]. Ez a jelenség nagyban segíti az SGI1 stabil fennmaradását és transzferét IncA/C plazmid jelenlétében, emellett valószínűleg hozzájárul a *helper* elem gyors eliminációjához is [51].

2.5. Az FlhDC-család mesterregulátorai

Az FlhDC-típusú regulátorokat (lásd: 6. ábra) elsőként az *E. coli* és más rokon Gram-negatív baktériumok flagelláris operonjainak transzkripció folyamatát szabályozó komplexeként azonosították, ahol több, mint 60 gén expresszióját szabályozzák [52, 53], azonban később kiderült, hogy egyéb folyamatok, például eltérő funkciójú gének expressziójának szabályozásában, vala-

mint mobilis genetikai elemek és konjugatív plazmidok transzferének szabályozásában is részt vehetnek (pl. FlhDC, SetCD, AcaCD; lásd: 1. táblázat) [43, 54, 55, 56, 57, 58].

1. táblázat. Homológia/Hasonlóság (%) Az FlhDC_{SGI1} fehérje szekvenciájának összehasonlítása az FlhDC-családba tartozó AcaCD (IncA/C plazmidok), SetCD (SXT ICE-k) és a Salmonella, valamint az E. coli regulátoraival (Protein BLAST)

	AcaC _{R55}	SetC _{SXT}	FlhC _{ST}	FlhC _{Ec}
FlhC _{SGI1} (S006)	79/89	33/49	28/43	27/43
	AcaD _{R55}	SetD _{SXT}	FlhD _{ST}	FlhD _{Ec}
FlhD _{SGI1} (S007)	46/67	21/45	25/44	29/50

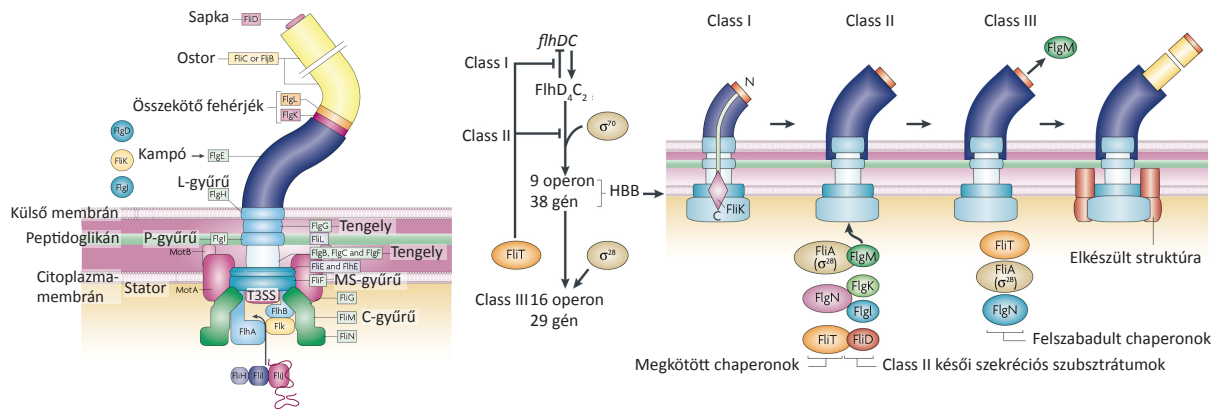


6. ábra. Az FlhD-(a) és FlhC-(b) típusú fehérjék filogenetikai kapcsolatai (Clustal Omega)

A konjugatív transzfer és a flagelláris génexpresszió szabályozási mechanizmusát részletesen tanulmányozták *E. coli*-ban, *S. enterica* Typhimurium-ban, *Agrobacterium tumefaciens*-ben és számos egyéb Gram-negatív baktériumban (pl. *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *C. crescentus*, *R. sphaeroides*, *H. pylori*, *C. jejuni*) [59, 60, 29, 61]. A génexpresszió regulonokon keresztül történő koordinálása széles körben megfigyelhető prokariótákban és eukariótákban egyaránt. A kiterjedt szabályozási rendszerek hálózata hasonló hierarchikus szerveződési szinteket mutat a különböző fajokban, így a flagelláris bioszintézis, mely a baktériumok fiziológiájának számos elemét ötvözi, ideális modellként szolgálhat a komplex regulációs folyamatok pontosabb megértéséhez [62].

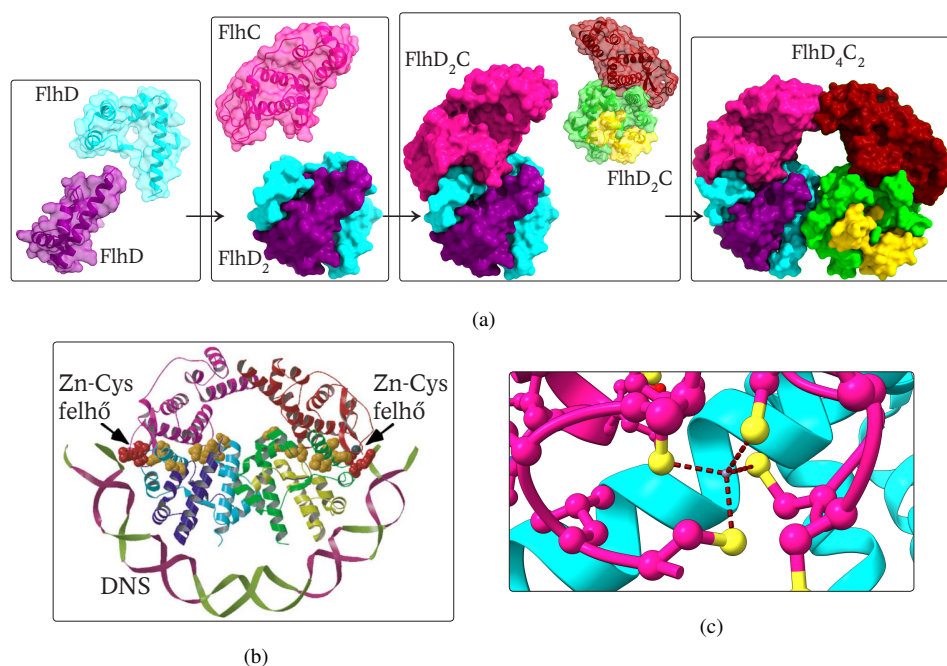
A baktériumok külső membránjához kapcsolódó flagelláris apparátus egy komplex makromolekuláris szerkezet, mely széles körű feladatokat lát el. Felépítése és működtetése egyaránt energiaigényes folyamat, ezért az ostor és a bazális test (*hook-basal body*, HBB) egyes komponenseinek megfelelő sorrendben történő expressziója szigorúan szabályozott folyamat (lásd: 7. ábra). Különböző környezeti hatások és metabolikus állapotok indukálják vagy gátolják (hőmérséklet, pH, ozmolaritás, szénforrások elérhetősége, *quorum sensing*) a σ -faktorok keletkezését, melyek a transzkripció iniciációjához szükségesek: felismerik a starthelytől 10, ill. 35 bp-al *upstream* található rövid szekvenciákat, aktiválva az adott gének expresszióját.

A flagelláris gének transzkripciójának kulcsszabályozói három hierarchikus promoter osztályba sorolhatók (Class I, II és III), mely rendszer nagy mértékben konzerválódott a Gram-negatív, peritrich ostorral rendelkező bélbaktériumok körében (*Proteobacteria*,



7. ábra. A bakteriális flagellum felépítése és a flagelláris gének expressziójának hierarchikus szabályozási szintjei [52]. A bioszintézis első lépése az MS-gyűrű, ill. a kapcsoló komplex kiépülése, majd a III-as típusú szekréciós rendszer (T3SS) összeállítása történik. A T3SS apparátus csatornáján keresztül exportálódnak és a megfelelő helyen polimerizálódnak a citoplazmában szintetizálódott közeli és távoli tengely-fehérjék, végül felépül a sejtfalhoz kötődő kettős gyűrű. Ezután kialakul a kampó, melynek megfelelő hossza meghatározó jelentőségű a baktérium mobilitásának szempontjából; ez a folyamat fontos visszacsatolási és ellenőrző pontja. [63, 64] Ekkor egy szabályozó faktor megváltoztatja a T3SS szekréciós specificitását, ami az FlgM exportját eredményezi és a felszabaduló σ^{28} -faktor (FliA) indukálhatja a III osztály tagjainak transzkripcióját. [65]

Enterobacteriaceae spp.). A Class I csoport egyedüli képviselőjeként számontartott *flhdc* operon az FlhD és FlhC fehérjéket kódolja. A 4 FlhD és 2 FlhC alegységből felépülő FlhD₄C₂ heterohexamer metallo-enzimkomplex egy atipikus transzkripciós faktor, jelenléte promotálja a σ^{70} -faktor-függő Class II operonok expresszióját, ezzel egyidejűleg auto-represszálja saját transzkripcióját [66, 67, 68]. A II osztályt további, a késői flagelláris gének transzkripcióját szabályozó σ^{28} -faktorok (FlgM, FliA) [69], valamint a HBB strukturális elemeit kódoló gének promoterei alkotják. A Class III promoterek irányítják a késői flagelláris komponenseket (filamentum, sapka, kapcsoló komplex) kódoló gének expresszióját. A *fliA* és *flgM* géneket a II és III osztály promoterei egyaránt expresszálják, mindig a megfelelő arányban, ami szépen példázza a folyamat összetett, precízen hangolt mechanizmusát: a folyamat későbbi szakaszában szükséges elemek csakis akkor szintetizálódhatnak, amikor a bazális test, melyhez kapcsolódni fognak, már elkészült [70, 71, 72]. A nanostruktúra komponenseinek exportját, monomer formában tartását és transzkripciós regulációját segítik a dajkafehérjék vagy chaperonok, melyek az egyes alegységek C-terminális domainjéhez kapcsolódnak [73, 74].



8. ábra. a) Az *E. coli* FlhDC komplexének (PDB:2AVU) felépülése (ChimeraX); b) A 2AVU-DNS-komplex ([75]); c) A tetraéderez szerkezetű 2AVU-ligandum interakció (ChimeraX).
Szürke: cink-ion, sárga: ciszteinek kénatomjai, kék: FlhD, rózsaszín: FlhC

Az *E. coli* FlhD₄C₂-komplexének szerkezetét 2005-ben határozták meg röntgenkristallográfiás vizsgálatokkal, 3.0 Å felbontással (PDB:2AVU). Az FlhC alegység protomer-kötő részét képezi egy négy cisztein-maradék által koordinált cink ion (lásd: 8c. ábra), mely motívum megtalálható a C4-típusú cink-ujjal rendelkező eukarióta transzkripciós faktorokban (PF00105 család). Az FlhD alegység egy elsősorban α-hélixekből álló polipeptid, ami a citoplazmában dimereket képez, majd mindkét FlhD₂ egy-egy FlhC-domainnel kötődik (lásd: 8a. ábra), melynek során a dimerek konformációja jelentősen megváltozik. Elektroforetikus mobilitás-eltolódás vizsgálatokkal (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA) kimutatták, hogy a vizsgált flagelláris operonok (*fliA*, *fliB*, *fliL*) -40; -80 régiójához kötődött hexamer komplex nagyjából 111°-os szögben hajlítja meg a DNS-t (lásd: 8b. ábra). A direkt DNS-fehérje interakció becsült helye két 17-18 bp hosszúságú fordított ismétlődés, melyeket egy 10-11 bp *spacer* elem választ el. Az FlhD és FlhC alegységek külön-külön is képesek DNS kötésére, bár jelentősen kisebb affinitással, mint amit a komplex esetében tapasztalhatunk, de olyan promotereket is azonosítottak már, melyek csak az FlhD szabályozása alatt állnak. Az ehhez hasonló heteromer regulátorok eukarióták körében nem ritkák, ám prokarióta rendszerekben az FlhD₄C₂ egyedülállónak mondható [75, 76, 77].

3. CÉLKITŰZÉSEK

Az SGI1 és a transzferét segítő helper plazmid mesterregulátorai között fennálló szerkezeti homológia és funkcionális analógia alapján kutatócsoportunk azt feltételezte, hogy az IncA/C plazmidok AcaCD és az SGI1 által kódolt FlhDC aktivátorfehérjéinek egyes alegységei egymással is képesek aktív komplexet alkotni. Elsődleges célom volt ezt a hipotézist igazolni, továbbá célom volt feltárni az így létrejövő hibrid regulátorok esetleges szerepét a konjugációs folyamat során. Emellett hosszabb távú célom volt rekombináns kiméra aktivátorfehérjék létrehozása, expressziója és tisztítása. Jelen dolgozatban a következő feladatok megvalósításának folyamatát tárgyalom:

- AcaCD-KO mutáns R55 helper plazmidot tartalmazó törzsek létrehozása és fenntartása az SGI1 genomi sziget és a mobilizációjáért felelős IncA/C plazmidok által termelt, FlhDC-családba tartozó aktivátorfehérjék kompatibilitásának vizsgálatához.
- Az *acaCD* és *flhDC* gének klónozása fehérje expressziós, illetve β -galaktozidáz mérésre alkalmas vektorokba.
- A hibrid aktivátorok expressziójának vizsgálata poliakrilamid gélelektroforézissel
- Az R55 plazmid feltételezetten vagy bizonyítottan AcaCD-szabályozás alatt álló promotereinek klónozása β -galaktozidáz mérőplazmidba.
- Promoteraktivitás kvantitatív vizsgálata a wt és a hibrid aktivátorok jelenlétében Miller [78] protokollja alapján kidolgozott módszerrel

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Felhasznált tápközegek és oldatok

1×TE puffer:	10 mM Tris (pH=7,4-8,0) 1 mM EDTA ddH ₂ O
5×TBE puffer (Tris-Borate-EDTA):	Tris (<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>): 54 g bórsav (H ₃ BO ₃): 27,5 g EDTA (0,5M, pH 8,0): 20 ml HCl hozzáadásával állítható pH=8,3- ra
LB tápközeg (<i>Luria broth</i>):	10 g/l pepton (tripton) 5 g/l élesztőkivonat 10 g/l NaCl ddH ₂ O-val 1 l-re kiegészítem, majd 121 °C- on 20 percig autoklávozom Lemezöntéshez (<i>Luria agar</i>): 1.5%- os végkoncentrációban agart adok és időszakos keverés mellett melegítem, amíg teljesen feloldódik. Felhasználásig 60 °C- os vízfürdőbe helyezem.
Miniprep 1×Lízis puffer (10 ml):	7,65 ml ddH ₂ O 2 ml 50% glükóz 100 µl EDTA (1 M, pH=8,0) 250 µl Tris-HCl (1 M, pH=8,0) 20 mg lizozim
Alkalikus SDS (100 ml):	91 ml ddH ₂ O 5 ml SDS (5%) 4 ml NaOH (5 M)
1×SDS lízis puffer (összfehérje preparátumhoz):	50 mM Tris-HCl (pH=6,8) 2% SDS 10% glicerin 0,1% brómfenolkék A mintákhoz a lízis puffer hozzáadásakor 100 mM végkoncentrációban DTT-t(ditiotreitol)/β-Merkapto-etanolt (BME) adtam.
15%- os poliakrilamid elválasztó gél (4 ml):	1500 µl akrilamid-bisakrilamid (37,5:1) 500 µl resolving gél puffer (3M Tris-HCl, pH=9,0) 1965 µl MQ víz 30 µl APS (10%-os ammónium-perszulfát) 5 µl TEMED (tetrametilén-diamin)

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Stacking poliakrilamid gél (1ml):	94 µl akrilamid-biszakrilamid (37,5:1) 250 µl tacking puffer (0.5 M Tris-HCl, pH=6,8) 644 µl MQ víz 10 µl APS (10%) 2 µl TEMED
10× SDS Futtató puffer:	32,2 g Tris-HCl (pH=6.8) 144 g glicerin 10 g SDS (6%) 1 l végtérfogatra egészítem ki desztillált vízzel és felhasználásig sötét üvegben, hűtőben tartom.
A-puffer (1 l):	20,214 g (0,0754 M) Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O 3,394 g (0,0246 M) NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O NaOH/HCl hozzáadásával pH=7,0-re állítom, desztillált vízzel 1 l végtérfogatra egészítem ki
Z-puffer (1 l):	16,1 g (0,06 M) Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O 5,5 g (0,04 M) NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 0,75 g (0,01 M) KCl 0,246 g (0,001 M) MgSO ₄ · 7H ₂ O 2,7 ml (0,05 M) BME ddH ₂ O: 1 l-re kiegészítem A BME fényérzékenysége miatt azt csak közvetlenül a felhasználás előtt adtam a felhasználni kívánt mennyiséghez a megfelelő koncentrációban

A használt baktériumtörzseket (lásd: 2. táblázat) -80°C-on, 30%-os végkoncentrációban glicerint tartalmazó LB tápközegben tároltam. A kísérleteket megelőzően a megfelelő antibiotikumokkal ellátott médiumban, 37°C-on egy éjszakán át (overnight, ON) tenyésztetem rázató/roller berendezésben.

2. táblázat. A dolgozatban bemutatott kísérletek során használt baktériumtörzsek

Törzs	Genotípus, releváns tulajdonságok
<i>E. coli</i> TG1	<i>supE hsdΔ5 thiΔ(lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i>
<i>E. coli</i> TG1Nal	TG1 Nal ^R származéka
<i>E. coli</i> TG2	<i>supE hsdΔ5 thi (lac-proAB) Δ(srl-recA)306::Tn10 (Tc^R) F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i>
<i>E. coli</i> TG90	TG1-származék, <i>pcn B80 zad::Tn10 (Tc^R)</i>
<i>E. coli</i> TG90Nal	TG90 Nal ^R származéka
HP2416	TG1Nal::SGI1-C KO21/R55dTnSm ^S Δ <i>acaCD</i> ::Km ^R (Nal ^R , Sm/Sp ^R , Cm ^R , Km ^R)
HP2417	TG1Nal::SGI1-C KO21/R55dTnSm ^S Δ <i>acaCD</i> (Nal ^R , Sm/Sp ^R , Cm ^R , Km ^S)

A kísérletek során alkalmazott antibiotikumok (AB) végkoncentrációja:

Ampicillin (Ap)	150 µg/ml
Gentamycin (Gm)	25 µg/ml
Kloramfenikol (Cm)	20 µg/ml
Kanamycin (Km)	30 µg/ml
Nalidixinsav (Nal)	20 µg/ml
Streptomycin (Sm)	50 µg/ml
Spektinomycin (Sp)	70 µg/ml
Tetraciklin (Te)	10 µg/ml

4.2. Kompetens sejtek készítése és transzformálás

A kompetens sejtek készítését és a transzformálásokat standard protokoll alapján [79] végeztem. A használni kívánt törzsekből ON kultúrát készítettem, majd 100×-os mennyiségű antibiotikumos LB-ben, folyamatos rázatás mellett $OD_{600}=0,3$ -ig növesztettem a sejteket. Ezután 10 percen át 5000 rpm-en, 4°C-on centrifugáltam és a felülúszó leöntése után óvatosan fel-szuszpendáltam a sejteket 10×-es mennyiségű, 0,1 M-os $CaCl_2$ -oldatban. Egy órán át jégen pihentettem a baktérium szuszpenziót, majd újabb centrifugálást követően (6000 rpm, 10 perc) 0,05×-ös térfogatnyi $CaCl_2$ -oldatban vettem fel a pelletet. Az így előkészített kompetens sejtekből egy transzformáláshoz 200 µl-t használtam fel, ehhez 0,5-1 µl plazmid DNS-t adtam, majd 30 percen át jégen pihentettem a sejteket. Ezután 2 percig 42°C-ra termosztált vízfürdőben hősokkoltam őket és újabb 15 perc jégen pihentetést követően 1-1 ml antibiotikumot nem tartalmazó táplevesben növesztettem a transzformánsokat 1-1,5 órán át, 37°C-on. Végül 50-200 µl-t szelektív lemezekre szélesztettem és az ON, 37°C-on felnőtt transzformáns telepekkel dolgoztam tovább.

4.3. DNS extrakciója és tisztítása**4.3.1. Plazmid DNS izolálása etanolos precipitációval**

A nukleinsavak koncentrálására és sómentesítésére széles körben alkalmazott technika elvi alapja, hogy etanolos oldatban a sókoncentráció növelésével (Na^{2+} -ionokkal) semlegesítjük a cukorfoszfát-gerince miatt hidrofil DNS-molekulák negatív töltésű foszfát (PO_3^-)-csoportjait, csökkentve azok vízzoldhatóságát. Az etanol a víznél jóval alacsonyabb dielektromos állandója révén segíti az ionok közti elektrosztatikus interakciót és a nukleinsavak kicsapódását az oldatból. A vizes oldatban lévő DNS-hez 2,5×-es térfogatnyi (tf) jéghideg abszolút alkoholt és egytized tf 3M-os nátrium-acetátot (pH=5,2) adtam, majd 15 perc termosztálást követően (-20°C) centrifugáltam (10 perc, 4°C, 16000 rpm) és óvatosan leöntöttem a felülúszót. Ezután

kétszer mostam a flokkulálódott DNS-t 70%-os etanollal, hogy a maradék sót eltávolítsam az elegyből (5 p, 25°C), majd centrifugáltam (5 p, 4°C, 16000 rpm) és vákuumszárítóban teljesen megszáritottam a pelletet, végül reszuszpendáltam egyötöd térfogatnyi MQ vízben.

4.3.2. DNS izolálása fenol-kloroform extrakcióval

A módszert genomi DNS a sejt-lizátum egyéb komponenseitől történő megtisztítására alkalmazzuk. A mintához 0,5-0,5 tf fenolt, ill. kloroformot adtam, majd kézzel alaposan összeráztam és centrifugálást (5 perc, 4°C, 13000 rpm) követően a felső frakciót óvatosan steril Eppendorfba vittem át. Ezután az oldatot kétszer 0,5 tf kloroformmal centrifugáltam 1 percig és a felső frakcióval dolgoztam tovább, ügyelve, hogy minimalizáljam a fenol/kloroform szennyeződést. A második centrifugálást követően alkoholos kicsapással folytattam az izolálást a 4.3.1 részben foglaltak szerint.

4.3.3. Plazmid DNS extrakciója alkalikus lízissel ("miniprep")

A megfelelő AB-okat tartalmazó LB médiumban növesztett ON kultúráról (3 ml) centrifugálással eltávolítottam a tápközeget (1 p, 13000 rpm), majd a pelletet 100 μ l jéghideg lízis pufferben szuszpendáltam és 15 percig jégen inkubáltam. Ezidő alatt a pufferben lévő lizozim hidrolizálja a sejt-fal peptidoglikánját, míg az EDTA gátolja a nukleázok működését a számukra esszenciális kétértékű kationok megkötésével (Mg^{2+} , Ca^{2+}), így azok nem képesek lebontani a plazmid DNS-t. A lízist követően 200 μ l alkalikus SDS-t adtam az oldathoz, majd 5 perc jégen pihentetést követően a feltisztult oldatban 150 μ l 3 M-os nátrium-acetát (pH=4,8) hozzáadásával 15 percen át jégen neutralizáltam a kicsapódott plazmid DNS-t, így az ismét a vizes oldaba került. Ezt követően a kicsapódott fehérjéket, sejttörmeléket és genomi DNS-t centrifugálással elválasztottam a vizes fázistól és az oldatot (400 μ l) óvatosan egy tiszta Eppendorfba vittem át. Az alkalikus lízis után a fentebb már ismertetett etanolos kicsapással tisztítottam tovább a plazmid DNS-t, végül a vákuumszárítóban szárított preparátumokat 75 μ l TE-ben oldottam fel.

4.4. Polimeráz láncreakció

Mára rutinműveletnek számít a K. B. Mullis ötlete nyomán tökéletesített polimeráz láncreakció (*polymerase chain reaction*, PCR) [80], melynek segítségével egy adott DNS- szekvenciát amplifikálhatunk. A természetben a DNS-függő DNS polimerázok végzik a szülői szál (templát) alapján az új szál szintézisét: a primáz enzim által elkészített oligonukleotid primer 3'-OH végéhez építi a komplementer nukleotidokat. A PCR reakció során 18-25 bp hosszúságú, mes-

terségesen előállított *forward*, illetve *reverse* primerekkel definiáljuk a megsokszorozni kívánt DNS-szegmenst. A folyamat első lépése a magas hőmérsékleten (94-98°C) történő hődenaturáció, ezután következik az amplifikációs ciklus, ami a templát denaturációból, a primerek csatolásából (anellálás) és a primer extenziós (elongáció) szakaszból áll, ezt a három lépést 20-35 alkalommal ismételve exponenciálisan megsokszorozhatjuk a templát DNS-t. Az utolsó szakasz az enzim optimális működési hőmérsékletén történő terminális extenzió, melynek során minden, esetlegesen nem teljes fragmentum szintézise befejeződik. Mindegyik szakasz erősen hőmérséklet- és időtartam-függő, így ezeket a faktorokat körültekintően kell megtervezni a primerek, illetve az alkalmazott enzim tulajdonságainak és a templát hosszának figyelembevételével. A kísérletek során végzett PCR reakciókhoz GeneAmp® PCR System 9700 készüléket használtam. A reakciókat általánosan 25 µl végtérfogatban végeztem, reakciónként 1-10 ng DNS templát, primerek (0,2 µM), enzim (5 U/µl Phusion®/Taq polimeráz) és dNTPs (0,2 µM) hozzáadásával és a megfelelő pufferrel. Az eredményeket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem a templát méretének megfelelő felbontású gélen (1-1,5%).

Az R55 plazmid AcaCD-reszponzív promotereinek klónozása során (lásd: 5.6. fejezet) a következő beállításokat használtam: 1.) Elődenaturáció: 98°C, 30 s; 2.) Amplifikációs ciklus (35): Templát denaturáció: 98°C, 10 s - Anellálás: 55°C, 15 s - Elongáció: 72°C, 20 s; 3.) Terminális extenzió: 72°C, 5 m. (a fragmentumok mérete: 158-316 bp; primerek: p012-, ptral-, p059-, ptraN-, pacaB-, ptraf-, p152rev és -for, ill. pucfor24)

Az 5.1. fejezetben ismertetett kísérletben az R55dTnSmSΔacaCD plazmid 1172 bp-os fragmentumát kolónia (*colony*) PCR-el amplifikáltam a parB_Ndefor-parB_BamHIrev primerpár használatával az alábbiak szerint: 1.) 98°C, 20 s; 2.) (35) 98°C, 10 s – 64°C, 5 s – 72°C, 40 s; 3.) 72°C, 1 m.

Szintén *colony* PCR-rel teszteltem az SGI1 kivágódott, illetve beépült formájának arányát (lásd: 5.2. fejezet): 1.) 94°C, 2 p; 2.) (35) 94°C, 20 s – 55°C, 30 s – 72°C, 60 s; 3.) 72°C, 5 m. Primerek: LJ2-RJ2 (*attP*, 827 bp), ill. RJ2-attsgirev (DRR, 509 bp). Ugyanilyen beállításokat alkalmaztam az 5.3. és 5.5. fejezetekben tárgyalt aktivátor-fragmentumokra specifikus *colony* PCR során a pKKfor (pJKI391)/pTXBfor (pET16b) és S006_Bamrev új (*acaD-flhC*)/flhc_BamHIrev (*flhD-acaC*) primerek használatával.

4.5. Fehérje expresszió vizsgálata poliakrilamid gélelektroforézissel

Az SDS-PAGE gélelektroforézis különböző proteinek méret szerinti elválasztására alkalmazott standard laboratóriumi eljárás. Elvi alapja, hogy erős anionos detergens (SDS) és a diszulfid-hidakat bontani képes redukálószer (β -merkaptotetanol) jelenlétében a negatív töltésű polipeptid láncok elveszítik másodlagos szerkezetüket és elektromos erő hatására a pozitív elektróda felé vándorolnak a poliakrilamid gélen keresztül. Az EDTA kelátkomplexet képez a kalcium- és magnézium-ionokkal, melyek szükséges kofaktorai a proteolitikus enzimeknek, ezáltal redukálja azok működését. A Tris biztosítja a megfelelő pH-t a tömörítés (*stacking*) során, a glicerín sűrűbbé teszi a mintát, ezáltal az a gél zsebeibe süllyed, a brómfenolkék festék pedig segíti a minták felvitelét a géltre és az elválasztás nyomon követését.

A célfehérjét expresszáló plazmidot heterológ génexpresszióra optimalizált törzsbe transzformáltam. Az ON tenyészetből kiválasztott 4 telepet antibiotikumos LB-be oltottam és másfél órán át, 37°C-on inkubáltam ($OD_{600}=0,5$). A friss kultúrák felét ezután 0,2 mM izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (IPTG) hozzáadásával indukáltam folyamatos rázatás mellett 3 órán keresztül, 30°C-on. Az indukált sejtekről (+) és az indukálatlan kontrollról (-) centrifugálással távolítottam el a tápközeget, majd SDS lízis pufferben [79] vettem fel, egytized térfogatnyi BME hozzáadásával. A fehérjeláncokat 95°C-on, 5 perces hőkezeléssel denaturáltam, majd az egyes mintákból 5-5 μ l-t futtattam poliakrilamid gélen. A futtatást egy gél esetén rendszerint 250 V feszültség, 20 mA áramerősség mellett végeztem, molekulasúly-markernek Thermo Scientific™ PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder-t, vagy ProSieve™ QuadColor™ 4.6 kDa–300 kDa Ladder-t használtam. Az elválasztás végén Coomassie *brilliant blue* festéket tartalmazó *staining* oldatban (30% metanol, 10% ecetsav, 0,1% Coomassie Blue R250) festettem a géleket 1 órán át, ami savas közegben elektrosztatikus és van der Waals-kölcsönhatásokkal kötődik a fehérjékhez, majd *destaining* oldatban (30% metanol, 10% ecetsav) kioldottam a gélből a nem kötődő festéket a megfelelő színintenzitás kialakulásáig.

4.6. DNS ligálása és emésztése restrikciós endonukleázokkal

A ligálásokat 20 μ l végtérfogatban végeztem 16°C-os vízfürdőben *overnight*, 1-1 μ l DNS, 1 μ l T4 ligáz, 2 μ l gyári ligáz puffer és MQ víz hozzáadásával. A restrikciós emésztéseket 20 μ l végtérfogatban végeztem 5-10 *unit* enzim, egyszeres mennyiségű megfelelő puffer, 1 mg/ml RNase, 50-100 ng plazmid DNS és MQ víz hozzáadásával. A reakciót az enzim optimális hőmérsékletén, 1,5 órán át végeztem, majd az eredményt agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem az elegy 3-5 μ l-ének felhasználásával.

4.7. Konjugációs tesztek

A donorok 4-4 párhuzamos telepéből és a recipiens törzsből középső log fázisban lévő baktérium szuszpenziót készítettem, melyek 200-200 μ l-ét elegyítettem, majd rövid centrifugálást (1 perc, 16000 rpm) követően kétszer mostam a pelletet 0,5 ml fiziológiás sóoldattal (0,9%-os NaCl-oldat). A sejteket AB mentes LB agar lemezekre szélesztve kereszteztem (6 óra, 37°C). A felnőtt baktériumpázsitot fiziológiás sóoldattal mostam le (4-4 ml), ebből 96 lyukú mikrotiter-tálcában hígítási sort készítettem ($cc.-10^{-7}$) és a megfelelő antibiotikumokat tartalmazó szelektív táptalajra cseppentettem 5-5 μ l-t. Külön lemezeken szelektáltam a donor, a recipiens, a sziget, illetve a helper plazmid ABR-markereire. Az ON 37°C-on inkubált lemezekről meghatároztam az egyes genotípusok titereit, majd az adatok alapján a konjugációs frekvenciát transz-konjugáns/donor cfu (tkj/d cfu) egységben adtam meg.

4.8. Promoteraktivitás vizsgálata β -galaktozidáz méréssel

A β -galaktozidáz enzim egy 120 kDa méretű homotetramer, melyet a *lac* operon *lacZ* génje kódol. Feladata a rendelkezésre álló laktóz hasítása glükózzá és galaktózzá, amennyiben a sejt nem jut elegendő glükózhoz. Laktóz, vagy egyéb azzal analóg induktor (pl. IPTG) hiányában a konstitutívan expresszáldó LacI represszor az operátor régióhoz kötődve megakadályozza az RNS-polimeráz kötődését a promoterhez, így az enzim nem termelődik. Az induktor kötődése a represszorhoz allosztérikusán inaktiválja annak kötődését az operátorhoz, így a struktúrgének (*lacZ*, *lacY*, *lacA*) kifejeződnek.

Az X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid, BCIG) a β -galaktozidáz enzim egy laktózzal analóg szintetikus szubsztrátja, melyet elsőként Jerome Horwitz és kollégái állítottak elő 1964-ben [81]. Az X-gal egy galaktóz és egy indolmolekulából áll, a β -glikozidos kötés elhasítását követően egy erősen kék színű termék, 5,5'-dibromo-4,4'-dikloro-indigo-2 keletkezik. Mivel az X-gal alapvetően színtelen, a kék bomlástermék megjelenése alkalmazható a β -galaktozidáz enzim jelenlétének monitorozására. Ez a jelenség képezi az alapját a rekombináns telepek azonosítására széles körben alkalmazott kék-fehér szelekciónak. A β -galaktozidáz másik kromogén szubsztrátja az ONPG (*o*-nitrophenyl- β -D-galactoside), mely elhasítva galaktózra és *o*-nitrofenolra, egy sárga színű anyagra bomlik. Az enzim aktivitása e két vegyület színintenzitásával mérhető az idő függvényében, amennyiben feleslegben vannak jelen a rendszerben. A *lacZ* gén elé más promoter régiókat klónozva a β -galaktozidáz által időegység alatt termelt színanyag mennyisége a vizsgálni kívánt promoter aktivitásával arányos.

A promoteraktivitás mérését Jeffrey Miller [78] módszere nyomán kidolgozott, mikrotiter-tálca olvasó berendezésre optimalizált protokoll alapján végeztem [82, 83, 84, 85] kisebb módosításokkal. Az ImmunoGenes Kft jóvoltából a mérésekhez CLARIOstar®^{Plus} EDR (BMG LABTECH) monokromátoros berendezést, a mért adatok feldolgozásához a MARS Data Analysis szoftvercsomagot használtam. Az enzimaktivitást „Miller Unit” egységben adtam meg a következő összefüggés szerint (1 Miller U: 1 μ mol ONPG elbontása 1 perc alatt 28°C-on):

$$1 \text{ Miller U} = \frac{1000 \cdot (OD_{420} - (1,75 \cdot OD_{550}))}{\Delta t \cdot V \cdot OD_{600}}; \text{ ahol}$$

Δt : eltelt idő (perc);

V: a reakció végtérfogata (ml);

OD₄₂₀: az o-nitrofenol abszorbanciája;

OD₅₅₀: a sejtörmelék abszorbanciája;

OD₆₀₀: steril tápközegre nullázott spektrofotométerben a baktérium- szuszpenzió fényelnyelése közvetlenül a reakció indítása előtt

A 37°C-ra termosztált rázatógépben, polipropilén anyagú, 96 lyukú, síkfenekű mikrotiter tálcában (Corning®), cellánként 150 μ l antibiotikus LB-ben tenyésztett ON kultúrákat 200 μ l friss szelektív LB-be oltottam át és ugyanilyen körülmények között OD₆₀₀ 0,1-0,2-ig növesztettem a sejteket (~110 perc). A minták fényelnyelését mikrotiter-tálca olvasóban mértem 600 nm-en, a méréseket indukált és indukálatlan körülmények között is elvégeztem (indukció: 0,05 mM IPTG). Ezt követően 2- 2 μ l kloroform és 5-5 μ l SDS (0,02%) hozzáadásával lixizáltam az egyes mintákat, majd rövid ideig szobahőmérsékleten hagytam, hogy elpárologjon a kloroform. Az indukált minták esetében tízszeres, az indukálatlanok esetében pedig kétszeres hígítást készítettem belőlük a megfelelő mennyiségű Z-pufferrel, vak kontrollnak sima LB és Z-puffer ugyanilyen arányú keverékét használtam. A t_0 időpontot rögzítve 20-20 μ l szubszt-rát oldat (4 mg/ml ONPG A-pufferben) hozzáadásával indítottam el a reakciót, melyet 28°C-os rázatógépben inkubálva végeztem a megfelelő sárga szín kialakulásáig. Ekkor 50-50 μ l ml 1,0 M-os Na₂CO₃-oldattal leállítottam a folyamatot. A Na₂CO₃ magas pH-ja denaturálja a β -galaktozidáz enzimet és megközelítőleg megduplázza a sárga szín intenzitását. Az egyes minták abszorbanciáját 550 és 420 nm-en is megmértem, végül a promoteraktivitást a már ismertetett képlet alapján számoltam.

4.9. Oligonukleotid primerek

A kísérletek során használt primerek tervezéséhez az SGI1 (GenBank: AF261825) illetve az R55 plazmid (GenBank: JQ010984) online elérhető szekvenciáját használtam. A tervezést a SnapGene, ill. az NCBI Primer Blast szoftverekkel végeztem, ügyelve a primerpárok megfelelő hosszára (18-25 bp), 40-60% közötti GC-tartalmára, páronkénti lehetőleg azonos olvadási hőmérsékletére (50-65°C), valamint arra, hogy az egyes párok ne alakíthassanak ki másodlagos kötést egymással, vagy önmagukkal (hetero- vagy homodimer, ill. hajtű). A 3'-végek utolsó 5 bázispárjában található egy vagy két G/C a bázisok közti erősebb hidrogénkötések révén segítheti a specifikus csatolást, háromnál több G/C ellenben a primer-dimerek képződésének kedvez, valamint az olvadási hőmérsékletet befolyásolja, így ez kerülendő. A molekuláris klónozáshoz használt oligonukleotidokat úgy terveztem meg, hogy azok túlnyúló 5'-végükön olyan, restriktációs endonukleázok által felismerhető szekvenciákat is hordozzanak, melyek a klónozni kívánt régióon belül és a vektor egyéb részén nem találhatók meg. Az alkalmazott primerek pontos leírása a 3. táblázatban látható.

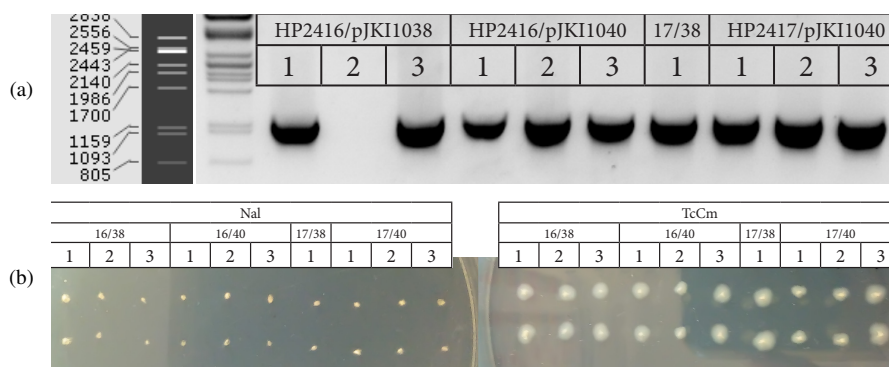
3. táblázat. A dolgozatban bemutatott kísérletek során használt primerek pontos szekvenciája

Név	Szekvencia (5' → 3')
attsgi1for	gctctagagcggccgcatggaagcggttccttgc
attsgi1rev	gctctagagcggccgcaaatgtgaatcgaatcacaatcg
LJ2	agctgcagcggccgcaagtttactctgtcttccag
RJ2	agctgcagcggccgctcgaagaggtagagcag
parB_Ndefor	ggccatatggcattgaacaatttaaaaggcctg
parB_BamHIrev	ataggatccttagccttcgacactcaggag
pucfor24	cgccagggttttccagtcacgac
p012for	aactgcaggtcaggtaaaaacctcctgttctctg
p012rev	aaccatgattcacctcctataccaaccagcg
ptralfor	aactgcagcgtgtcgttctcatcaaaaattgtcg
ptralrev	tcaccatggaggttgaccatattctctatcg
p059for	aactgcagcatgtaggttgaccatattctctatcg
p059rev	gtcccatggtgtcgttctcatcaaaaattgtcg
ptraNfor	aactgcagccctatttacaccatctggcgatgg
ptraNrev	ttcccatggtgttctccattcaaccttccc
pacaBfor	aactgcagatgtgcatggtgttgctcctatg
pacaBrev	ctgccatgggagatactcctaaatttgaggtac
ptrafFfor	aactgcagcgacagaagttgaagaggacac
ptrafFrev	ttccatggtctcacgcacgtattttcca
p152for	aactgcagggttaaggtctgtttatctgagcc
p152rev	gacccatggaatcctcaaagattgcttttag
pTXBfor	ggggaattgtgagcggataacaattcc
pKKfor	ttgaattctatggctgtgcaggtcgtaaadc
s006_Bamrev új	ttggatcctcaggcagcttttgagaccggcg
flhc_BamHIrev	ataggatcctcaagcacactcttttccccac

5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. AcaCD-deficiens R-plazmidot hordozó törzsek létrehozása konjugációval

Annak vizsgálatához, hogy komplementálhatók-e *in trans* az aktivátort nem expresszáló, ezáltal konjugációra önmagában nem képes *helper* plazmid konjugatív funkciói, olyan törzseket hoztam létre, melyekbe az R55dTnSmSΔ*acaCD* plazmidot juttattam be konjugációval. A donor törzsekből (HP2416, HP2417) ON tenyésztett kultúrából a 4.2. fejezetben ismertetett módon kompetens sejteket készítettem és a vad típusú (wt) aktivátorokat P_{tac} promoterről kifejező AcaCD (pJKI1038), ill. FlhDC (pJKI1040) expressziós plazmidokat transzformáltam beléjük. A pJKI1038 plazmidot tartalmazó donorokat 10:1 arányban, a pJKI1040-et tartalmazókat 5:1 arányban adtam a recipiens törzshöz (*E. coli* TG90), a keresztezést a 4.7 fejezetben leírtak szerint végeztem. A megfelelő antibiotikus lemezek (Tc/TcCm/NalCm) ON felnőtt telepek közül morfológiai vizsgálat alapján (kerek, ép, enyhén domború, fehéres színű, egyedül álló telep) választottam ki 3-3-at, melyeket a további kísérletekhez LB agar+AB (Tc/Cm) fenntartó lemezre vittem át és ON tenyésztést követően 4°C-on tartottam. A cfu/ml értékek rögzítése után kolónia (*colony*) PCR-rel ellenőriztem az R55 plazmid meglétét a mutáns törzsekben. Ehhez egy



9. ábra. a) *Colony* PCR az R55dTnSmSΔ*acaCD* plazmid 1172 bp hosszú fragmentjére
b) Szűrás teszt LB agar+Nal/TcCm szelektív lemezekre (37°C, ON)

1172 bp fragmentet amplifikáltam fel a parB_Ndefor–parB_BamHIrev primerpár használatával a 4.4. részben leírtak szerint, az eredményeket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem 1%-os gélen (lásd: 9a. ábra). A *colony* PCR mellett a pozitívnak bizonyult telepek szelektív lemezre történő átszűrásával is megerősítettem (Nal/TcCm), hogy a transzkonjugánsok tartalmazzák az *acaCD*-deléciót hordozó R55 plazmidot (lásd: 9b. ábra), majd friss ON tenyészeteket készítettem belőlük, melyekből 700-700 μ l sejtuszpenziót 300 μ l glicerinben felvéve -70°C-on tároltam további felhasználásig és a HP2549–HP2558 jelzőszámokkal láttam el.

5.2. Az Flh/Aca D és C alegységek kompatibilitásának vizsgálata

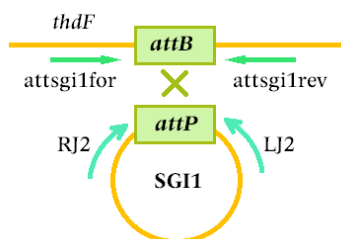
Az FlhD/FlhC és AcaD/AcaC fehérjék kompatibilitásának teszteléséhez az aktivátort nem expresszáló *E. coli* TG1NaI^R::SGI1-CΔ006-007 törzsből készített kompetens sejtekbe transzformáltam az alábbi plazmid konstrukciókat, melyek a pJKI391 (Km^R; kisebb kópiaszám), illetve a pKK223-3 (Ap^R; nagyobb kópiaszám) plazmidokon hordozzák az egyes alegységeket külön-külön, vagy egy operonban kódoló géneket az 4. táblázatban látható kombinációk szerint.

A kísérlet során azt kívántuk vizsgálni, hogy az egyes alegységeket külön expresszálva azok

4. táblázat. Kettős transzformálás 12 kombináció szerint az aktivátorfehérje-alegységek kompatibilitásának teszteléséhez

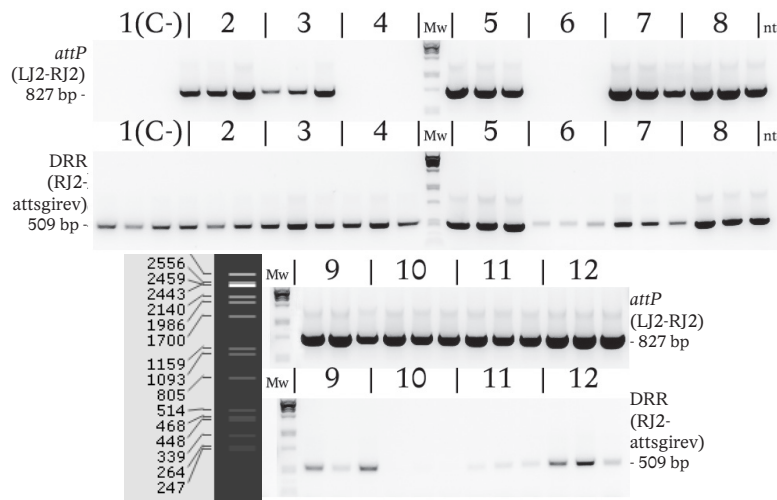
	Km ^R (~ 15 kópia)	Ap ^R (~ 25 kópia)
1	pJKI391 (-)	pKK223 (-)
2	pJKI888 (AcaDC)	pKK223 (-)
3	pJKI1095 (AcaC)	pJKI1101 (AcaD)
4	pJKI1096 (AcaD)	pJKI1100 (AcaC)
5	pGMY6 (FlhDC)	pKK223 (-)
6	pJKI391 (-)	pJKI1105 (FlhDC)
7	pJKI1097 (FlhC)	pJKI1103 (FlhD)
8	pJKI1098 (FlhD)	pJKI1102 (FlhC)
9	pJKI1095 (AcaC)	pJKI1103 (FlhD)
10	pJKI1096 (AcaD)	pJKI1102 (FlhC)
11	pJKI1097 (FlhC)	pJKI1101 (AcaD)
12	pJKI1098 (FlhD)	pJKI1100 (AcaC)

képesek-e aktív komplexet alkotni, valamint, hogy amennyiben kizárólag hibrid kialakulására van lehetőség, úgy ez megtörténik-e és a kialakult komplex képes-e indukálni az SGI1 kivágódását a sziget AcaCD-kontroll alatt álló *xis* génjének aktiválásával. A szelektív lemezeken ON felnőtt kettős transzformáns telepekben *colony* PCR-rel vizsgáltam az SGI1 kivágódott, illetve beépült formájának arányát, majd agaróz gélen ellenőriztem az eredményeket (lásd: 11. ábra). Az integrálódott formát a DRR amplifikálásával teszteltem (DRR: RJ2-attsgi1rev, 509 bp), a kivágódott, cirkuláris formát pedig az *attP* régióra specifikus, a sziget két végére kifelé csatoló



10. ábra. Az SGI1 kivágódott, ill. beépült formájának detektálására használt primerek pozíciója

primerpárral (LJ2-RJ2, 827 bp) (lásd: 10. ábra). A *colony* PCR-el kvalitatív információt kapunk az aktiváció mértékéről is az alapján, hogy a sejtpopuláció mekkora százalékában nem vágódott ki az SGI1: nagyobb mennyiségű integrált forma gyengébb aktivációra utal.



11. ábra. *Colony* PCR TG1Nal::SGI1-CA006-007 kivágódásra.
Mw: λ DNS PstI emésztése; ntc: nontemplát kontroll

Az eredmény szinte minden esetben pozitív lett, a hibrid aktivátorok mindegyike képes tehát aktív komplexet alkotni és indukálni a sziget kivágódását. A 4-es és 6-os minták esetében kapott negatív eredmény valószínűleg annak tudható be, hogy a kis kópiaszámban termelt AcaD/AcaDC nem elegendő a folyamat indukálásához. Egyes esetekben (10, 11) nagyobb mértékű kivágódást tapasztaltam, mint a natív fehérjékkel, ezért a kísérletet megismételtem az egy operonból expresszálandó hibrid aktivátorokkal (lásd: 5.3. fejezet), továbbá konjugációs tesztekkel vizsgáltam, hogy azok képesek-e komplementálni a *helper* plazmid AcaCD-deficienciáját (lásd: 5.4. fejezet).

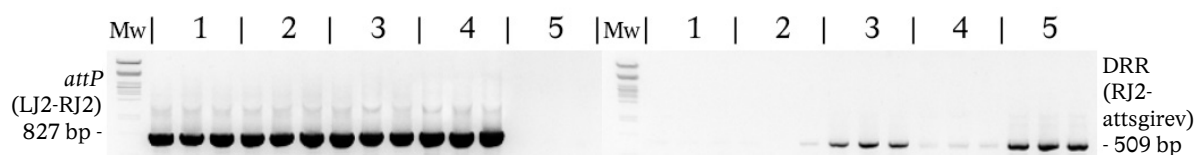
5.3. A vad típusú *acaCD* és *flhDC*, valamint az *flhD-acaC* és *acaD-flhC* fúziós operonok klónozása PCR-rel

A natív és hibrid regulátorok lehetséges funkciójának további vizsgálatához a wt aktivátorokat hordozó pGMY6 (*flhDC*), ill. pJKI877 (*acaCD*), valamint a Dr. Kiss János által elkészített és szekvenálással is ellenőrzött, fúziós operonokat tartalmazó pJKI1107 (*acaD-flhC*), ill. pJKI1108 (*flhD-acaC*) plazmidokról (pBluescript II SK (+) alapú konstrukciók) a pJKI391 fehérje expressziós vektorba vittem át az egyes aktivátorokat kódoló szekvenciákat. A pJKI391 plazmid (Km^R) egy p15A klónozó vektor származéka, melyben a P_{tac} promotor után egy többszörös klónozási hely vagy polilinker régió (*multicloning site*, MCS) és egy *lacI^q* (represszor)

gén található. A *trp* és *lac* operonok kombinációjából származó P_{tac} promoter nem represszálható teljes mértékben, minimális expresszió indukció nélkül is detektálható rajta (szivárgó/*leaky* promoter), így alkalmazásával a natív környezetben konstitutívan expresszálódó aktivátorok esete megfelelően modellezhető.

A hibrid operonok kiemeléséhez és a pJKI391 expressziós vektor felnyitásához az NdeI, BamHI, illetve az insertek esetében PvuII (NEB) restrikciós endonukleázokat használtam. A PvuII enzim tompa végeket generálva felhasítja a vektort az insert régió kívül, ezáltal csökkenthető a visszaligálódás esélye. A fragmentumokat fenolos extrakcióval tisztítottam meg a 4.3.2. fejezetben leírtak szerint, majd 10-10 μ l TE-ben oldottam vissza. Az insertek és a vektor ligálását követően az NdeI-BamHI régió belül hasító XhoI (37°C, 1 óra) restrikciós enzimmel emésztettem a ligátumokat, hogy elimináljam az *insert*-et nem tartalmazó, üres vektorokat, majd *E. coli* TG1 kompetens sejtekbe transzformáltam azokat. Az SGI1-C s007-es ORF-je (*flhD*) tartalmaz egy NdeI hasítóhelyet, így a klónozás során külön markerrel nem rendelkező, csonka S007-fragmentumot tartalmazó termékek is keletkeztek, ezért a transzformálást követően a teljes fragmentumra specifikus *poolozott colony* PCR-el kerestem meg azokat a telepeket, melyek a helyesen összeligálódott vektor konstrukciót tartalmazták a pKKfor és S006_Bamrev új (*acaD-flhC*)/*flhc*_BamHIrev (*flhD-acaC*) primerek használatával. A termékeket miniprep protokoll (lásd: 4.3.3. fejezet) szerint izoláltam a megfelelő telepekből frissen készített ON sejtuszuspenzióból és a pJKI1109 (*acaD-flhC*), ill. pJKI1111 (*flhD-acaC*) jelzésekkel láttam el.

Az előállított vektorokat az 5.2. fejezetben leírtakkal egyező módon kompetens TG1 sejtekbe transzformáltam és ON tenyésztést követően *colony* PCR-rel vizsgáltam az SGI1 kivágódott, ill. beépült formájának arányát a telepeken (lásd: 12. ábra). Az eredmények alapján az egy



12. ábra. *Colony* PCR TG1Nal::SGI1-CΔ006-007 kivágódásra. Mw: λ DNS PstI emésztése; 1. pJKI888 (*acaCD*) 2. pGMY6 (*flhDC*) 3. pJKI1109 (*acaD-flhC*) 4. pJKI1111 (*flhD-acaC*) 5. pJKI391 (C-)

promoterről expresszált hibrid konstrukciók esetében is megállapíthatjuk, hogy erősen indukálják az SGI1 kivágódását a vizsgált sejtpopulációban, bár a pJKI1109 (*AcaD-FlhC*) esetében jóval nagyobb mennyiségű integrálódott formát mutatott ki a reakció, ami megerősíti a korábbi vizsgálatok során tapasztaltakat.

5.4. Az R55 plazmidon végzett *acaCD*-deléció komplementációjának vizsgálata hibrid aktivátorokkal

A D és C alegységek nagyfokú hasonlósága (67% és 89%), valamint az AcaCD és az FlhDC_{SGI1} aktivátorok által felismert azonos promoter célszekvencia miatt a következő kísérletben megvizsgáltam, hogy a wt FlhDC_{SGI1}-hez hasonlóan a kiméra aktivátorok is képesek komplementálni az *acaCD*-KO *helper* konjugációs funkcióit. A komplementációs tesztek a korábbi kísérletek során elkészített mutánsokkal végeztem, melyekbe az R55Δ*acaCD* plazmidot juttattam be konjugációval (lásd: 5.1. fejezet). Ezen *E. coli* TG90NaI^R/R55ΔTnSm^{S+} törzsekbe transzformáltam a pJKI391 (*insert* mentes kontroll), pGMY6 (wt *flhDC*), pJKI888 (wt *acaCD*), pJKI1109 (*acaD-flhC*), pJKI1111 (*flhD-acaC*) expressziós plazmidokat, majd a transzformánsokat *E. coli* TG2 recipiens sejtekkel kereszteztem a 4.7. fejezetben leírtak szerint. Az eredmé-

5. táblázat. Az R55Δ*acaCD* konjugációjának komplementációja vad típusú, ill hibrid aktivátorokkal

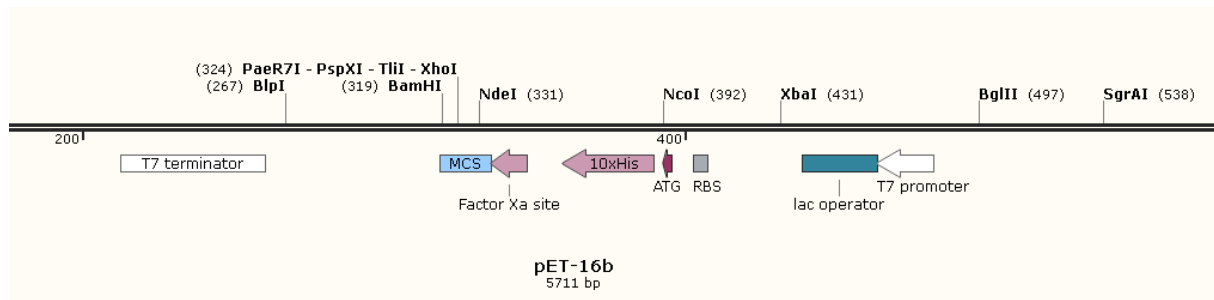
	Donor titer (cfu)	Recipiens titer (cfu)	R55 transzkonjugáns titer (cfu)	R55 konjugációs gyakoriság (tkj/d cfu)
pJKI888 (AcaCD)	$3,00 \cdot 10^9$	$2,76 \cdot 10^9$	$9,15 \cdot 10^7$	$3,40 \cdot 10^{-2} \pm 9,58 \cdot 10^{-3}$
pGMY6 (FlhDC)	$9,85 \cdot 10^9$	$2,55 \cdot 10^8$	$5,30 \cdot 10^7$	$5,33 \cdot 10^{-3} \pm 1,57 \cdot 10^{-3}$
pJKI1109 (AcaD-FlhC)	$5,00 \cdot 10^9$	$5,95 \cdot 10^8$	$8,25 \cdot 10^7$	$1,65 \cdot 10^{-2} \pm 7,90 \cdot 10^{-4}$
pJKI1111 (FlhD-AcaC)	$4,79 \cdot 10^9$	$1,25 \cdot 10^9$	$6,90 \cdot 10^7$	$5,44 \cdot 10^{-2} \pm 4,35 \cdot 10^{-2}$
pJKI391 (-)	$6,98 \cdot 10^9$	$2,90 \cdot 10^9$	$3,00 \cdot 10^1$	$4,43 \cdot 10^{-9} \pm 6,97 \cdot 10^{-10}$

nyek alapján elmondható, hogy a hibrid konstrukciók is képesek helyettesíteni az R55Δ*acaCD* hiányzó aktivátorát (lásd: 5. táblázat). A legmagasabb transzfer frekvenciát az AcaCD jelenlétében tapasztaltam. Az AcaD-FlhC hibrid erősebb aktivátornak tűnik az FlhDC_{SGI1}-nél, míg az FlhD-AcaC esetében a magas szórás értékek miatt ez nem jelenthető ki egyértelműen.

5.5. A vad típusú és hibrid operonok klónozása pET16b vektorba és a fehérje expresszió vizsgálata

Az eddig leírt megfigyelések alapján érdemesnek láttam megkísérelni a nagy mennyiségben expresszáltatott kiméra-aktivátorok komplex formában történő tisztítását, ezért a pGMY6 (*flhDC*), pJKI877 (*acaCD*), pJKI1107 (*acaD-flhC*), ill. pJKI1108 (*flhD-acaC*) plazmidok megfelelő régióit egy heterológ génexpresszióra optimalizált vektorba klónoztam.

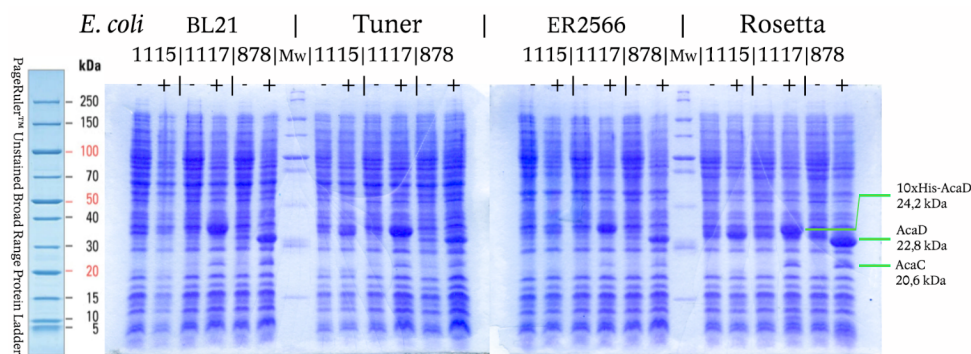
A pET16b (Ap^R) expressziós rendszerben a MCS ORF egy 10×His-tag-et kódoló szekven-
ciával kezdődik, ily módon az expresszált fehérje N-terminális végéhez egy polihisztidin láncot
fuzionáltathatunk (~1,4 kDa), mely lehetővé teszi az affinitás kromatográfiával történő tisztí-
tást. A MCS-től upstream található a lacO operátor és a T7 promoter, melyet a T7 bakteriofág
DNS-függő RNS polimeráza képes felismerni. A célfehérje termeltetése során olyan törzseket
használtam, melynek kromoszómájába beépítették a T7 RNS polimeráz génjét és annak kifeje-
ződését izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranoziddal (IPTG-vel) indukálhatjuk.



13. ábra. A pET16b vektor polilinker régiója

A wt és hibrid operonok klónozását PET16b rendszerbe az 5.3. fejezetben leírtakkal egye-
ző módon végeztem. A helyesen összeligálódott, teljes fragmentumokat tartalmazó klónokat
szintén *poolozott colony* PCR-el kerestem meg a pTXBfor és az S006_Bamrev_új (*flhDC* és
acaD-flhC), vagy *flhC_BamHIrev* (*acaCD* és *flhD-acaC*) primerek használatával és alkalikus
lízissel tisztítottam, végül restrikciós emésztéssel is ellenőriztem (StuI-MfeI, ill. NdeI-BamHI;
37°C; 1,5 óra). Ezen plazmidokat a pJKI1114 (*flhDacaC*), pJKI1115 (*flhDC*), pJKI1116 (*acaD-
flhC*), ill. pJKI1117 (*acaCD*) jelzésekkel láttam el.

Az így létrehozott konstrukciók fehérjetermelésének vizsgálatát annak megállapításával
kezdttem, hogy milyen heterológ génexpresszióra optimalizált törzset érdemes használni az
affinitás-kromatográfiás tisztítás során. Ehhez a következő négy törzsbe transzformáltam a vizs-
gálni kívánt plazmidokat: *E. coli* BL21 (DE3), Tuner™ (DE3); ER2566 és Rosetta™(DE3). Az
eredményeket a 10×His-taggel jelölt wt aktivátorok (pJKI1115, pJKI1117) példáján mutatom be,
kontrollként a pJKI878 vektort használtam, mely P_{T7} promoterről expresszálja a wt AcaC (183
aa; 20,6 kDa) és AcaD (202 aa; 22,8 kDa) alegységeket 10×His-tag nélkül. A fehérje expressziót
a 4.5. fejezetben ismertetett módon végeztem, majd 15%-os poliakrilamid gélen ellenőriztem
a mintákat. A gélkép alapján megállapítható, hogy a 10×His-taggel jelölt D alegység mind a
négy törzsben szépen expresszálódik, azonban a C alegység esetében jelentős különbség látha-
tó az ER2566 esetében, valamint minimális mennyiségi eltérés felfedezhető a BL21 és Tuner™,
valamint a Rosetta™ törzsekben termeltetett minták között is. Az eredményekkel összhangban

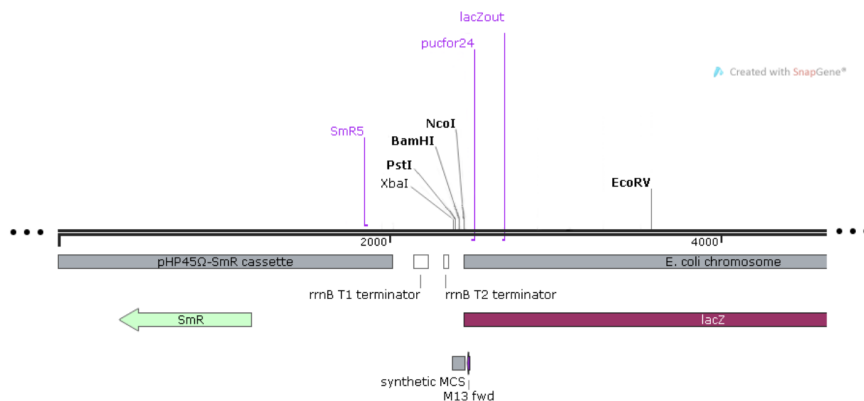


14. ábra. Fehérje expresszió vizsgálata (SDS-PAGE)

a további fehérjetisztítási kísérleteket és a kiméra aktivátorok expresszióját Rosetta™ törzsbe transzformálva fogom végezni.

5.6. Az R-plazmid AcaCD-reszponzív promotereinek fúziója lacZ génnel

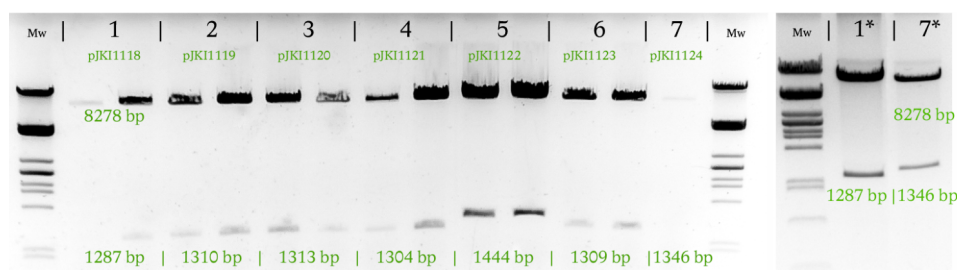
A hibrid aktivátorok hatásának mértékét β -galaktozidáz méréssel vizsgáltam az SGI1, illetve a *helper* plazmid AcaCD/FlhDC_{SGI1}-reszponzív promoterein. Ehhez a pJKI1118-pJKI1124 vektorokat állítottam elő oly módon, hogy a pJKI990 (Ap^R) mérőplazmid *lacZ* génje elé klónoztam az R55 plazmid 7 vizsgálni kívánt promoterét a következők szerint: A P_{012} , P_{traID} ,



15. ábra. A pJKI990 (9470 bp) plazmid polilinker régiója

P_{059} , P_{traN} , P_{acaB} , P_{traFGH} , P_{152} régiókat a megfelelő primerpárokkal PCR-rel amplifikáltam, majd 1,2%-os agaróz gélen ellenőriztem a termékek méretét és alkoholos precipitációval izoláltam a fragmentumokat (lásd: 4.3.1. fejezet). Ezután 9-9 μ l TE-ben felvett DNS-t emésztettem NcoI-PstI restrikciós enzimekkel (Y+ puffer; 37°C) és fenolos extrakciót követően (lásd: 4.3.2. fejezet) minden mintát 10 μ l TE-ben oldottam vissza. Ezután az egyes promoter régiók 1-1 μ l-ét összeligáltam az előzőleg szintén NcoI-PstI enzimekkel linearizált pJKI990 vektorral (1 μ l), majd a transzformálás előtt BamHI-el is emésztettem a ligátumokat. A BamHI a pJKI990

MCS régiójának NcoI-PstI szakaszán belül hasít, ezáltal az insertet esetlegesen nem tartalmazó üres vektorokat linearizálja. Az így előállított ligátumokat (pJKI1118-pJKI1124) *E. coli* TG90 kompetens sejtekbe transzformáltam és az ON felnőtt transzformánsokban *colony* PCR-rel ellenőriztem a megfelelő méretű insert régiók jelenlétét a pucfor24 (NcoI-hasítóhelytől downstream, a *lacZ* génen csatol), ill. a promoter fragmentek amplifikációjához is használt, PstI-oldali primerekkel (lásd: 15. ábra). Ezután 2-2 párhuzamos, a PCR alapján pozitívnak bizonyult telepekből minipreppel izoláltam a plazmidokat és újabb restrikciós emésztéssel győződtem meg a konstrukciók helyességéről (XbaI-EcoRV; 1,5 óra, 37°C). Az XbaI az inserttől upstream, a MCS-ban hasítja el a DNS-t, az EcoRV pedig a *lacZ* génben, így minden minta esetén egy 8278 bp-os, illetve egy kisebb, az inzertált promoter régió méretétől függő fragmentet kaptam (lásd: 16. ábra).

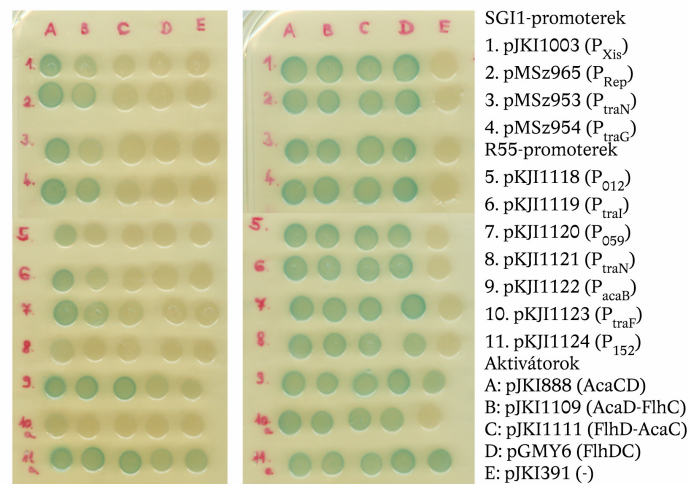


16. ábra. Az R55 promoterek XbaI-EcoRV emésztése (5-5 μ l). A *-gal jelölt minták az első izolálás során negatív eredményt adó két telep ismételt tisztításának emésztési képei.

5.7. Az AcaCD-reszponzív promoterek aktivitásának vizsgálata β -galaktozidáz méréssel

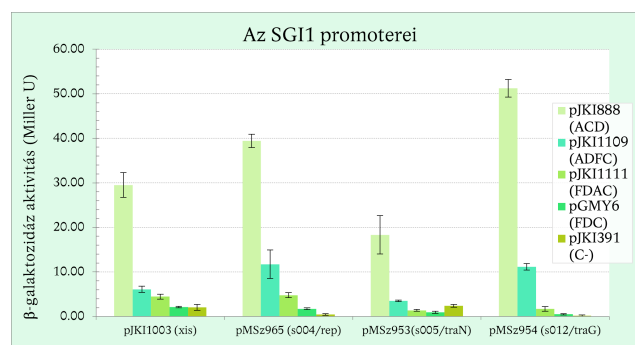
A β -galaktozidáz méréseket a korábbiakban elkészített wt és hibrid aktivátorokat P_{tac} promoterről expresszáló vektorokkal végeztem (lásd: 5.3. fejezet). Az R55 plazmid hét *lacZ* génnel fuzionáltatott promoterét (lásd: 5.6. fejezet), valamint további négy, az SGI1-ről származó, szintén AcaCD-reszponzív promotert hordozó β -galaktozidáz mérőplazmidot *E. coli* TG1 kompetens sejtekbe transzformáltam az aktivátorokat expresszáló vektorokkal kombinálva. A kettős transzformánsokat AB (Km, Ap)+X-gal tartalmú lemezekre szélesztettem, ily módon az ON felnőtt telepek kék színéből előzetes kvalitatív információ kapható a vizsgált promotereken indukált transzkripció mértékéről. A lemezekről fiziológias sóoldatban szuszpendáltam egy-egy telepet, melyből 5-5 μ l-t cseppentettem indukáló és nem indukáló (0,05 mM IPTG), AB+X-gal tartalmú LB lemezekre. (lásd: 17. ábra). Az eredményekből például látható, hogy némely esetben a noninduktív körülmények között is, még a negatív kontroll esetében is detektálható volt valamennyi aktivitás (9, 11), illetve az is, hogy a hibridek szinte minden esetben

erősebb hatást váltottak ki az *flhdc*-nél és gyengébbet az *acacd*-nél. A transzformánsokat a to-



17. ábra. Promoteraktivitás vizsgálata indukáltalan és 0,05 mM IPTG-vel indukált, AB+X-gal tartalmú lemezen, wt (A, D) és hibrid (B, C) aktivátorok, valamint *insert* mentes kontroll (E) jelenlétében.

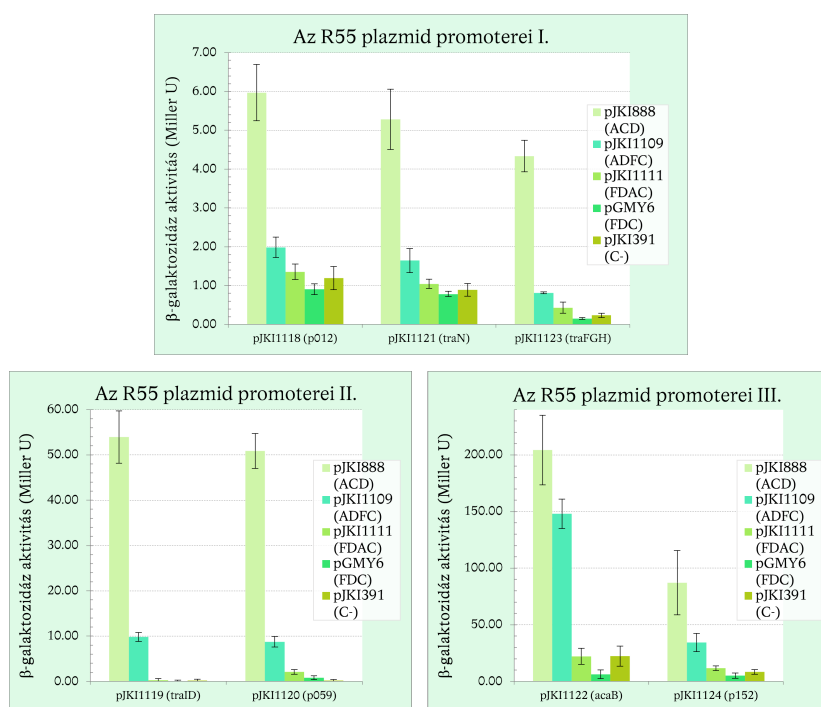
vábbiakban 4°C-on tartottam, az egyes promoterek kvantitatív mérését 8-8 párhuzamos telepéből indított ON kultúrán végeztem az 4.8. fejezetben leírtak szerint. Az X-gal tartalmú lemezekre cseppentett, IPTG-vel indukált minták színintenzitásában nem tapasztaltam olyan mértékű különbséget, mint az indukátlan minták esetében, ami alapján arra következtettem, hogy az ON növesztés alatt már a leggyengébb aktivátor is olyan mértékű enzimermelést váltott ki, ami telítette a rendszert, ezáltal az induktív körülmények torzított, alacsonyabb felbontású képet mutatnak. A kvantitatív mérések ezt a feltevést megerősítették, így jelen dolgozatban a noninduktív körülmények között végzett mérési eredményeket mutatom be.



18. ábra. Az SGI1 promoterein mért enzimaktivitás

Az egyes aktivátorok hatásának erőssége a korábbi tapasztalatokkal összhangban minden promoteren hasonló mintázatot mutatott. A wt *AcaCD* a legerősebb, a wt *FlhDC* a leggyengébb a négy konstrukció közül, bár a negatív kontrollként használt, aktivátort nem kódoló üres vektor (pJKI391) több esetben hasonló vagy nagyobb mértékű aktivitást eredményezett az *FlhDC*-nél,

azonban a néhány Miller U nagyságrendű aktivitás az észlelhetőség alsó határához közelít. A második legerősebbnek minden vizsgált promoteren az AcaD-FlhC kiméra bizonyult, ez az aktivátor minden esetben szignifikánsan erősebb hatást fejtett ki az FlhD-AcaC konstrukciónál. Az SGI1 négy vizsgált promotere közül a legerősebb aktiváció a *traHG* promoter régióban volt mérhető, mely feltehetőleg egy, a konjugatív transzferhez elengedhetetlen peptidoglikán-degradáló enzimet kódol [86, 87]. A második legerősebben a replikáció iniciációjáért felelős RepA promotere aktiválódott, a harmadik a sziget kivágódásáért felelős Xis (excizionáz) promoter régiója, a leggyengébb aktiváció pedig a valószínűsíthetően a pilusképzésben szerepet játszó TraN promoterén volt tapasztalható.



19. ábra. Az R-plazmid promoterein mért β -galaktozidáz aktivitás (I. Az *acaB* és az imseretlen funkciójú *s152* promoterei; II. A *P_{traID}* és a vele divergens *P₀₅₉*; III. A T4SS elemeinek promoterei)

Az R55 plazmid promoterei közül a legerősebb aktivációt a DNS-kötő tulajdonsággal bíró AcaB pozitív regulációs faktor promoterén mértem, mely már az X-gal tartalmú lemezre cseppentett előzetes vizsgálat során is egyértelműen detektálható aktivitást mutatott. Ez alapján feltételezhető, hogy az *acaB* esetében az aktivátorok csak erősítik a konstitutív gén expresszióját; ugyanez igaz a második legerősebb aktivitást kiváltó, öt gént hajtó *p152* promoterre is, melynek szerepét a folyamatban egyelőre nem ismerjük, bár a wt AcaCD által kifejtett hatás a nagy szórás-értékek miatt itt megkérdőjelezhető. Ezután a *traID* és a vele divergens *p059* következett az *acaB*-hez viszonyítva körülbelül 25%-os erősséggel. A konjugációs folyamat és a T4SS ismert elemei, valamint az *s012* ORF promoterein gyenge, az *acaB*-hez viszonyítva két nagyságrenddel kisebb mértékű aktivációt tapasztaltam.

6. DISZKUSSZIÓ

Az AcaCD és FlhDC aktivátorok között fennálló analógiából kiindulva *in vivo* kísérletekkel igazoltam, hogy az SGI1 és az IncA/C plazmidok által kódolt aktivátorfehérjék egyes alegységei egymással felcserélhetők, belőlük egy operonból vagy külön-külön expresszáva is aktív komplex alakulhat ki, mely képes aktiválni a sziget kivágódásért felelős *xis* génjének promoterét, sőt komplementálja az *acaCD*-KO R55 plazmid konjugációs deficienciáját is. A *helper* plazmid hét AcaCD-reszponzív promoterét egy β -galaktozidáz mérésre alkalmas vektorba klónoztam, majd az SGI1 négy promoterével együtt kvalitatív és kvantitatív módszerekkel vizsgáltam az egyes aktivátorok rajtuk kifejtett hatását. Kimutattam, hogy a hibrid aktivátorok az IncA/C plazmidok, illetőleg az SGI1 azon promotereit, melyek a horizontális transzfer kulcsfontosságú elemeinek expressziójáért felelnek, szintén aktiválják. Az egyes promotereken kiváltott hatásukat vizsgálva megállapítottam, hogy a *helper* plazmid aktivátora minden promoteren nagyobb mértékű hatást vált ki, mint bármelyik másik konstrukció, a sziget *wt* aktivátora viszont minden esetben szignifikánsan gyengébb transzkripciót eredményezett az AcaD-FlhC kiméránál.

A sziget által kódolt aktivátor alacsonyabb aktivációs képessége alapulhat annak eltérő DNS-felismerő képességén, előfordulhat, hogy nem képes tartósan stabil komplexet alkotni, vagy hogy maguk az alegységek gyorsabban degradálódnak, de az sem zárható ki, hogy a folyamat elején feltehetően nagyobb koncentrációban jelen lévő FlhD/C alegységek "elfoglalják" az erősebb aktivitással bíró AcaD/C helyét az egyes promotereken, negatívan befolyásolva a plazmid által kódolt konjugációs komponensek expresszióját, ezáltal előnyösebb helyzetet biztosítva a saját homológjai számára.

A tapasztaltak pontos magyarázata és az SGI1 horizontális transzferében betöltött szerepe további kutatást igényel, az mindenesetre kijelenthető, hogy amennyiben egy sejtbe kerülnek, az SGI1 különböző rendszerekből származó génjei segítségével jóval hatékonyabban tud fennmaradni és terjedni is, mint maga a *helper* elem. A konstitutívan expresszáldó FlhDC koncentrációja nem elegendő a sziget kivágódásához, a plazmid aktivátorának jelenlétében azonban egy öngerjesztő folyamat indulhat el, melynek hatására a konjugációs apparátus kiépülése felgyorsul, a sziget kivágódása és replikációja, valamint feltételezett partíciós funkciói pedig az SGI1 számára kedveznek a folyamat során. Ezt a feltevést alátámasztja az 5.7. fejezetben bemutatott mérés eredménye: a pozitívan visszacsatoló AcaB promoterén kiugróan magas értékeket tapasztaltam mind az AcaCD, mind az AcaD-FlhC hibrid esetében.

Irodalomjegyzék

- (1) Thompson, T. *Nature* **2022**.
- (2) Jajere, S. M. *Veterinary World* **2019**, *12*, 504–521.
- (3) Fekete, P. Z.; Nagy, B. *Acta Veterinaria Hungarica* **2008**, *56*, 5–11.
- (4) Levings, R. S.; Lightfoot, D.; Partridge, S. R.; Hall, R. M.; Djordjevic, S. P. *Journal of Bacteriology* **2005**, *187*, 4401–4409.
- (5) Boyd, D. A.; Peters, G. A.; Ng, L. K.; Mulvey, M. R. *FEMS Microbiology Letters* **2000**, *189*, 285–291.
- (6) Boyd, D.; Peters, G. A.; Cloeckaert, A.; Boumedine, K. S.; Chaslus-Dancla, E.; Imberechts, H.; Mulvey, M. R. *Journal of Bacteriology* **2001**, *183*, 5725–5732.
- (7) Cohen, E.; Davidovich, M.; Rokney, A.; Valinsky, L.; Rahav, G.; Gal-Mor, O. *Environmental Microbiology* **2020**, *22*, 413–432.
- (8) EFSA; for Disease Prevention, E. C.; Control EFSA Journal **2020**, *18*, e06007.
- (9) De Curraize, C.; Siebor, E.; Neuwirth, C.; Hall, R. M. *Plasmid* **2020**, *107*, 102453.
- (10) Beutlich, J.; Jahn, S.; Malorny, B.; Hauser, E.; Hühn, S.; Schroeter, A.; Rodicio, M. R.; Appel, B.; Threlfall, J.; Mevius, D.; Helmuth, R.; Guerra, B. *Applied and Environmental Microbiology* **2011**, *77*, 5655–5664.
- (11) Siebor, E.; Neuwirth, C. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2013**, *68*, 1750–1756.
- (12) Doublet, B.; Golding, G. R.; Mulvey, M. R.; Cloeckaert, A. *PLoS ONE* **2008**, *3*, DOI: 10.1371/journal.pone.0002060.
- (13) Frost, L. S.; Leplae, R.; Summers, A. O.; Toussaint, A. *Nature Reviews Microbiology* **2005**, *3*, 722–732.
- (14) Cascales, E.; Christie, P. J. *Nature Reviews Microbiology* **2003**, *1*, 137–149.
- (15) Alvarez-Martinez, C. E.; Christie, P. J. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2009**, *73*, 775–808.
- (16) Gillings, M. R. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2014**, *78*, 257–277.
- (17) Esposito, D.; Scocca, J. J. *Nucleic Acids Research* **1997**, *25*, 3605–3614.
- (18) Siguier, P.; Gourbeyre, E.; Varani, A.; Ton-hoang, B.; Chandler, M. *Mobile DNA III* **2015**, 555–590.
- (19) Vandecraen, J.; Chandler, M.; Aertsen, A.; Van Houdt, R. *Critical Reviews in Microbiology* **2017**, *43*, 709–730.
- (20) Bellanger, X.; Payot, S.; Leblond-Bourget, N.; Guédon, G. *FEMS Microbiology Reviews* **2014**, *38*, 720–760.
- (21) Guédon, G.; Libante, V.; Coluzzi, C.; Payot, S.; Leblond-Bourget, N. *Genes* **2017**, *8*, DOI: 10.3390/genes8110337.
- (22) Cabezon, E.; Ripoll-Rozada, J.; Peña, A.; De La Cruz, F.; Arechaga, I. *FEMS microbiology reviews* **2015**, *39*, 81–95.
- (23) Costa, T. R.; Harb, L.; Khara, P.; Zeng, L.; Hu, B.; Christie, P. J. *Molecular microbiology* **2021**, *115*, 436–452.
- (24) Juhas, M.; Crook, D. W.; Hood, D. W. *Cellular Microbiology* **2008**, *10*, 2377–2386.
- (25) Guzmán-Herrador, D. L.; Llosa, M. *Plasmid* **2019**, *104*, 102415.
- (26) Guglielmini, J.; Quintais, L.; Garcillán-Barcia, M. P.; de la Cruz, F.; Rocha, E. P. *PLoS genetics* **2011**, *7*, e1002222.
- (27) Garcillán-Barcia, M. P.; Francia, M. V.; De La Cruz, F. *FEMS Microbiology Reviews* **2009**, *33*, 657–687.
- (28) Burrus, V.; Pavlovic, G.; Decaris, B.; Guédon, G. *Molecular Microbiology* **2002**, *46*, 601–610.
- (29) Smillie, C.; Garcillán-Barcia, M. P.; Francia, M. V.; Rocha, E. P.; de la Cruz, F. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2010**, *74*, 434–452.
- (30) Wozniak, R. A.; Fouts, D. E.; Spagnoletti, M.; Colombo, M. M.; Ceccarelli, D.; Garriss, G.; Déry, C.; Burrus, V.; Waldor, M. K. *PLoS genetics* **2009**, *5*, e1000786.
- (31) Carraro, N.; Matteau, D.; Luo, P.; Rodrigue, S.; Burrus, V. *PLoS Genetics* **2014**, *10*, DOI: 10.1371/journal.pgen.1004714.
- (32) Shintani, M.; Sanchez, Z. K.; Kimbara, K. *Frontiers in microbiology* **2015**, *6*, 242.
- (33) Hegyi, A.; Szabó, M.; Olasz, F.; Kiss, J. *Scientific Reports* **2017**, *7*, DOI: 10.1038/s41598-017-11097-0.
- (34) Carraro, N.; Rivard, N.; Burrus, V.; Ceccarelli, D. *Mobile Genetic Elements* **2017**, *7*, 1–6.
- (35) Harmer, C. J.; Partridge, S. R.; Hall, R. M. *Plasmid* **2016**, *86*, 38–45.
- (36) Dunny, G. M.; Hirt, H. *Molecular Microbiology* **2019**, *112*, 1061–1065.
- (37) Kiss, J.; Szabó, M.; Hegyi, A.; Douard, G.; Praud, K.; Nagy, I.; Olasz, F.; Cloeckaert, A.; Doublet, B. *Frontiers in Microbiology* **2019**, *10*, 1–16.
- (38) Hancock, S. J.; Phan, M.-D.; Luo, Z.; Lo, A. W.; Peters, K. M.; Nhu, N. T. K.; Forde, B. M.; Whitfield, J.; Yang, J.; Strugnell, R. A. és tsai. *Nature Microbiology* **2020**, *5*, 1340–1348.
- (39) Hall, R. M. **2010**, 1525–1538.
- (40) Hermans, A. P.; Beuling, A. M.; van Hoek, A. H.; Aarts, H. J.; Abee, T.; Zwietering, M. H. *Microbiology* **2006**, *152*, 2137–2147.
- (41) Mulvey, M. R.; Boyd, D. A.; Olson, A. B.; Doublet, B.; Cloeckaert, A. *Microbes and Infection* **2006**, *8*, 1915–1922.
- (42) Doublet, B.; Boyd, D.; Mulvey, M. R.; Cloeckaert, A. *Molecular microbiology* **2005**, *55*, 1911–1924.

- (43) Kiss, J.; Papp, P. P.; Szabó, M.; Farkas, T.; Murányi, G.; Szakállas, E.; Olasz, F. *Nucleic Acids Research* **2015**, *43*, 8735–8745.
- (44) Carraro, N.; Rivard, N.; Ceccarelli, D.; Colwell, R. R.; Burrus, V. *mBio* **2016**, *7*, 1–9.
- (45) Carraro, N.; Durand, R.; Rivard, N.; Anquetil, C.; Barrette, C.; Humbert, M.; Burrus, V. *PLoS Genetics* **2017**, *13*, 1–20.
- (46) Szabó, M.; Murányi, G.; Kiss, J. *Nucleic acids research* **2021**, *49*, 832–846.
- (47) Murányi, G.; Szabó, M.; Olasz, F.; Kiss, J. *PLoS ONE* **2016**, *11*, 1–12.
- (48) Kiss, J.; Nagy, B.; Olasz, F. *PLoS ONE* **2012**, *7*, DOI: 10.1371/journal.pone.0032497.
- (49) Humbert, M.; Huguet, K. T.; Coulombe, F.; Burrus, V. *Journal of Bacteriology* **2019**, *209*, DOI: 10.1128/JB.00731–18.
- (50) Huguet, K. T.; Rivard, N.; Garneau, D.; Palanee, J.; Burrus, V. *PLoS Genetics* **2020**, *16*, DOI: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1008965.
- (51) Durand, R.; Huguet, K. T.; Rivard, N.; Carraro, N.; Rodrigue, S.; Burrus, V. *Nucleic Acids Research* **2021**, 1–18.
- (52) Chevance, F. F.; Hughes, K. T. *Nature Reviews Microbiology* **2008**, *6*, 455–465.
- (53) Chilcott, G. S.; Hughes, K. T. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2000**, *64*, 694–708.
- (54) Prüß, B. M.; Liu, X.; Hendrickson, W.; Matsumura, P. *FEMS Microbiology Letters* **2001**, *197*, 91–97.
- (55) Li, B.; Yue, Y.; Yuan, Z.; Zhang, F.; Li, P.; Song, N.; Lin, W.; Liu, Y.; Yang, Y.; Li, Z.; Gu, L. **2017**, 1–14.
- (56) Prüß, B. M.; Campbell, J. W.; Van Dyk, T. K.; Zhu, C.; Kogan, Y.; Matsumura, P. *Journal of Bacteriology* **2003**, *185*, 534–543.
- (57) Poulin-Laprade, D.; Carraro, N.; Burrus, V. *Frontiers in Microbiology* **2015**, *6*, 1–15.
- (58) Stafford, G. P.; Ogi, T.; Hughes, t. *Microbiology* **2005**, *151*, 1779–1788.
- (59) Llosa, M.; Gomis-Rüth, F. X.; Coll, M.; Cruz, F. d. l. *Molecular microbiology* **2002**, *45*, 1–8.
- (60) Llosa, M.; Roy, C.; Dehio, C. *Molecular microbiology* **2009**, *73*, 141–151.
- (61) Thanassi, D. G.; Bliska, J. B.; Christie, P. J. *FEMS microbiology reviews* **2012**, *36*, 1046–1082.
- (62) Soutourina, O. A.; Bertin, P. N. *FEMS Microbiology Reviews* **2003**, *27*, 505–523.
- (63) Kinoshita, M.; Tanaka, S.; Inoue, Y.; Namba, K.; Aizawa, S. I.; Minamino, T. *Scientific Reports* **2020**, *10*, 1–12.
- (64) Waters, R. C.; O'Toole, P. W.; Ryan, K. A. *Protein Science* **2007**, *16*, 769–780.
- (65) Hughes, K. T. *Journal of Bacteriology* **2012**, *194*, 4793–4796.
- (66) Claret, L.; Hughes, t. *Journal of Molecular Biology* **2000**, *303*, 467–478.
- (67) Claret, L.; Hughes, t. *Journal of Molecular Biology* **2002**, *321*, 185–199.
- (68) Fitzgerald, D. M.; Bonocora, R. P.; Wade, J. T. *PLoS Genetics* **2014**, *10*, DOI: 10.1371/journal.pgen.1004649.
- (69) Sorenson, M. K.; Ray, S. S.; Darst, S. A. *Molecular Cell* **2004**, *14*, 127–138.
- (70) Guse, A.; Halte, M.; Hüsing, S.; Erhardt, M. *Molecular Microbiology* **2021**, *116*, 1189–1200.
- (71) Jain, K.; Pradhan, A.; Mokashi, C.; Saini, S. *Systems and Synthetic Biology* **2015**, *9*, 19–31.
- (72) Kutsukake, K. *Molecular and General Genetics* **1997**, *254*, 440–448.
- (73) Hung, C. C.; Haines, L.; Altier, C. *PLoS ONE* **2012**, *7*, DOI: 10.1371/journal.pone.0034220.
- (74) Aldridge, P.; Hughes, K. T. *Current Opinion in Microbiology* **2002**, *5*, 160–165.
- (75) Wang, S.; Fleming, R. T.; Westbrook, E. M.; Matsumura, P.; McKay, D. B. *Journal of Molecular Biology* **2006**, *355*, 798–808.
- (76) Kim, J. M.; Garcia-Alcala, M.; Balleza, E.; Cluzel, P. *Science advances* **2020**, *6*, eaax0947.
- (77) Albanna, A.; Sim, M.; Hoskisson, P. A.; Gillespie, t.; Rao, C. V.; Aldridge, P. D. *Scientific reports* **2018**, *8*, 1–11.
- (78) J.H. Miller CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY **1972**, ISBN: 9780, 466.
- (79) Sambrook, J.; Russel, D. W. *Molecular Cloning, 3-Volume Set : A Laboratory Manual*, 2000.
- (80) Mullis, K. B. *Scientific American* **1990**, *262*, 56–65.
- (81) Horwitz, J. P.; Chua, J.; Noel, M.; Donatti, J. T.; Freisler, J. *Journal of medicinal chemistry* **1966**, *9*, 447–447.
- (82) Griffith, K. L.; Wolf, R. E. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, *290*, 397–402.
- (83) Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K., *Current Protocols in Molecular Biology: Preface*; SUPPL. 90, 2010.
- (84) Thibodeau, S. A.; Fang, R.; Joung, J. K. *Biotechniques* **2004**, *36*, 410–415.
- (85) Schaefer, J.; Jovanovic, G.; Kotta-loizou, I.; Buck, M. *Data in Brief* **2016**, *8*, 350–352.
- (86) Goessweiner-Mohr, N.; Arends, K.; Keller, W.; Grohmann, E. *Plasmid* **2013**, *70*, 289–302.
- (87) Goessweiner-Mohr, N.; Eder, M.; Hofer, G.; Fercher, C.; Arends, K.; Birner-Gruenberger, R.; Grohmann, E.; Keller, W. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **2014**, *70*, 2376–2389.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretném megköszönni mentoromnak, dr. Kiss Jánosnak, a Gazda-patógén Interakció és Mikrobiális Genomika Csoport vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra a részvételt a kutatócsoport munkájában. Köszönöm sokéves tapasztalaton alapuló, bölcs tanítását és lelkesítő támogatását, melyek nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Köszönöm konzulensemnek, a Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék mestertanárának, dr. Bujna Erikának szakmai segítségnyújtását és odaadó figyelmét, valamint a kitartó türelmet és biztatást, melyet munkám során tanúsított.

Szeretném továbbá megköszönni dr. Szabó Mónikának, a kutatócsoport tudományos főmunkatársának hozzáértő tanácsait és a sok remek hangulatban végzett labormunkát, azok időigényességétől, bonyolultságától vagy egyszerűségétől függetlenül. Köszönöm a kutatócsoport további tagjainak, dr. Murányi Gábornak, dr. Veress Alexandrának és Nagy István PhD hallgatónak a hasznos gyakorlati tanácsokat és a folyamatos támogatást, valamint Sztánáné Keresztúri Erikának és Bogár Andreának a folyamatos, kiváló technikai asszisztálást. Köszönöm barátomnak, Szinger Dávidnak, hogy figyelmembe ajánlotta a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetet és bemutatott a kutatócsoport tagjainak. Nem utolsó sorban hálásan köszönöm a szüleim véget nem érő támogatását.

A Genetika és Biotechnológia Intézetben töltött idő hatalmas élmény számomra, a folyamatos tanulás és technikai fejlődés mellett rendkívüli megtiszteltetésnek tartom, hogy ebben a kedves, mégis professzionális közegben tanulmányozhatom az antimikrobiális rezisztencia terjedésének hátterében húzódó bonyolult molekuláris folyamatokat.

A. Rövidítésjegyzék

aa	aminosav (<i>amino acid</i>)
ABR/AMR	antibiotikum-rezisztencia/ antimikrobiális rezisztencia
ACSSuT	ampicillin-, kloramfenikol/florfenikol-, streptomycin-, sulfonamid- és tetraciklin-rezisztens fenotípus
cfu/ml	telepképző egység/ml (<i>colony forming unit/ml</i>)
CP	„coupling” fehérje
ddH ₂ O/MQ víz	duplán desztillált/Milli-Q ultratiszta víz
DR	direkt ismétlődés (<i>direct repeat</i>)
Eex	belépés kizárása (<i>entry exclusion</i>)
EMSA	elektroforetikus mobilitás-eltolódás vizsgálat (<i>electrophoretic mobility shift assay</i>)
GI	genomi sziget (<i>genomic island</i>)
ICE	integratív konjugatív elem (<i>integrative and conjugative element</i>)
IME	integratív mobilizálható elem (<i>integrative and mobilizable element</i>)
IS	inzerációs szekvencia (<i>insertion sequence</i>)
IR	fordított ismétlődés (<i>inverted repeat</i>)
HGT	horizontális géntranszfer
LA/LB	<i>Lysogeny</i> agar/ <i>Lysogeny</i> tápleves (<i>broth</i>)
MDR	multidrog-rezisztencia
MCS	polilinker régió (<i>multicloning site</i>)
MGE	mobilis genetikai elemek
MPF	<i>mating pair formation</i>
Mw	Molekulasúly marker (<i>molecular weight marker</i>)
OD	optikai denzitás
ON	egy éjszakán át (<i>overnight</i>)
oriT	transzfer origója
oriV	replikációs origó
ORF	nyitott leolvasási keret (<i>open reading frame</i>)
RDF	rekombinációs szabályozó faktor (<i>recombination directionality factor</i>)
rpm	percenkénti fordulatszám (<i>revolutions per minute</i>)
SOE-PCR	<i>splicing by overlap extension</i> -PCR
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PCR	polimeráz láncreakció (<i>polymerase chain reaction</i>)
RCR	gördülő gyűrű replikáció (<i>rolling circle replication</i>)
SGI1	<i>Salmonella</i> genomi sziget 1 (<i>Salmonella genomic island 1</i>)
TBE	tris-borát-EDTA puffer
TE	transzpozázibilis elem
tkj/d	transzkonjugáns/donor
Tn	transzpozon
T3SS/T4SS	bakteriális szekréciós rendszerek (<i>type 3/4 secretion system</i>)