

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biokémiai intézet

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Egy új diagnosztikai eljárás kifejlesztése bakteriális kórokozók
kimutatására rekombináns bakteriofágok segítségével

Development of a novel diagnostic method to detect bacterial
pathogens using recombinant bacteriophages

Avramucz Ákos Antal

Témavezető: Dr. Fehér Tamás

Tudományos főmunkatárs

Tartalomjegyzék

Publikációs lista.....	
Rövidítésjegyzék	
1. Bevezetés.....	1
2. Irodalmi áttekintés.....	3
2.1 A bakteriofágok életciklusa.....	3
2.2 A bakteriofágok felépítése	7
2.3 Bakteriofágok diagnosztikai célú felhasználása.....	8
2.3.1 <i>In vitro</i> fertőzés természetes bakteriofágokkal.....	11
2.3.2 <i>In vitro</i> fertőzés genetikailag módosított bakteriofágokkal.....	11
2.3.3 Immobilizált fágokon alapuló bioszenzorok	12
2.3.3.1 Elektrokémiai szenzorok	13
2.3.3.2 Magnetoelasztikus szenzorok.....	13
2.3.3.3 Raman spektroszkópián alapuló érzékelés	13
2.3.4 Bakteriofág alapú biokonjugátumok	14
2.3.5 További fejlesztési lehetőségek.....	15
2.4 T7 család, K1F	16
3. Célkitűzések	21
5. Felhasznált anyagok, módszerek.....	21
5.1 Baktérium és bakteriofág törzsek.....	21
5.2 Táptalaj és vegyszerek	22
5.3 Alapvető molekuláris biológiai technikák.....	23
5.4 Bakteriofág technikák	25
5.5 Plazmidok előállítása.....	26
5.6 Fág genom manipuláció	28
5.7 Luminometria	29
6. Kísérleti eredmények bemutatása.....	30
6.1 Lumineszcens jel generálására képes bakteriofágok tervezése	30
6.2 Az N-terminális nanoluciferázt kódoló K1F fágtörzsek szerkesztése	32
6.3 A C-terminális nanoluciferázt kifejező plazmidok konstrukciója.....	36
5.4 A rekombináns fágok funkcionális vizsgálata	38
5.4.1 A rekombináns fágok által generált lumineszcencia <i>in vitro</i> vizsgálata	38
5.4.2 A rekombináns fágok által generált lumineszcencia <i>in vivo</i> vizsgálata	41

5.4.2.1	A végponti lumineszcencia mérése a fág-sejt interakció során.....	41
5.4.2.2	A lumineszcencia kinetikus mérése a fág-sejt interakció során.....	43
5.4.2.3	A lumineszcencia eredetének bizonyítása.....	44
5.4.3	A modell diagnosztikai rendszer tesztelése.....	48
5.4.3.1	Fertőzés externális CnLuc jelenlétében.....	49
5.4.3.2	A modell érzékenységeinek tesztelése	51
6.	Diszkusszió.....	54
7.	Összefoglalás.....	63
8.	Summary	65
9.	Köszönetnyilvánítás	67
10.	Nyilatkozat	68
11.	Irodalomjegyzék.....	69
12.	Függelék	75

Publikációs lista

MTMT azonosító: 10081639

A doktori eljárás alapját képező 2 db közlemény:

Shukla RD, Zvara Á, **Avramucz Á**, Biketova AY, Nyerges A, Puskás LG, Fehér T. inPOSE: A Flexible Toolbox for Chromosomal Cloning and Amplification of Bacterial Transgenes. Microorganisms. 2022 Jan 21;10(2):236. doi: 10.3390/microorganisms10020236. PMID: 35208691; PMCID: PMC8875745.

Avramucz Á, Møller-Olsen C, Grigonyte AM, Paramalingam Y, Millard A, Sagona AP, Fehér T. Analysing Parallel Strategies to Alter the Host Specificity of Bacteriophage T7. Biology (Basel). 2021 Jun 20;10(6):556. doi: 10.3390/biology10060556. PMID: 34202963; PMCID: PMC8234382.

Közlemények az itt bemutatott munkáról:

Rapid, expression-free bacteriophage-based specific detection of target bacteria by conditional release of encapsidated reporter molecules (Preprint)

Tamas Feher, Akos Avramucz, Joseph Wheatley, Richard Amaee

<https://www.researchsquare.com/article/rs-5283843/v1>

Bacteriophage-based diagnostic test

Richard D. Amaee

UK: GB202413481D0

WIPO (PCT): WO2025149749A1

Rövidítésjegyzék

AhTC – anhidrotetraciklin

ATP – adenzin-trifoszfát

CFP – ciánkék fluoreszcens fehérje

CFU – kolónia képző egység

CPEC – Circular Polymerase Extension Cloning

CnLuc – C-terminális nanoluciferáz enzimtöredék

DNS – dezoxiribonukleinsav

dNTP – dezoxiribonukleotid-trifoszfát

EDTA – etilén-diamin-tetraecetsav

GFP – zöld fluoreszcens fehérje

ICP – internális kapszid fehérje

IPTG – izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid

LB – Luria-Bertani táp

NnLuc – N-terminális nanoluciferáz enzimtöredék

PCR – polimeráz láncreakció

PFU – plakk képző egység

qPCR – kvantitatív polimeráz láncreakció

RBS – riboszóma kötőhely

RT-PCR – valós idejű polimeráz láncreakció

RNS – ribonukleinsav

RPM – percenkénti fordulatszám

TBE – Tris-borát-EDTA

UP – desztillált és ioncserélt (Ultra Pure) víz

1. Bevezetés

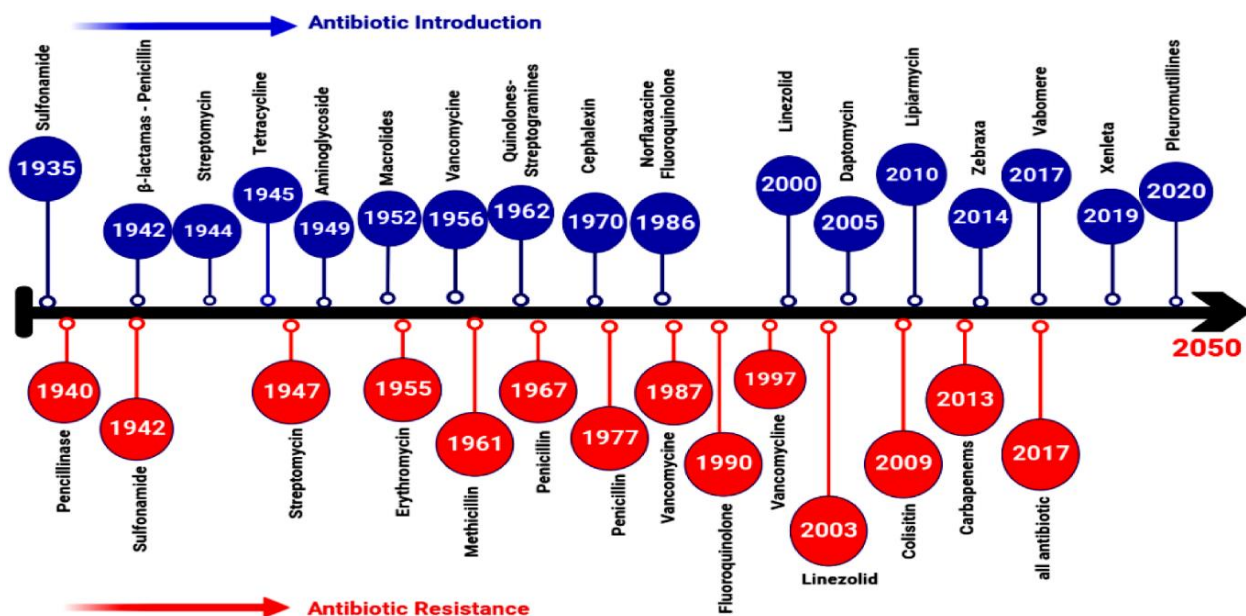
A bakteriofágok baktériumokat fertőző vírusok. Rendkívül kis méretük miatt csupán 1915 óta tudunk a fágok létezéséről, azonban minden jel arra utal, hogy egyszerre, vagy közel egy időben jöttek létre az első élő sejtekkel és mára a legszámosabb biológiai entitások a Földön (Calendar and Abedon, 2005) (Arivarasan, 2023). Ez következképpen azt jelenti, hogy a predáció-élősködés jelensége nem az eukarióta sejtekkel kezdődött, az első élő sejtek nem csak egymással és a környezeti viszonytágókkal versenyeztek, hanem már virális ágenseknek is kiszolgáltatótá váltak. Egyes kutatások szerint ma a Föld teljes bioszférájában megtalálható összes baktérium fele kétnaponta bakteriofággal fertőződik és ennek következtében elpusztul (Shkoporov, Turkington and Hill, 2022).

Minden jel arra mutat, hogy minden környezetben, ahol baktériumok élnek, az azokat parazitáló fágok is megtalálhatóak. Igaz ez az egészen extrém körülményeket felvonultató élőhelyekre is: például izlandi gejzírekben egy teljes bakteriofág családot fedeztek fel, melyek 1 óra 120 °C-os autoklávozás után is stabilak és fertőzőképesek (Zillig *et al.*, 1988).

Az evolúció logikája egy évmilliárdok óta tartó fegyverkezési versenyt eredményezett baktériumok és bakteriofágok; gazdatestek és élősködők között. A baktériumok védekezése elsősorban a vírusok által felismert és azok kikötődésére szolgáló sejt felszíni struktúrák megváltozásán alapult. Az egymástól elkülönült fejlődési pályára került baktériumfajok végsősoron nagy mértékben specializálódott bakteriofágokat eredményeztek. Egy-egy fág csak kis számú - gyakran egyetlen - baktériumtörzs fertőzésére képes (Ross, Ward and Hyman, 2016).

A baktériumokat fertőző vírusokra először Frederick Twort figyelt fel 1915-ben, majd két évvel később Félix d'Hérelle nevezte el ezen entitásokat bakteriofágoknak. Az első terápiás alkalmazások az utóbbi nevéhez fűződnek; először baromfi szalmonella fertőzést kezelt sikeresen, majd kiterjesztette terápiás protokollját emberi páciensekre is (Häusler, 2006). A fágterápiára hamar felfigyelt a korabeli orvostudomány, azonban a pontos kórokozó törzs azonosításának pontatlansága gyakran vezetett kaotikus és nehezen reprodukálható terápiás eredményekhez, aminek következtében a bakteriofágok terápiás alkalmazása soha nem tudott igazán elterjedni. A végső csapást a penicillin 1928-as felfedezése jelentette. Ez, az 1932-ben leírt szulfonamidok, majd a hamarosan felfedezett többi antibiotikum (1. ábra) jól karakterizálható vegyületek révén egyértelműen előnyösebb terápiás szernek ítéltettek, mint az akkor még mindig gyerekcipőben járó

bakteriofág koktélok. A szélesspektrumú antibiotikumokkal elhárult a pontos kórokozó azonosításának terhe is, noha ennek előre nem látott negatív következményei voltak a bélflóra egészségére (Patangia *et al.*, 2022). A 20-ik század így az antibiotikumok korát hozta el, újabb és újabb vegyületek felfedezésével, miközben a fágterápia a nyugati világban feledésbe merült, mint egy egzotikus, megbízhatatlan és kaotikus eredményeket produkáló módszer.



1. ábra: A baktériumok elleni küzdelem mérföldkövei. Felül: az egyes antibiotikumok használatának évszámai.

Alul: az adott antibiotikum elleni rezisztencia megjelenése a klinikumban (forrás: Helmy *et al.* Antibiotics 2023, 12(2), 274)

Az antibiotikumok széleskörű és gyakran indokolatlan használata azonban a rezisztens patogén baktériumtörzsek gyors terjedését idézte elő (1. ábra). Az 50-es évekbeli “antibiotikum aranykor” már a múlt kódéba vezett, az utolsó új antibiotikum családot a 90-es években engedélyezték. A könnyen hozzáférhető antibiotikumforrások kimerülése az új vegyületek fejlesztését egyre drágábbá teszi, a várhatóan kialakuló antibiotikum-rezisztencia pedig kérdőjelessé teszi a befektetés anyagi megtérülését. A gyógyszeripar nagy szereplői ezen okokból kifolyólag kutatási forrásaikat inkább más, gyorsabb és nagyobb anyagi megtérüléssel kecsegtető területekbe fektetik. Ez a 21. század egyik, ha nem a legnagyobb, egyre súlyosbodó egészségügyi problémája (O’Neill, 2014).

Az antibiotikumok hatékonyságának csökkenése, valamint a molekuláris biológia eszköztárának gyors fejlődése a bakteriofágkutatás reneszánszát hozta el. Habár a fágterápia nagyszabású áttörése még várat magára, a tudományos közélet egyre fokozódó érdeklődést mutat

a nem terápiás célú felhasználás felé is (Arivarasan, 2023). Jelen munka témája egy bakteriofágokon alapuló innovatív diagnosztikus rendszer fejlesztése.

A közelmúlt globális egészségügyi kríziseiből levonható egyik legfontosabb tanulság, hogy szükség van egy felhasználóbarát, gyors és olcsó diagnosztikus tesztre, mellyel felmérhető a krízis súlyossága és terjedési dinamikája. Nyilvánvaló, hogy az izolációs-tenyésztéses eljárások nem képesek teljesíteni ezeket a követelményeket. A molekuláris biológiai megközelítések gyors és pontos eredményeket adnak, azonban a polimeráz láncreakciót felhasználó tesztek, különösen a qPCR és RT-PCR tesztek drága berendezéseket, képzett személyzetet és nagy körültekintéssel kialakított laborkörnyezetet igényelnek, míg a manapság elterjedt immunreakció alapú eljárásokat a szükséges antitestek ára, nem kielégítő érzékenysége és rendelkezésre állása hátráltatja.

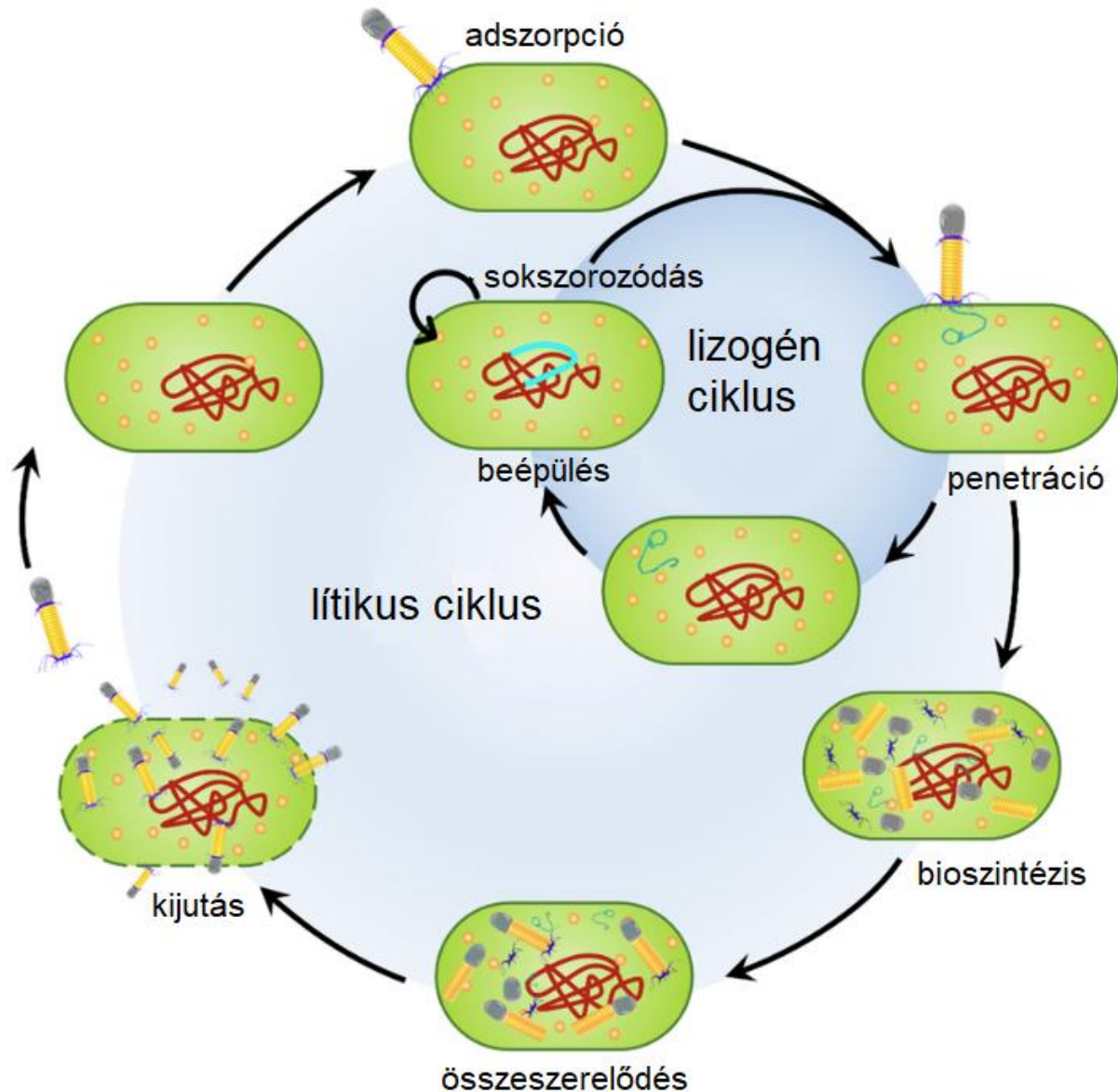
Az elmúlt évtizedben nagy érdeklődés bontakozott ki a bakteriofág-alapú diagnosztikus eljárások iránt. A bakteriofágok könnyen, olcsón és gyorsan előállíthatóak, ellenállóak a biológiai mintákra jellemző szennyeződésekkel szemben és - a megfelelő faj kiválasztásával - beállítható a specifitásuk. A fág-alapú diagnosztikus eljárásokban sokféle megközelítést járnak körül a korábbi kutatások. Az egyik ezek közül a genetikailag módosított vírusok használata, melyek specifitásuktól függően csak a célbaktérium jelenlétében képeznek valamilyen mérhető jelet a bakteriális bioszintetikus masinéria felhasználásával.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A bakteriofágok életciklusa

A bakteriofágok - egyéb vírusokhoz hasonlóan - csak bizonyos megkötések mellett tekinthetőek élőlényeknek. Sejtekre jellemző folyamatokkal egyáltalán nem rendelkeznek, a fertőzési folyamat megkezdéséig gyakorlatilag intakt makromolekulákként viselkednek. Önmaguk sokszorosítására bakteriális célszervezeteik sejtes folyamatait használják fel, azokon élőködnek. A bakteriofág-célszervezet kapcsolat az esetek többségében nagyfokú specifitással rendelkezik, sokszor egy adott fág csak egy baktériumfaj egy-egy törzsét képes fertőzni. Az adszorpciót megelőzően a célbaktériumok specifikus felszíni struktúráit ismerik fel, leggyakrabban az úgynevezett farokrost régió kifejezett fehérjemotívumok segítségével (Sorokulova, Olsen and Vodyanoy, 2014). Az adszorpciót egy virion-citoplazma csatorna létrehozása követi, melyen

keresztül a virális genom a részben passzív, részben aktív folyamat lezajlását követően végül teljes egészében a baktériumba kerül.



2. ábra: Bakteriofágok replikációs stratégiái (Bisen et al., 2024, módosítva)

A genom sejten belüli sorsa alapján alapvetően kétféle bakteriofágot, illetve sokszorozódási stratégiát különböztetünk meg: a lítikus, illetve a temperált fágokat. A lítikus stratégia a célszervezet folyamatait a lehető legnagyobb mértékben a fágok sokszorozódásának veti alá, és végsősoron a baktérium lízisén keresztül bocsát ki 50-200, újbóli fertőzésre kész viriont. Az obligát lítikus bakteriofágok képezik a hagyományos fágterápia alapját, és egyéb egészségügyi

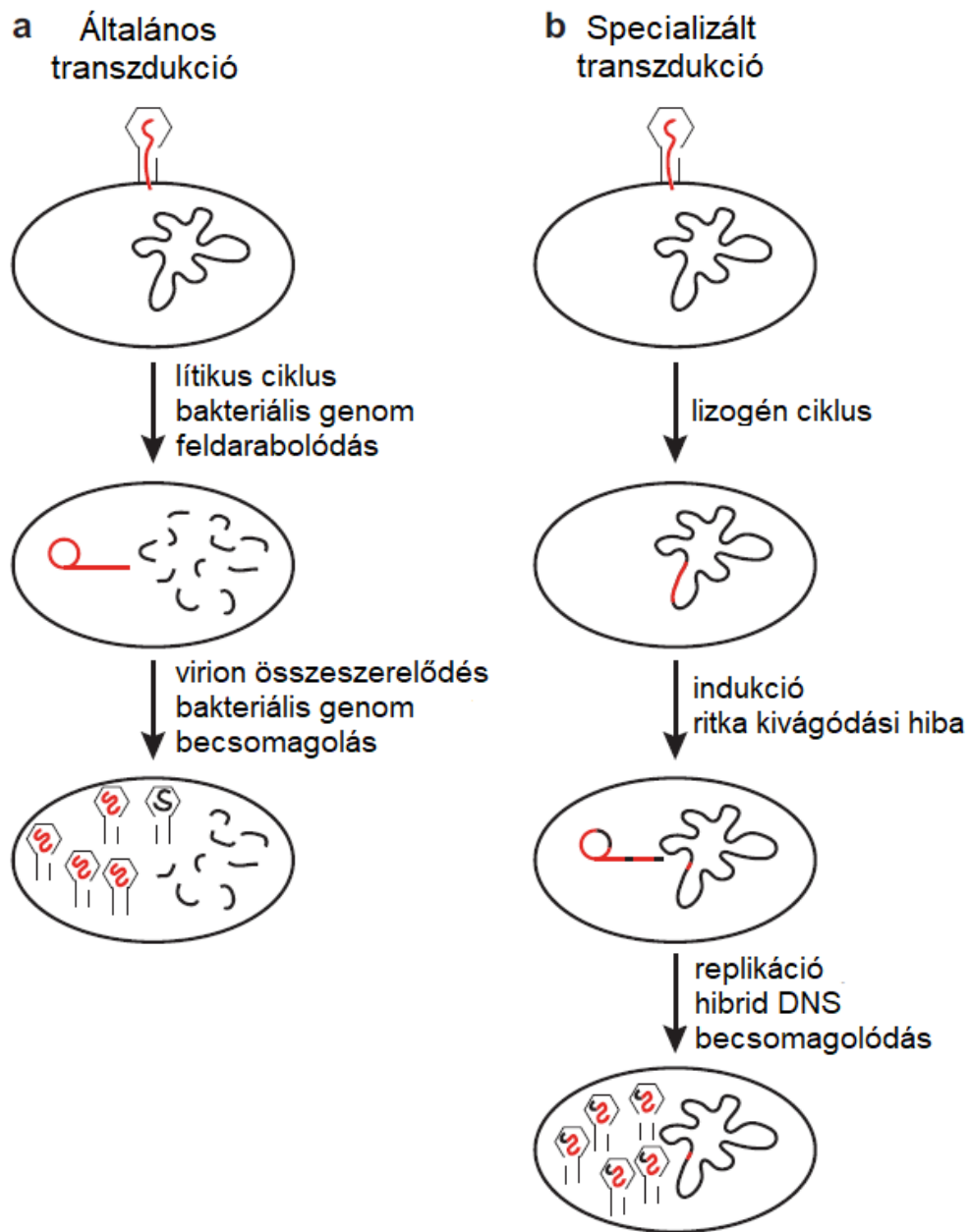
felhasználások is elsősorban ezekre koncentrálnak (Orlova, 2012). Tipikus obligát lítikus fajok a T7 család tagjai, így például az ezen kutatás alapjául szolgáló K1F is.

A temperált stratégia ezzel szemben a fág örökítőanyagának baktérium genomba épülésével biztosítja a hosszútávú fennmaradást. A beépült fággenom, másnéven profág a baktériummal együtt osztódik, majd valamilyen környezeti behatás következtében indukálódik, kivágódik és lítikus ciklusba lép. A fág örökítőanyagot hordozó sejt rezisztenssé válik azonos faj, illetve egyes esetekben a közeli rokon fág-fajok fertőzésével szemben. A temperált fágok egy spektrumot alkotnak, attól függően, hogy a fertőzési esemény adott körülmények között mekkora eséllyel jár a lizogén ciklusba lépéssel. Tipikus képviselőjük a P1, melynek léteznek elsősorban lizogén, és elsősorban lítikus (hipervirulens) törzsei is. Utóbbiakat a molekuláris biológiában generalizált DNS-transzdukcióra használjuk (lásd alább) (Calendar and Abedon, 2005 IV/24).

Mind a lítikus, mind a temperált fágok képesek idegen DNS fágfejbe csomagolására, és recipiens baktériumokba juttatására. Ez a folyamat a transzdukció, melynek két formáját különböztetjük meg (Schneider, 2017).

A generalizált, vagy általános transzdukció során a lítikus ciklus során feldarabolódott gazdasejt eredetű genomi-, vagy plazmid DNS darabok közül egy, a fertőzésben résztvevő bakteriofág genomjával megközelítőleg megegyező méretű DNS szegmens csomagolódik a kapszidba. Az így létrejött defektív fág intakt kapsziddal rendelkezik, ezáltal képes a fertőzésre, azonban a megfelelő örökítőanyag hiányában önmaga sokszorosítására képtelen. A becsomagolódott idegen DNS töredéket viszont részben vagy egészben képes beinjektálni a megfertőzött sejtbe, ezáltal intakt géneket vagy akár egész génklasztereket bejuttatva az úgynevezett horizontális géntranszfer során a közeli rokon baktériumokba. A generalizált transzdukcióra mind a lítikus, mind a lizogén (de lítikus ciklusba lépett) bakteriofágok képesek. (Schneider, 2017).

Specializált transzdukcióra ezzel szemben csak a lizogén bakteriofágok képesek. Ennek során a bakteriális genomba beépült profág reaktivációja során tökéletlenül vágódik ki és ezáltal egy baktérium-bakteriofág hibrid DNS molekula csomagolódik be a fágfejbe. Az általános transzdukcióval ellentétben specializált transzdukció során csak a bakteriális genom meghatározott, profág inszerciós pontok közelében elhelyezkedő DNS szakaszai vihetők át (Schneider, 2017).



3. ábra: Transzdukció fajtái (Schneider, 2017, módosítva)

A fágtranszdukció evolúcióbiológiai jelentősége óriási, mivel a baktériumok vertikális öröklődése során megfigyelhető, általában kismértékű mutációs ráta mellé mechanizmust biztosít egy sokkal drasztikusabb génállomány-változásra is. E jelenség, melyet horizontális vagy laterális géntranszfernek is hívnak, az antibiotikum-rezisztencia gyors terjedésében betöltött szerepe miatt is a kutatások középpontjában áll. Munkám alkalmazott jellege révén azonban a transzdukció evolúciós szerepénél annak biotechnológiai vonatkozásai még inkább relevánsak. A transzdukció

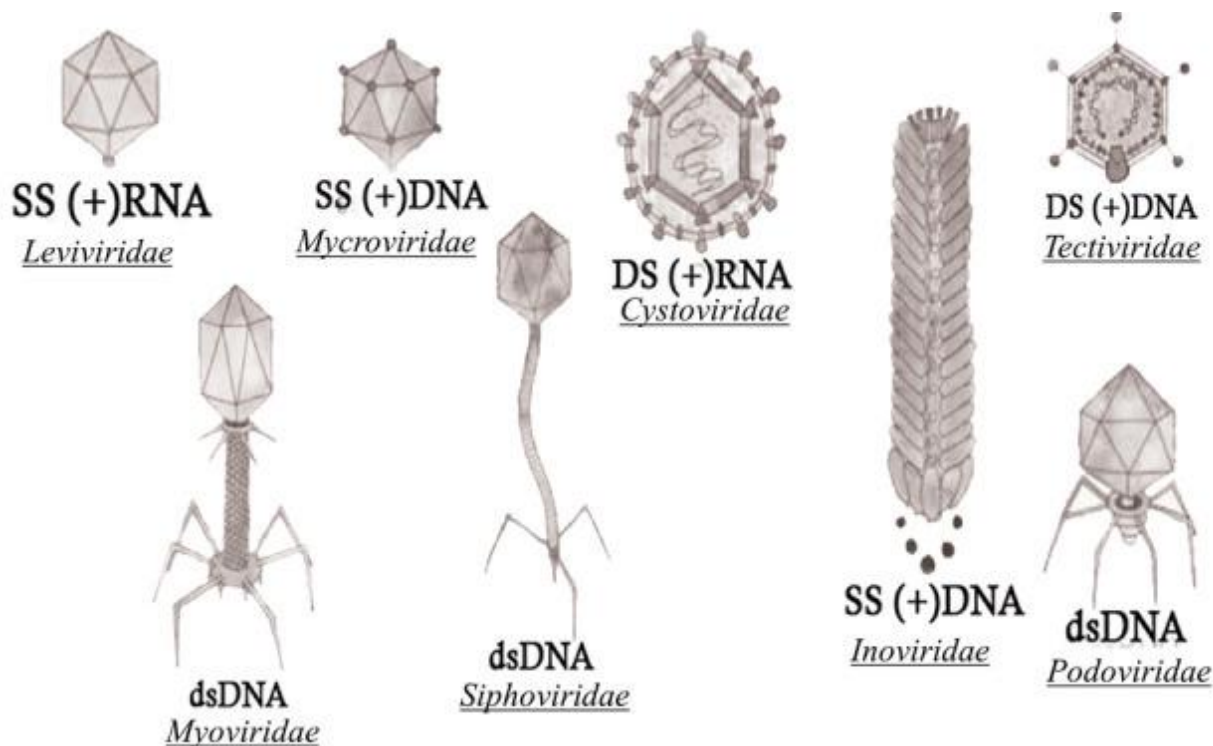
egykoron fontos eszköze volt a bakteriális genomok térképezésének (Björk, 1975) és még inkább manipulációjának, azaz a megfelelő genotípusú baktériumtörzsek előállításának (Miller, 1977). A *cos*-szekvenciával bíró plazmidok, az ún. cosmid-ok λ -fág kapszidba csomagolva korábban népszerű eszközei voltak a DNS klónozásnak és genomi könyvtárkészítésnek (Collins and Hohn, 1978). Ma az ilyen önreplikációra képtelen fágok transzdukáló részecske néven találnak funkcióra új molekuláris biológiai eljárásokban. Ilyen eljárás pl. a GOTraP, amely meglévő fág farokrostok mutagenézisével új bakteriális törzseket tesz transzdukciós célponttá (Yosef *et al.*, 2017), vagy a DEEPMINE, mely segítségével jóval tágabb bakteriális fajspektrumban végezhetők funkcionális metagenomikai screenek, mintha egyszerű DNS-transzformációt használnánk (Apjok *et al.*, 2023).

2.2 A bakteriofágok felépítése

A bakteriofágok a végletekig alkalmazkodtak életstílusukhoz. Felépítésük egyszerű, a virion arra optimalizálódott, hogy a megfelelő körülmények megléte esetén a megfertőződött sejt gyorsan, nagy mennyiségű fág részecskét tudjon előállítani. Bár természetes körülmények között a részecskék nagy része darabjaira hullik a célbaérés előtt a dehidratáció, az UV sugárzás és egyéb behatások miatt, néhány fertőzőképes marad amíg megfelelő gazdasejtre talál (Calendar and Abedon, 2005 I/5).

A bakteriofágok eredete még napjainkban is homályos, ezért osztályozásuk is nehézkes. A ma elfogadott osztályozási rendszer (4. ábra) a fágok felépítésén és azon a megalapozott feltételezésen alapul, hogy a felépítés hasonlósága fordítottan arányos az evolúciós távolsággal. Fontos megjegyezni, hogy ez a megközelítés nem tökéletes, és egyes közelmúltban felfedezett, osztályokon átívelő tulajdonságokkal rendelkező fajok nyilvánvalóvá teszik a korlátait (Calendar and Abedon, 2005 I/2).

A bakteriofágok alapvetően fehérjékből és nukleinsavláncokból épülnek fel. A nukleinsav lehet RNS vagy DNS, lehet egyes vagy többes szálú, és a sejtes szervezetekhez hasonlóan ez tölti be az örökítőanyag szerepét. Az örökítőanyag egy fehérjeburokba, kapszidba csomagolódik, így megóvva azt a külső behatásokkal szemben. A kapszid apróbb részegységekből, spontán szerelődik össze. A virion bináris-, kubikális- vagy helikális szimmetriával rendelkezik, habár létezik közelmúltban osztályozásba vett, tucatnyi fajt magába foglaló pleiomorf, vagyis szimmetria (és kapszid) nélküli rend is.



4. ábra: Bakteriofágok formai változatossága (Anpilogov *et al.*, 2020)

2.3 Bakteriofágok diagnosztikai célú felhasználása

Néhány fertőző betegség annyira látványos és jellegzetes tüneteket produkál, hogy különösebb laborvizsgálatok nélkül, ránézésre azonosítható, vagy legalább csoportdiagnózisba sorolható. A veszélyes kórokozók többsége azonban gyakran szofisztikáltabb, de mindenképp pontosabb diagnosztikus eljárásokat igényel (Parsons, 1974).

A jelenlegi egészségügyi protokollok többnyire az évszázados múltra visszatekintő tenyésztés – telepmorfológia – Gram festés – mikroszkópia kombinációjára, vagy - főleg virális fertőzéseknél - a szerológias diagnózisra hagyatkoznak. Az elmúlt évtizedekben vált bevett eljárássá a PCR alapú kórokozó azonosítás, melyet először 1987-ben alkalmaztak klinikai laborokban HIV diagnózis felállítására (Lakshmi *et al.*, 2011).

Ezek a protokollok képzett személyzetet, jól felszerelt laboratóriumokat és viszonylag hosszú időt vesznek igénybe. A legelterjedtebb tenyésztési eljárás több nappal késlelteti a diagnózis felállítását és a helyes kezelés megkezdését. A szerológiai diagnózis fő limitációja az érzékenység, elsősorban a kimutatható ellenanyag mennyiségének időbeli fluktuációja miatt,

valamint a rendelkezésre álló specifikus ellenanyagok korlátozott rendelkezésre állása is hátráltatja. Ennek ellenére a nagyfokú specifitás és miniatürizálhatóság miatt számos szerológián alapuló úgynevezett betegség melletti (bedside) diagnosztikus kit van forgalomban.

A PCR amplifikáción alapuló protokollok nem tudnak különbséget tenni élő és inaktív kórokozók között, továbbá a kellő hatékonyság eléréséhez nagy körültekintéssel kell kiválasztani a kimutatandó - és az adott kórokozóra specifikus - DNS szegmenseket minden egyes vizsgálni kívánt törzsre, különben az újonnan létrejött vagy azonosítatlan törzsek és mutánsok fals-negatív jelet adhatnak. A qPCR módszerek gyors átfutással, jó specifitással és nagyon jó szenzitivitással kecsegtetnek, azonban a szükséges reagensek és a kellőképpen felszerelt laborok, illetve az azokat megtöltő személyzet elérhetősége hátráltatja az alkalmazást (Yang and Rothman, 2004).

Ígéretes kutatási terület a bioszenzor-alapú diagnosztika. Ezen módszerek egy specifikus érzékelő-felületen, valamint egy jeltovábbító rétegen alapulnak, mely a patogén kötődést valamilyen érzékelhető - leggyakrabban elektronikus - jellé alakítja. A bioszenzoroknak, és azokon belül a pathogéneket detektáló rendszereknek igen széles szakirodalma van, tekintettel a felismerő- valamint a jelátalakító komponenseik változatos megoldásaira (Banakar *et al.*, 2022). Munkám szempontjából azok a rendszerek relevánsak, ahol a felismerő mechanizmus a fág-baktérium kapcsolódáson alapul. Az ilyen típusú bioszenzorokat, és a hozzájuk tartozó jelátalakító megoldásokat a későbbiekben tárgyalom.

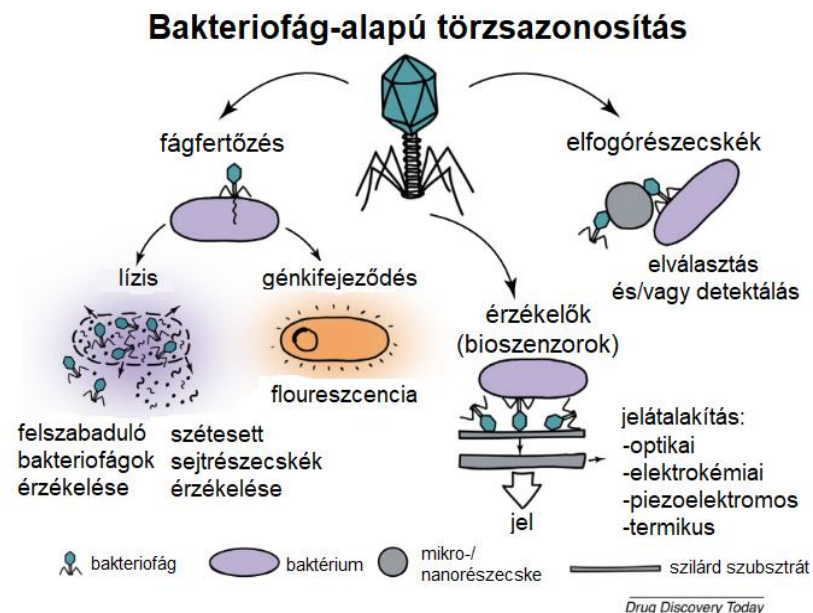
Az elmúlt években egyre nagyobb tudományos érdeklődés mutatkozik a bakteriofág alapú diagnosztikus eljárások iránt, mint az immunreakción alapuló gyors tesztek vonzó alternatívája (Singh *et al.*, 2012). A bakteriofágok életmódjának ismeretében kézenfekvő fejlesztési célpontot nyújtanak. Rendkívüli fokú felépítésbeli sokszínűségük és változatos egyéb tulajdonságaik rengeteg lehetőséget rejtnek magukban. Olybá tűnik, minden célbaktériumra lehet találni egy megfelelő - azonosított, vagy még azonosítatlan - bakteriofágot, vagy bakteriofág halmazt. Néhány alább ismertetett megközelítésnek még a felhasznált, adott patogént célzó fág pontos azonosítása sem előfeltétele. Némely bakteriofág csupán egyetlen faj egyetlen törzsén képes élősködni, míg mások több törzset, vagy akár több baktériumfajt is fertőznek (Ross, Ward and Hyman, 2016). Emellett olyan gyakorlati előnyökkel is alátámasztható a fág-alapú diagnosztikumok fejlesztése, mint a fágok környezeti hatásokkal, például a magas hőmérséklettel (Brigati and Petrenko, 2005), szélsőséges pH értékekkel (Nobrega *et al.*, 2016) és oldószerekkel (Olofsson, Ankarloo and Nicholls, 1998) szembeni viszonylagos robusztussága és az ipari méretekre is könnyen adaptálható

előállítás, ami gyakorlatilag egy batch-fermentációban felnevesztett baktériumkultúra “lefertőzése”, majd a létrejött lizátum downstream kívánalmaknak megfelelő tisztítása. Összefoglalva, a bakteriofágok kiváló jelölteknek ígérkeznek biológiai reakciókon alapuló, újszerű diagnosztikus eljárások kifejlesztésére.

A bakteriofágokon alapuló diagnózis lényege a fágokra jellemző gazdaspecifitás. A fágok alkalmazásának számos további előnye van, úgymint:

- olcsó, könnyen felskálázható előállítás
- képesek életképes és inaktív kórokozók közötti különbségtételre
- kevésbé érzékenyek a minták szennyezettségére
- jeltovábbítás mellett jelerősítésre is képesek

Jelenleg négy jól elkülöníthető stratégia van. *In vitro* fágfertőzés természetes bakteriofágokkal, *in vitro* fágfertőzés genetikailag módosított bakteriofágokkal, bakteriofág alapú bioszenzorok, illetve a bakteriofág alapú biokonjugátumok használata. Ezeket az alábbiakban részletesebben is bemutatom.



5. ábra: Bakteriofág alapú diagnózis stratégiák (Richter *et al.*, 2018, módosítva)

2.3.1 *In vitro* fertőzés természetes bakteriofágokkal

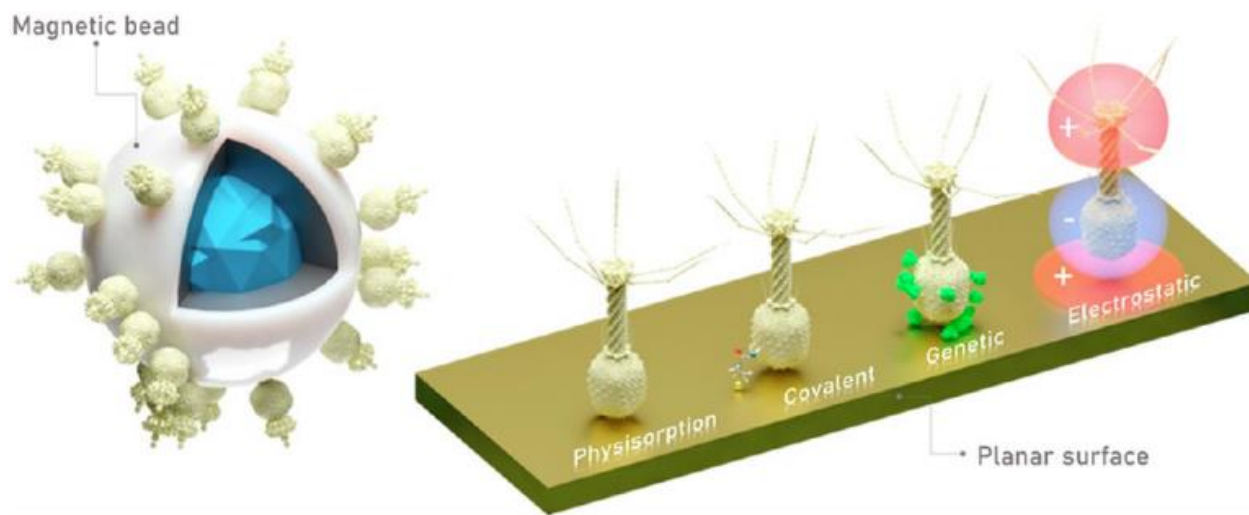
A legegyszerűbb a mintavételt követően a gyanított kórokozóval szemben hatékony fágoktól való *in vitro* fertőzés. A sikeres fertőzés a sejtek líziséhez vezet, és felszabaduló fágokat, vagy a tömeges lízis által előidézett változásokat, például vezetőképesség változást okoz, amely megfelelő eljárásokkal érzékelhető. Az alacsony érzékenység miatt rendszerint mérés előtt egy tenyésztési, inkubációs lépéssel meg kell növelni a detektálendő baktériumok mennyiségét. A módszer nagyszerűsége egyszerűségében rejlik. Mivel áttételesen a lízis ténye kerül érzékelésre, nincs szükség a bakteriofágok bármilyen módosítására, vagy bármilyen bonyolult, hosszadalmas és drága előkészítő folyamatra. Valójában a használt fág azonosítására sincs szükség, azok bármikor újonnan izolálhatók például kórházi szennyvízből (Farooq *et al.*, 2020), vagy környezeti mintákból (Yan *et al.*, 2017), ami által könnyen és gyorsan adaptálni lehet a diagnosztikus berendezést a helyi viszonyokhoz. A megközelítés hátrányai az erőteljes függőség a detektálendő baktériumok mennyiségétől, valamint az értelemszerűen felmerülő követelmény, hogy kizárólag lítikus fágok felhasználásával alkalmazható.

2.3.2 *In vitro* fertőzés genetikailag módosított bakteriofágokkal

Egy másik módszer a bakteriofágok genetikai, vagy tranziens módosítása, annak érdekében, hogy a megfertőzött sejtekben a vírusgenom mellett vagy helyett valamilyen könnyen mérhető jelet, például fluoreszcenciát vagy lumineszcenciát eredményező fehérje termelését kódolják. Ezen megközelítés nagy előnye, hogy a vírusokra alapvetően jellemző életstratégiát - vagyis, hogy átveszik az irányítást a fertőzött sejt transzkripciós-transzlációs masinériái felett, a virionban hordozott genomi szekvenciák nagymértékű kifejeztetése érdekében - használja fel a diagnózis alapjául szolgáló jel sokszorosítására, ezáltal az érzékelési küszöb drasztikus csökkentésére. A stratégia legnagyobb hátránya, hogy a felhasználni kívánt bakteriofágot azonosítani, és ha nem áll rendelkezésre pontos szekvencia, szekvenálni kell, majd minden egyes esetben meg kell tervezni és el kell végezni a DNS-manipulációs munkát. A patogén baktériumtörzsek sokfélesége és a fágok viszonylag szűk specifikációja miatt ez nagyszámú drága és időigényes fág-manipulációs projektet jelent. További, gyakori hátrány a módosított bakteriofágok csökkent életképessége, habár ez általában a megfelelő tervezéssel kiküszöbölhető, vagy legalábbis nagyban mérsékelhető (Pires *et al.*, 2016).

2.3.3 Immobilizált fágokon alapuló bioszenzorok

Alaposan körüljárt megközelítés a fágok immobilizálása szilárd felületen, érzékeny bioszenzort képezve. A virionok szilárd felülethez kötése számos módon kivitelezhető. A fiziszorpciós megközelítés a legegyszerűbb, másodlagos kötődésen, a van der Waals erőn alapul. A kemiszorpciós immobilizálás kovalens kötődést használ, rendszerint valamilyen tranzienst módosítással létrehozva a virion és a felület közötti kapcsolatot. Ennek szofisztikáltabb változata a bakteriofág genetikai módosítása, annak érdekében, hogy az valamilyen tag-et fejezzon ki a kapszidon, majd az erre a tagre jellemző elfogómolekula segítségével immobilizálódjon a felületen. Jól ismert kölcsönhatások az avidin-biotin és a streptavidin-biotin spontán kapcsolódása. Egy teljesen másik megközelítés az elektrosztatikus immobilizálás, ami a bináris bakteriofágok azon általános jellemzőjét használja ki, miszerint a kapszid negatív, míg a farokrostok pozitív össztöltéssel rendelkeznek, tehát a fágfejet bevonzza a pozitív töltésű felület. Ez egyúttal a virion orientálására is lehetőséget ad (O'Connell, Marcoux and Roupioz, 2021). A baktériumok kötődésének jelle alakítására eddig három módozatot dolgoztak ki: elektrokémián, magnetoelasztikus szenzorokon, valamint az úgynevezett felületerősített Raman-spektroszkópián alapuló eljárásokat.



6. Bakteriofág immobilizálási stratégiák (O'Connell, Marcoux and Roupioz, 2021)

2.3.3.1 Elektrokémiai szenzorok

Az elektrokémiai megközelítés az elektródon immobilizált fágokon alapul. A baktériumok bekötődése változást okoz az elektromos jelben, ami könnyedén érzékelhető, főleg, hogy nincs szükség jelátalakításra, a megváltozott áramerősség vagy feszültség közvetlenül érzékelhető. Ez az út tűnik a legígéretesebbnek, mivel az elektrokémián alapuló bioszenzorok könnyen miniatürizálhatóak, illetve viszonylag olcsón előállíthatóak. Az irodalomban számos példa található erre a megközelítésre, egy esetben 14 CFU/ml érzékelési határt is elérve egy coliform baktériumokat általánosan fertőző bakteriofág felhasználásával (Sedki *et al.*, 2020).

2.3.3.2 Magnetoelasztikus szenzorok

A magnetoelasztikus szenzorok rendszerint amorf ferromágneses szalagok, melyek indukció hatására vibrálnak, mely mikrovibráció detektálható másodlagos mágneses teret indukál. Ezen szalagokon immobilizált bakteriofágok a baktérium-befogás hatására megváltoztatják a szenzorok tömegét, mely megváltoztatja a szalagok mikrovibrációs mintázatát és végső soron detektálható különbséget okoznak a másodlagos mágneses térben (Paczesny, Richter and Hołyst, 2020). Ez a stratégia viszonylag rövid idő alatt képes diagnosztikus eredményt adni, noha az érzékelési határ eléréséhez az elektrokémiai alapú teszteknel több baktériumra van szükség a mintában. A magnetoelasztikus szalagok viszonylag felhasználóbarátak, Chen és munkatársai például egy olyan szenzort fejlesztettek ki, mellyel *Salmonella*-fertőzést lehet kimutatni nyers csirkehúsból. A mintavételhez egyszerűen a húshoz kell nyomni a szalagot (Chen *et al.*, 2017).

2.3.3.3 Raman spektroszkópián alapuló érzékelés

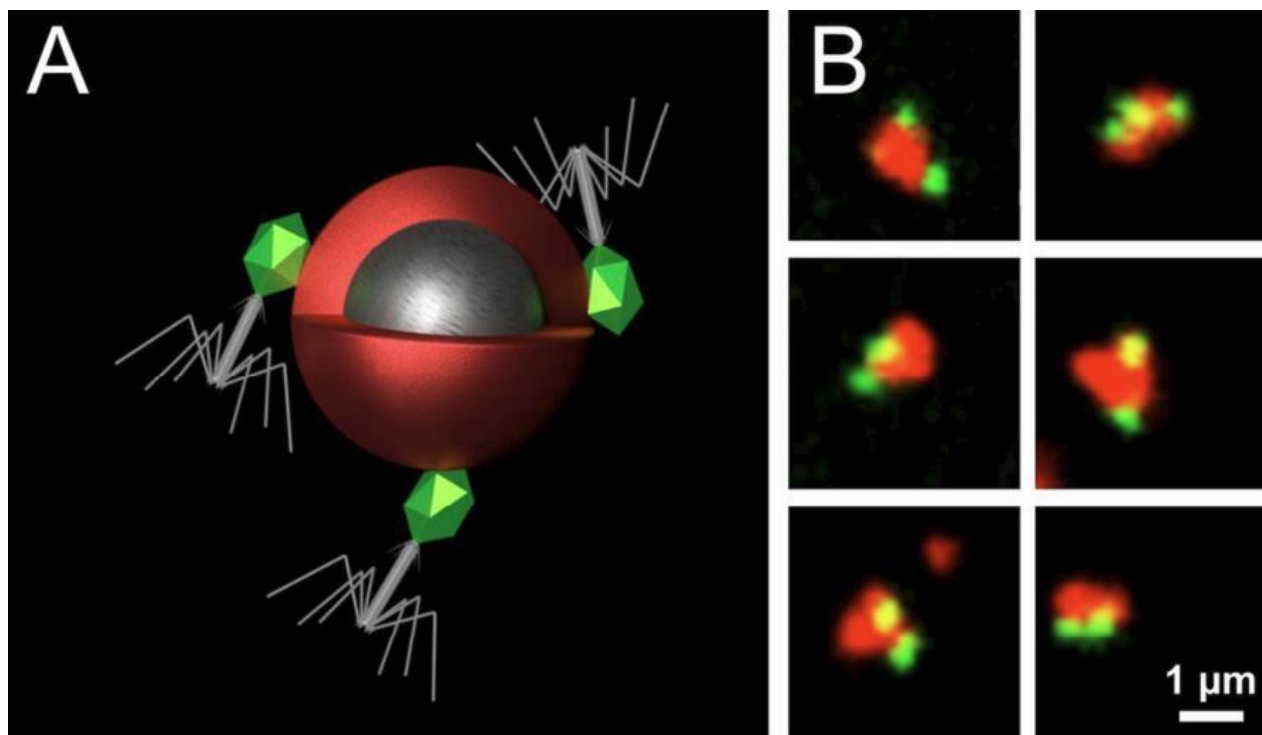
A felületerősített Raman-spektroszkópia egy olyan analitikai eljárás, amely fémfelületek lokalizált felületi plazmonrezonanciáját használja fel az úgynevezett Raman-szórás nagymértékű felerősítéséhez. Ezen módszerrel lehetőség nyílik akár egyedi molekulák érzékelésére is (Yu *et al.*, 2020). Az olyan nagyobb részecskék esetén azonban, mint a bakteriofág-baktérium komplexek, az érzékelés elé bizonyos nehézségek gördülnek, amennyiben a nagyobb méretű részecskék értelemszerűen csökkentik az adott méretű felületen elérhető reakciók számát (Paczesny, Richter and Hołyst, 2020). A közelmúltban Rippa és munkatársai plazmonikus nanoöregéből álló

szubsztrátot fejlesztettek ki, amely immobilizált bakteriofágréteget tartalmazott és a speciális geometria miatt megnövelte a leadott jel erősségét (Rippa *et al.*, 2018).

A bakteriofágok immobilizálásával nyert bioszenzorok meglehetősen érzékenyek, és általában gyors mintafeldolgozást tesznek lehetővé, azonban a gyakorlati felhasználás várat magára. Az érzékelőfelület felépítésének ipari léptékű felskálázása túl bonyolultnak bizonyult, ráadásul a laborban előállított bioszenzorok az idő múlásával gyorsan veszítenek stabilitásukból (Richter *et al.*, 2018).

2.3.4 Bakteriofág alapú biokonjugátumok

A negyedik stratégia biokonjugátumok képzése, amelyeket módosított bakteriofágok és mikro-, vagy nanopartikulomok alkotnak. A fágok ebben az elrendezésben elfogórészecskékként használhatók, majd miután specifikusan kötődtek a gazdasejtekhez, a részecskék kiválaszthatók a reakciós kamrából. Ez a megközelítés megnöveli az érzékelési felületet a szilárd felületen immobilizált bakteriofágokhoz képest, valamint lehetőséget biztosít a jel koncentrálására is (Richter *et al.*, 2018).



7. ábra: Bakteriofág alapú magnetikus biokonjugátumok sematikus (A) és mikroszkópiás (B) ábrázolása (Janczuk *et al.*, 2017)

Peng és munkatársai hozzáférhető tiolcsoportokkal rendelkező módosított M13 bakteriofágokat reagáltattak patogéneket tartalmazó mintával, majd a kötődés létrejötte után centrifugálással koncentrálták a reakciós elegyet. Arany nanopartikulomok hozzáadása után a tiolcsoportok spontán kapcsolódnak és - baktériumok jelenléte esetén - mérhető színváltozás alakult ki (Peng and Chen, 2019). Janczuk és munkatársai fluoreszcens-mágneses részecskékhez kapcsoltak kovalensen bakteriofágokat, majd a baktériumokat tartalmazó mintával történt reakció után magnetikus úton feldúsították a keveréket, ami így alkalmassá vált áramlási citometria alapú fluoreszcencia-mérésre. Az áramlási citometriás analízissel elkülöníthetők a negatív mintákra jellemző egyedi fluoreszcens részecskék a pozitív mintákban megjelenő nagyméretű, keresztkötött komplexektől (Janczuk *et al.*, 2017).

2.3.5 További fejlesztési lehetőségek

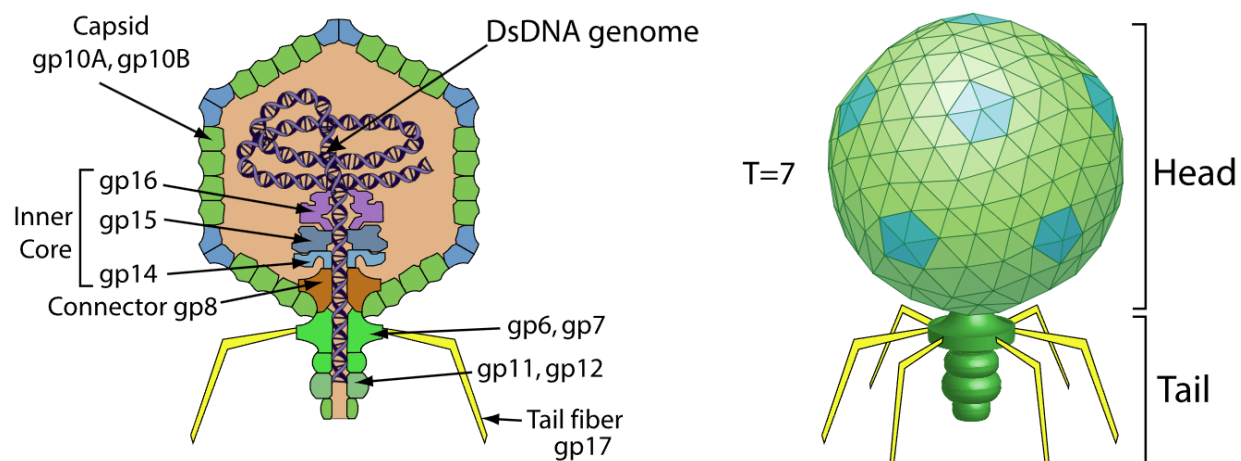
A bakteriofágok immobilizálásán és a biokonjugátumokon alapuló stratégia további fejlesztési lehetőségei között nagy figyelem irányul az immobilizált fágok orientációjának optimalizálására. A bakteriofágok, és általában a diagnosztikus célokra használt fágok túlnyomó többsége bináris szimmetriával rendelkezik, egy kapszidfejből és egy farokrégióból épül fel. A célsejthez kötődés minden eddig vizsgált esetben a farokrégió, pontosabban a farokrostok kapcsolódásán keresztül jön létre (Calendar and Abedon, 2005 IV/17). Ennek következtében a bakteriofágok véletlenszerű orientációban történő immobilizálása szuboptimális érzékelőfelületet eredményez. Tolba és munkatársai publikáltak először olyan próbálkozást, amiben az érzékelési határt nem az immobilizált bakteriofágok mennyiségének növelésével, hanem azok orientációjának beállításával sikerült csökkenteni. Munkájuk során T4 fág kapszidgénjéhez fúzionáltattak specifikus kötődést biztosító fehérjéket, melyek kizárólag a kapszidon fejeződtek ki, így elősegítve az előnyös virion orientációt az immobilizálási folyamat során (Tolba *et al.*, 2010). Tolba és munkatársai kutatása kiváló példa két stratégia vegyítésére, amennyiben genetikailag módosított bakteriofágokat immobilizáltak az érzékelőfelület létrehozására. Richter és munkatársai elektromos tér felhasználásával optimalizálták a fágok orientációját, majd kvantitatívan jellemezték az újítást. Random virionorientációval összevetve előbb négyszeres, majd váltakozó trapéz hullámú elektromos tér felhasználásával tízszeres hatékonyságjavulást értek el (Richter *et al.*, 2017).

Egy másik lehetőség egész virionok helyett csupán a baktériumok felismeréséért és kötéséért felelős fágalkotók - tehát rendszerint a nyaki-farki régió - használata. Ez a megközelítés megnyitja az utat a további miniaturizálás előtt, ami különösen előnyös lehet az az elektrokémián és a Raman spektroszkópián alapuló szenzorok számára. Emellett segít kiküszöbölni azt a banális problémát, hogy a lítikus természetű bakteriofágok az elnyújtott reakció során az érzékelendő patogének egy részét lizálják, mielőtt az összes elérhető baktérium befogásra kerülne, aminek az eredménye egy időben változó, haranggörbére hasonlító jelleadás. Az inkomplett virionok csupán a megfelelő baktériumok befogására képesek, lízis nélkül, így segítve az adott szenzorra jellemző jel akkumulációját az érzékelési küszöbérték fölé (Paczesny, Richter and Hołyst, 2020).

2.4 T7 család, K1F

A fágok gyakorlati felhasználásának többsége, ahogy ezen munka is, a bináris, pontosabban ikozahedrális szimmetriájú kapsziddal és ahhoz egy nyaki régión keresztül kapcsolódó farokrostokkal rendelkező fágokon alapul. Ezek a bakteriofágok ikozahedrális szimmetriájú kapszidokkal rendelkeznek, mely kiegészül egy nyaki régióval, amelyhez egy véglemezen keresztül 3-6 farokrost kapcsolódik (Calendar and Abedon, 2005 IV/20). Jelenlegi tudásunk szerint ezek a farokrostok határozzák meg a gazdaspecifitást és ismerik fel a sejt felszíni struktúráit (Hyman and Abedon, 2010) (Bertozzi Silva, Storms and Sauvageau, 2016). Az egyik legjobban tanulmányozott példa ezen fágokra a T7, mely kapsziddal nem rendelkező *E. coli* törzseket fertőz.

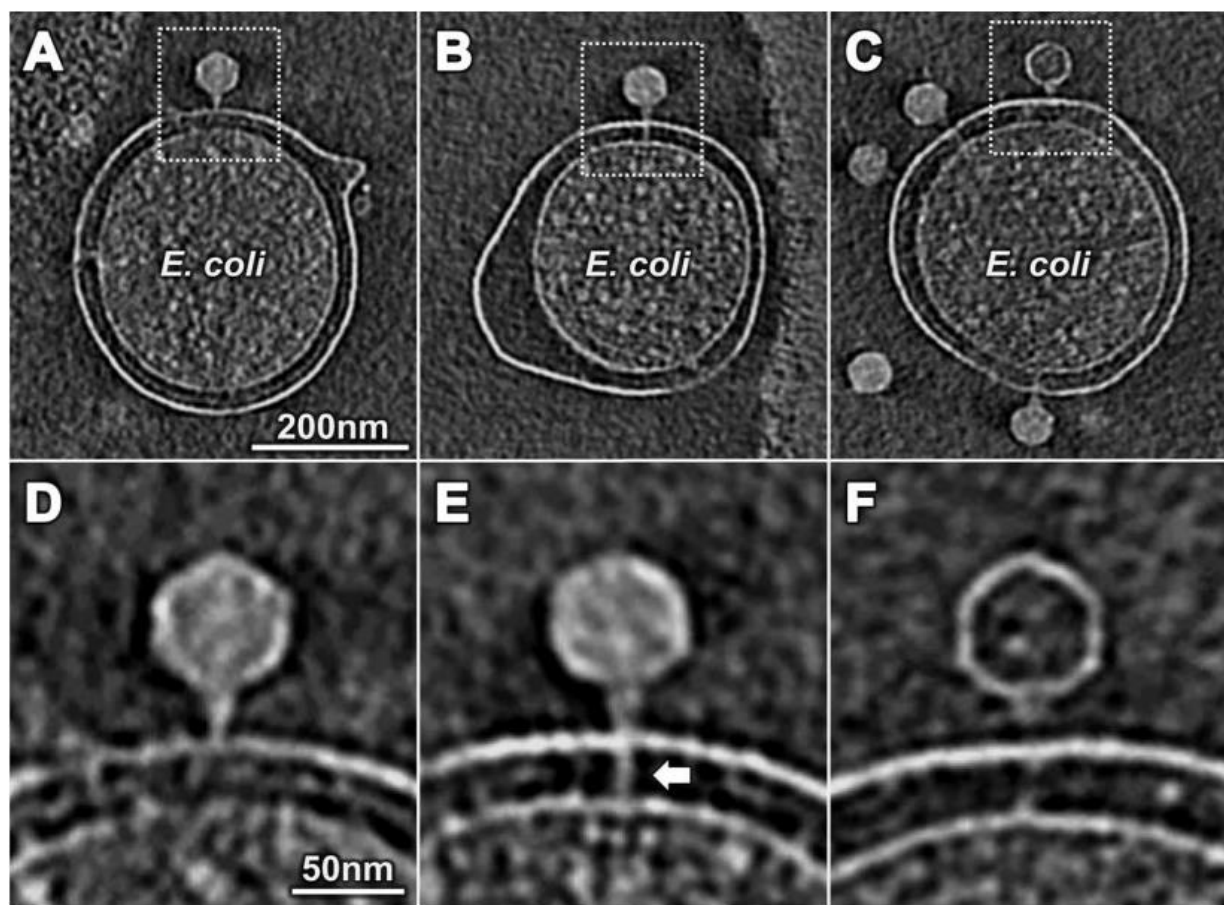
Ezen munka a T7 közeli rokonával, a K1F fággal foglalkozik, melynek célszervezetei a K1-kapsziddal rendelkező patogén *E. coli* törzsek. A K1F genomja és felépítése nagyfokú analógiát mutat a sokat tanulmányozott T7 fággal, jelentős különbség azonban a farokrost, annak is a C-terminális vége, mely lényegesen hosszabb és enzimatis, pontosabban endoszialidáz aktivitással rendelkezik, mely a K1 kapszula lebontásán keresztül hozzáférhetővé teszi a célsejtet a fág kitapadásához (Calendar and Abedon, 2005 IV/20).



8. ábra: A T7 bakteriofág felépítése [https://viralzone.expasy.org/709]

Az ikozahedrális szimmetriával rendelkező fágok örökítőanyaga relaxált állapotban nem fér be a kapszidba, ezért azt egy ATP-dependens folyamat kényszeríti bele a fágfejbe. Ott a fág genom túltelített állapotban, mint egy felhúzott rugó vár a transzlokációs csatorna megnyílására (Calendar and Abedon, 2005). Az örökítőanyag mellett rendszerint úgynevezett internális kapszidfehérjék is becsomagolódnak, melyek nem strukturális célokat szolgálnak, hanem segítik a fertőzési folyamatot a transzlokációs csatorna stabilizálásával, illetve a fággenom átíródását, vagy az összeszerelődést modulálják (Calendar and Abedon, 2005). Ezek a fehérjék a fág örökítőanyaga előtt, vagy azzal együtt haladnak át a transzlokációs csatornán a periplazmatikus térbe, vagy a citoplazmába (Kemp, Garcia and Molineux, 2005).

Hipotézisünk szerint az internális kapszid fehérjék diagnosztikai eljárások alapjául szolgálhatnak, kihasználva azon tulajdonságukat, hogy fehérjeként injektálódnak fertőzéskor a gazdasejtbe. A T7 és K1F bakteriofágokban öt ilyen fehérje van, úgymint g6.7, g7.3, g14, g15 és g16 termékei (1. táblázat). A g6.7 és g7.3 terméke mindössze 15 kDa méretű, ezáltal natív állapotban átjutnak a transzlokációs csatornán. A g14-16 által kódolt fehérjék nagyobb méretűek, ezért legalább részben denaturálódva képesek csak behatolni a periplazmatikus térbe vagy a citoplazmába (Calendar and Abedon, 2005 IV/20).



9. ábra: T7 virion fertőzés közben (Hu *et al.*, 2013).

A folyamat lépései látványosan végigkövethetőek: bakteriofág kapcsolódása a célsejthez (A és D), a kapszid tartalma befecskendeződik a sejt falon keresztül (B és E), végül a kiürült kapszidú fág továbbra is kapcsolódva marad a baktériumhoz (C és F), miközben egy újabb fág kezdi meg a fertőzést ugyanazon a sejten (C)

Elképzelésünk szerint a diagnosztikai felhasználáshoz elméletben mindössze egy jelképzésre képes enzimet kell valamelyik internális kapszid fehérjéhez fűzionálni, mely a virionon belül el van szigetelve szubsztrátjától, így nem ad jelet. Amint a bakteriofág felismeri gazdasejtjét, és megindul a fertőzés rendes folyamata, a fúziós fehérje kiszabadulna és az előállított jel mérhető lesz. Mivel a fúziós fehérje közvetlenül injektálódik, ezzel az eljárással kikerülhető lenne a transzkripció-transzláció és jelentősen felgyorsulhatna a diagnosztikai jelképzés folyamata.

Gén	Funkció	Konzerváltság	Esszencialitás
Korai gének			
0.3	I. típusú restrikció inhibitor	konzervált	esszenciális
0.4, 0.5, 0.6A, 0.6B	ismeretlen	nem konzervált	nem esszenciális
0.7	gazda transzkripció leállítása	konzervált	esszenciális
1	T7 RNS polimeráz	konzervált	esszenciális
1.1	ismeretlen	konzervált	nem esszenciális
1.2	dGTPáz inhibitor	konzervált	esszenciális
1.3	DNS ligáz	konzervált	esszenciális
Középső gének			
1.4, 1.5, 1.6	ismeretlen	nem konzervált	nem esszenciális
1.7	fitnessz fokozás	nem konzervált	nem esszenciális
1.8	ismeretlen	gyengén konzervált	nem esszenciális
2	RNAP inhibitor	konzervált	esszenciális
2.5	SSB fehérje	konzervált	esszenciális
2.8	ismeretlen	nem konzervált	nem esszenciális
3	endonukleáz I	konzervált	esszenciális
3.5	T7 RNS polimeráz regulátor	konzervált	esszenciális
3.8	homing endonukleáz	nem konzervált	nem esszenciális
4A	primáz-helikáz	konzervált	esszenciális
4.1, 4.2	ismeretlen	nem konzervált	ismeretlen
4.3, 4.5	ismeretlen	konzervált	nem esszenciális
4.7	ismeretlen	nem konzervált	nem esszenciális
5	DNS polimeráz	konzervált	esszenciális
5.3	homing endonukleáz	nem konzervált	nem esszenciális
5.5	λ rex exklúzió	konzervált	nem esszenciális
5.7	ismeretlen	konzervált	nem esszenciális
5.9	RecBCD inhibitor	nem konzervált	nem esszenciális

6	Rnáz H	konzervált	esszenciális
6.3	ismeretlen	gyengén konzervált	nem esszenciális
Kései gének			
6.5	ismeretlen	konzervált	nem esszenciális
6.7	internális kapszid fehérje	konzervált	esszenciális
7	célsejt specifitás, ismeretlen	nem konzervált	nem esszenciális
7.3	internális kapszid fehérje	konzervált	esszenciális
7.7	homing endonukleáz	nem konzervált	nem esszenciális
8	fej-nyak konnektor fehérje	konzervált	esszenciális
9	scaffolding fehérje	konzervált	esszenciális
10A	nagy kapszid fehérje	konzervált	esszenciális
10B	kis kapszid fehérje	konzervált	esszenciális
11	farok fehérje	konzervált	esszenciális
12	farok fehérje	konzervált	esszenciális
13	gp6.7 bepakolás	konzervált	esszenciális
14	internális kapszid fehérje	konzervált	esszenciális
15	internális kapszid fehérje	konzervált	esszenciális
16	internális kapszid fehérje	konzervált	esszenciális
17	farokrost fehérje	konzervált	esszenciális
17.5	II osztályú holin	konzervált	esszenciális
18	kis termináz alegység	konzervált	esszenciális
18.5-18.7	sejt lízis	konzervált	esszenciális
19	nagy termináz alegység	konzervált	esszenciális
19.2, 19.3	ismeretlen	konzervált	ismeretlen
19.5	ismeretlen	konzervált	nem esszenciális

1. táblázat: A T7 és K1F fágok feltárt nyílt olvasási keretei (Calendar and Abedon, 2005 IV/20.)

3. Célkitűzések

Ebben a munkában olyan fágalapú diagnosztikai eljárást kívántam kifejleszteni, mely a célbaktériumok rekombináns fágok általi *in vitro* fertőzése során keletkező fény detekcióján alapul. Ám szemben a szakirodalomban eddig leírtakkal, célom olyan rendszer szerkesztése volt, amely nem a fényemittáló fehérje génjének injektálását, hanem maga a fehérje injektálását detektálja.

A megválaszolandó kérdések a következők voltak:

1. Létrehozható-e olyan stabil bakteriofág, amely a kapszidjába képes csomagolni egy lumineszcens fehérjét?
2. Lehet-e a fágból a célbaktériumba injektált lumineszcens fehérjével detektálható mértékű fényt generálni a baktériumsejt fertőzése során?
3. Kialakítható-e egy modell diagnosztikai eljárás, mely a fenti mechanizmus útján szelektíven képes jelezni egy adott baktériumtörzs jelenlétét más törzsekkel szemben?

4. Felhasznált anyagok, módszerek

4.1 Baktérium és bakteriofág törzsek

A genetikai konstruktok klónozásához *Escherichia coli* MDS42 „multi deléciós” törzset használtam (Pósfai *et al.*, 2006).

A K1F specifikus célszervezeteként az *E. coli* EV36 törzset használtam, mely Dr. Eric R. Vimr ajándéka. Ezt a törzset a jól ismert K-12 MG1665 labortörzs genomi módosításával hozták létre. Az EV36 konstitutívan K1 kapszulát fejez ki, ezért K1-specifikus bakteriofágok csökkent virulenciájú célszervezeteként használható (Scholl, Adhya and Merril, 2005).

A bakteriális fehérjetermeltetéshez BL21(DE3) sejteket alkalmaztam (Studier and Moffatt, 1986).

A kiválasztott bakteriofág modellszervezet a K1F, mely Dr. Dean Scholl ajándéka volt kutatócsoportunk számára (Scholl and Merril, 2005).

4.2 Táptalaj és vegyszerek

Folyékony és szilárd formában egyaránt standard Luria-Bertani (LB) táptalajt használtam a bakteriális sejtek növesztéséhez (Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989).

A plazmidszelekcióhoz ampicillin, klóramfenikol és kanamicin antibiotikumokat alkalmaztam rendre 100 µg/ml, 25 µg/ml és 50 µg/ml végkoncentrációban.

Az expressziós plazmidok indukálásához anhidrotetraciklint (AhTC) és izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozidot (IPTG) alkalmaztam rendre 200 ng/ml és 0,5 mM végkoncentrációban. A fent ismertetett vegyszereket a Sigma-Aldrich-tól szereztük be.

A bakteriofágok izolálásához és titrálásához úgynevezett lágy-agar overlay-t használtam, melynek során az 1% agart tartalmazó LB szilárd táptalajra 0,5%-os koncentrációban agarózt tartalmazó lágy táptalajt öntöttem. Az így kapott térhálós szerkezetű rétegen jól megfigyelhető plakkok képződnek, ami megkönnyíti az izolációt, illetve a számlálást.

A bakteriális sejtek növesztése és indukálása egyaránt 37 °C-os inkubátorban, vagy inkubált rázóberendezésben történt.

Az expressziós kísérletek expressziós vektorának alapja az EV36-ban a klóramfenikol rezisztenciát hordozó, anhidrotetraciklinnel indukálható pZA31tetR plazmid volt, míg a kívülről hozzáadott C-terminális nanoluciferáz termeltetéséhez a kanamicin rezisztenciát hordozó, laktózzal, vagy izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranoziddal (IPTG) indukálható pET24 plazmidot használtam fel. A transzgén termelésének indukálására 200 ng/ml koncentrációjú anhidrotetraciklint (pZA31-es vektorok esetén), vagy 0,5 mM koncentrációjú IPTG-t (pET24-es vektor esetén) tartalmazó folyékony LB tápoldatot alkalmaztam. Az indukálás előtt overnight starter kultúrát oltottam le majd ebből 10, vagy 50 ml LB-tápoldatot tartalmazó Erlenmeyer-edényekbe oltottam át 100× hígítással. Az indukálószeret másfél-két óra növesztést követően adtam hozzá a kultúrákhoz, a fent említett koncentrációkban, majd tovább növesztettem az EV36pZA31CnLuc_His_tetR kultúra esetén másfél, míg a BL21(DE3)pET24CnLuc_His kultúra esetén 3 órán keresztül.

4.3 Alapvető molekuláris biológiai technikák

A polimeráz láncreakciók (PCR) paramétereit a következőképpen állítottam be:

- A klónozási reakciókban a denaturáció 20 s 97 °C, az annealing - a tervezett primereknek megfelelően – 30 s 60 °C és az elongáció a várt fragmens méretétől függően 10-20%-nyi ráhagyással 1000 bázispáronként 30 s. Minden esetben 28 ciklusos reakciót végeztem, New England Biotech gyártmányú Q5 polimerázzal, a gyártó által mellékelt puffer, UP víz és Thermo Scientific gyártmányú dNTP keverék hozzáadásával.
- Az ellenőrző reakciókban a denaturáció 30 s 95 °C, az annealing - a tervezett primereknek megfelelően – 30 s 57 °C és az elongáció a várt fragmens méretétől függően 10-20%-nyi ráhagyással 1000 bázispáronként 60 s. Minden esetben 28 ciklusos reakciót végeztem, Thermo Scientific gyártmányú Taq polimerázzal, a gyártó által mellékelt puffer, UP víz és Thermo Scientific gyártmányú dNTP keverék, valamint MgCl₂ hozzáadásával.

A felhasznált primereket a függelékben található 2. táblázat listázza.

Az *in vitro* előállított DNS-fragmensek elsődleges ellenőrzése agaróz-gélelektroforézis segítségével történt. Az agaróz gél töménységét a preparált fragment méretével fordítottan arányosan állítottam be, 0,75-2% között. Az 50 ml térfogatú gélhez szükséges agarózt annak kimérése után tris-borát-EDTA (TBE, 45 mM tris(hidroxi-metil)-amino-metán, 45 mM borát és 1 mM EDTA) pufferben oldottam fel mikrohullámú sütőben forralással. Miután az elegy szemmel láthatóan nem tartalmazott oldatlan agarózzrészecskéket, az oldatot csap alatt hűtöttem megközelítőleg 40 °C hőmérsékletre, amikor is hozzákevertem az ECO Safe nukleinsav festéket (Thermo Fisher Scientific) 1%-os végkoncentrációban, majd kiöntöttem. A gél, annak zsebeinek mintákkal való feltöltése után 150 mA áramerősséggel futtattam meg 15-20 percen keresztül egy TBE pufferrel feltöltött Biocomdirect gyártmányú futtatókádban. Az eredményeket ezután egy UviTech Essential V6 UV géololvasón vizualizáltam.

A plazmidok klónozásához elektroporációt alkalmaztam. Az elektrokompetens sejtek előállításához 5 ml sejt kultúrát oltottam le overnight starterkultúra 100×-os hígításával, majd ezt 37 °C-ra állított rázó-inkubátorban növesztettem két órán keresztül, amikor is a 600 nanométeren mért optikai denzitás (OD₆₀₀) megközelítőleg 0,6 volt, más szóval úgynevezett mid-log fázisban

volt a kultúra. Ekkor begyűjtöttem a sejteket 1 perces 10 000 g-n történő centrifugálással, majd az üledékből kimostam az ionok nagyrésztét kétszeri UP vízzel történő felszuszpendálással megismételt centrifugálással. Végül az immár elektrokompetens sejteket 40 µl UP vízben felszuszpendáltam és hozzákevertem 1-3 µl-t a klónozni kívánt plazmidból. Az elegyet Bio-Rad gyártmányú elektroküvetébe mértem majd egy Bio-Rad micropulser elektroporátorban elektrosokkoltam, az „*E. coli*” gyári paramétereknek megfelelően. Az elektroporált elegyet 1 ml folyékony LB táptalajban regeneráltam, majd steril körülmények között kikentem a megfelelő antibiotikumot tartalmazó szilárd LB lemezre.

Az egyes baktérium, illetve bakteriofág hígítási sorokat Thermo Scientific 96-lyukú lemezekre állítottam fel, olyan módon, hogy minden lépésben 5 µl elegyet hígítottam tovább 45 µl steril LB táptalajhoz keverve, majd három fel-le pipetázással alaposan összekeverve, hogy minél megismételhetőbb eredményt kapjak.

A plazmidokat Thermo Scientific gyártmányú miniprep kittel preparáltam, a gyártó által megadott protokoll pontos követésével.

A klónozendó N-terminális nanoluciferáz génfragmenst GeneStrand nevezetű, kettősszálú DNS szintetizátumként rendeltük a Eurofins-től, míg a C-terminális génfragmenst GeneBlock nevezetű, kettősszálú DNS szintetizátumként rendeltük az IDT vállalatától.

A termeltetett fehérjék tisztításának megkönnyítése érdekében His-tag-et fuzionáltattam a C-terminálishoz. A termeltetéshez egy éjszakán át növesztett BL21(DE3)pET24CnLuc_His starter tenyészetet 100-szorosára hígítottam, és 2 órán át 37 °C-on 50 ml folyékony LB táptalajt tartalmazó Erlenmeyer növesztőedényben tenyésztettem, majd 0,5 mM végkoncentrációjú IPTG indukálószer hozzáadása után további 3 órán át növesztettem. A sejteket 10.000 g-vel 10 percig centrifugáltam, majd 1 ml úgynevezett ekvibráló pufferben (20 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7,4) reszuszpendáltam. A sejteket 4 alkalommal, egyenként 30 másodpercig tartó ultrahangos kezeléssel lizáltam, 30 másodperces szünetekkel, majd 10 percig 10.000 g-vel centrifugáltam. Ezt követően a felülúszót Thermo Scientific gyártmányú His-Pur nikkel-NTA oszlopon tisztítottam, a gyártó által megadott protokollt pontosan követve.

A Sanger szekvenálásokat a HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont szolgáltatásaként működő szekvenálólabor végezte.

Minden egyéb, nem részletezett molekuláris biológiai eljárást a Fritsch, Sambrook, Maniatis: Molecular cloning útmutatása alapján végeztünk.

4.4 Bakteriofág technikák

A K1F bakteriofágok propagálásához EV36 starterkultúrát oltottam le 5 ml LB-táptalajt tartalmazó fiolákba, majd overnight növesztettem 37 °C-on 230 RPM rázatás mellett. Másnap 100x hígítással átoltottam a kultúrát az aktuális fáglizátum igényeknek megfelelő 5-, vagy 50 ml LB-táptalajt tartalmazó fiolákba vagy papírdugóval lezárt Erlenmeyer-edényekbe, majd ezeket ismét 37 °C-on 230 RPM rázatás mellett növesztettem megközelítőleg két órán keresztül, amikor is a 600 nanométeren mért optikai denzitás 0,4-0,6 közötti értéket vett fel, ezzel jelezve, hogy a kultúra az úgynevezett mid-log növekedési fázisba lépett. Ekkor a rázatást leállítva bakteriofág lizátumot pipettáztam a növesztőedénybe, annak 5000× hígítását elérve. 160-200 közötti burst size feltételezésével (Nguyen and Kang, 2014) ez a hígítás két növekedési ciklust tesz lehetővé. A fágok első fertőzési ciklusának összehangolása érdekében további 5 percig nem indítottam újra a rázatást, majd folytattam a növesztést a korábbi paramétereknek megfelelően. A bakteriofágok hozzáadásától számított 45-60 perccel később nagymértékű lízis volt megfigyelhető, ekkor leállítottam a növesztést és a lizátumot 20 ml-es fecskendővel 0,22 µm-es szűrőn nyomtam át, ami biztosította, hogy élő (adott esetben akár fágrezisztens) baktérium nem jut be a preparált lizátumba, melyet a szűrés után 6 °C-on hűtve tároltam.

Egyedi plakkokból történő bakteriofág izoláláshoz úgynevezett lágy-agar overlay-t (soft agar overlay) alkalmaztunk. Ennek során egy 1% agart tartalmazó szilárd LB táplemezre 3 ml 0,5% agarózt tartalmazó folyékony LB médiumot széleszttem. Az agarózt forralás mellett oldottam fel a tápoldatban, majd megközelítőleg 45 °C-ra visszahűtve 3 ml-t mértem ki egy 37 °C-ra melegített kémcsőbe. Ezt követően 100 µl mid-log fázisban levő EV36 kultúrát kevertem a folyékony lágyagarhoz, majd ezt gyorsan ráöntöttem a szintén 37 °C-ra melegített táplemezre. A lágy-agar overlay pár perc alatt teljesen megszilárdul lamináris áramlású sterilfűlkében, ezt követően a kellően kihígított bakteriofágok a baktériumoknál megszokott módszerrel, szélesztőpálcával eloszthatóak a lágy-agar felületen. A megfelelő hígítás megállapítására szükséges egy megelőző fágtitrálási procedúra, mely során egy hígítási sor minden lépcsőjéből állandó mennyiségű (esetemben 10 µl) hígított fáglizátumot cseppentettem ki lágy-agar overlayre, majd az alapján, hogy melyik hígítási lépcső adott különálló plakkokat, visszaszámoltam az eredeti lizátum úgynevezett plaque forming unit (PFU) 1 ml-re vonatkoztatott értékét.

A lágy-agaron megfigyelt plakkok ellenőrzéséhez plakk PCR-t alkalmaztam. A mintavételhez egy levágott végű pipettaheggyel megszűrtam a vizsgálni kívánt plakkok közepét,

olyan módon, hogy a lágy-agar és szilárd agar határáig hatoljak csak le, így egy úgynevezett plakkdugó a pipettahegyben marad. Ezt a plakkdugót 100 µl Tris-EDTA puffert tartalmazó eppendorf csőbe lőttem, majd overnight 42 °C-os inkubátorba helyeztem. Másnapra a melegben fellágyult lágy-agar plakkdugóból százezres nagyságrendben kidiffundálódnak a pufferbe a bakteriofágok, amiből 0,5-1 µl elégséges templátot biztosít a PCR reakciókhoz.

4.5 Plazmidok előállítása

A pSBC3g6.7::NnLuc donor plazmid előállításához egy korábbi munkánkból származó plazmidból, a pSBC3-ból indultam ki, amely egy GFP gént hordoz, amelyet homológ karok szegélyeznek, és amelyek a K1F kis-kapszid alegységhez, a g10b 3' végéhez irányítják a rekombináció során. Először a pSBC3 plazmidgerincet PCR-amplifikáltam, kihagyva a GFP gént és egy TGA stopkodont hozzáadva a g10b 3' végéhez a pSBC3fw és pSBC3rev primerek felhasználásával, Q5 polimerázt és 60 °C-os annealing hőmérsékletet alkalmazva, így egy 4320 bp méretű terméket kaptam. Ezt követően, az NnLuc GeneStrand templátból az NnLuc67Fw és NnLucRev primerek felhasználásával, Q5 polimerázt és 60 °C-os annealing hőmérsékletet alkalmazva, egy 240 bp méretű PCR terméket kaptam. A konstrukt utolsó elemét, a g6.7 gént 100-szorosan hígított K1F fág lizátumból amplifikáltuk a g6.7fw és g6.7rev primerekkel, Q5 polimerázzal és 60 °C-os annealing hőmérséklettel, így egy 255 bp hosszúságú terméket kaptam. Ez a PCR termék tartalmazza a g6.7 saját promóterét.

A három PCR terméket egy úgynevezett Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) reakcióban állítottam össze (Quan and Tian, 2009). Q5 polimeráz és 60 °C-os annealing hőmérséklet felhasználásával. A terméket a Thermo Scientific Gel/PCR DNS izolációs rendszerével tisztítottam, és *E. coli* MDS42-be elektroporáltam, majd ampicillinnel kiegészített LB agar lemezekre szélesztettem. A telepeket kolónia PCR-rel ellenőriztem a VF2 + NnLucCheckRev primerekkel, Taq polimerázzal és 57 °C-os annealing lépéssel, így egy 609 bp hosszúságú terméket; valamint VR2 + NnLucCheckFw primerekkel, Taq polimerázzal és 57 °C-os annealing hőmérséklettel, így egy 350 bp hosszúságú terméket kaptam abban az esetben, ha a tervezett konstrukt valóban létrejött. A mindkét primerpárral pozitív jelet adó telepeket növesztettem plazmid preparáláshoz. A kapott plazmidok szekvenciáját Sanger-szekvenálással ellenőriztük VF2 és VR2 felhasználásával. Ha mindkettő helyes volt, a plazmidot pSBC3g6.7::NnLuc-ként neveztük el.

A pSBC3g14::NnLuc klónozásához a fenti eljárást megismételtem két változtatással:

- A g6.7fw és g6.7rev primerpárt g14fw-vel és g14rev-vel helyettesítettem, amelyek egy 641 bp hosszú PCR-terméket eredményeztek a K1F genomon
- Az NnLuc67Fw-t NnLuc14Fw-vel helyettesítettem. Az NnLuc14Fw + NnLucRev PCR egy 259 bp hosszú terméket eredményezett. A CPEC-t, a tisztítást, a transzformációt és a telep-PCR-t azonosan végeztem, mint fentebb, de a VF2 + NnLucCheckRev helyes PCR-terméke ebben az esetben 976 bp hosszú volt.

A C-terminális nanoluciferáz (CnLuc) fehérjét bakteriális rendszerben kifejező plazmid előállításához a CnLuc GeneBlock fragmenst PCR-amplifikáltam CnLucFw és CnLucRev2 primerekkel, Q5 polimerázzal, 60 °C-os annealing hőmérséklettel. Ezt a PCR-terméket használtam templátként a PCR második köréhez, RBSfw és CnLucRev primerekkel, Q5 polimerázzal, 60 °C-os annealinggel. Ez a termék az inszert fragmens, amelyet egy Salis Lab által prediktált riboszómakötőhely (RBS, prediktált transzláció iniciációs ráta: 44761) (Reis and Salis, 2020) és az azt követő CnLuc gén alkot. A vektor előkészítéséhez a korábbi munkánkból származó pET24dihyd_his_tetR plazmidot PCR-amplifikáltuk, kizárva a 'dihyd' gént, miközben megtartottuk a hexahisztidin-tagot és a stop kodont, pET24CnLucFw és pET24CnLucRev primerekkel, Q5 polimerázzal, 60 °C-os annealing lépéssel. Ez az 5208 bp-os fragmens a plazmidgerinc.

Az inszertet és a vektor fragmenseket CPEC-vel fuzionáltam. A terméket a Thermo Scientific Gel/PCR DNS izolációs rendszerével tisztítottam, majd *E. coli* MDS42-be elektroporáltam, majd kanamicinnel kiegészített LB agar lemezekre szélesztettem. A telepeket kolónia PCR-rel ellenőriztem pET24CheckFW + CnLucRevCheck (585 bp) és pET24CheckRev + CnLucFWcheck (678 bp) primerpárok felhasználásával, mindkét esetben Taq polimerázzal, 57 °C-os annealing hőmérsékleten végeztem. A mindkét primerpárral megfelelő méretű jelet adó telepekből preparált plazmidok szekvenciáját Sanger szekvenálással ellenőriztem pET24CheckFW és pET24CheckRev felhasználásával. Ha mindkettő helyes volt, a plazmidot pET24CnLuc_His-nek neveztük el.

Annak érdekében, hogy egy, az EV36 célsejtben hatékony expressziót biztosító plazmidot kapjunk, PCR amplifikáltam a plazmidgerincet a korábbi munkánkból származó pZA31CFP_tetR expressziós plazmidból a „CFP” gén kizárásával, pZALucFw2 és pZALucRev primerekkel, Q5

polimerázzal, 60 °C-os annealing hőmérséklettel. Ez a 2787 bp-os termék a vektorfragmens. Az inszertfragmenst a korábban konstruált, szekvencia-ellenőrzött pET24CnLuc_His plazmidból amplifikáltam, az RBS, a hexahisztidin-tag, a CnLuc gén és a stop kodon átvitelével. A PCR amplifikációt RBSFw és CnLucRev3 primerekkel végeztem Q5 polimerázzal, 60 °C-os annealinggel.

Az inszert- és a vektorfragmenseket CPEC-vel fúzionáltuk. A terméket a Thermo Scientific Gel/PCR DNS Isolation System segítségével tisztítottam, majd *E. coli* MDS42-be elektroporáltam, majd klóramfenikollal kiegészített LB agar lemezekre szélesztettem. A telepeket kolónia PCR-rel ellenőriztem pZACheckFW + CnLucRevCheck (659 bp) és pZACheckRev + CnLucFWcheck (663 bp) primerpárok felhasználásával, mindkettőt Taq polimerázzal, 57 °C-os annealinggel végeztem. A mindkét primerpárral pozitív jelet adó telepekből preparált plazmidok szekvenciáját Sanger szekvenálással ellenőriztem pZACheckFW és pZA31CheckRev plazmidok felhasználásával. Ha mindkettő helyes volt, a plazmidot pZA31CnLuc_His_tetR-ként neveztük el.

4.6 Fág genom manipuláció

A K1Fe6.7NnLuc fág létrehozásához a pSBC3g6.7::NnLuc plazmidot *E. coli* EV36-ba transzformáltam. Ezt a törzset vad típusú, módosítatlan K1F fággal fertőztem. A ritka eseményként végbemenő rekombináció következtében a kapott lizátumot rekombináns- és – túlnyomó többségben – vad típusú bakteriofágok keveréke alkotta. A kapott fágkeveréket pCas9K1FC2 szelekciós plazmiddal transzformált EV36 (Moller-Olsen *et al.*, 2018) törzsön tenyésztettem három fág növekedési körben. A harmadik fág lizátumot hígítottam, hogy izolált plakkokat kapjak *E. coli* EV36 lágy-agar overlay tenyészetben, majd a plakkokat plakk PCR-rel ellenőriztem g10fw + NnLucCheckRev (930 bp) és NnLucCheckFw + g11rev (481 bp) primerpárok alkalmazásával. Mindkét ellenőrző PCR-t Taq polimerázzal végeztem 57 °C-os annealing hőkezelési hőmérsékleten. A mindkét primerpárral megfelelő terméket adó plakkokból izolált fágokkal vad típusú EV36 sejteket fertőztem, majd a kapott lizátumot ismét hígítottam, hogy egyedi plakkokat kapjak EV36 lágy-agar overlay tenyészetben. A szelekció nélkül növesztett lizátumból izolált 5 plakkot ismét ellenőriztem a fenti primerpárokkal és ha mind az 5 pozitív jelet adott, Sanger szekvenálással ellenőriztük az izolált fágokat a g10fw és a g11rev primerek felhasználásával. A szekvencia helyessége esetén a létrehozott bakteriofág törzset K1Fe6.7NnLuc-nak neveztük el.

A K1Fe14NnLuc fág előállításának technológiája azonos volt, azzal a különbséggel, hogy a donor plazmid a pSBC3g14::NnLuc volt. Az ellenőrző PCR-reakciók ugyanazok voltak, de a g10fw + NnLucCheckRev PCR helyes esetben 1296 bp méretű terméket eredményezett.

4.7 Luminometria

A lumineszcencia méréseket egy Synergy H1 leolvasókészülékkel hajtottam végre, Thermo Scientific gyártmányú fehér, lapos aljú, 96-lyukú lemezek felhasználásával. Minden esetben 100 µl mintát egyesítettem 100 µl előkészített Promega NanoGlo reagenssel egy-egy lyukban. Az összeállított NanoGlo reagens tartalmazta a nanoluciferáz specifikus furimazin szubsztrátját. A leolvasás minden alkalommal közvetlenül (<30s) a reagens mintához keverése után történt. A műszervezéléshez és az adatgyűjtéshez a Gen5 3.11 programot használtuk. A leolvasás 460 nm-en történt, a gain 140-re volt állítva.

A minták közötti jelszennyeződés minimalizálása érdekében az egyes hárommintás párhuzamos lyukak között egy-egy lyukat 200 µl steril LB médiummal töltöttünk fel, így elszeparálva az egyes kísérleti csoportokat.

A sejtes mérések mintáinak előkészítéséhez *E. coli* EV36 tenyészeteket (amelyek adott esetben pZA31CnLuc_His_tetR is hordoztak) 200 ng/ml anhidrotetraciklinnel (AhTc) indukálva folyékony LB táptalajban 0,6-os OD₆₀₀ értékig növesztettünk, amelyből a megfelelő lyukakba pipettáztunk, egyenként 35 µl-t. Ezt követően fágvizátumokat pipettáztunk a mintákhoz, egyenként 65 µl-t, közel egyidejűleg egy többcsatornás pipettával, így a végtérfogat 100 µl/mintára állt be.

A kinetikai mérésekhez az időzítőt akkor indítottuk el, amikor a fágok hozzáadásra kerültek az egyes mintákhoz, tehát az időzítő 0 időpontja a virionok és sejtek fizikai találkozását jelöli, nem feltétlenül a fertőzés tényleges kezdetét. A NanoGlo reagens mintához keverése +30 s adja az adott minta időzítőjének leállítását, ami kompenzálja a 96-lyukú lemez leolvasóba helyezését, majd az ezt követő 10 másodperces lineáris rázást és a tényleges lumineszcencia-mérést. Így minden kinetikai időpont megközelítőleg a tényleges lumineszcencia-mérés kezdetét jelenti. A NanoGlo reagens hozzáadására bekövetkező instant lízist feltételezve a sejtek kémiai feltárása és így a transzkripció-transzláció leállítása körülbelül 30 másodperccel az egyes kinetikai mérési időpontok előtt történt.

A külsőleg hozzáadott CnLuc alegységet vizsgáló kísérletekhez egy éjszakán át növesztett BL21(DE3) starter tenyészetet (amely opcionálisan pZA31CnLuc_His_tetR plazmidot is tartalmazott) 100-szorosára hígítottunk, és 2 órán át 37 °C-on 10 ml folyékony LB táptalajt tartalmazó Erlenmeyer növesztőedényben tenyésztettük, majd 200 ng/ml végkoncentrációjú ahTc indukálószer hozzáadása után további másfél órán át növesztettük. A sejteket 10.000 g-vel 1 percig pelletáltuk, majd 1 ml úgynevezett ekvilibráló pufferben (20 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7,4) reszuszpendáltuk. A sejteket 4 alkalommal, egyenként 30 másodpercig tartó ultrahangos kezeléssel lizáltuk, 30 másodperces szünetekkel, majd 5 percig 10.000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszót összegyűjtöttük és jégre helyeztük a CnLuc aktivitásának teszteléséhez.

5. Kísérleti eredmények bemutatása

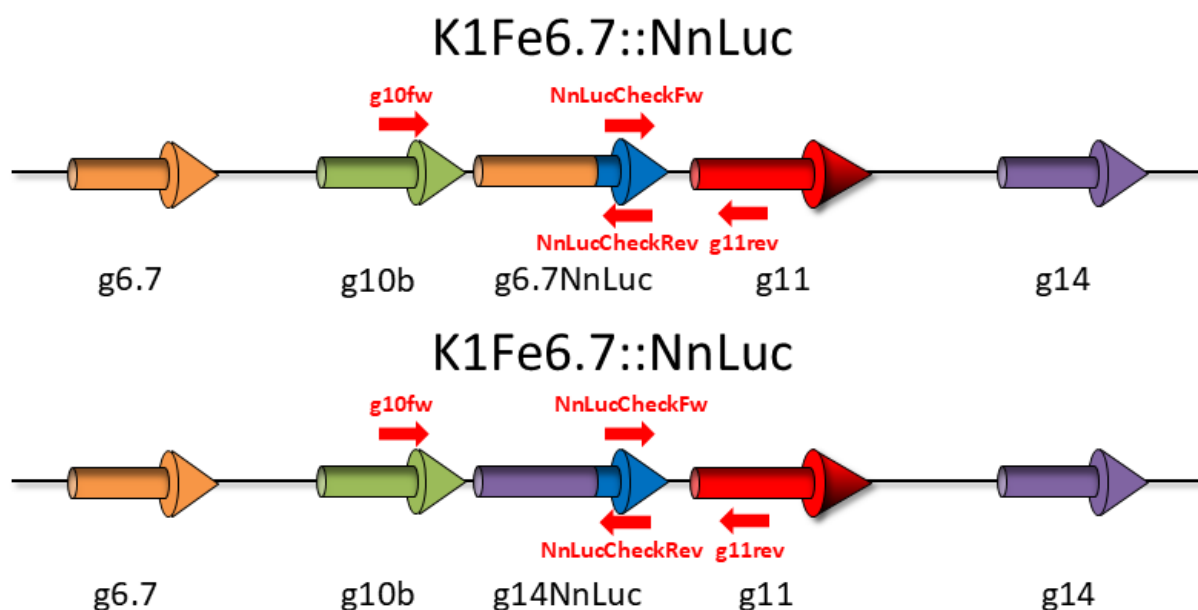
5.1 Lumineszcens jel generálására képes bakteriofágok tervezése

Munkám a kísérleti stratégia átgondolásával és a genetikai konstrukciók megtervezésével kezdődött. Kiindulási bakteriofágként a K1F bakteriofágot választottuk, mely K1 kapszulával rendelkező baktériumokat általánosan fertőz (Arredondo-Alonso *et al.*, 2023). Célbaktériumként kezdetektől a K1 kapszulát kifejező EV36 *E. coli* labor törzset használtam, mivel ez a klinikai *E. coli* K1 törzzsel szemben egy apathogén, biztonságos céltörzse a K1F fágnek. A K1F nagyfokú hasonlóságot mutat a részletesen leírt kólifág modellszervezet T7-tel, így - noha a K1F genomi funkciói nem vizsgáltak széleskörűen az irodalomban - megalapozottan feltételeztük, hogy a releváns génjeik, és az azokról kifejeződő fehérjék hasonlóan viselkednek.

Első feladat volt annak biztosítása, hogy a fág genomba ültetett lumineszcencia gének által kódolt fehérjék a fágfejbe csomagolódnak, és fertőzés során a baktériumba juthassanak. Mivel nem ismertek fág-specifikus fehérje-injekciós szignálok, az internális kapszid fehérjék ígéretes alternatívának mutatkoznak, mint fúziós partnerek egy enzim, vagy enzim alegység számára. Öt ilyen fehérje ismert a T7 bakteriofágban, mely gének nagyban hasonlító szekvenciával a K1F-ben is megtalálhatók, úgymint: g6.7, g7.3, g14, g15, g16. Ezek közül kettő gén termékét választottunk ki a kísérletek felállítására, a g6.7 és a g14 által kódolt fehérjét. A g6.7 mellett szól, hogy terméke a legkisebb az internális kapszid fehérjék közül, így natív állapotban képes áthaladni a transzlokációs csatornán. Ezt a tulajdonságát feltehetően egy kellően kisméretű fúziós partner

társaságában is megőrizheti. A g14 terméke nagyobb méretű, legalább részben ki kell tekerednie az injektálódás során, viszont mivel eleve nagyobb méretű, arányaiban kevésbé nyújtja meg a fúziós partner hozzacsatolása.

A jel előállításához szükséges továbbá egy enzim, mely valamilyen mérhető metabolitot, színváltozást, fluoreszcens, vagy lumineszcens jelet ad. Választásunk kis mérete és robosztus jelleadási dinamikája miatt a nanoluciferáz enzimre esett. Ezt a fehérjét a *Oplophorus gracilirostris* mélytengeri garnélarákból izolálták, és előnyös tulajdonságai miatt több kereskedelmi lumineszcencia kit épül rá. Mindössze 19.1 kDa méretű, továbbá - ami miatt számunkra különösen vonzó - lehetséges elhasítani egy 7.22 kDa-os N- és egy 12.8 kDa-os C-terminális alegységre, mely alegységek oldatban spontán összekapcsolódnak és ismét funkcionális enzimet alkotnak (Zhao *et al.*, 2016). A nanoluciferáz felhasználásának egy komoly hátránya van, a fényreakció létrejöttéhez szükség van egy specifikus szubsztrátra, a furimazinra (England, Ehlerding and Cai, 2016).

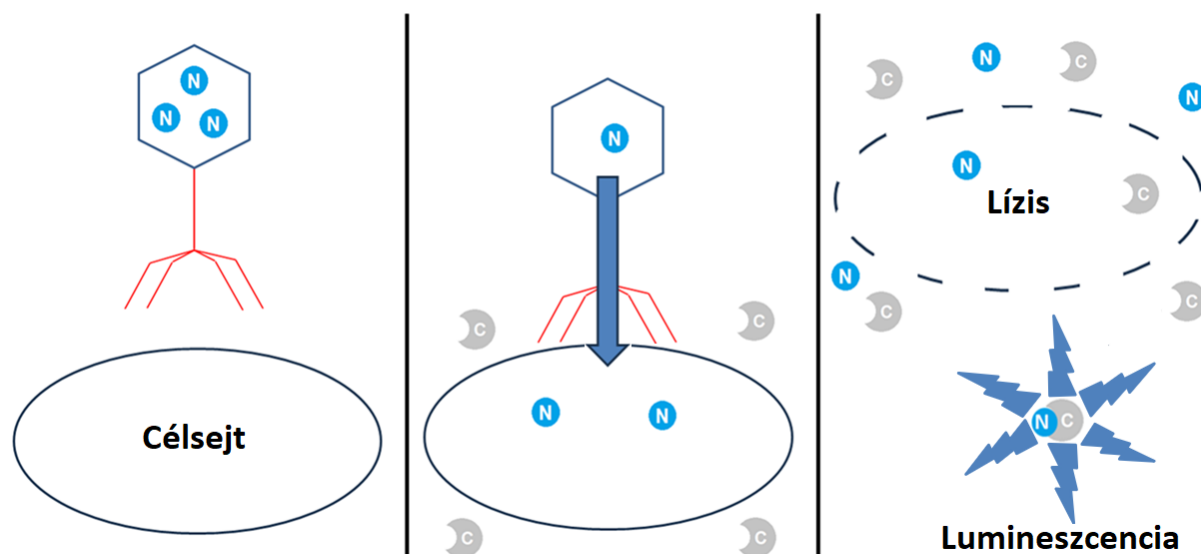


10. ábra: Bakteriofág genetikai konstrukciók

A piros nyilak az ellenőrző primerek kötőhelyeit jelölik

Elképzelésünk szerint az N-terminális alegységet (NnLuc) fuzionálnánk a virális fehérjékhez, míg a C-terminális alegységet (CnLuc) proof-of-concept jellegű kísérletekben a gazdasejtben termeltetnénk meg, majd végül oldatban adnánk a reakciós elegyhez. A C-terminális önmagában nem képes lumineszcens jelet adni, csak abban az esetben, ha kötődik az N-terminális alegységhez (10. ábra). Az N-terminális alegység viszont a fágfejbe zártan tárolódik, egészen

addig, amíg - a fágra specifikusan jellemző - gazdasejt nincs a mintában, ekkor végbemegy a fertőzés rendes folyamata, és a két nanoluciferáz alegység egy térbe kerül, majd jelet ad. A kezdeti kísérleti rendszerünkben a C-terminális fragmentet plazmidon kódolva biztosítanánk a célsejtben. Ha ilyen rendszerrel sikerül lumineszcenciát produkálni, vad típusú célsejtek kimutatásával folytathatnánk, külső forrásból hozzáadott C-terminális nanoluciferáz felhasználásával.



11. ábra: Vázlatos diagnosztikus koncepció.

N: internális kapszid fehérjéhez fúzionált N-terminális nanoluciferáz. C: C-terminális nanoluciferáz

5.2 Az N-terminális nanoluciferázt kódoló K1F fág törzsek szerkesztése

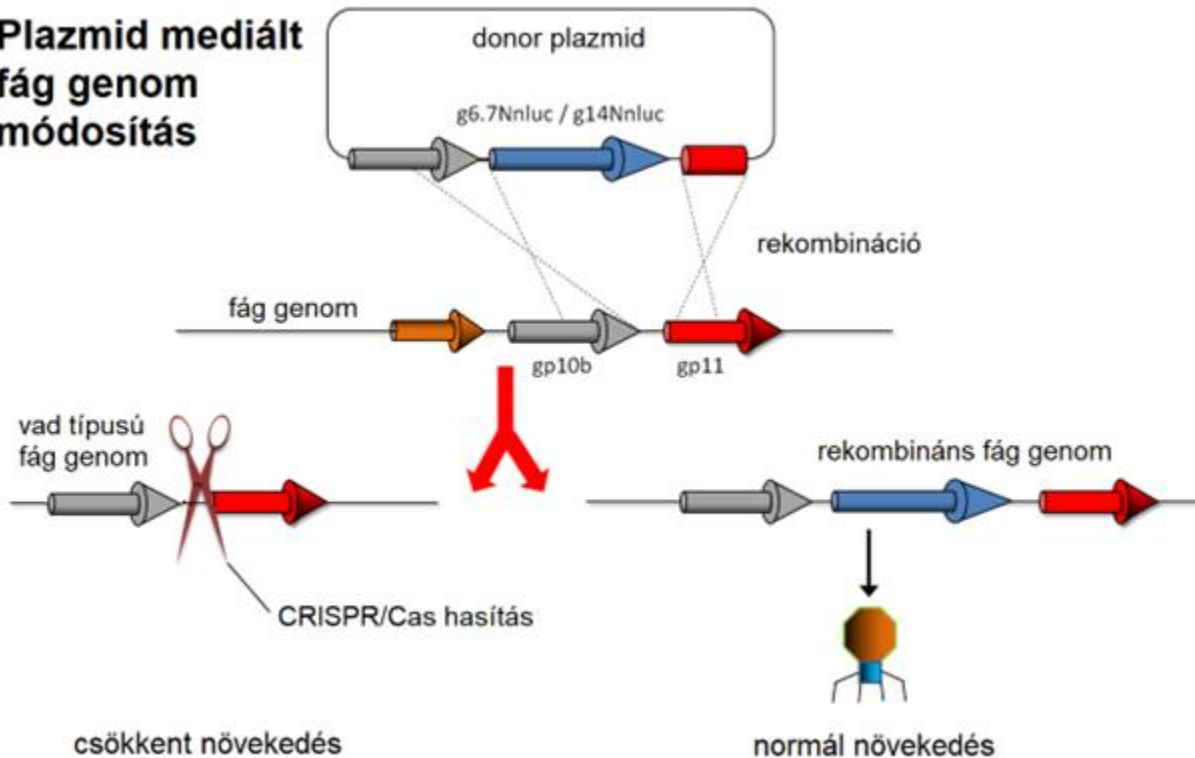
A hipotézisünk bizonyításához mindenekelőtt az enzimtöredéket hordozó bakteriofágok előállítására volt szükség. Noha ma már jól bevett gyakorlat a fágok tranziens módosítása (Emslander *et al.*, 2022) (Wang *et al.*, 2024), a hozzáadott érték növelése, valamint a jövőbeli gyakorlati alkalmazás költségeinek csökkentése érdekében úgy döntöttünk, genetikailag módosított, szelekció nélkül fenntartható törzseket állítunk elő.

Mind a g6.7, mind a g14 gén konzervált és esszenciális a T7 fágban, ezért feltételeztük, hogy K1F esetén is hasonló a státuszuk. Mivel nehéz megbecsülni, milyen hatást gyakorol a fúziós partner a két internális kapszid fehérje eredeti funkciójára, úgy döntöttünk, a g6.7-NnLuc, illetve g14-NnLuc konstrukciókat egy másik lókuszbba, a g10b, vagyis a kis kapszid-alegység után következő régióba klónozzuk. Ennek következtében a K1F::e6.7NnLuc, illetve a K1F::e14NnLuc törzsek genomjában rendre a g6.7 vagy a g14 gén duplikálva található meg, egy vad típusú kópia

az eredeti lókuszban, valamint egy N-terminális nanoluciferáz alegységgel fűzionált rekombináns kópia a g10b downstream régiójában. A kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján a g10b 3' régiója képes változatos transzgének fogadására, a bakteriofág viabilitásának érzékelhető megváltozása nélkül (Moller-Olsen *et al.*, 2018) (Liyanagedera *et al.*, 2022). A két rekombináns K1F fág géntérképének releváns részeit a 10. ábra mutatja be.

A bakteriofágok genomjának módosításához két donorplazmidot alkalmaztunk, melyeknek kiindulási alapja a korábbi munkánkban használt pSBC3 plazmid volt (Moller-Olsen *et al.*, 2018). A pSBC3 egy GFP kazettát hordoz homológia boxokkal a K1F g10b 3' végéhez történő rekombinációhoz. Ezt a plazmidot templátként használva a pSBC3fw és pSBC3rev primerekkel PCR amplifikáltam a plazmidgerincet olyan módon, hogy a GFP kazettát ne tartalmazza, viszont hozzáadódjon egy TGA nukleotid triplet a bal oldali homológiaboxhoz. Erre azért volt szükség, hogy a beklónozni kívánt kazetta ne a g10b gén termékével fűzióban fejeződjön ki. Az N-terminális nanoluciferáz alegységet génszintézissel rendeltük meg GeneStrands-ként az Eurofins Genomics cégtől, majd az Nn67Lucfw vagy Nn14Lucfw és NnLucrev primerekkel kapcsoltam hozzá a megfelelő átfedéseket az előbbi PCR-termékhez rendre a pSBC3g6.7::NnLuc és pSBC3g14::NnLuc plazmidok összeszereléséhez. Ez a szegmens a g6.7 illetve a g14 natív promóterét is tartalmazta. A kazettához hiányzó utolsó elem a g6.7, illetve g14 gén, melyet K1F fágizátumot templátként használva, a g6.7fw és g14rev, illetve a g14fw és g14rev primerekkel amplifikáltam. A három fragmenst egy PCR reakció keretében egyesítettem, majd a létrejövő termékkel MDS42 *E. coli* sejteket elektroporáltam, majd a pSBC3 plazmidgerincnek megfelelő amplicillin tartalmú LB táptalajra szélesztettem. A felnövő telepeket a VF2 és NnLucCheckRev, illetve a VR2 és NnLucCheckFw primerek felhasználásával PCR screeneltem, majd várt méretű PCR terméket adó telepek közül kettőből plazmidot preparáltam. A preparátumokat a VF2 és VR2 primerekkel Sanger-szekvenálásra küldtem, ami megerősítette, hogy a beépült kazetta szekvenciája helyes.

Plazmid mediált fág genom módosítás

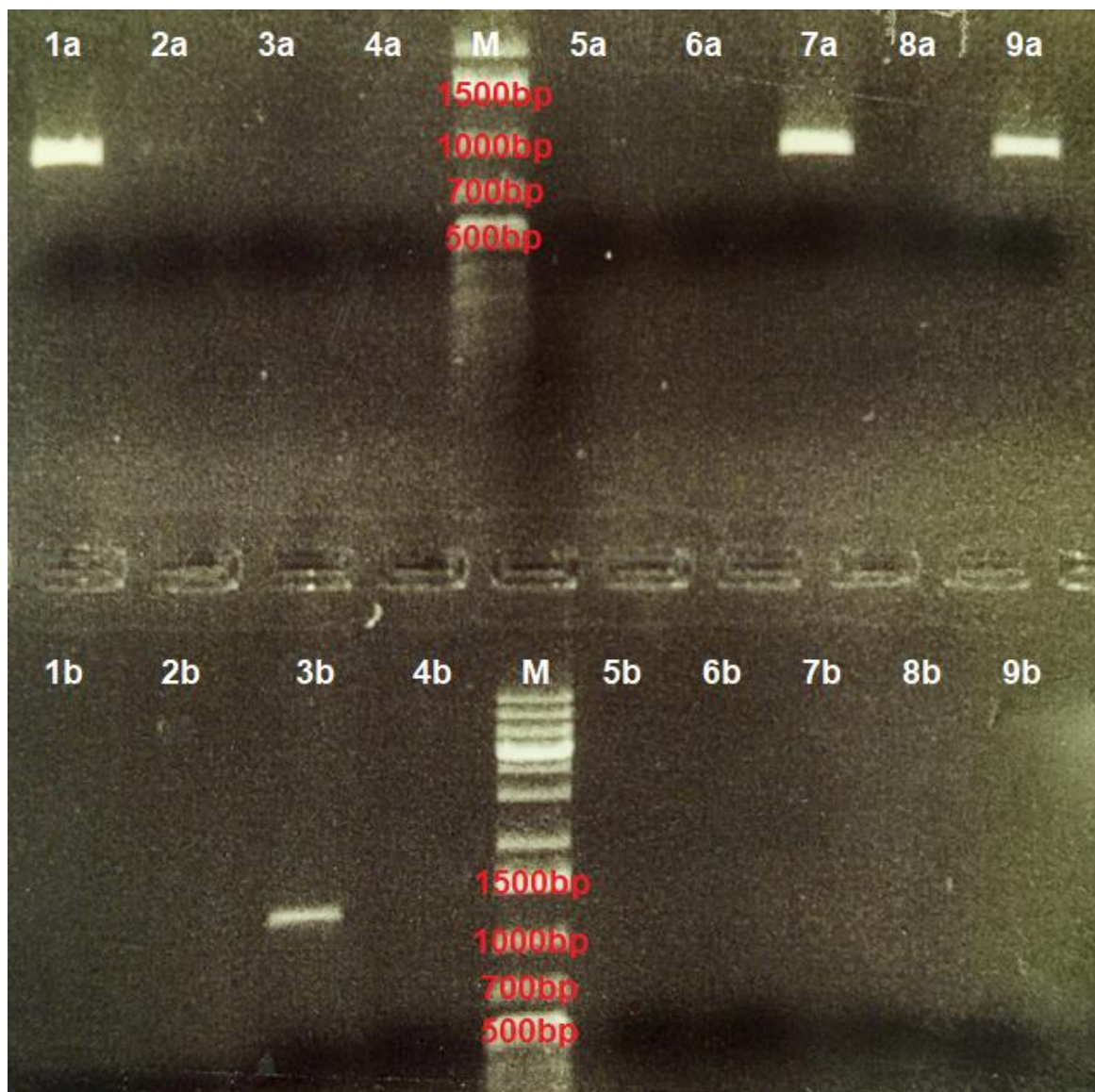


12. ábra: Klónozás menete

A rekombináns K1Fe6.7::NnLuc és K1Fe14::NnLuc bakteriofágok előállításához a vad típusú K1F fágokat rendre a pSBC3g6.7::NnLuc és a pSBC3g14::NnLuc plazmidokkal transzformált EV36 sejteken növesztettem (11. ábra). A létrejövő lizátumból a ritka, random rekombináció eredményeképpen PCR reakcióban kimutatható volt a két rekombináns bakteriofág jelenléte. Mivel a rekombinánsok aránya elhanyagolható volt, a keveréket 3 növesztési cikluson keresztül a kutatócsoportunk korábbi projektjében használt, vad típusú K1F genom ellen targetált pCas9K1FC2 szelekciós plazmidot hordozó EV36 törzsön növesztettem (Moller-Olsen *et al.*, 2018). Ez a plazmid egy pCas nukleázt fejez ki konstitutívan, melynek guide RNS-e a K1F g10b downstream régiójához hibridizál. Ez a lókus az általunk várt rekombináció végbemenetele esetén megváltozik, így a guide RNS a továbbiakban nem ismeri fel és nem történik hasítás. A fágkeverékben ezért minden, *E. coli* EV36+pCas9K1FC2 sejten történt növesztés után nő a rekombináns fág aránya a vad típus rovására. A harmadik szelekciós ciklus után a lizátumot hígítás után szélesztettem *E. coli* EV36 pázsiton, majd az egyedi plakkokat PCR reakcióval screeneltem klonális rekombináns bakteriofágokat keresve. A 9. ábrán látható, hogy a plakk PCR-hez felhasznált g10fw és NnLucCheckRev, illetve NnLucCheckFw és g11rev primerpárokat úgy

terveztük, hogy az egyik primer (g10fw ill. g11rev) a fággenomhoz, a másik primer (NnLucCheckRev ill. NnLucCheckFw) a beépült fúziós génhez hibridizál. A két primerpár tehát csak akkor ad PCR terméket, ha a kazettát tartalmazó fággenom valóban létrejött.

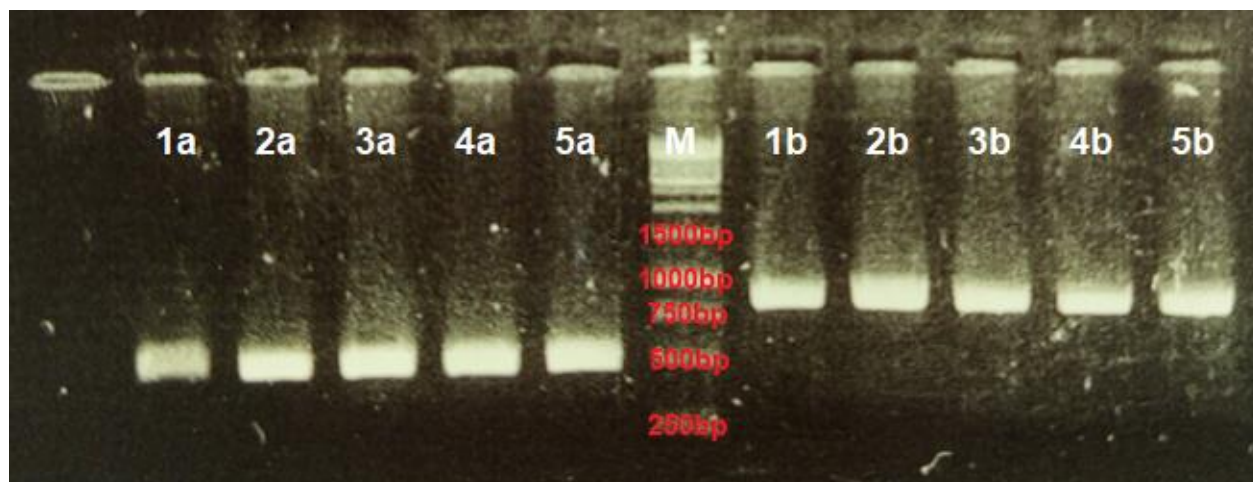
A 13. ábrán mutatom be a K1Fe6.7::NnLuc (A) és K1Fe14::NnLuc (B) bakteriofágtörzsek előállításánál végzett plakk PCR-ek eredményeit. A rekombináns fágokat tartalmazó plakkok adják a várt hosszúságú PCR-termékeket (ld. az ábraszövegben), míg a vad típusú fágokat tartalmazó plakkok nem adnak PCR-terméket ezekkel a primerekkel.



13. ábra: Egyedi plakkokból nyert bakteriofágok PCR screenelése

Az 1a-9a wellek a K1Fe6.7 fágok g10fw + NnLucCheckRev primerekkel (930bp) végzett-, az 1b-9b wellek a K1Fe14 fágok g10fw + NnLucCheckRev primerekkel (1296bp) végzett amplifikáció eredményét mutatják.

A rekombináns fágok genomi stabilitásának ellenőrzése végett szelekció nélkül tenyésztettem egy-egy pozitív plakkból nyert fágokat. A kapott lizátumokat hígítottam és ismét lág-agar overlayre szélesztettem majd a megjelenő egyedi plakkokat ismét PCR-teszteltem. A 14. ábra tanúsága szerint 5-ből 5 plakk a rekombináns genomra jellemző termékeket adta, így megállapíthatjuk, hogy a létrejött genomi konstrukciók egy fág-növesztési ciklus során nem szenvednek el masszív átrendeződést. A kiválasztott egy-egy K1Fe6.7 és K1Fe14 fágtörzs módosított régiójának Sanger szekvenálása megerősítette a genomi szekvenciák helyességét.



14. ábra: izolált rekombináns bakteriofágok PCR ellenőrzése

Szelekció nélkül tenyésztett K1Fe6.7 plakkokból nyert fágok g10fw + NnLucCheckRev (1a-5a; 930 bp) és

NnLucCheckFw + g11rev (1b-5b; 481 bp) primerekkel képzett termékei

5.3 A C-terminális nanoluciferázt kifejező plazmidok konstrukciója

A kísérletek elvégzéséhez két expressziós vektort állítottam elő. A célsejtben történő C-terminális nanoluciferáz kifejeztetéshez a pZA31CnLuc_His_tetR, a kívülről szuplementált CnLuc előállításához pedig a pET24CnLuc_His plazmidot alkalmaztam (15. ábra).

A CnLuc fragmenst GeneBlock szintézisként rendeltünk, majd ezt amplifikáltam a CnLucFw és CnLucRev2 primerek felhasználásával. Ez az amplifikátum templátként szolgált egy második PCR reakcióban, ahol egy Salis Lab által prediktált riboszómakötőhelyet (Reis and Salis, 2020) csatoltam hozzá a C-terminális fragmenshez az RBSfw és CnLucRev primerek felhasználásával.

A pET24CnLuc_His plazmid alapjául a korábbi munkámból származó pET24_dihyd_His plazmid szolgált, melyet templátként használva amplifikáltam a pET24 gerincet a pET24CnLucFw és pET24CnLucRev primerek felhasználásával olyan módon, hogy az amplifikátum tartalmazza

dihyd kazettából a C-terminális hexahisztidin-taget és a stop kodont. A CnLuc fragmenst és a plazmidgerincet egy CPEC reakció keretei között egyesítettem, majd az amplifikátummal *E. coli* MDS42 sejteket transzformáltam elektroporációval, majd a pET24 gerincnek megfelelő kanamicin tartalmú LB táptalajra szélesztettem. A felnövő telepeket a pET24CheckFW és a CnLucRevCheck, valamint a pET24CheckREV és a CnLucFwCheck primerpárok felhasználásával screeneltem, majd a pozitív kolóniák közül kettőből plazmidot preparáltam, amiket Sanger-szekvenálásra küldtem a pET24CheckFW és pET24CheckREV primerekkel, ami megerősítette, hogy a beépült inszert szekvenciája helyes.

15. ábra: C-terminális nanoluciferáz expresszáló vektorok

A pZA31CnLuc_His plazmid alapjául a kutatócsoportunk által korábban szerkesztett pZA31CFP_TetR plazmid szolgált (Feher, 2012). Ebből a templátból amplifikáltam a plazmidgerincet a CFP kazetta kihagyásával, a pZALucFw2 és a pZALucRev primerek felhasználásával. Az inszertet a feljebb leírt pET24CnLuc_His plazmidból amplifikáltam az RBSfw és a CnLucRev3 primerpár felhasználásával, olyan módon, hogy a riboszóma kötőhely, a CnLuc kódoló régiója, a hexahisztidin-tag és a stop kodon alkossa az inszertet. A két fragmenst egy CPEC reakció keretein belül egyesítettem, majd az amplifikátummal MDS42 sejteket transzformáltam elektroporációval, majd a pET24 gerincnek megfelelő klóramfenikol tartalmú LB táptalajra szélesztettem. A felnövő telepeket a pZACheckFW és a CnLucRevCheck, valamint a pZACheckREV és a CnLucFwCheck primerpárok felhasználásával screeneltem, majd a pozitív

kolóniák közül kettőből plazmidot preparáltam, amiket Sanger-szekvenálásra küldtem a pZACheckFW és pZACheckREV primerekkel, ami megerősítette, hogy a beépült inszert szekvenciája helyes.

5.4 A rekombináns fágok funkcionális vizsgálata

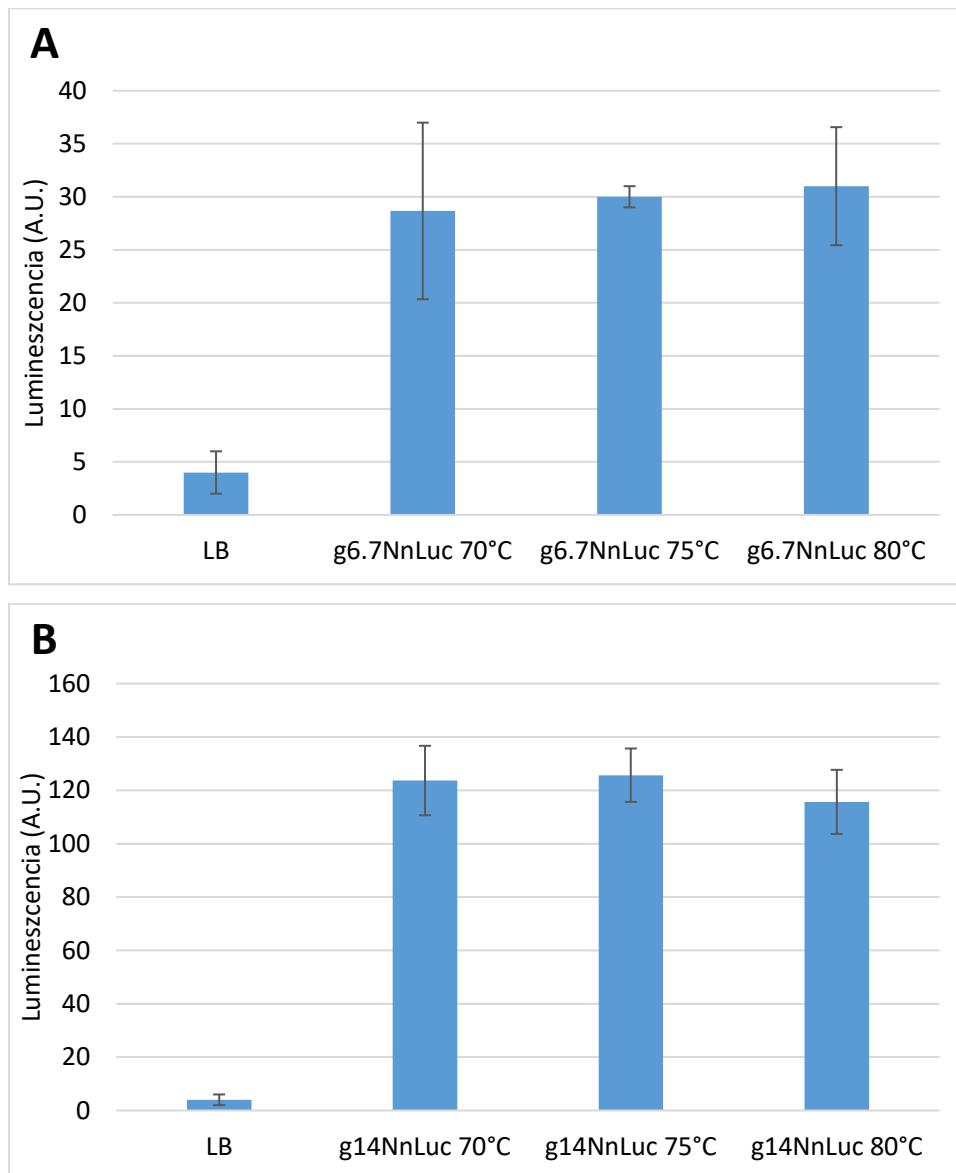
A fentiekben ismertettem a K1F bakteriofág genetikai módosításához szükséges klónozási lépéseket, illetve magát a két fágtörzs megszerkesztését. Az előállított rekombináns K1Fe6.7::NnLuc és K1Fe14::NnLuc bakteriofág törzsek genomjában két kópia található rendre a g6.7 és g14 génekből, amiből a második kópia transzlációsan fuzionálva van a nanoluciferáz enzim N-terminálisával (lásd 10. ábra). PCR alapú vizsgálataim alapján a gének stabilan beépültek, mivel a rekombináns fágok genetikailag homogén plakkokat voltak képesek képezni. Szintén PCR-tesztekkel igazoltam, hogy a rekombináns fágok (pontosabban fúziós génjeik) legalább egy fág-növesztési ciklus erejéig szelekció nélkül is fennmaradnak. Fontos azonban megjegyezni, hogy a fentiekben bemutatott PCR eredmények csupán a fúziós gének genomi jelenlétet igazolják. A rekombináns fágok funkcionális vizsgálatának elsődleges célja ezért a fúziós gének kapszidbeli jelenlétének bizonyítása volt. Ezt az NnLuc funkciójára támaszkodva tettem meg, voltaképpen az enzimtöredék funkcionálításának igazolásával egyidejűleg végezve (5.4.1. szekció). Ezt a fágok NnLuc injektáló képességének vizsgálata követte CnLuc-kifejező célsejtekbe, szintén a luciferáz-funkcióra támaszkodva (5.4.2. szekció). Végül magát a modell-diagnosztikai rendszert teszteltem, ahol a célsejtekhez a CnLuc fehérjét kívülről adva mértem a nanoluciferáz aktivitását (5.4.3. szekció).

5.4.1 A rekombináns fágok által generált lumineszcencia *in vitro* vizsgálata

Annak érdekében, hogy bizonyítsam a rekombináns fúziós fehérjék kapszidba történő becsomagolódását, egy *in vitro* tesztet használtam, melyet több paraméter variálása mellett is végrehajtottam. A kísérlet lényege, hogy a bakteriofágok kellően magas hőmérsékleten hőinaktiválhatóak, aminek következtében a - kovalens kötésekkel nem rögzített - kapszid alegységek elválnak egymástól, és a fágfejben található, egyébként elszigetelt fehérjék oldatba kerülnek.

Az első kísérletben három különböző hőmérsékleten inaktiváltam a két rekombináns fágot, minden alkalommal 5 percen keresztül. A szobahőmérséklet közelébe hűlt inaktivált fágteleget

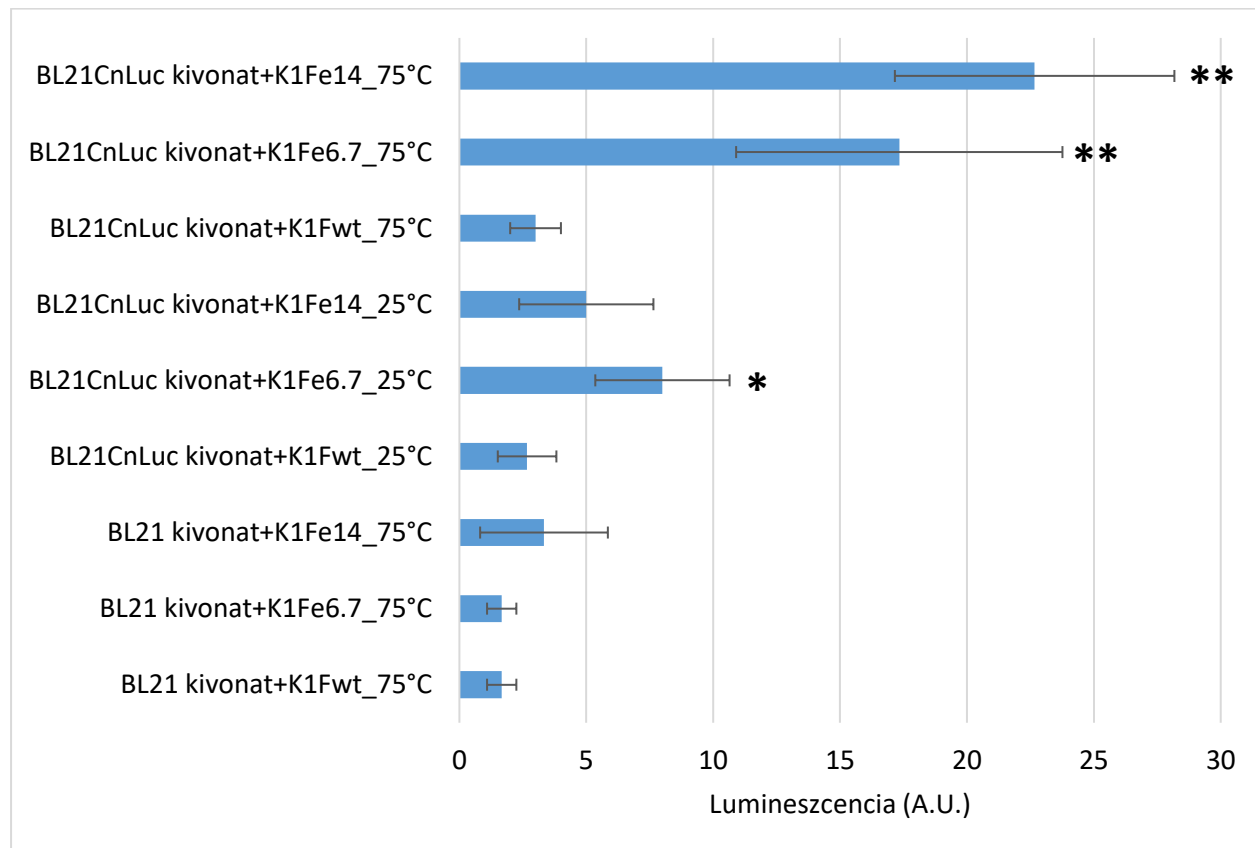
ezután további 15 percig inkubáltam indukált, majd szonikációval feltárt BL21(DE3) pZA31CnLuc_His_tetR sejt kultúra felüliszórával, ami időt ad a kapszidból felszabadult N-terminális- és a sejtextraktumban lévő C-terminális nanoluciferáz alegységek egymáshoz kötődésére. Végül az előkészített Promega gyártmányú NanoGlo reagens hozzákeverése után mértem a keletkező lumineszcenciát. Mindkét rekombináns fágtörzs esetén a háttérnél jelentősen nagyobb lumineszcenciát mértem, függetlenül a hőinaktiváció hőmérsékletétől (16. ábra).



16. ábra: Fágfejből felszabadított N-terminális nanoluciferáz (NnLuc) aktivitása

A mérések során K1Fe6.7::NnLuc (A) és K1Fe14::NnLuc (B) bakteriofágokat a jelzett hőmérsékleten történő hőinaktiváció után reagáltattam C-terminális nanoluciferázt (CnLuc) expresszáló törzs kivonatával. A grafikonok 3 párhuzamos mérés eredményét mutatják. A csillagozás kétmintás, párosítatlan Student-féle t-teszt eredményét mutatja, az egyes mintákat az LB háttérhez hasonlítva: *: $p < .01$; **: $p < .0001$

Egy második, hasonló kísérlet során számos negatív kontrollt is belefoglaltam a mérésbe. Az elvártaknak megfelelően a hőkezelt rekombináns bakteriofágokat és C-terminális alegységet tartalmazó minták szignifikáns lumineszcencia-növekmény mutattak a kontrollhoz képest, mindkét rekombináns fág törzs esetében. Ezzel szemben a C-terminális nanoluciferázt nem expresszáló sejtkultúra extraktumát tartalmazó minták nem mutattak a kontrolltól eltérő lumineszcens jelet. Hasonlóan, a C-terminális nanoluciferázt és vad típusú K1F bakteriofágokat, vagy a C-terminális nanoluciferázt és hőkezeletlen K1Fe14::NnLuc fágot tartalmazó minták sem mutattak szignifikáns növekményt. Az egyetlen váratlan eredmény a hőkezeletlen K1Fe6.7::NnLuc fágokat és C-terminális alegységet tartalmazó mintákban megfigyelhető - a hőkezelt fágokat tartalmazónál gyengébb, de - a kontrollhoz képest szignifikáns lumineszcencia növekmény (17. ábra).



17. ábra: Fágfejből felszabadított N-terminális nanoluciferáz (NnLuc) aktivitása

A „BL21CnLuc kivonat” minták indukált pZ431CnLuc_His_tetR plazmidot tartalmazó BL21(DE3) sejtek feltárásával kapott kivonátát jelölik. Az jelölt hőmérséklet a fág sejtexteraktumhoz keverése előtti hőkezelésére utal. A grafikonok 3 párhuzamos mérés eredményét mutatják. A csillagozás kétmintás, párosítatlan Student-féle t-teszt eredményét mutatja, az egyes mintákat a kontrollhoz (BL21 kivonat + K1Fwt) hasonlítva: *: $p < .05$, **: $p < .005$

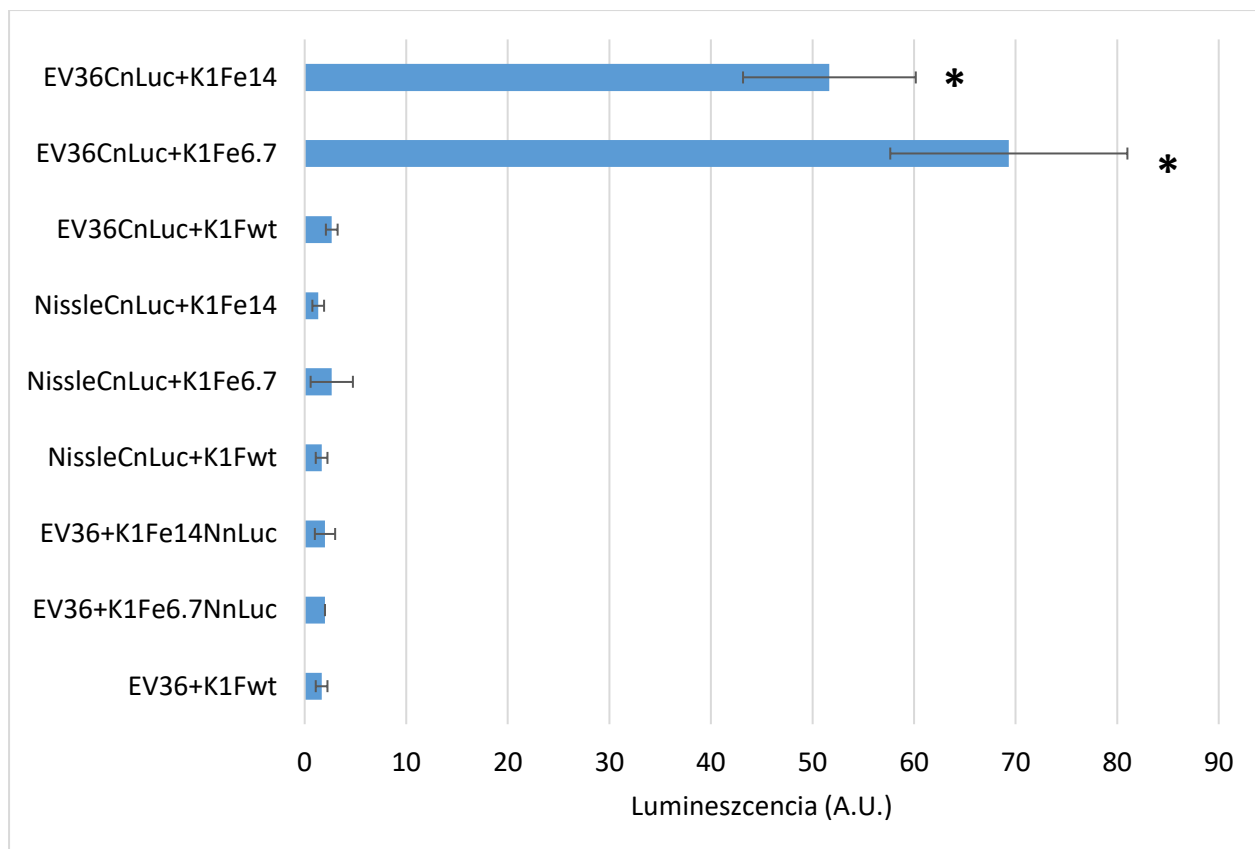
A magyarázat feltehetően a kísérletben felhasznált, frissen preparált bakteriofág lizátumban rejlik, ugyanis sejtésünk szerint az átírt virális proteinek egy része nem csomagolódik be a fágfejbe, hanem a lízis során oldatba kerül. Úgy ítéljük, hogy ez a maradék, még aktív fúziós fehérje okozza a kérdéses jelet. Megfigyeléseim szerint a lizátumban található aktív fúziós fehérje a lizátum preparálása után még napokig kimutatható jelet ad, ami fokozatos gyengülés után a háttér szintjére csökken (lásd függelék 30. számú ábrája). Összességében e két kísérlet igazolta, hogy a rekombináns fágok tartalmazzák az NnLuc enzimtöredék és a g6.7 ill. a g14 gén termékének fúziós fehérjét, és az rendelkezik az NnLuc-ra jellemző enzimatis aktivitással. Mivel ez az aktivitás túlnyomórészt csak a rekombináns fágok hőkezelése után vált kimutathatóvá, a fúziós enzimek az ép fág egy hozzá nem férhető kompartmentjében, minden bizonnyal a kapszidon belül helyezkedhetnek el.

5.4.2 A rekombináns fágok által generált lumineszcencia *in vivo* vizsgálata

A fenti kísérletek igazolták, hogy a g6.7::NnLuc, ill. a g14::NnLuc fúziós fehérjék a fág kapszidba csomagolódnak, és hőkezelés hatására onnan kiszabadíthatók. A kísérletek azt is demonstrálták, hogy a fúziós fehérjék megőrzik az NnLuc enzimatis aktivitását. Jelen szekció fő kérdése az volt, hogy fágfertőzés során képes-e a rekombináns fág a kétféle fúziós fehérjét a baktériumsejtbe injektálni oly mennyiségben, hogy az detektálható mértékű fényt generálhasson. E kísérletekben olyan célsejteket használtunk, melyekben plazmid biztosította a CnLuc fehérje jelenlétét.

5.4.2.1 A végponti lumineszcencia mérése a fág-sejt interakció során

Az első sejtes kísérletben vad típusú, valamint rekombináns fágokkal fertőztem C-terminális nanoluciferázt expresszáló- és negatív kontrollként nem expresszáló EV36 célsejteket, illetve K5 kapszulával rendelkező Nissle1917 törzs sejtjeit, melyet az irodalom szerint a K1F bakteriofág nem képes fertőzni. A C-terminális alegységet pZA31_CnLuc_His_TetR plazmidról expresszáltattam a megfertőzni kívánt sejtekben, *in vivo*. A fágok hozzáadása után 12 perccel adtam az elegyhez az előkészített NanoGlo reagenst, mely lizáló ágenst tartalmaz, így a virális gének kifejeződését a baktérium lizálásával leállítja.



18. ábra: Végponti lumineszcencia értékek különböző baktérium-fág interakciók esetén.

Az "EV36CnLuc" indukált pZA31CnLuc_His_tetR plazmid tartalmú *E. coli* EV36 sejteket jelöl, az "EV36" plazmid-mentes *E. coli* EV36 sejteket, a NissleCnLuc pedig indukált pZA31CnLuc_His_tetR plazmid tartalmú *E. coli* Nissle 1917 sejteket jelent. Az oszlopok 3 párhuzamos mérés eredményét mutatják. A csillagozás kétmintás, párosítatlan Student-féle t-teszt eredményét mutatja, az egyes mintákat a kontrollhoz (*E. coli* EV36 + K1Fwt) viszonyítva: *: $p < .001$

A kísérletben kizárólag akkor kaptam lumineszcencia-növekményt a kontrollhoz képest, ha a CnLuc-ot túltermelő *E. coli* EV36 sejtet fertőztem valamelyik rekombináns fággal (18. ábra). Ez a lumineszcens jel, mivel 12 perccel a fertőzés után lett mérve, két forrásból származhat: a kapszidba csomagolt fúziós fehérjék sejtbe történő injektálásából, illetve a beinjektált fág-DNS-ről történt expresszióból. Ezek aránya e kísérletből nem derül ki, de mindenesetre igazolja a fúziós fehérjék NnLuc-komponensének funkcionalitását a sejten belül. A másik fontos következtetés, hogy a rendszer szelektív: az *E. coli* Nissle 1917 törzs, amely nem célpontja a fágoknak, nem képes lumineszcenciát generálni rekombináns fágfertőzés és egyidejű CnLuc túltermelés esetén sem. Természetesen akkor sem keletkezett lumineszcencia-növekmény

a kontrollhoz képest, ha a fágból hiányzott az NnLuc-ot, vagy a sejtből hiányzott a CnLuc-ot kódoló gén.

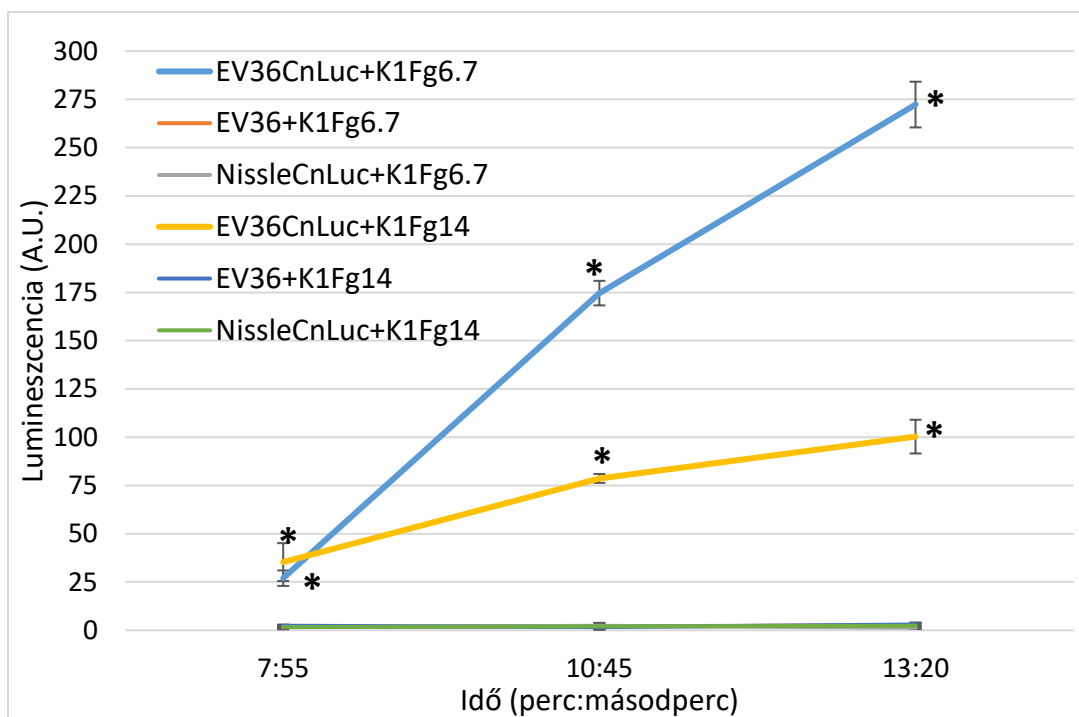
5.4.2.2 A lumineszcencia kinetikus mérése a fág-sejt interakció során

A T7 családba tartozó fágok génjeinek genomi elhelyezkedése nagy vonalakban megfelel a kifejeződésük sorrendjének. A bal végén található géncsoport tagjai, az I. osztályú (Class I) gének a fertőzés utáni 2. és 8. perc között, a középén található II. osztályú (Class II) gének a 6. és 15. perc között, míg a jobb végén található III. osztályú (Class III) gének a 6-8. perctől kezdve a lízisig (25. perc) kerülnek fehérjeszinten kifejeződésre (Studier, 1972). A beültetett fúziós gének transzlációját két okból is a 6.-8. perc után várjuk:

- a fúziós genetikai konstruktok inszerciós lókusza, vagyis a g10 downstream régiója a kései gének közé esik
- a két fúziós gént (g6.7::NnLuc és g14::NnLuc) a g6.7 és g14 gének természetes promóterével hajtottuk meg. Az utóbbi tény egy esetleges promóter-alapú expresszió-időzítés esetén is kései (III. osztályú) expresszióhoz vezet, mivel a g6.7 és g14 eredetileg is a kései gének csoportjába tartozik.

Amint a célkitűzésekben jeleztem, a munka egyik fő kérdése és potenciális újdonsága a lumineszcens jel kimutatásának sebességében rejlik, ami a nanoluciferáz enzimtöredék fehérjeként történő bejuttatásán alapul. Az *in vitro* sejtmentes kísérletek bizonyítják a funkcióképes fúziós fehérjék kapszidba csomagolódását, viszont önmagukban nem támasztják alá azok injektálódását a transzlokációs csatornán keresztül, illetve, hogy amennyiben képesek ilyen úton bejutni a sejtekbe, megőrzik-e aktivitásukat. Ezen lényeges részletek tisztázására kinetikus kísérleteket végeztem, melyek fő kérdése az volt, hogy a III. osztályú génekre jellemző 8. perc előtt detektálható-e lumineszcencia-növekmény a fágfertőzés során. E kísérletekben továbbra is C-terminális nanoluciferázt kifejező sejt kultúrákat fertőztem N-terminálist hordozó rekombináns bakteriofágokkal. A fertőzést az egyes mintacsoportokban meghatározott időközönként NanoGlo reagens hozzáadásával állítottam le. Közvetlenül ezután lemértem a keletkezett lumineszcenciát. A 19. ábra tanúsága szerint mérhető jel – az elvárásoknak megfelelően – csak CnLuc expresszáló EV36 célsejtek fertőzése esetén figyelhető meg. Az eredmény mindkét rekombináns fág összes mérési pontjánál szignifikánsan különbözik a negatív kontrolltól. A T7 család fentiekben

részletezett fehérjeexpresszió-időrendje alapján a 8 perc előtt megszakított fertőzési folyamatnál detektálható jel jó eséllyel az génexpresszió nélküli, csupán a fágfejben hordozott fúziós fehérjék beinjektálásán alapuló jelképzésre utal. A CnLuc expresszálo nem célsejt Nissle1917 törzsekben nem keletkezett mérhető jel, csakúgy, mint a C-terminálist nem kifejező EV36 célsejt esetében, ami ugyancsak megfelel az elvárásainknak.



19. ábra: Különböző fág-baktérium interakciók lumineszcencia-kinetikája.

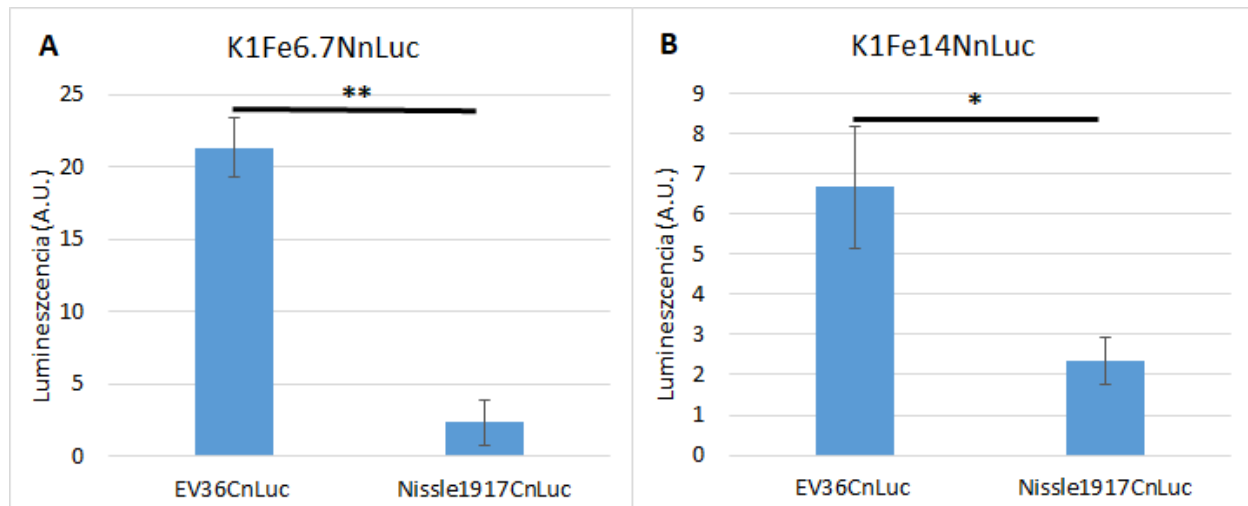
A CnLuc jelzésű sejt kultúrák indukált pZA31_CnLuc_His_tetR plazmidot hordoztak, mely a C-terminális nanoluciferáz jelenlétét biztosította a sejten belül. A grafikonok 3 párhuzamos mérés eredményét mutatják. Az első mérési pont 7 perc 50-55 másodperc. Az egyes mérési pontokra helyezett csillagok a negatív kontrollal (CnLuc-ot nem kifejező EV36, ugyan azzal a faggal fertőzve) szemben elvégzett Student-féle t-teszt eredményét mutatják. *: $p < 0.01$

5.4.2.3 A lumineszcencia eredetének bizonyítása

A kinetikus kísérletek meglátásunk szerint csak gyengén támasztják alá a hipotézisünk egyik lényeges elemét, vagyis a bakteriofágok által közvetlenül a célsejtekbe juttatott fúziós fehérjék jelenlétét.

A további bizonyítás érdekében további kísérleteket végeztem el. Elsőként megpróbáltam a fertőzést, pontosabban a baktériumok és fágok összekeverést követően a lehető leghamarabb szignifikáns lumineszcencia jelet előállítani. Az előzőekben bemutatott tesztekhez hasonlóan N-

terminális nanoluciferázt hordozó rekombináns bakteriofágokkal fertőztem C-terminális plazmidról kifejező EV36, vagy Nissle1917 sejteket (utóbbit, mint negatív kontroll).

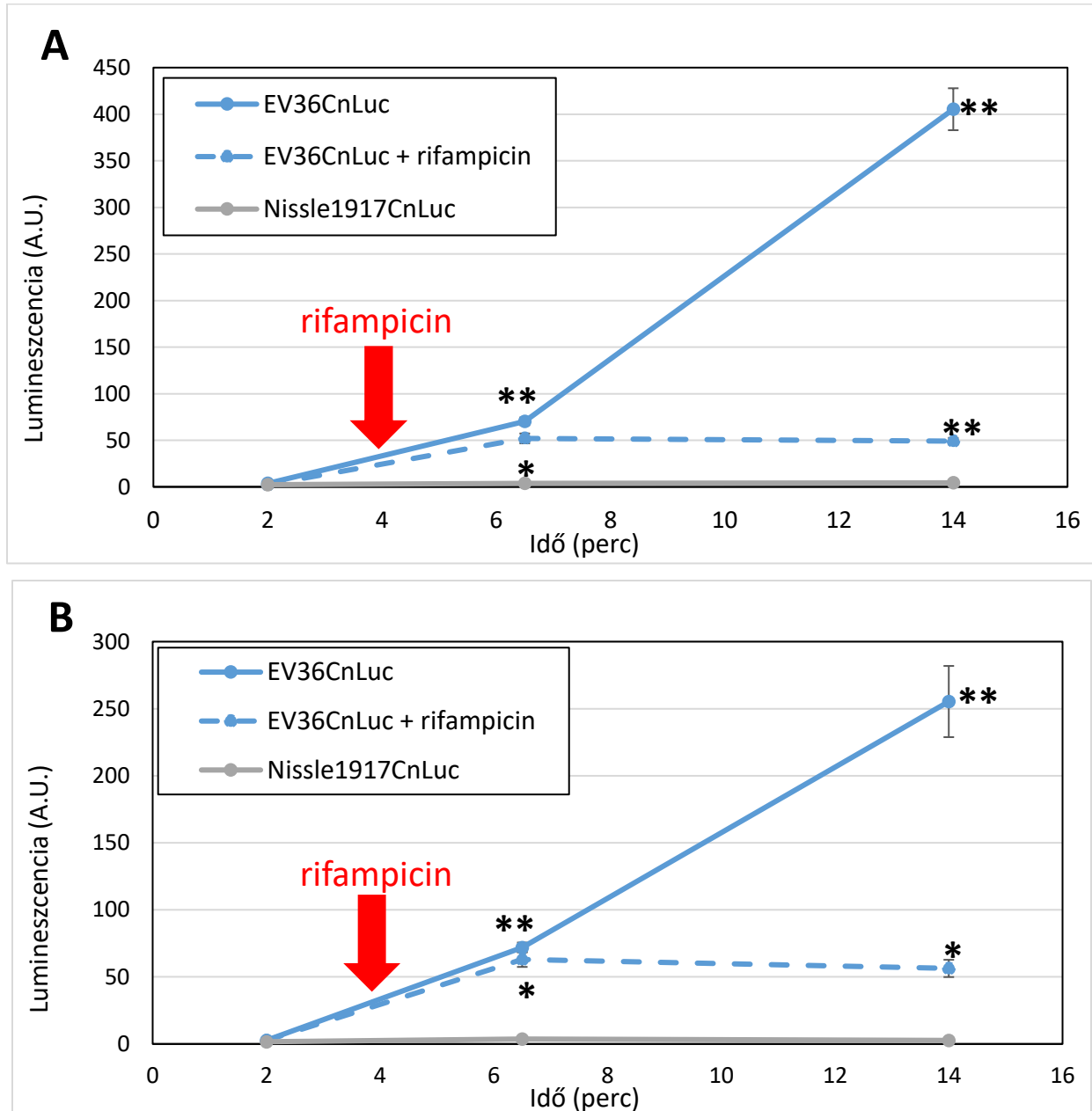


20. ábra: Fág-baktérium interakciók korai lumineszcencia értékei K1Fe6.7::NnLuc (A) és K1Fe14::NnLuc (B) bakteriofágokkal történő fertőzésnél. A mérés 5 perc 45 másodperccel a fertőzés kezdete után történt. A sejtkultúrák indukált pZA31CnLuc_His_tetR plazmidot hordoztak, mely a C-terminális nanoluciferáz jelenlétét biztosította a sejtben belül. A grafikonok 3 párhuzamos mérés eredményét mutatják. Az első mérési pont 7 perc 50-55 másodperc. Az egyes grafikonokra helyezett csillagok Student-féle t-teszt eredményét mutatják. *: $p < .05$; **: $p < .001$

Az 20. ábrán bemutatott értékeket 5 perc 45 másodperccel a fertőzés után mértem. Mivel az irodalmi források némi rugalmassággal 6 és 8 perc közé teszik a késői gének kifejeződésének kezdetét, megalapozottan állíthatjuk, hogy a 6 perc előtt kimutatott lumineszcencia alátámasztja a fágfejben hordozott fúziós fehérjék injektálásának tényét és a csatornán áthaladt enzimtöredék funkcionálisát.

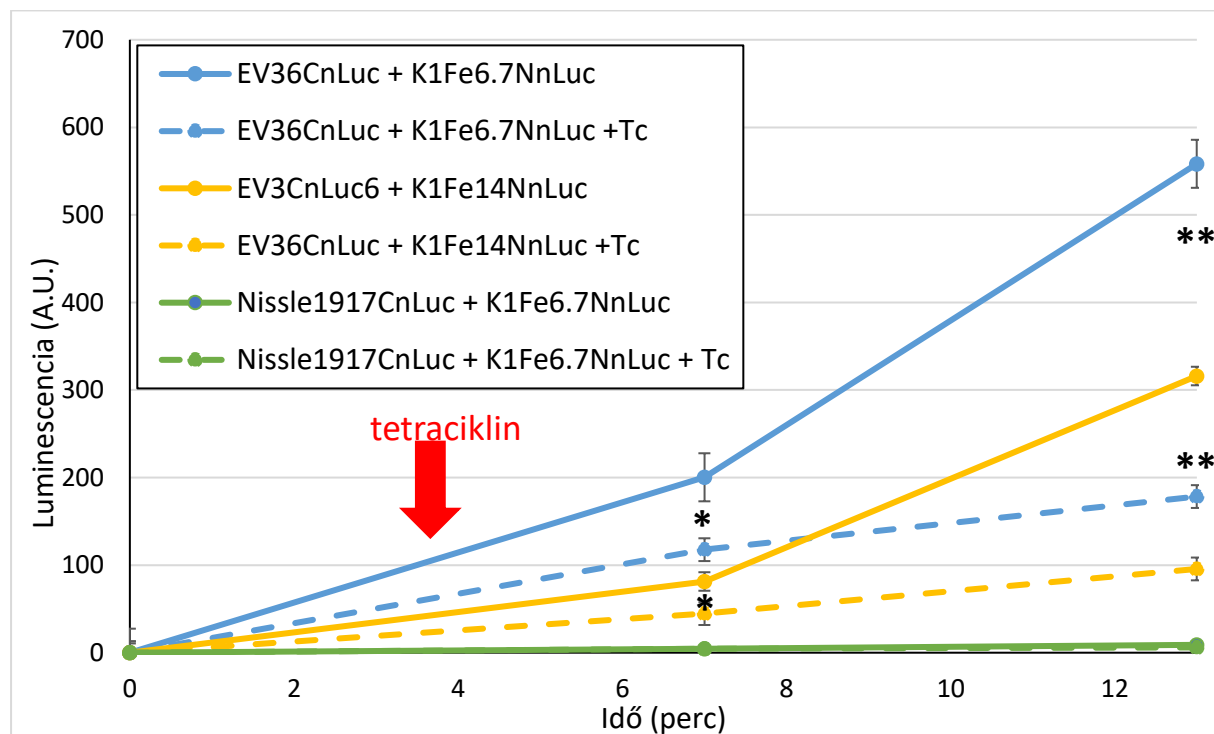
Egy másik kísérletben eltérő megközelítést alkalmaztunk, a kinetika helyett a transzkripció leállításával alátámasztva a hipotézist. Ennek kivitelezéséhez ismét rekombináns bakteriofágokkal fertőztem C-terminális nanoluciferázt kifejező sejteket, azonban egy-egy mintacsoportban a fágok hozzákeverése után 4 perccel 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ rifampicin hozzáadásával leállítottam a bakteriális transzkripciót. A 21. ábrán kiválóan megfigyelhető ahogy a rifampicinnel kezelt, valamint a rifampicinnel nem kezelt minták is hasonló mértékű, a negatív kontrollnál szignifikánsan nagyobb lumineszcenciát mutatnak 6 perc 30 másodpercnél. Ez jelzi, hogy a 6 min 30 s időpontban még gyakorlatilag a teljes lumineszcencia-jel független a bakteriális transzkripciótól, azaz feltehetően a beinjektált fúziós fehérjék generálják. A rifampicinnel kezelt

és kezeletlen minták lumineszcens jele ezután elválnak egymástól; az előbbi platózik, míg utóbbi esetében – bizonyára a sejtekben újonnan szintetizált fúziós fehérjék hatására – tovább növekszik.



21. ábra: A transzkripciógátlás hatása a lumineszcencia kinetikájára K1Fe6.7::NnLuc (A) és K1Fe14::NnLuc (B) bakteriofágokkal történő fertőzésnél. A piros nyíllal jelölt időpontban (4 perccel a fertőzési esemény kezdete után) 50 µg/ml rifampicin került hozzáadásra az EV36CnLuc+rifampicin jelölésű sejtkultúrához. A sejtek indukált pZA31_CnLuc_His_tetR plazmidot hordoztak, mely biztosította a C-terminális nanoluciferáz jelenlétét a sejten belül. A grafikonok 3 párhuzamos mérés eredményét mutatják. Az első mérési pont 6 perc 50 másodperc. Az egyes grafikonokra helyezett csillagok Student-féle t-tesztek eredményét mutatják, a Nissle-törzshöz viszonyítva. *: $p < .005$; **: $p < .001$

A transzkripció leállítása mellett a transláció leállítását is megvizsgáltam. Ennek érdekében ismét rekombináns bakteriofágokkal fertőttem C-terminális nanoluciferázt kifejező sejteket, azonban egy-egy mintacsoportban a fágok hozzákeverése után 3 perc 50 másodperccel ezúttal 61,25 µg/µl tetraciklin hozzáadásával leállítottam a bakteriális translációt. Az első lumineszcencia leolvasásra ezt követően 7 perc 20 másodpercnél került sor. Ahogy vártuk, a tetraciklinnel kezelt minták is a kontrollnál szignifikánsan nagyobb lumineszcencia jelet mutattak (22. ábra).



22. ábra: A translációgátlás hatása a lumineszcencia kinetikájára K1Fe6.7::NnLuc és K1Fe14::NnLuc bakteriofágokkal történő fertőzésnél. A piros nyílal jelölt időpontban (3 perc 50 másodperccel a fertőzési esemény kezdete után) 61,25 µg/ml rifampicin került hozzáadásra az EV36CnLuc+TC jelölésű sejtkultúrákhoz. A sejtek indukált pZA31_CnLuc_His_TetR plazmidot hordoztak, mely biztosította a C-terminális nanoluciferáz jelenlétét a sejtben belül. A grafikonok 3 párhuzamos mérés eredményét mutatják. Az első mérési pont 7 perc 20 másodperc. Az egyes grafikonokra helyezett csillagok Student-féle t-teszt eredményét mutatják, az EV36 sejteket a tetraciklinnel kezelt EV36 törzshöz viszonyítva. *: $p < .01$; **: $p < .001$

Ez igazolja a bakteriális fehérjeszintézis szükségességét a fény generálásához, és az injektált fúziós fehérjék enzimátikus aktivitását jelzi. A 21. ábrán megfigyelhető kísérlettel szemben viszont itt már jelentős különbség van az első mérési időpontban a gátlószerezrel kezelt és nem kezelt minták lumineszcenciája között. Ez valószínűleg a kezeletlen kultúrákban 7 min 20

sec-nál már zajló transzkripció-transzláció következménye. A második, 13 percnél végzett mérési pontban egyértelműen tovább nő a kezeletlen mintákban megfigyelhető lumineszcens jel az első időpontban megfigyelhető értékekhez, valamint a második időpontban látható, tetraciklinnel kezelt mintákhoz képest is, ami a baktériumban expresszálandó fúziós fehérjének tulajdonítható.

Meglepő módon a tetraciklinnel kezelt minták első és második mérési időpontja között is megfigyelhető egy el nem hanyagolható lumineszcencia-növekmény. A magyarázatot az újabb batch-ből származó Promega NanoGlo kit-ek szolgáltathatják, melyeknél a reagens hozzákeverésétől a leolvasásig eltelt idő – bizonyos keretek között – növeli a kapott jel nagyságát.

5.4.3 A modell diagnosztikai rendszer tesztelése

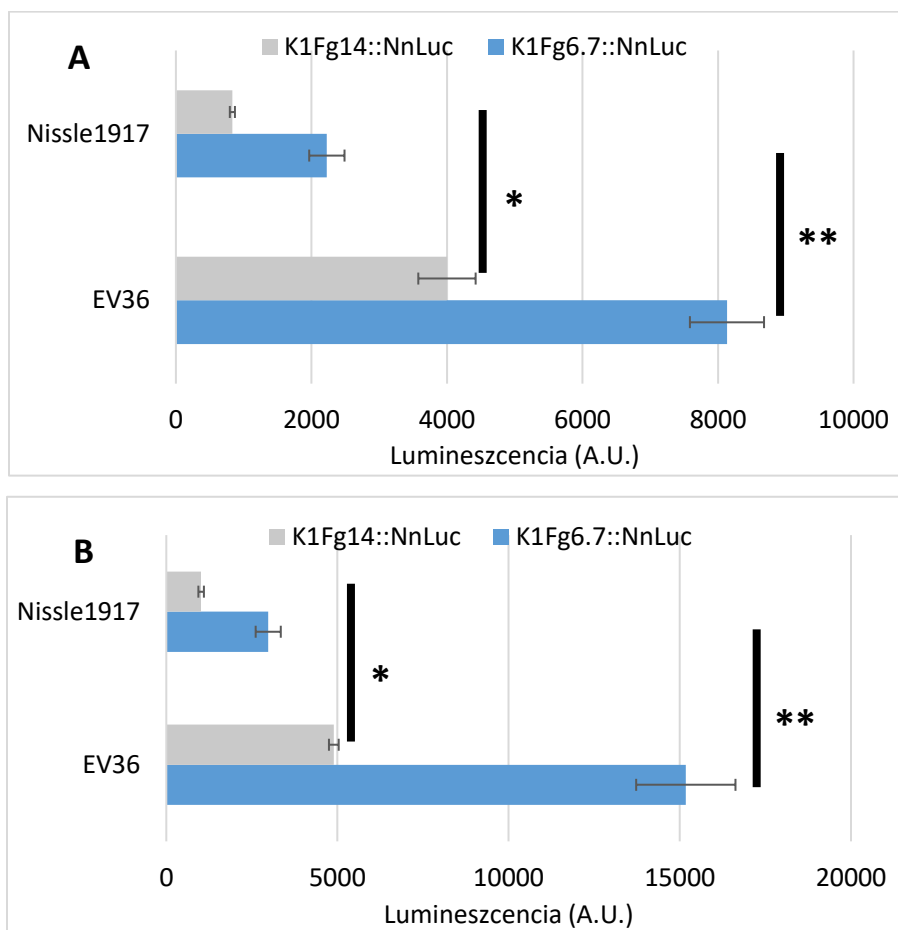
Nyilvánvaló, hogy a természetben megtalálható patogén baktériumok nem termelnek C-terminális nanoluciferáz enzimtöredéket csupán annak érdekében, hogy működőképesse tegyék a korábbiakban felvázolt diagnosztikus eljárást. A módszer tehát csak akkor lehet a gyakorlatban is használható, ha sikerül lumineszcens jelet produkálni vad típusú sejtek fertőzésével, külsőleg hozzáadott C-terminális enzimalegységgel. Ebben az elrendezésben a fágfejben hordozott N-terminális fúziós fehérje a sejten belül nem, csak a lízist követően, az extracelluláris oldatban kapcsolódik a C-terminálishoz. A felhasznált kereskedelmi lumineszcencia kit (Promega NanoGlo) puffertje tartalmaz egy, a cég által meg nem nevezett szélesspektrumú sejtfeltáró ágenszt. Ideális esetben ez a komponens elégséges lehet a sejtek feltárásához, így további feltáró ágens hozzáadására vagy a bakteriofágok által előidézett lízis kivárására nincs szükség.

A külsőleg hozzáadott nanoluciferáz töredék az intracelluláris, kompartmentalizált tér helyett a reakciós oldatban kell, hogy diffundáljon, majd kapcsolódjon egy N-terminális partnerhez, funcionális enzimet képezve. A kapcsolódási események számának növelése érdekében logikusnak tűnik megnövelni a reagáló partnerek számát. Ennek egyik módja a rekombináns fágkészítmény koncentrációjának növelése. Ez a fágok ultrafiltrációjával megoldható, azonban a fágok koncentrációja korábbi munkánkban tett megfigyeléseim szerint 10^{13} pfu/ml fölé a szuszpenzió viszkozitásnövekedése miatt nem növelhető. Annak érdekében, hogy a C-terminális nanoluciferáz töredék mennyisége semmiképp sem legyen limitáló a reakcióelegyen, annak termeltetését az évtizedek óta használt és jól bevált BL21(DE3)

sejtekben, a T7 promóterrel rendelkező pET24CnLuc_His plazmidról végeztem el. Ahogy a plazmid elnevezése is jelzi, a CnLuc kazetta egy hexahisztidin-taggal van fúzionálva, ami lehetővé teszi a Ni-NTA oszlopon való tisztítását és – ami talán még fontosabb - koncentrációját.

5.4.3.1 Fertőzés externális CnLuc jelenlétében

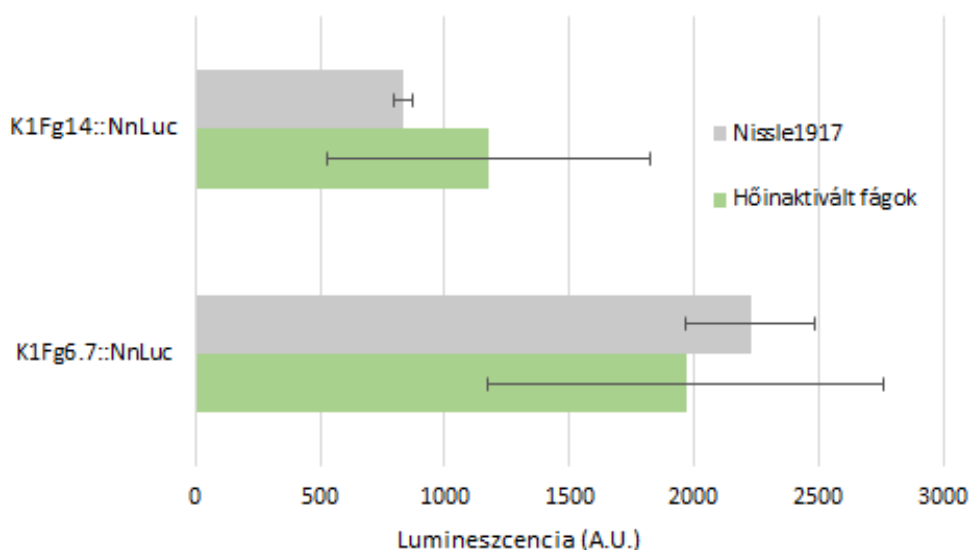
A diagnosztikai rendszert modellező kísérletekben ismét rekombináns K1Fe6.7::NnLuc és K1Fe14::NnLuc bakteriofágokat vettem be, azonban ezúttal plazmidot nem hordozó, EV36 vagy Nissle 1917 típusú *E. coli* sejtek fertőzésére. A reakcióelegyhez hozzáadtam a tisztított-koncentrált C-terminális nanoluciferáz enzimtöredéket. A sejteket a fertőzés megkezdése után 3 vagy 12 perccel lizáltam, Promega NanoGlo reagens hozzáadásával.



23. ábra: Különböző fág-baktérium interakciók során mért lumineszcencia, külsőleg hozzáadott CnLuc felhasználásával. A grafikonok 3 párhuzamos mérés eredményét mutatják 3 perccel (A) és 12 perccel (B) a bakteriofágokkal történő fertőzés után. A fekete vonalak a Student-féle t-teszt párokat jelzik: *: $p < .0005$; **: $p < .0001$

A 23. ábra tanúsága szerint ez a stratégia rendkívül impozáns eredményeket adott, már 3 perccel a fertőzés után erősen szignifikáns különbség mutatkozik az EV36 célsejt és a Nissle1917 negatív kontroll esetében mért lumineszcencia között, különösen a K1Fe6.7::NnLuc fágok esetében. Ez az nagymértékű szignifikancia 12 perc elteltével még tovább nő, minden bizonnyal az időközben transzkripció-transzláció útján termelődő N-terminális nanoluciferáz töredék következtében.

Ezeket az eredményeket némileg beárnyékolja a negatív kontroll által adott lumineszcencia, amely mindenképpen magyarázatra szorul. A kísérletek során megfigyeltem, hogy a hőinaktivált rekombináns bakteriofágok és tisztított C-terminális nanoluciferáz elegye hasonló mértékű lumineszcenciát ad, mint a negatív kontrollnak szánt Nissle1917 kultúra, amelyet rekombináns fágokkal és tisztított C-terminálissal kevertem össze. Noha a szórás meglehetősen nagy, a 24. ábrán megfigyelhető, hogy a kérdéses értékek kísértetiesen hasonlítanak egymásra.



24. ábra: Negatív kontroll perspektívában.

A grafikon 3 párhuzamos mérés eredményét mutatják

Megjegyzendő továbbá, hogy a 23. ábrán a Nissle1917 minták lumineszcenciája nagyon hasonló a fertőzés 3. és 12. percében (rendre $2228 \pm 260,49$ és $2977 \pm 367,11$ a g6.7- illetve $833 \pm 37,64$ és $1018 \pm 80,55$), ami elhanyagolható transzkripció-transzláció eredetű jel keletkezésére utal. Ezekből levonhatjuk a következtetést, hogy a negatív kontrollban látható lumineszcencia feltehetően a fágfejből felszabaduló N-terminális fúziós fehérjék eredménye.

Ezen spontánnak tűnő fehérjekidobódás megfigyeléseim szerint valószínűleg a NanoGlo reagens sejtfeltáró ágensének a mellékhatása, melynek összetétele üzleti titok. E feltételezés szerint a NanoGlo puffer fágfelnnyító hatásának kivédése a negatív kontroll által generált jel csökkenését eredményezné, amely a diagnosztikai rendszer jel/zaj arányát tovább javíthatná. Ennek lehetőségeit a diszkusszióban tárgyalom.

Összességében az itt bemutatott kísérlet igazolja, hogy egy fúziós enzim-molekula fággal történő baktériumba injektálása vad típusú bakteriális törzsek lumineszcens detekciójára is felhasználható, ha (a szubsztrát mellett) az enzim hiányzó fragmensének jelenlétét is biztosítjuk a reakcióban.

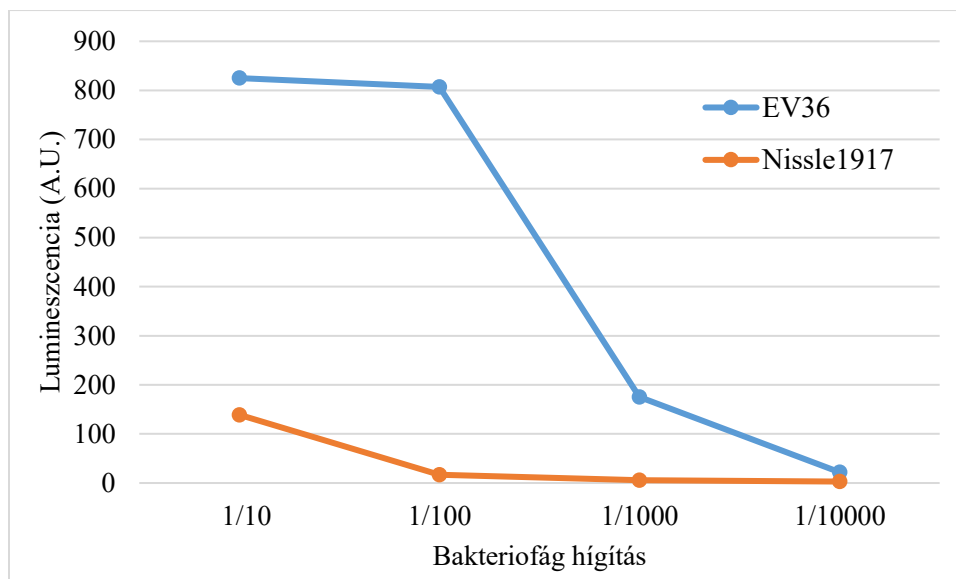
5.4.3.2 A modell érzékenységeinek tesztelése

Egy jövőbeli szabadon forgalmazott diagnosztikus teszt egyik legfontosabb tulajdonsága az érzékenység, vagyis a vizsgált kórokozó kimutathatósági küszöbértéke.

A felvázolt diagnosztikus rendszerünk érzékenységét kézenfekvően az egyes reakcióterekben lefertőzött baktériumok számának csökkentésével vizsgálni. A korábbi kísérleteknek való nagyobb fokú megfeleltethetőség érdekében úgy döntöttünk, a sejtszámot nem az előzetes növesztés idejének csökkentésével, hanem a mid-log fázisú kultúrából vett alikvotok sorozatos hígításával csökkentjük.

A korábbiakban feltárt negatív-kontroll probléma, ami valószínűleg nem a nem-célsejtek fertőzéséből, hanem a szabad virionok reagens általi feltárásból ered, egy érzékenység-vizsgálatban előreláthatólag értelmezhetetlen adatokat szülne. Ennek orvoslására azzal a feltételezéssel éltünk, hogy a probléma eredetét illető sejtsemm helyes és a negatív kontrollban megfigyelhető nemkívánatos jel a reagens komponenseinek megváltoztatása nélkül, csupán a fertőzésben résztvevő bakteriofágok számának csökkentésével is mérsékelhető, vagy akár megszüntethető.

Ennek érdekében tehát először egy pilot kísérletben optimalizáltam a felhasznált fágok mennyiségét a negatív kontroll által adott jel csökkentéséhez. A kísérlet során négy különböző hígítású bakteriofágkeverékkel fertőztem szintén hígított EV36 (lyukanként megközelítőleg $6,9 \times 10^5$ db), vagy Nissle1917 (lyukanként megközelítőleg $5,6 \times 10^5$ db) sejteket. A tisztított-koncentrált C-terminális nanoluciferázt az előző szekcióhoz hasonlóan kívülről adtam hozzá az elegyhez. A Nanoglo reagens hozzáadásáig megközelítőleg 15 perc telt el.



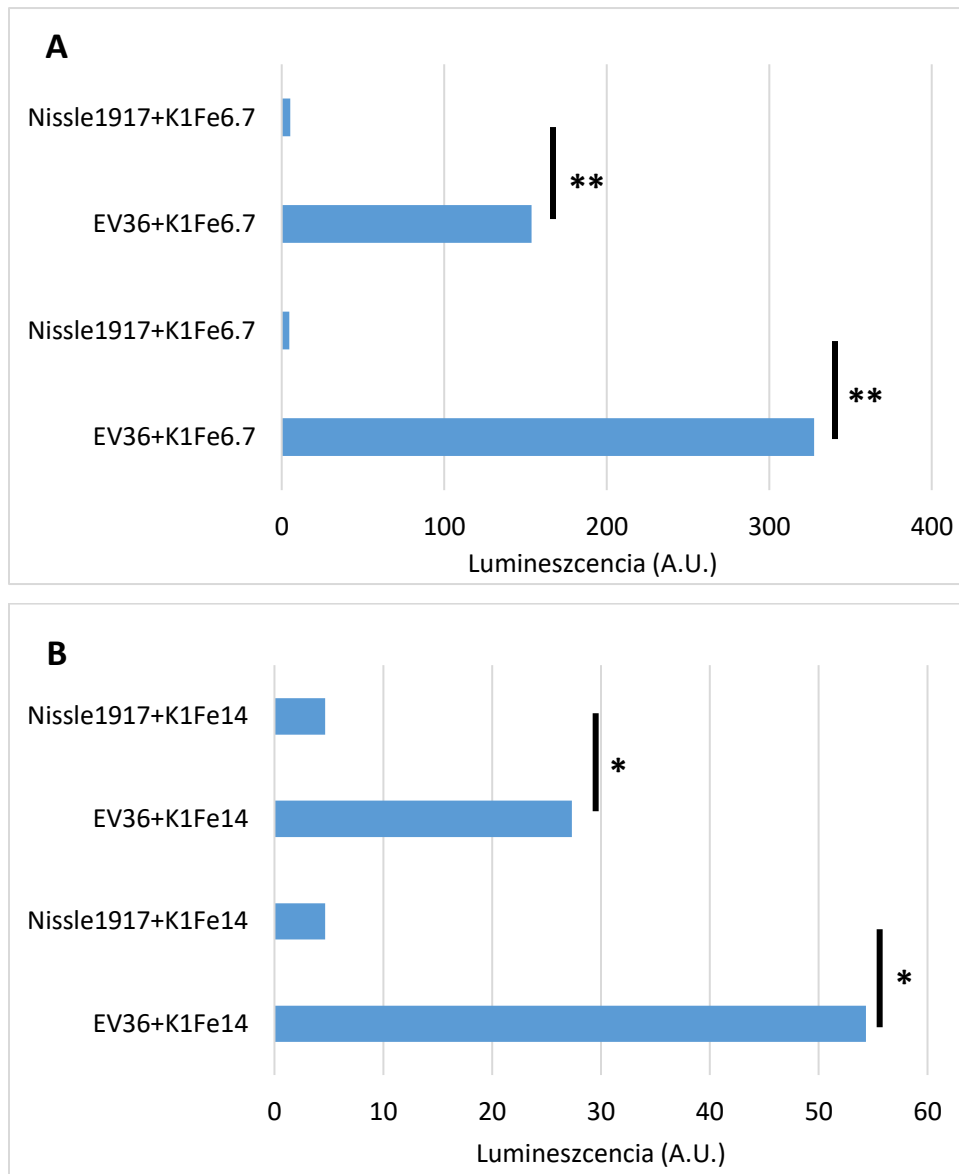
25. ábra: Bakteriofágok mennyiségének optimalizálása a negatív kontroll csökkentése érdekében.

A kiindulási fágkonzentráció megközelítőleg 4×10^9 virion/tartalom/ml

A 25. ábrán jól látható, ahogy a negatív kontroll már a százszorosán hígított bakteriofágok esetén a háttér közelébe csökken, majd ennél nagyobb hígításoknál teljesen kimutathatatlan, miközben a célsejt EV36 fertőzése esetén még ezerszeres hígítás esetén is viszonylag erős jel figyelhető meg, ami a legnagyobb hígításnál még mindig mérhető. Látványos, ahogy a két kisebb fágkonzentrációnál az EV36 sejtek nagyon hasonló méretű jelet adnak, miközben a Nissle sejtekben megközelítőleg tizedére csökken a jel, tehát ugyanakkora mennyiségű virion hozzáadása mellett a pozitív kontrollban a sejtek száma, míg a negatív kontrollban a fágok száma a jelet limitáló tényező. Ezek az eredmények alátámasztják korábbi sejtésemet, miszerint a negatív kontrollban megfigyelhető értelemszerűen nem kívánatos jel a reagens hatására spontán felnyíló fágokból ered, amennyiben nagyobb mennyiségű bakteriofág nagyobb mennyiségű kapszidba csomagolódott enzimetörredék felszabulálásával jár együtt. Megfigyelhető továbbá, hogy valahol a száz- és ezerszeres hígítás között a fágok válnak a képződő lumineszcenciát limitáló tényezővé, ebben a kísérleti felállásban, K1Fe6.7 fágokkal fertőzve megközelítőleg $6,9 \times 10^5$ db EV36 sejtet.

A tényleges érzékenységvizsgálathoz a negatív kontroll minimalizálása érdekében az ezerszeresen hígított bakteriofágokat választottuk, ami lyukanként megközelítőleg $1,2 \times 10^5$, vagyis százhuszezer viriont jelent. A kombinatórikus robbanás elkerülése végett, egyfajta „megalapozott találgatás”-ként úgy döntöttünk, kétféle sejtszámot tesztelünk, EV36 kultúra

esetében lyukanként megközelítőleg $6,9 \times 10^5$ -, illetve $6,9 \times 10^4$ db, míg Nissle1917 esetében lyukanként megközelítőleg $5,6 \times 10^5$ -, illetve $5,6 \times 10^4$ db sejtet tesztelve a 96 lyukú lemezen. Az így beállított reakciós terekbe kevertem a szintén beállított mennyiségű bakteriofágot, majd megközelítőleg 8 perc elteltével az elegyhez kevertem a NanoGlo reagenst és rövidesen megkezdtem a leolvasást.



26. ábra: Érzékenységi vizsgálat külsőleg hozzáadott CnLuc felhasználásával.

A grafikonok 3 párhuzamos mérés eredményét mutatják 8 perccel megközelítőleg $1,2 \times 10^5$ bakteriofággal történő fertőzés után. Az A jelű grafikonon a reakciókamrákba rendre $6,91 \times 10^5$ EV36, illetve $5,56 \times 10^5$ Nissle1917 sejt, míg a

B jelű grafikonon rendre $6,91 \times 10^4$ EV36, illetve $5,56 \times 10^4$ Nissle1917 sejt került betöltésre. A fekete vonalak a

Student-féle t-teszt párokat jelzik: *: $p < .001$; **: $p < .0001$

Ahogy a 26. ábrán látható, az összeállított diagnosztikus rendszer megbízhatóan ki tud mutatni $6,9 \times 10^4$ bakteriális sejtet, miközben a célsejtet nem tartalmazó mintákban mindössze egy rendkívül alacsony háttérérték figyelhető meg. Az érzékenységvizsgálat teljessé tételéhez további méréseket fogok végezni annak meghatározására, hogy mennyi a legkisebb baktériumszám, amely még elegendő a kontrolltól szignifikánsan eltérő jel képzéséhez.

6. Diszkusszió

A munkánk célja annak a hipotézisnek a tesztelése volt, hogy egy fág kapszidfejének belsejéből egy – a fág specifikitásától függő - célbaktérium citoplazmájába injektált fehérje közvetlenül kimutatható-e könnyen elérhető laboratóriumi eszközökkel. A munkát megalapozó újszerű ötlet az volt, hogy a célsejtbe való injektálásra predesztinált fág internális kapszid fehérjét (ICP) olyan riporter fehérje partnerhez fuzionáljuk, amely a kapszidból kijutva könnyen kimutatható jelet képez. Megvizsgáltuk a kromogén, fluoreszcens és lumineszcens jelet adó fehérjék alkalmazását, végül úgy döntöttünk, hogy a nanoluciferáz fehérjét használjuk fúziós partnerként, mivel a lumineszcencia irodalmi adatok szerint sokkal jobb jel-zaj aránnyal rendelkezik, mint a két másik riporter kategória (Mauri, Vecchione and Fritz, 2019).

A nanoluciferáz az *Oplophorus gracilirostris* mélytengeri garnélarák luciferázának mesterségesen létrehozott származéka, amely kis mérettel (19,1 kDa), hosszú aktivitással és magas specifikus aktivitással rendelkezik, ugyanis a fényreakcióhoz furimazin szubsztrátra van szükség (Hall *et al.*, 2012). Ezen enzim legfőbb előnye kis mérete, mely tovább csökkenthető a hasított, önmagát összeszerelő formájának (NnLuc-CnLuc) felhasználásával (Zhao *et al.*, 2016). Ez a megoldás több potenciális problémát is megkerül:

- a nem kapcsolódó fágokból származó háttérlumineszcenciát
- a nagyobb fehérjerakomány által potenciálisan megzavart ICP injektálást
- a nagyobb méretű klónozott szekvencia következtében fellépő fitness-csökkenést

Ezek közül a háttérlumineszcencia kiküszöbölésére irányuló várakozások nem, vagy csak mérsékelten teljesültek, ugyanis az *in vitro* kísérletek (17. ábra) és a kívülről hozzáadott C-terminálist felhasználó kísérletek során (23. ábra) is jelentős háttérlumineszcencia volt megfigyelhető. Noha az N-terminálist hordozó bakteriofágok önmagukban (a NanoGlo reagens hozzáadásával) valóban nem képesek lumineszcens jelet előállítani, a tényleges felhasználás

során biztosított CnLuc jelenlétében a friss fágglizátumban jelenlevő szabad NnLuc, vagy a reagens által szándékolatlanul felnyitott fágkapszidok képesek jelet adni az adott tesztben kimutatni kívánt baktériumok jelenléte nélkül is.

Ezen tapasztalatok ellenére **magabiztosak vagyunk abban, hogy a megfelelő paraméterek beállításával teljesen elkerülhető, vagy elhanyagolható szintre csökkenthető a háttérlumineszcencia.** Erre a legjobb megoldás egy olyan Nanoluciferáz reagens kifejlesztése lenne, amely éppen hagyja a fágkapszidokat. Ennek kivitelezése túlmutat a jelenlegi munka hatókörén. Egy másik lehetőség a háttér csökkentésére az érzékenységvizsgálat során bemutatott megközelítés, nevezetesen a tesztben résztvevő bakteriofágok számának csökkentése (25-26. ábra). Ez a megoldás egyszerű optimalizáció, nem igényel különösebb befektetett munkát.

Fágtervezésünk fő elve az volt, hogy minimalizáljuk a riporterfehérje ICP-hez való fúziójának fitneszköltségét. Emiatt az ICP::NnLuc fúziós fehérjét kódoló géneket úgy illesztettük be, hogy érintetlenül hagytuk a vad típusú ICP gént. Ezeket a transzgéneket az adott ICP természetes promótere vezérelte, és a K1F fág genomjának olyan pozíciójába illesztettük be, amelyről korábbi munkánk során megállapítottuk, hogy ellenáll az inszerciók esetében gyakran megfigyelhető genetikai instabilitásnak vagy fitneszköltség növekedésnek (Moller-Olsen *et al.*, 2018). Annak érdekében, hogy növeljük a siker esélyét, párhuzamosan végeztem a két különböző ICP-n alapuló fúziós gén inszercióját. Mivel a klónozás mindkét konstrukció esetén sikeres volt, a továbbiakban párhuzamos kísérleteket folytattunk a felvázolt diagnosztikus rendszer széleskörű alkalmazhatóságának alátámasztása érdekében.

Választásunk a g6.7 és a g14 ICP-re esett, melyek méretben különbözőek, tovább növelve a siker esélyét, valamint szélesítve az alkalmazhatóság prezentációját. A fitneszköltség minimalizása érdekében a hasított nanoluciferáz fragmensek közül értelemszerűen a kisebbet, az NnLuc-ot választottuk fúziós partnernek. **Mind a g6.7-, mind a g14 fúzió funkcionálisnak mutatkozott az általunk felállított összes kísérleti elrendezésben.** A két rendszer között ugyanakkor megfigyelhető egy, az egész projekt során végighúzódó, feltűnő különbség: a K1Fe6.7 fágok rendre erősebb jelet adtak. Ennek magyarázatára meglátásunk szerint két lehetőség van:

- A K1Fe6.7NnLuc bakteriofág kisebb fitneszköltséget „fizet” a módosításért, mint a nagyobb rakományt hordozó K1Fe14NnLuc, amely különbség a fágglizátum titerjében is megnyilvánul

- A g6.7 fúziós fehérjéből több csomagolódik a fágfejbe, mint a g14 konstrukcióból

Noha a titermérés módszere nem kifejezetten pontos, az egyes, párhuzamosan előállított fág-lizátumok titerében (PFU/ml) nem volt megfigyelhető különbség. Másszóval úgy tűnik, a különböző időpontban előállított lizátumok titerjében nagyobb különbségek voltak, mint a párhuzamosan előállított, különböző fágokat tartalmazó lizátumok esetén. Ez arra utal, hogy az egyéb tényezőktől, például a lefertőzött sejt-kultúra sejtszámától - noha igyekeztünk azonos optikai denzitás mellett végrehajtani a fágoltást – sokkal jobban függ a fág-titer, mint a hordozott genomi konstrukciótól. Meglátásunk szerint sokkal valószínűbb a második lehetőség, vagyis, hogy a g6.7 fúziós fehérjéből több csomagolódik a virionokba, mint a g14-es változatból. Ezt a sejtést alátámasztják az irodalmi adatok is, tudniillik **az összeszerelődés során 12-20 kópia g6.7 és 8-12 kópia g14 ICP csomagolódik a kapszidba (Calendar and Abedon, 2005 IV/20). A megfigyelhető 1.5-3× jelerősségbeli különbség a g6.7 konstrukció javára azt sugallja, hogy a fúziós fehérjék megőrzik a vad típusú fehérjékre jellemző arányt.** Noha a becsomagoló fúziós és vad típusú fehérjék arányáról semmilyen információval nem rendelkezünk, a vad kópiák promóterének felhasználása miatt logikus sejtés, hogy - ha a becsomagolódás nem is, - a kifejeződés hasonló mértékű az eredeti ICP-k kifejeződési szintjéhez. Kínálja magát az optimalizációs lehetőség, hogy - amennyiben a fúziós konstrukciók megőrzik az ICP funkciójukat - **a vad kópiák kiejtésével növeljük a becsomagoló, majd célsejtekbe injektálódó NnLuc enzim-töredék számosságát, aláhúzva a felvázolt diagnosztikus rendszerben rejtőző további fejlesztési potenciált.**

Egy újszerű, piacra pályázó diagnosztikus tesztnek néhány alapvető feltételt teljesítenie kell, hogy esélye legyen elterjedni:

- Specifitás
- Érzékenység
- Egyszerű használat

Korábban bemutattuk, hogy a megfelelő paraméterek mellett nagyfokú specifitás jellemzi a felvázolt diagnosztikus rendszert. Munkánk során az érzékenységet is lemértük, amit a beállított paraméterek mellett $6,9 \times 10^4$ db K1 kapszulát kifejező célsejtet sikerült megbízhatóan kimutatnunk, miközben $5,6 \times 10^4$ db K5 kapszulát kifejező sejt, amelyet a modell nem céloz,

semmilyen jelet nem adott. Természetesen azonos mennyiségű sejtet volna érdemes összehasonlítani, azonban a laborunk technikai szintje miatt csak a hagyományos, hígításon, szélesztésen, majd kolóniaszámláláson alapuló sejtszám meghatározást volt módunk használni, ami természetesen csak másnapra ad eredményt, amikor a lumineszcenciamérés már rég lezárult. Meglátásunk szerint a két törzs közötti sejtszámkülönbség egyértelműen nem indokolja a **lumineszcenciában megfigyelhető különbséget, az valóban a modell specificitását támasztja alá.** Ami az érzékenységet illeti, az eredmény értelmezéséhez elengedhetetlen a perspektívába helyezés. Ezt némileg megbonyolítja a releváns irodalomban használt kétféle sejtszámformátum. A fágdiagnosztikával foglalkozó tanulmányok többsége az érzékelőfelülettel érintkező sejtek darabszámával írja le az érzékenységet, míg egy részük, valamint az egyes bakteriális fertőzésekkel foglalkozó tanulmányok 1 ml mintában (adott esetben testfolyadékban) számolt telepképző egységgel (CFU/ml) dolgoznak. A mi esetünkben a 30 µl-re számolt 6.9×10^4 EV36 és 5.6×10^4 Nissle 1917 rendre 2.3×10^6 , illetve 1.9×10^6 CFU/ml-nek felel meg. De mit is jelent ez a gyakorlatban?

A csecsemőket súlyosan érintő bakteriális agyhártyagyulladás esetén például meglehetősen tág tartományban, 2×10^1 és 4×10^9 CFU/ml-re mérhető a különböző kórokozók koncentrációja a cerebrospinális folyadékban (Bingen *et al.*, 1990). A 27. ábrára tekintve látható az átlagos bakteriális sejtszám, valamint némi információ a sejtszám eloszlásáról is, miszerint a *N. meningitidis* kivételével **az esetek többségében 10^5 -nél nagyobb CFU/ml értékek mérhetők, számos esetben akár 10^7 CFU/ml-t elérve.** Továbbá a kórokozók száma érthető módon arányosnak tűnik a fertőzés tüneteinek súlyosságával (Bingen *et al.*, 1990) Természetesen esetünkben az ***E. coli* K1 értékek relevánsak,** - noha véleményünk szerint nyitva áll a kapu a tanulmány kiterjesztése további fág-baktérium párokra is - **amelyek 2×10^4 és 4×10^7 között változnak, 2×10^5 átlag mellett, az esetek 60%-ában 10^5 -nél nagyobb, illetve az esetek 40%-ában 10^7 -nél nagyobb mérhető sejtszámmal.** A jelenlegi paraméterek mellett 10^6 CFU/ml-nél nagyobb sejtszámmal járó esetek lennének igazán informatívak, azonban fontos kitétel, hogy a bemutatott diagnosztikus rendszerben számos fejlesztési lehetőségek rejtőznek, amelyek bizonyára növelnék az érzékenységet. Ennek ellenére **látható, hogy az adatpontok jelentős részét már a jelenlegi formájában is lefedné a bemutatott rendszer.**

Organism	No of isolates	Bacterial count (CFU/ml)		Percent of specimens with following counts	
		Mean	Range	$\geq 10^5$ CFU/ml	$\geq 10^7$ CFU/ml
<i>Haemophilus influenzae</i> type b	31	8×10^5	$2 \times 10^1 - 4 \times 10^9$	69	45
<i>Neisseria meningitidis</i>	31	5×10^3	$3 \times 10^1 - 5 \times 10^8$	35	10
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10	4×10^5	$3 \times 10^2 - 4 \times 10^9$	60	20
<i>Escherichia coli</i> K1	5	2×10^5	$2 \times 10^4 - 4 \times 10^7$	60	40
Group B streptococci	5	2×10^7	$3 \times 10^4 - 2 \times 10^9$	66	66
<i>Proteus mirabilis</i>	2	4×10^3	$5 \times 10^2 - 3 \times 10^4$		
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	10^4			
Total	85			51	25

27. ábra: Kezelés előtt mért bakteriális sejtszámok 85 agyhártyagyulladásban szenvedő páciens gerincvelőfolyadékában (Bingen *et al.*, 1990)

További finomítás az előző összesítő ábrához, a legveszélyeztetettebb korcsoportban, az újszülöttekben megfigyelt fertőzésben mért sejtszám. A 28. ábrán látható, hogy ezek az értékek az átlagosnál magasabbak - az 27. ábrán bemutatott maximális értékek újszülöttekből származnak - ráadásul a páciensek sérülékenysége gyors diagnózist és a kezelés mihamarabbi megkezdését igényli (Bingen *et al.*, 1990). **Ezek a paraméterek ideális piaci rést jelenthetnek egy újszerű, bakteriofágokon alapuló diagnosztikus kitnek.**

Patient no.	Age	Isolates	Antibiotic therapy	Count before therapy (CFU/ml)	Count after 24 h of therapy (CFU/ml)
8	2 weeks	group B streptococci	ampicillin + gentamicin	2×10^9	1×10^4
23	2 days	<i>Escherichia coli</i> K1	cefotaxime + netilmicin	3×10^7	3×10^5
39	8 days	<i>Escherichia coli</i> K1	cefotaxime + netilmicin	4×10^7	2×10^1

28. ábra: Három agyhártyagyulladásban szenvedő újszülött gerincvelőfolyadékában mért bakteriális sejtszámok antibiotikumterápia előtt és közben (Bingen *et al.*, 1990)

A jelenleg alkalmazásban levő diagnosztikus tesztek változatos érzékenységgel rendelkeznek, a PCR alapú tesztek 10^1 - 10^2 CFU/ml sejtet is képesek kimutatni, azonban az

antitest alapú úgynevezett latex agglutinációs gyorseszteszt - hasonlóan az általunk felvázolthoz - csak a 10^6 CFU/ml és afeletti sejtszámok kimutatásában megbízható (Kennedy et al, 2007).

A közelmúltban leírt genetikailag módosított bakteriofágokon alapuló diagnosztikus megközelítések számos működési elvet sorakoztatnak fel, a teljesség igénye nélkül:

- Wisuthiphaet és munkatársai a T7-ALP névre keresztelt fággal kísérleteztek, amely alkalikus foszfatázt fejezett ki *E. coli* sejtek fertőzésekor. A baktériumok kimutatásához fluoreszcens szubsztrátot kellett az elegyhez adni, majd az alkalikus foszfatáz aktivitását fluoreszcens képalkotással és képelemzéssel párosítva mérték. **Az eljárás hat órát vett igénybe**, és körülbelül 10^2 baktérium/gramm ($\sim$ CFU/ml) **kimutatási határt** tett lehetővé italmodellekben (Wisuthiphaet et al., 2019).
- Kretzer és munkatársai a *Listeria* fág endolizinekből származó sejt-falkötő doméneket használó magnetoszeperációt kombinálták az A511::luxAB biolumineszcens riporter fág assay-jel. Így két fág alapú protokollt egyesítettek egyben. A végső protokoll **hat órán belül több *Listeria* törzs esetében körülbelül 10^2 CFU/ml kimutatási határt** ért el (Kretzer, Schmelcher and Loessner, 2018).
- A Nugen-csoport *E. coli* sejteket mutatott ki körülbelül 5×10^2 CFU/ml érzékenység mellett, **kétórás NanoLuc expressziós kazettát hordozó módosított T7 fágokkal történő inkubálás után** (Pulkkinen, Hinkley and Nugen, 2019).
- Kim és munkatársai módosított phiV10 fágokat használtak, melybe luxCDABE operont klónoztak. A szerzők *Escherichia coli* **O157:H7 mutattak ki körülbelül 1 CFU/ml kimutatási határral tiszta tenyészetben, illetve rendre körülbelül 10 CFU/cm², 13 CFU/ml és 17 CFU/g kimutatási határral mesterségesen** lefertőzött római salátában, almalében és darált marhahúsban. A teljes protokoll körülbelül **6 órát vett igénybe** (Kim et al., 2017).

A tudomány jelenlegi állásában szembeűnő a meglehetősen vonzó **10^2 , vagy egyes esetekben akár 10^1 CFU/ml** érzékenység, mely kétségtelenül hatékony diagnózist tesz lehetővé. Azonban nem szabad elsiklani a tény felett, miszerint ezekben a rendszerekben minden esetben **preinkubációval sikerült elérni** ezeket a figyelemre méltó kimutatási határokat. **Ezekben a**

tesztekben az általában 6 órás procedúra nagy része magát az inkubációt takarja, a mintában jelenlevő kimutatandó baktériumok koncentrációjának növelése érdekében. Ezzel szemben az általunk bemutatott érzékenység 15-20 perces teljes vizsgálati időtartam mellett értelmezhető.

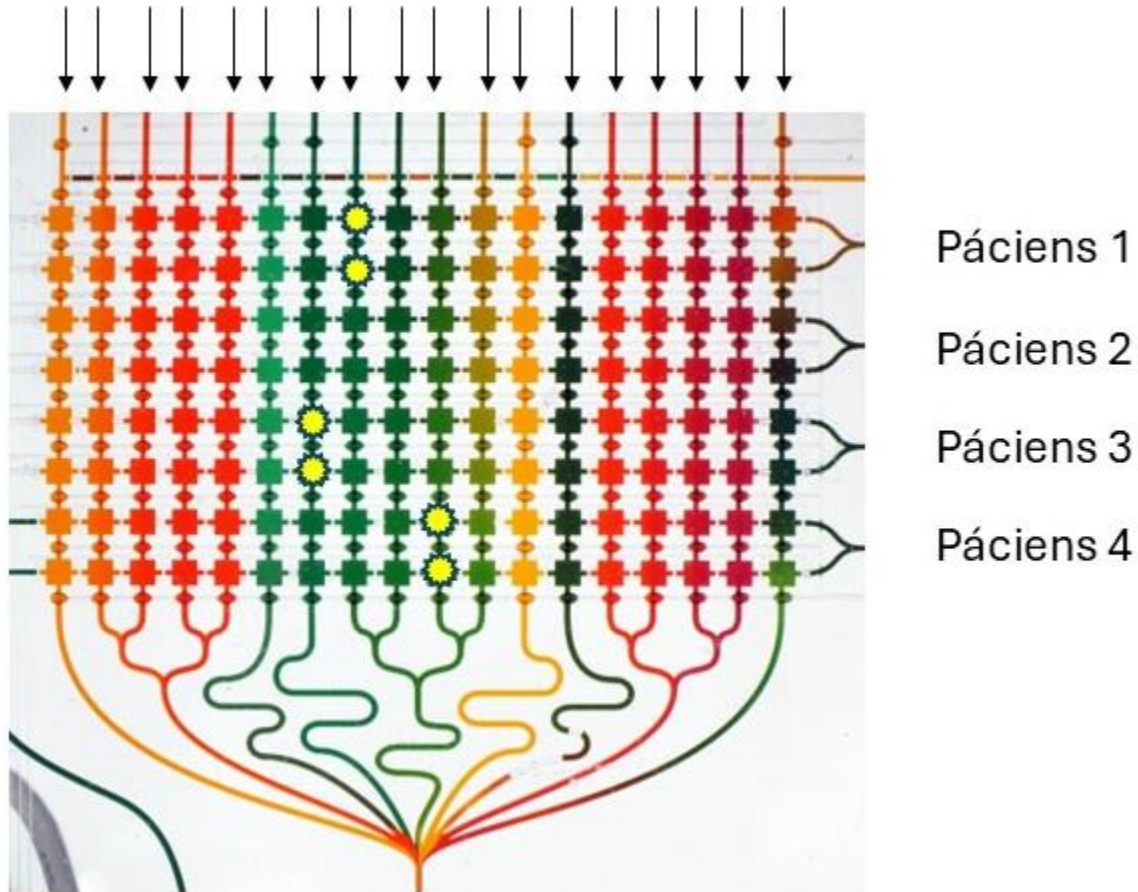
A 2.3 fejezetben tárgyalt bakteriofág alapú bioszenzorokat és biokonjugátumokat alkalmazó diagnosztikai eljárások közül néhány preinkubáció nélkül is képes hasonló kimutatási határt elérni, azonban ehhez legtöbbször több módszert kombinálnak, ami megnöveli az érzékelőfelületen a baktériumok számosságát (Paczesny, Richter and Hołyst, 2020).

Ennek talán legkézenfekvőbb módja, amikor a szilárd felületen immobilizált bakteriofágokkal „béllet” reakciós kamrán viszonylag nagy mennyiségű mintát folytatnak át. A fluidikai jellemzők ideális esetben úgy kerülnek beállításra, hogy az egyes fág-baktérium kapcsolódások elég erősek ahhoz, hogy az áramló folyadékból „kihalásszák” az egyes baktériumrészecskéket, így akkumulálva a jelet (Paczesny, Richter and Hołyst, 2020).

Egy másik lehetőség, amikor a mintához fágartalmú biokonjugátumokat kevernek, majd egy másik konjugátumképző molekulára jellemző specifikus kölcsönhatást kihasználva bekoncentrálják az immár baktériumokhoz kötött részecskéket (Paczesny, Richter and Hołyst, 2020).

Az általunk kifejlesztett eljáráshoz véleményünk szerint leginkább egy **mikrofluidikai lapka illene, amelyre számos, fáginjektált NnLuc – hozzáadott CnLuc elvén működő bakteriofágot immobilizálnánk** (29. ábra). A lapkát adaptálni lehetne valamilyen meglévő leolvasóberendezéshez, vagy a kellő források megléte esetén akár egy, ennek a diagnosztikus tesztnek az igényei köré tervezett kisméretű, hordozható leolvasóberendezést is ki lehetne fejleszteni. Az apró reakciókamrákra fókuszált leolvasó várhatóan hatékonyabb érzékelést, ezáltal alacsonyabb kimutatási határt tenne lehetővé. **A rendszer érzékenysége tovább növelhető, hiszen az immobilizált fágoknak köszönhetően a reakciókamrákon viszonylag nagy mennyiségű minta folyatható át, amiből a kötődés létrejötte esetén visszatartásra kerülnek a vizsgált patogének a leolvasásig.**

Különböző specificitású immobilizált fágok



29. ábra: Mikrofluidikai chip vázlata [National Institute of Standards and Technology]

A különböző reakciókamrákban elhelyezett különböző patogéneket fertőző bakteriofágokat csoportosítani lehetne olyan módon, hogy prediagnózisként viszonylag széles gazdaspecificitással rendelkező fágokkal azonosítjuk a patogén rendszertani családját vagy nemzetségét, ami adott esetben elégséges is lehet a terápia megkezdéséhez. Amennyiben valamilyen okból kifolyólag pontosabb azonosításra van szükség, a prediagnosztikus lapka által adott eredmény alapján választunk egy másik, szűk gazdaspecificitással rendelkező fágokkal töltött lapkát, amin ismét megfuttatható a minta, ami ezúttal a patogén fájának azonosítására is alkalmas. **Az azonosításra használt, nanoluciferáz töredéket hordozó fág** - amennyiben obligát lítikus fágról van szó - **elvileg alkalmas lehet fágterápia kivitelezésére is, azonban tisztában vagyunk vele, hogy ez az alkalmazás a genetikai módosítás miatt számtalan szabályozási akadályba ütközne.** A diagnosztikus rendszer azonban **párosítható egy azonos**

fajú, de módosíthatlan bakteriofágokat tartalmazó fágkönyvtárral, ami lényegesen egyszerűbbé tenné a specifikus, személyre szabott terápia mihamarabbi megkezdését.

Egy ilyen teszt gyakorlati kivitelezéséhez nem szabad megfeledkezni a külsőleg hozzáadott CnLuc szükségességéről. Ehhez fagyasztva szárított, vagy valamilyen egyéb módon tartósított, majd a teszt kivitelezésekor feloldott enzimtöredék használata lenne ideális. Adott esetben az immobilizálandó fágok betöltéséhez használt keresztesatornák használhatók lennének a CnLuc fragmenssel összekevert furimazin szubsztrát és nanoluciferáz puffer keresztirányú átfolytatására.

Ennek a problémának egy lehetséges megkerülése, ha a rövid N-terminális enzimtöredék helyett a teljes nanoluciferáz enzimet fuzionálnánk a kiválasztott internális kapszid fehérjével. Ezt a megoldást elkezdtük kidolgozni, a donorplazmidok sikeres klónozása után a rekombinációt, majd dúsítást is megkísérelve. A létrejött fágkeverékben sosem sikerült 1% fölé növelni a rekombináns bakteriofágok arányát, ennek ellenére sikerült pozitív PCR jelet produkáló plakkot izolálni, azonban a rekombináció a további tenyésztés során instabillnak bizonyult. Ez a megfigyelés azt sugallja, hogy a bejuttatni kívánt DNS fragmens meghaladta a K1F fág teherbíróképességét. Lehetséges megoldást kínál a vad ICP kópiák kiejtése, ami segítene „helyet csinálni” a teljes nanoluciferáz enzim szekvenciájának bejuttatására.

Összességében a kísérleti eredmények alapján a kijelölt céljaimmal kapcsolatban az alábbi megállapításokat tehetem:

1. Bizonyítottam, hogy lehetséges stabil genomú bakteriofágokat létrehozni, mely megbízhatóan képes kapszidjába rekombináns lumineszcens fehérjét, pontosabban fehérjetöredéket csomagolni.
2. Bizonyítottam, hogy a létrehozott rekombináns bakteriofágokkal célsejt jelenlétében lehetséges lumineszcens jelet előállítani, még hozzá rendkívül rövid idő alatt, a transzkripció kihagyásával, csupán a kapszidokba csomagolódot fehérjékre hagyatkozva.
3. Kialakítottam-e egy modell diagnosztikai eljárást, mely a fenti mechanizmus útján szelektíven képes jelezni egy vad típusú, azaz a hiányzó enzimtöredéket nem termelő baktériumtörzs jelenlétét.

7. Összefoglalás

A fertőző betegségek gyors diagnosztizálása kiemelkedő fontosságú a járványkitörések és világjárványok megelőzése vagy megfékezése érdekében. A klinikumban a baktériumok kimutatása tenyésztésen, szekvenciadependens PCR reakción vagy immunreakción alapul. Ezek a bevett módszerek egyike sem tudja egyszerre kielégíteni a gyors, felhasználóbarát, specifikus és olcsó diagnosztika iránti igényt. Az elmúlt évtizedekben az antibiotikumrezisztens kórokozók terjedésével egyre növekvő tudományos figyelem irányult a bakteriofágokra, elsősorban azok terápiás felhasználására, azonban ezek a rendkívül sokoldalúan hasznosítható szervezetek diagnosztikus protokollok alapjául is szolgálhatnak. A bakteriofág alapú diagnosztikus eljárások minden esetben a fág-célsejt kölcsönhatások gyorsaságára, specificitására és hatékonyságára támaszkodnak, és ennek az interakciónak a mérhető jellel alakításának számtalan módozatát dolgozta ki a közelmúltban a tudományos közösség. Az egyik jelátalakítási módszer a fágfertőzés rendes folyamatának kihasználása a jel sokszorosítására egy fluoreszcencia vagy lumineszcencia alapú riporter génnel átírásával. A korábbi megközelítések azonban a riporter gének transzkripcióját és translációját igényelték, ami hosszú vizsgálatokhoz és kevésbé felhasználóbarát protokollokhoz vezetett. Ebben a koncepciózus munkában azt vizsgáltuk, hogy a jelgenerálási idő lerövidíthető-e közvetlenül egy fágfehérje injekciójának detektálásával, ezáltal teljesen megkerülve a génexpresszió szükségességét.

A munkát a tervezési paraméterek megfontolásával kezdtük. Modell bakteriofágnak a K1-kapszulát kifejező *E. coli* törzseket fertőző K1F-et választottuk, mellyel kapcsolatban kutatócsoportunk korábbi projektjeiből rengetek ismeretre és gyakorlati tapasztalatra tettünk szert. Riporterfehérjének némi mérlegelés után az *Oplophorus gracilirostris* mélytengeri garnélarák hasított nanoluciferáz fehérjéjét választottuk. Bemutattuk, hogy ezen enzim N-terminális frágmentje a megfelelő tervezéssel fuzionálható a K1F fág g6.7 vagy g14 génjeihez, azok duplikációit létrehozva. Bebizonyosodott, hogy a létrehozott két bakteriofágtörzs szekvenciája a tervezetteknek megfelelően létrejött és hogy ezek a rekombináns törzsek szelekció nélkül is stabilan fenntarthatóak.

Az *in vitro* kísérletek során bebizonyítottuk, hogy a fúziós fehérjék becsomagolódnak a fágkapszidba a rendes, batch alapú virionszaporítás során. Bemutattuk, hogy a becsomagolt N-terminális nanoluciferáz enzimtöredék hőkezelés hatására, célsejt jelenléte nélkül is

felszabadítható, majd a C-terminális és a specifikus furimazin szubsztrát hozzáadásával mérhető lumineszcens jelet ad, igazolva a fúziós fehérje enzimatis aktivitását.

Ezt követően az *in vivo* kísérletekben CnLuc-ot expresszáló bakteriális sejteket fertőztünk NnLuc-ot hordozó rekombináns bakteriofágokkal. Ezek a kísérletek bemutatták a rendszer szelektivitását, miszerint csak a K1 kapszulával rendelkező célsejtek adtak mérhető lumineszcens jelet, miközben a K5 kapszulával burkolt nem-célsejtek a háttértől megkülönböztethetetlen jelet mutattak. Kinetikára, transzkripcióra és translációra vonatkozó bizonyítékokkal is alátámasztottuk, hogy a célsejt jelenlétében a fággenomon hordozott transzgének átíródása nélkül, csupán a kapszidból injektált enzimtöredék is képes jelet adni, aláhúзва az munkánk innovatív voltát.

Bemutattuk, hogy a valós körülményekhez hasonló kísérleti elrendezésben, vad típusú sejtek rekombináns fágokkal való fertőzésekor is keletkezik könnyen kimutatható, erős lumineszcens jel. Elvégeztük a diagnosztikus rendszer kezdeti optimalizációját, ami így megbízhatóan képes különbséget tenni az K1-kapszulát kifejező, és nem kifejező baktériumtörzsek között.

Jellemeztük a megközelítésünk kezdetleges formájának érzékenységét, majd ezt gyakorlati példákkal és az egyéb fág-alapú diagnosztikus rendszerekhez történő összehasonlítással perspektívába helyeztük. Érveltünk amellett, hogy az elképzelés piaci érdeklődésre tarthat számot.

Végül bemutattuk elképzeléseinket az általunk kifejlesztett rekombináns bakteriofágokon alapuló diagnosztikum további fejlesztési lehetőségeiről és távlati koncepcióiról.

Munkánkkal reményeink szerint lefektettük egy újszerű bakteriofág-alapú diagnosztikus rendszer alapjait. A fágterápia reneszánszával a patogén baktériumtörzs szerotípusának meghatározása egy ilyen fág-alapú megközelítéssel messze meghaladja a puszta osztályozás értékét: közvetlen, vizuálisan alátámasztott információt nyújt a patogén izolátum fágérzékenységéről. Az ebben a munkában bemutatott új diagnosztikai fágok a jelenlegi gyakorlatban bevett diagnosztikus eljárásokkal szemben lehetőséget biztosítanak terápiás fágokkal való termékkapcsolásra, hiszen a pozitív jelet generáló fágok azonnali jelölteket adnak terápiás fágoktélók elkészítéséhez. Ez a személyre szabott antibakteriális terápiák korábban soha nem látott sebességű, órákról percekre történő lerövidítését eredményezheti a precíziós gyógyászatban.

8. Summary

Rapid diagnosis of infectious diseases is of paramount importance in the prevention or control of outbreaks and pandemics. In the clinic, bacterial detection is based on culture, sequence-dependent PCR reaction or immune reaction. None of these established methods can simultaneously satisfy the need for rapid, easy-to-use, specific and inexpensive diagnostics. In the recent decades, with the spread of antibiotic-resistant pathogens, increasing scientific attention has been directed towards bacteriophages, primarily for their therapeutic use, but these extremely versatile organisms can also serve as the basis for diagnostic protocols. Bacteriophage-based diagnostic procedures always rely on the speed, specificity and efficiency of phage-target cell interactions, and the scientific community has developed countless innovative methods for converting this interaction into a measurable signal. One approach to signal transduction is to use the normal process of phage infection to amplify the signal with a fluorescence or luminescence-based reporter gene. However, previous approaches required transcription and translation of the reporter genes, which led to lengthy assays and less user-friendly protocols. In this proof-of-concept work, we investigated whether the signal generation time could be shortened by detecting the injection of a phage protein directly, thus completely bypassing the need for gene expression.

We began by considering the design parameters. We chose the model bacteriophage K1F, which infects *E. coli* strains expressing the K1 capsule, as a model bacteriophage, with which we have gained a lot of knowledge and practical experience from the previous projects in our research group. After some consideration, we chose the cleaved nanoluciferase protein from the deep-sea shrimp *Oplophorus gracilirostris* as the reporter protein. We have shown that the N-terminal fragment of this enzyme can be fused to the g6.7 or g14 genes of the K1F phage, creating duplications of them, with appropriate design. It was demonstrated that the sequences of the two bacteriophage strains were successfully altered as designed and that these recombinants can be stably maintained without selection.

In vitro experiments have shown that the fusion proteins are packaged into the phage capsid during regular, batch-based virion propagation. We have demonstrated that the packaged N-terminal nanoluciferase enzyme fragment can be released upon heat treatment. The released

fusion protein gives a measurable luminescent signal upon addition of the C-terminal enzyme fragment and the specific substrate furimazine, verifying that the enzymatic activity of the fusion protein is retained.

In the *in vivo* experiments, we infected bacterial cells expressing CnLuc with recombinant bacteriophages carrying NnLuc. The results demonstrated the selectivity of the system, namely that only target cells with the K1 capsule gave measurable luminescence, while non-target cells coated with the K5 capsule showed an indistinguishable signal from the background. We have provided kinetic, transcriptional and translational evidence, that the enzyme particle injected from the capsid alone is sufficient to give a signal, even without the transcription of the transgenes carried on the phage genome, underlining the innovative nature of our work.

We demonstrated that in an experimental setup similar to real conditions, an easily detectable, strong luminescent signal is generated when wild-type cells are infected with recombinant phages. We performed an initial optimization of the diagnostic system, which is thus able to reliably distinguish between cognate and non-cognate bacterial strains.

We characterized the sensitivity of the exploratory form of our approach, and then put it into perspective with practical examples and comparison with other phage-based diagnostic systems. We argued that the idea could be of market interest.

Finally, we presented our ideas on further development possibilities and long-term concepts of the diagnostics based on recombinant bacteriophages we developed.

With our work, we hope to lay the foundations for a novel bacteriophage-based diagnostic system. With the renaissance of phages, determining the serotype of a pathogenic bacterial strain with such a phage-based approach completely extends beyond the value of mere classification: it provides direct, visually supported information about the pathogen's phage susceptibility. The new diagnostic phages presented in this work provide an opportunity for product coupling with therapeutic phages in contrast to the diagnostic procedures currently used in practice, since phages generating a positive signal provide immediate candidates for the preparation of therapeutic phage cocktails. This could improve the speed of setting up personalized antibacterial therapies to previously unprecedented levels, shortening the time from hours to mere minutes in precision medicine.

9. Köszönetnyilvánítás

Legfőképpen szeretném megköszönni feleségemnek Avramucz-Csipak Brigittának támogatását, megértését és türelmét, amit a doktori tanulmányaim gondtalan és kevésbé gondtalan időszakában egyaránt tanúsított.

Kiemelten szeretném megköszönni Dr. Fehér Tamásnak, amiért lehetőséget biztosított, hogy doktori tanulmányaimat a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban végezzem. Hálával tartozom amiért számtalan alkalommal adott elméleti és gyakorlati tanácsot, valamint amiért partner volt néha nehezen követhető töprengéseim szétszalazásában és tudásom gyarapításában.

Hálás vagyok kutatócsoportunk egykori és jelenlegi tagjainak, Rantidev Shuklának, Walliyulahi Ajibolának, Alyona Biketovának, Swapnil Sanmukhnak, Kovács Baláznak és Kerekes Marcellnek a barátságos és kölcsönösen támogató labor- és irodai légkörért.

Köszönettel tartozom Dr Richard Amaee és Joseph Wheatley, valamint a Lucidix Biolabs vállalat pénzügyi támogatásáért és iránymutatásáért, ami nélkül ez a kutatás nem valósulhatott volna meg.

Hálás vagyok a Papp Balázs csoport minden tagjának, kiemeltem Tengölics Rolandnak, Sarkadi Zsuzsának, Birtyik Fanninak és Sajben Csillának, amiért időszakosan rendelkezésemre bocsátották a Synergy H1 leolvasóberendezésüket a lumineszcenciamérésekhez, amely nélkül kétségtelenül nem valósulhatott volna meg ez a kutatás.

Végezetül pedig köszönettel tartozom családomnak, Édesanyámnak, Édesapámnak és Testvéremnek a tanulmányaim egésze során tanúsított támogatásukért.

Ez a kutatás a Biotechnológiai Nemzeti Labor (NFKIH 2022-2.1.1-NL-2022-00008. sz. projekt), valamint a Lucidix Biolabs pénzügyi támogatásával készült.

10. Nyilatkozat

Alulírott Avramucz Ákos, biológus szakos hallgató kijelentem, hogy a doktori értekezésemben foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, vegyszerek, stb.) használtam fel.

Tudomásul veszem azt, hogy doktori értekezésemet a Szegedi Tudományegyetem repozitóriumában helyezik el.

Aláírás:

Dátum: Szeged, 2025.08.06.

11. Irodalomjegyzék

Anpilogov, K. *et al.* (2020) 'Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations', *Acta bio-medica: Atenei Parmensis*, 91. Available at: <https://doi.org/10.23750/abm.v91i13-S.10819>.

Apjok, G. *et al.* (2023) 'Characterization of antibiotic resistomes by reprogrammed bacteriophage-enabled functional metagenomics in clinical strains', *Nature Microbiology*, 8, pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01320-2>.

Arivarasan, V.K. (2023) 'Chapter Six - Unlocking the potential of phages: Innovative approaches to harnessing bacteriophages as diagnostic tools for human diseases', in V. SINGH (ed.) *Phage Therapy - Part B*. Academic Press (Progress in Molecular Biology and Translational Science), pp. 133–149. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2023.03.025>.

Arredondo-Alonso, S. *et al.* (2023) 'Evolutionary and functional history of the Escherichia coli K1 capsule', *Nature Communications*, 14(1), p. 3294. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39052-w>.

Banakar, M. *et al.* (2022) 'Electrochemical Biosensors for Pathogen Detection: An Updated Review', *Biosensors*, 12, p. 927. Available at: <https://doi.org/10.3390/bios12110927>.

Bertozzi Silva, J., Storms, Z. and Sauvageau, D. (2016) 'Host receptors for bacteriophage adsorption', *FEMS Microbiology Letters*, 363, p. fnw002. Available at: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw002>.

Bingen, E. *et al.* (1990) 'Bacterial counts in cerebrospinal fluid of children with meningitis', *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 9(4), pp. 278–281. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF01968060>.

Bisen, M. *et al.* (2024) 'Bacteriophages in nature: recent advances in research tools and diverse environmental and biotechnological applications', *Environmental Science and Pollution Research*, 31, pp. 1–44. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11356-024-32535-3>.

Björk, G.R. (1975) 'Transductional mapping of gene trmA responsible for the production of 5-methyluridine in transfer ribonucleic acid of Escherichia coli', *ASM Journals Journal of Bacteriology* [Preprint].

Brigati, J.R. and Petrenko, V.A. (2005) 'Thermostability of landscape phage probes', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382(6), pp. 1346–1350. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3289-y>.

Calendar, R. and Abedon, S.T. (2005) *The Bacteriophages: Second Edition*. Oxford University Press. Available at: <https://doi.org/10.1093/oso/9780195148503.001.0001>.

- Chen, I.-H. *et al.* (2017) 'Bacterial assessment of phage magnetoelastic sensors for Salmonella enterica Typhimurium detection in chicken meat', *Food Control*, 71, pp. 273–278. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.003>.
- Collins, J. and Hohn, B. (1978) 'Cosmids: A Type of Plasmid Gene-Cloning Vector that is Packageable in vitro in Bacteriophage λ Heads', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75, pp. 4242–6. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.75.9.4242>.
- Emslander, Q. *et al.* (2022) 'Cell-free production of personalized therapeutic phages targeting multidrug-resistant bacteria', *Cell Chemical Biology*, 29(9), pp. 1434–1445.e7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2022.06.003>.
- England, C., Ehlerding, E. and Cai, W. (2016) 'NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence', *Bioconjugation Chemistry*, 27, pp. 1175–1187.
- Farooq, U. *et al.* (2020) 'High-density phage particles immobilization in surface-modified bacterial cellulose for ultra-sensitive and selective electrochemical detection of Staphylococcus aureus', *Biosensors and Bioelectronics*, 157, p. 112163. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112163>.
- Feher, T. (2012) 'Competition between Transposable Elements and Mutator Genes in Bacteria', *MBF*, 29(10), pp. 3153–3159.
- Hall, M. *et al.* (2012) 'Engineered Luciferase Reporter from a Deep Sea Shrimp Utilizing a Novel Imidazopyrazinone Substrate', *ACS Chemical Biology*, 7(11), pp. 1848–1857.
- Häusler, T. (2006) *Viruses vs Superbugs: A Solution to the Antibiotics Crisis ?* Macmillan, New York, USA 2006: 1 -7.
- Hu, B. *et al.* (2013) 'The Bacteriophage T7 Virion Undergoes Extensive Structural Remodeling During Infection', *Science (New York, N.Y.)*, 339. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1231887>.
- Hyman, P. and Abedon, S. (2010) 'Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance', *Advances in applied microbiology*, 70, pp. 217–48. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70007-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70007-1).
- Janczuk, M. *et al.* (2017) 'Bacteriophage-Based Bioconjugates as a Flow Cytometry Probe for Fast Bacteria Detection', *Bioconjugate Chemistry*, 28(2), pp. 419–425. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00596>.
- Kemp, P., Garcia, L. and Molineux, I. (2005) 'Changes in bacteriophage T7 virion structure at the initiation of infection', *Virology*, 340(2), pp. 307–317.

- Kennedy, W.A. and et al (2007) 'Incidence of bacterial meningitis in Asia using enhanced CSF testing: polymerase chain reaction, latex agglutination and culture', *Epidemiol Infect.* [Preprint].
- Kim, J. *et al.* (2017) 'Sensitive detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 from foods using a luciferase-reporter phage phiV10lux', *International Journal of Food Microbiology*, 254, pp. 11–17. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.002>.
- Kretzer, J.W., Schmelcher, M. and Loessner, M. (2018) 'Ultrasensitive and Fast Diagnostics of Viable *Listeria* Cells by CBD Magnetic Separation Combined with A511::luxAB Detection', *Viruses* [Preprint].
- Lakshmi, V. *et al.* (2011) 'Erratum to: Application of Polymerase Chain Reaction to Detect HIV-1 DNA in Pools of Dried Blood Spots', *Indian Journal of Microbiology*, 51(4), pp. 536–536. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0192-4>.
- Liyanagedera, S.B.W. *et al.* (2022) 'SpyPhage: A Cell-Free TXTL Platform for Rapid Engineering of Targeted Phage Therapies', *ACS Synthetic Biology*, 11(10), pp. 3330–3342. Available at: <https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00244>.
- Mauri, M., Vecchione, S. and Fritz, G. (2019) 'Deconvolution of Luminescence Cross-Talk in High-Throughput Gene Expression Profiling', *ACS Synthetic Biology*, 8(6), pp. 1361–1370. Available at: <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00032>.
- Miller, J.H. (1977) 'Generalized transduction; use of P1 in strain construction', *Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press*, pp. 201–205.
- Moller-Olsen, C. *et al.* (2018) 'Engineered K1F bacteriophages kill intracellular *Escherichia coli* K1 in human epithelial cells', *Scientific Reports*, 8, p. 17559.
- Nguyen, H.M. and Kang, C. (2014) 'Lysis Delay and Burst Shrinkage of Coliphage T7 by Deletion of Terminator T ϕ Reversed by Deletion of Early Genes', *J. Virol* [Preprint], (88(4):2107–2115).
- Nobrega, F. *et al.* (2016) 'Genetically manipulated phages with improved pH resistance for oral administration in veterinary medicine', *Scientific Reports*, 6. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep39235>.
- O'Connell, L., Marcoux, P.R. and Roupioz, Y. (2021) 'Strategies for Surface Immobilization of Whole Bacteriophages: A Review', *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(6), pp. 1987–2014. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00013>.
- Olofsson, L., Ankarloo, J. and Nicholls, I.A. (1998) 'Phage viability in organic media: Insights into phage stability', *Journal of Molecular Recognition*, 11, pp. 91–93.
- O'Neill, J. (2014) 'Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations', *AMR Review*, Wellcome Trust, London, UK.

- Orlova, E.V. (2012) 'Bacteriophages and Their Structural Organisation', in. Available at: <https://doi.org/10.5772/34642>.
- Paczesny, J., Richter, Ł. and Hołyst, R. (2020) 'Recent Progress in the Detection of Bacteria Using Bacteriophages: A Review', *Viruses*, 12, p. 845. Available at: <https://doi.org/10.3390/v12080845>.
- Parsons, J.R. (1974) 'The Principles of Diagnosis', *Dental Clinics of North America*, 18(1), pp. 3–23. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0011-8532\(22\)00636-X](https://doi.org/10.1016/S0011-8532(22)00636-X).
- Patangia, D. *et al.* (2022) 'Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health', *MicrobiologyOpen*, 11. Available at: <https://doi.org/10.1002/mbo3.1260>.
- Peng, H. and Chen, I.A. (2019) 'Rapid Colorimetric Detection of Bacterial Species through the Capture of Gold Nanoparticles by Chimeric Phages', *ACS Nano*, 13(2), pp. 1244–1252. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b06395>.
- Pires, D.P. *et al.* (2016) 'Genetically Engineered Phages: a Review of Advances over the Last Decade', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80, pp. 523–543. Available at: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00069-15>.
- Pósfai, G. *et al.* (2006) 'Emergent Properties of Reduced-Genome Escherichia coli', *Science (New York, N.Y.)*, 312, pp. 1044–6. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1126439>.
- Pulkkinen, E., Hinkley, T. and Nugen, S. (2019) 'Utilizing in vitro DNA assembly to engineer a synthetic T7 Nanoluc reporter phage for Escherichia coli detection', *Molecular Microbiology*, 11(3), pp. 63–68.
- Quan, J. and Tian, J. (2009) 'Circular Polymerase Extension Cloning of Complex Gene Libraries and Pathways', *PloS one*, 4, p. e6441. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006441>.
- Reis, A.C. and Salis, H.M. (2020) 'An Automated Model Test System for Systematic Development and Improvement of Gene Expression Models', *ACS Synthetic Biology*, 9(11), pp. 3145–3156. Available at: <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00394>.
- Richter, Ł. *et al.* (2017) 'Dense Layer of Bacteriophages Ordered in Alternating Electric Field and Immobilized by Surface Chemical Modification as Sensing Element for Bacteria Detection', *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(23), pp. 19622–19629. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsaami.7b03497>.
- Richter, Ł. *et al.* (2018) 'Recent advances in bacteriophage-based methods for bacteria detection', *Drug Discovery Today*, 23(2), pp. 448–455. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.11.007>.

- Rippa, M. *et al.* (2018) 'Dodecagonal plasmonic quasicrystals for phage-based biosensing', *Nanotechnology*, 29. Available at: <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aad2f5>.
- Ross, A., Ward, S. and Hyman, P. (2016) 'More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages', *Frontiers in Microbiology*, Volume 7-2016. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01352>.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1. könyv). Available at: <https://books.google.hu/books?id=8WViPwAACAAJ>.
- Schneider, C. (2017) 'Bacteriophage-Mediated Horizontal Gene Transfer: Transduction', in, pp. 1–42. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8_4-1.
- Scholl, D. and Merrill, C. (2005) 'The Genome of Bacteriophage K1F, a T7-Like Phage That Has Acquired the Ability To Replicate on K1 Strains of Escherichia coli', *Journal of Bacteriology*, 187(24).
- Sedki, M. *et al.* (2020) 'Non-lytic M13 phage-based highly sensitive impedimetric cytosensor for detection of coliforms', *Biosensors and Bioelectronics*, 148, p. 111794. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111794>.
- Shkoporov, A.N., Turkington, C.J. and Hill, C. (2022) 'Mutualistic interplay between bacteriophages and bacteria in the human gut', *Nature Reviews Microbiology*, 20(12), pp. 737–749. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00755-4>.
- Singh, A. *et al.* (2012) 'Bacteriophage based probes for pathogen detection', *Analyst*, 137(15), pp. 3405–3421. Available at: <https://doi.org/10.1039/C2AN35371G>.
- Sorokulova, I., Olsen, E. and Vodyanoy, V. (2014) 'Bacteriophage biosensors for antibiotic-resistant bacteria', *Expert Rev Medical Devices*, 11(2), pp. 175–186.
- Studier, F.W. (1972) 'Bacteriophage T7', *Science*, 176(4033), pp. 367–376. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.176.4033.367>.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) 'Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes', *Journal of Molecular Biology*, 189(1), pp. 113–130. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2).
- Tolba, M. *et al.* (2010) 'Oriented immobilization of bacteriophages for biosensor applications', *Appl Environ Microbiol*. [Preprint].
- Wang, H. *et al.* (2024) 'Phage-based delivery systems: engineering, applications, and challenges in nanomedicines', *Journal of Nanobiotechnology*, 22. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02576-4>.

Wisuthiphaet, N. *et al.* (2019) 'Rapid detection of Escherichia coli in beverages using genetically engineered bacteriophage T7', *AMB Express*, 9. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0776-7>.

Yan, C. *et al.* (2017) 'Combining phagomagnetic separation with immunoassay for specific, fast and sensitive detection of Staphylococcus aureus', *Talanta*, 170, pp. 291–297. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.007>.

Yang, S. and Rothman, R.E. (2004) 'PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings', *The Lancet Infectious Diseases*, 4(6), pp. 337–348. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01044-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01044-8).

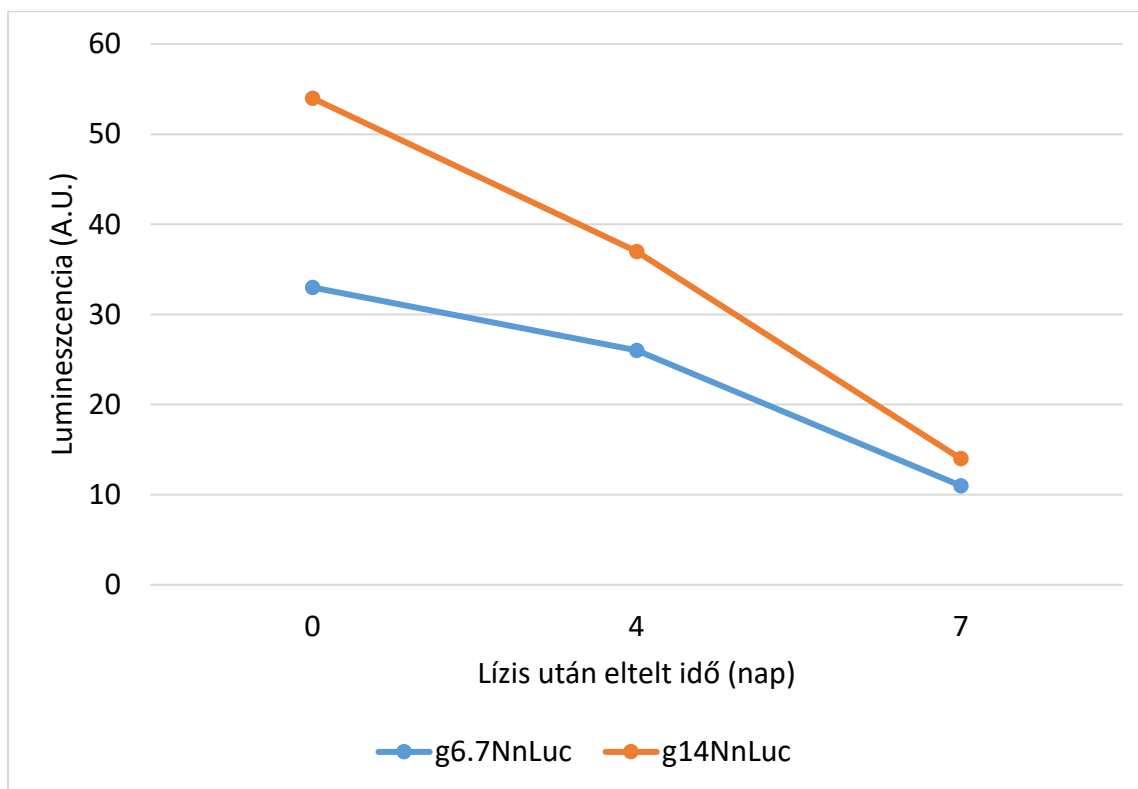
Yosef, I. *et al.* (2017) 'Extending the Host Range of Bacteriophage Particles for DNA Transduction', *Molecular Cell*, 66(5), pp. 721–728.e3. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.025>.

Yu, Y. *et al.* (2020) 'Roadmap for single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy', *Advanced Photonics*, 2, p. 1. Available at: <https://doi.org/10.1117/1.AP.2.1.014002>.

Zhao, J. *et al.* (2016) 'Self-Assembling NanoLuc Luciferase Fragments as Probes for Protein Aggregation in Living Cells', *ACS Chemical Biology*, 11(1), pp. 132–138. Available at: <https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00758>.

Zillig, W. *et al.* (1988) 'Viruses of Archaeobacteria', in R. Calendar (ed.) *The Bacteriophages*. Boston, MA: Springer US, pp. 517–558. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5424-6_12.

12. Függelék



29. ábra: Szabad fúziós fehérjék degradációja

A görbék egy-egy mérés eredményét mutatják. Minden esetben ugyanaz a 4°C-on tárolt fáglizátum került felhasználásra. Az egyes welllekbe 65 µl hőkezelés nélküli lizátum és 35 µl frissen preparált indukált BL21DE3pZA31CnLuc_His felülúszó került betöltésre. Ez a kísérlet a CnLuc koncentráció esetleges eltérései miatt nélkülözi a tudományos igényesség feltételeit, csupán a lumineszcencia eredetére vonatkozó sejtésünk alátámasztásául szolgál.

pQlinkUpCnLuc	CCTTCTTCTTCTTACTTCTAGCCCTGTTTCttgttatccgctcacaattg
pQlinkDnCnLuc	CTGGCTTAAtgagcttgactcctg
CnLucFW	GCTAGAAGTAAGAAGAAGAAGGAGGTATTTatgggtggtctgtctg
CnLucRev2	AGCCAGGATACGTTTCG
CnLucREVcheck	GTAACACCGTTGATGGTAACACG
CnLucFWcheck	AGTTGTTTACCCGGTTGACG
RBSfw	TAGAGATACTGAAACAGGGCTAGAAGTAAG
CnLucRev	gctaattaagcTTAAGCCAGGATACGTTTC
pZALucFw	CCTGGCTtaaGCTTAATTAGCTGAGTCTAGAG
pZALucRev	gccctgtttcAGTATCTCTATCACTGATAGGG
pZACheckFW	GGCTGCTCTACACCTAGCTTC
pZACheckRev	GGTTTCGCCACCACTGATTTG
pSBC3fw	CCCGTACGAATAATTGAAACCCCTTGGG
pSBC3rev	ctatagtgatagtcaGTTGTTGGACTCAGCC
NnLuc67Fw	catggggTCTGGTGGCGGTTC
NnLucRev	ggtttcaaTTATTCGTACGGGATGATAAC
g6.7fw	ccaacaactgactatcactataggGATACCGTTCAG
g6.7rev	CCACCAGACCCCATGTTGACGC
NnLuc14FW	ggtcatagcTCTGGTGGcGGTTC
g14fw	ccaacaactgaCTATCACTATAGGGAGCGTTTTCAACTATTCAC
g14rev	ccaccagaGCTATGACCTGTAGGTGTG
VF2	tgccacctgacgtctaagaa
VR2	TGGCGAGCCCGATCTTC
NnLucCheckRev	GCCAGTCACCAACGAAGTC
NnLucCheckFw	TCTGTTACCCCGATCCAGC
g11rev	GTGAAAGTGGTTGACTGAGTGG
g10fw	GGCGACCGTTACTTCTACACC
pET24CnLucFw	TGGCTCCTCTGGTCTCGAGCACCACCAC
pET24CnLucRev	ccctgtttcGGAATTGTTATCCGCTCAC
pET24CheckFW	CTCGACGCTCTCCCTTATGC
pET24CheckRev	GAACGTGGCGAGAAAGGAAGG
CnLucRev3	ctaattaagcTCAGTGGTGGTGGT
pZALucFw2	ccaccactgaGCTTAATTAGCTGAGTCTAGAG

1. táblázat: Felhasznált PCR primerek listája