

Szekvenciaspecifikus DNS-fehérje kölcsönhatások
vizsgálatára alkalmas módszerek kidolgozása
Escherichia coliban

Ph.D. értekezés tézisei

Zsibrita Nikolett

Témavezető: Dr. Kiss Antal (emeritus kutatóprofesszor)

Kutatás helye: ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Biokémiai Intézet



Képzés helye: Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar,
Biológia Doktori Iskola



Szeged
2023

Bevezetés

A DNS-kötő fehérjék szerepe kulcsfontosságú számos biológiai folyamatban, mint a transzkripció szabályzás, a replikáció, a DNS hibajavítás és modifikáció. A gén-regulációs folyamatok nélkülözhetetlen elemei a transzkripciós faktorok, melyek közvetlen kölcsönhatásba lépnek a DNS-sel és aktiválják vagy represszálják a célgén kifejeződését. Számos fajban, a baktériumoktól az emberekig bezárólag, a transzkripciós faktorok 3-10%-át teszik ki a fehérjét kódoló géneknek a genomban. A transzkripciós faktorok mutációi gyakran megbetegedéshez vezetnek, mint pl. a legtöbb humán rákos sejtből bizonyos transzkripciós faktorok túlzott aktivitást mutatnak, amely alátámasztja annak fontosságát, hogy minél alaposabban megértsük a DNS-kötő fehérjék működését és funkcióját.

A DNS és a hozzá kötődő fehérje közötti kölcsönhatás lehet specifikus és nem specifikus. A DNS-kötő fehérjék specifikitását azt értjük, hogy a fehérje mennyivel nagyobb affinitást mutat egy adott, egyedi kötőhelyhez, mint a többi DNS szekvenciához. Azt az egyedi kötőhelyet, melyhez a fehérje a legnagyobb affinitással kötődik, specifikus kötőhelynek nevezik. Ehhez az általában rövidebb, mint 20 bp hosszú specifikus kötőhelyhez az affinitás 10^3 - 10^6 -szor erősebb lehet, mint általában a DNS-hez. A transzkripciós faktorok preferált kötőhelyük mellett - kisebb affinitással - a célhelyüktől kis mértékben különböző szekvenciákhoz is kötődhetnek.

A fehérjék szekvensspecifikus kötést leginkább bázisfelismerés által alakítanak ki. A kötés általában az aminosav oldalláncok és a bázisok közötti hidrogénkötés, mely jellemzően a DNS nagy árki felszínén alakul ki. A specifikus fehérje-DNS komplexekben van néhány tipikus, egyes aminosav oldalláncok és bázisok közötti kötés, habár ez a preferált kölcsönhatás kontextusfüggő, nem egységes az összes fehérje-DNS komplexnél. A fehérjék pontos felismerőhelyeinek feltárásához alapos biokémiai, biofizikai vizsgálatokra van szükség.

Az elmúlt pár évtizedben ugrásszerűen megnőtt a DNS-fehérje kötés vizsgálatára alkalmas módszerek száma. Ezek alapvetően két részre oszthatók: *in vitro* és *in vivo* módszerekre. A nagy átteresztőképességű *in vitro* technikákkal azonosíthatók a DNS-kötő fehérjék konszenzus kötőhelyei, habár sokszor nehézséget okoz a fehérje tisztítása, valamint az információt a valódi, *in vivo* funkcióra átvezetni. Több *in vivo* módszerrel már genomi szinten vizsgálható a DNS és a fehérje között kialakuló specifikus kötés, azonban ezek a technikák általában igen költségesek, valamint idő- és munkaigényesek.

Egyszerűbb megoldást kínálnak az úgynevezett „hibrid” módszerek. A hibrid módszerek előnye, hogy nincs szükség a tesztelt fehérje tisztítására, mivel a DNS - fehérje kölcsönhatások a sejten belül vizsgálhatóak. Az egyik legáltalánosabban alkalmazott módszer a bakteriális egy-hibrid (B1H) rendszer, ahol az RNS polimeráz egy alegységét a tesztelt fehérjéhez kötik. A vizsgált DNS

szekvenciát egy riporter gén promoteréhez közel építik be. Ha a tesztfehérje kötődik a vizsgált szekvenciához, a fuzionált polimeráz alegység lokális koncentráció-növekedése révén megindul a riporter gén kifejeződése. A baktériumra jellemző nagyobb transzformációs hatékonyság miatt több, mint 100-szor nagyobb szekvencia-komplexitás vizsgálható, mint élesztőben.

Előzmények

A munkám kezdetén egy olyan témához csatlakoztam, ahol a cél egy egyszerű irányított DNS-metilációs módszer kialakítása és a metiláció specifikusságának javítása volt. Az irányított DNS-metiláció módszerének alapelve, hogy egy CG-specifikus DNS metiltranszferázt egy DNS-kötő fehérjéhez kapcsolunk, amely irányítodoménként működve a célzott CG hely közelébe kötődik és ezáltal segíti a kiválasztott CG hely preferenciális metilálódását. Irányító modulként mesterségesen létrehozott cink-ujj fehérjéket alkalmaztunk. Bár a munkánk során alkalmazott két mesterséges cink-ujj, a 6ZA és 6ZB fehérjék felismerőhelyei ismertek voltak, az ellentmondó kísérleti eredmények miatt fontos volt ellenőrizni, hogy a fehérjék *in vivo*, *Escherichia coliban* is kötődnek-e ismert célszekvenciájukhoz. Ennek az egyszerű kérdésnek a megválaszolásához az ismert technikák túl munkaigényesnek ígérkeztek, ezért megpróbáltunk egy egyszerűbb módszert kidolgozni.

Célkitűzés

- Egy olyan *in vivo*, *Escherichia coli*-ban alkalmazható módszer kialakítása, mellyel egy fehérje DNS-hez való specifikus kötődése egyszerűen, a tesztelni kívánt fehérje fúzióba hozatala nélkül kimutatható.
- Munkánk későbbi fázisában a módszerünket egy nagy átteresztőképességű technika irányába kívántuk továbbfejleszteni, amely alkalmas lehet több nukleotidszekvencia egyidejű vizsgálatára, így az adott fehérjéhez legjobban kötődő DNS szekvencia megtalálására.

Anyagok

- Alkalmazott baktériumtörzsek: *Escherichia coli* DH10B, MDS42, MDS42recA, MDS66, ER1821; ER1821 Δ *lacI* törzsei.
- Tápfolyadék, táptalaj: folyékony és szilárd LB táptalaj
- antibiotikumok:
ampicillin (100 μ g/ml), kanamicin (50 μ g/ml), kloramfenikol (50 μ g/ml), tetraciklin (12,5 μ g/ml)
- indukáló- és gátlószerek:
arabinóz (0,1%), glükóz (0,2%)
- kromogén, laktózanalóg szubsztátok:
X-gal (40 μ g/ml), ONGP (1 mg/ml)

Módszerek

- Plazmidok bejuttatása baktériumba:
kémiai transzformálás, elektroporáció
- Klónozás: restrikciós klónozás, PCR;
módosított inverz-PCR
- Plazmidkönyvtár létrehozása:
módosított inverz-PCR technika
- Mutagenézis:
 - plazmidon: inverz-PCR, QuikChange
 - genomon: „öngyilkos plazmid” technika
- β -galaktozidáz aktivitás kimutatása, mérése:
 - egyszerűsített Miller protokoll
 - tovább módosított Miller protokoll
 - X-gal tartalmú agarlemezen
- Az álpozitív klónok eliminálása a plazmid-
könyvtárból: ampicillin rezisztencián alapuló
rendszerrel
- A kötőspecifikus partnermolekulák azonosítása:
 - β -galaktozidáz aktivitás alapján
 - kloramfenikol rezisztencián alapuló rendszerrel
- Promoteraktivitás mérés: fluoresszencia mérés
- DNS nuklotidszekvencia meghatározás:
kapilláris szekvenálás, Illumina szekvenálás
- Statisztika: ANOVA, PostHoc (Bonferroni korrigált),
Shannon egyenletesség index

Eredmények

1) Az I-Block módszer kivitelezése

- **Az I-Block módszer működésének elve:**

Az I-Block módszer az *E. coli lac* operon jól jellemzett szabályozási mechanizmusán alapszik. A módszer három alapvető eleme a *lacI* deléciós *ER1821 E.coli ΔlacI* törzs, és két kompatibilis plazmid, a *lacI* gént hordozó pLacI és a tesztfehérje génjét kódoló pDBP (DNA Binding Protein) plazmid. A tesztfehérje potenciális kötőhelyét a pLacI plazmidon lévő *lacI* gén promoterébe klónozzuk. A specifikus fehérje-DNS kötődés a β-galaktozidáz aktivitás mérésével detektálható. A módszer elnevezése (I-Block) a *lacI* transzkripció gátlására utal.

- **Az I-Block módszer validálása:**

- A specifikus kötést 5 különböző DNS-kötő fehérjével mutattuk be:
 - két mesterségesen előállított cink-ujj fehérje
 - cI857 lambda fág represszor ('helix-turn-helix')
 - Tet represszor ('helix-turn-helix')
 - CRISPR-dCas9 fehérje (RNS-közvetített)
- Megfigyeltük, hogy egyes kötőhelyek hatása orientációfüggő, amely arra utalt, hogy bizonyos szekvenciák gátolják a *lacI* transzkripciót. Ezek a szekvenciák álpozitív klónokat eredményeztek.

A beépített idegen szekvenciák *lacI* transzkripcióra gyakorolt hatását részletesen vizsgáltuk és módszert dolgoztunk ki az álpozitív klónok kiszűrésére.

2) Az I-Block módszer működését befolyásoló körülmények vizsgálata és alkalmazhatóságának kiterjesztése

- **Random szekvenciát hordozó plazmidkönyvtár létrehozása**

A plazmidkönyvtár létrehozásához kialakítottunk egy módosított inverz-PCR technikát, amelyben a 18 bp hosszú random szekvenciát az egyik primer hordozza az 5' végén. A plazmidkönyvtárban magas volt az álpozitív eredményt adó, LacI^- sejtek száma. Korábbi eredményeink arra engedtek következtetni, hogy a nem-templát szálon citozinban gazdag szekvenciák gyengítik a *lacI* transzkripciót.

Ezt a jelenséget alaposabban megvizsgálandó, a random szekvencia kémiai szintézisekor a nukleotidarányt úgy módosítottuk, hogy $\frac{1}{4}$ helyett csak $\frac{1}{10}$ arányban tartalmazzon citidint. A változtatással az álpozitív, $\text{LacI}^- \beta\text{-gal}^+$ sejtek aránya a felére csökkent.

- **Kísérlet a *lacI* transzkripció helyreállítására**

- Hipotézis: „polimeráz elakadás”
- Kísérletek:
 1. A kötőszekvencia beépítési helyének eltolása
 2. σ^{32} függő promoter alkalmazása (*groE-lacI* fúzió)
 3. Az elakadást mérséklő, σ^{70} mutánsok alkalmazása

Az első két változattal ugyan sikerült a *lacI* transzkripciót helyreállítani, azonban a tesztfehérje kötődése már nem volt kimutatható, így nem alkalmaztuk ezeket a megoldásokat.

- **LacI⁻ sejtek eliminálása a plazmidkönyvtárból**

A *lacI* gént transzkripciós kapcsoltságba hoztuk az ampicillin rezisztenciát biztosító β -laktamáz génnel (pLacI-ApR plazmid). A *lacI* - β -laktamáz bicisztronos génkonstrukcióról külön fehérjék termelődnek, azonban mivel az átíródásuk kapcsolt, csak azok a sejtek életképesek ampicillin mellett, amelyekben kifejeződik a Lac represszor is. Ezzel a módszerrel visszaszorítható az álpozitív, LacI⁻ klónok száma.

- **A *lacI* promoter erősségének növelése**

A bicisztronos konstrukcióban feltételezhetően a 2. cisztronról kifejeződő β -laktamáz nagyon alacsony koncentrációban van a sejtben. Annak érdekében, hogy növeljük a bicisztronos konstrukció által biztosított ampicillin rezisztenciát, a *lacI_{NE}* promotert az eredeti *lacI* promoterre ($P_{lacI-wt}$) cseréltük a pLacI-ApR plazmidon. A *lacI* promoter erősítésével az ampicillin mellett életképesebbek voltak a klónok, valamint megemeltük a LacI sejtben belüli koncentrációját is.

- **Direkt szelekciós rendszer kialakítása a specifikusan kötődő partnermolekulák azonosításához**

A telepszín alapján való megkülönböztetés nem alkalmas arra, hogy egy specifikus kötést mutató klónt nagy telepszámú háttérből izoláljunk. Tehát az I-Block módszer eredeti változatában nem használható nagy komplexitású szekvenciakönyvtár kezelésére. Ahhoz, hogy egy DNS-kötő fehérje ismeretlen célszekvenciáját megtaláljuk, az I-Block módszert úgy alakítottuk át, hogy a sejt csak akkor legyen életképes, ha a vizsgált fehérje kötődik a *lacI* promoterbe klónozott szekvenciához. A kialakított direkt szelekciós rendszer kloramfenikol rezisztencia megjelenésén alapszik.

Összefoglalás

Kidolgoztunk egy egyszerű módszert, amellyel a szekvencaspecifikus DNS-fehérje kölcsönhatás vizsgálható *in vivo*, *Escherichia coliban*.

Az I-Block-nak nevezett módszer a laktóz-operon jól ismert szabályozási mechanizmusán alapszik. Az I-Block módszer működését 5 DNS-kötő fehérjével demonstráltuk. Az 5 fehérje 3 különböző DNS-felismerő fehérjecsaldába tartozik, ez azt jelzi, hogy a módszer várhatóan a DNS-kötő fehérjék széles körénél alkalmazható lesz.

Az I-Block módszer eredeti változatában csak kis számú fehérje–DNS kombináció vizsgálatára alkalmas.

Továbbfejlesztettük a módszert egy „nagy átteresztő-képességű” technika irányába azzal a céllal, hogy alkalmas legyen a DNS-kötő fehérjék kötőhelyének egy komplex oligonukleotid-könyvtárból való azonosítására. Ennek érdekében az I-Block módszert két szelektációs lépéssel egészítettük ki:

1. Kidolgoztunk egy rendszert a LacI^+ sejtek szelektálásához. A *lacI* gént transzkripció kapcsolttságba hoztuk az ampicillin rezisztenciát biztosító β -laktamáz génnel. Ez a bicisztronos konstrukció lehetővé teszi, hogy a LacI^- sejteket ampicillin rezisztenciára szelektálva elimináljuk.
2. A második szelektáció szintén antibiotikum rezisztencián alapul, ebben a lépésben a specifikus DNS-fehérje kötést mutató klónokat a sejtek életképessége alapján azonosíthatjuk.

Az I-Block módszer előnye a publikált *in vivo* módszerekkel szemben, hogy nem kell fúzióba hozni a tesztfehérjét, valamint az, hogy a random szekvencia beépítése nem restrikciós klónozással történik, hanem egy erre a célra kialakított módosított inverzPCR technikával, amely megkönnyíti és felgyorsítja az oligonukleotid könyvtár létrehozását. Az I-Block módszer egyszerű, olcsó és gyors eredményt adó alternatívája lehet a már publikált *in vivo*, szekvencia-specifikus DNS-fehérje kölcsönhatás vizsgálatára alkalmas módszereknek.

Summary

We have developed a simple method for studying sequence-specific DNA-protein interactions *in vivo*, in *Escherichia coli*. The technique, called I-Block, is based on the well-known regulatory mechanism of the *lac* operon. We demonstrated functioning of the I-Block assay using five DNA-binding proteins. Because these proteins belong to three different classes of DNA-recognizing proteins, we assume that the technique can be used with a wide range of DNA-binding proteins.

The I-Block assay can, in its original version, test only a small number of DNA-protein combinations. With the goal to make the technique capable of finding the target site of a DNA binding protein within a complex oligonucleotide library, we developed the method in the direction of a „high-throughput” technique.

The original version of the I-Block assay was supplemented with two selection steps:

1. To eliminate clones containing sequences blocking *lacI* transcription, we have developed a system for the selection of Lacl^+ clones. The *lacI* and the β -lactamase genes were cloned in a tandem arrangement to ensure coupled transcription. Transcriptional coupling allows elimination of Lacl^- clones by selecting for ampicillin resistance.
2. The second selection step serves to identify binding positive clones by virtue of their resistance to chloramphenicol.

The I-Block assay has the advantage over other published *in vivo* methods that there is no need for the creation of protein fusion. Another result of our work is that we have developed a modified inverse PCR technique for cloning of the random DNA sequence, which makes creation of the plasmid library easier. We hope that the method will be a simpler and cost-efficient alternative of the published *in vivo* methods for the detection of sequence-specific DNA-protein interactions.

Köszönetnyilvánítás

Elsőként a témavezetőmnek, Dr. Kiss Antalnak köszönöm, hogy a pályafutásom kezdetétől támogatta a fejlődésem. Köszönöm a sok évnyi tanítását és türelmét.

Hálás vagyok Karcagi Ildikónak a közös munkáért és barátságáért. Köszönöm Varga Bencének is a biztatást és a beszélgetéseket. Köszönöm Szentés Saroltának, Koncz Mihálynak, Simon-Pletl Zitának, Sági-Zsigmond Eszternek és Salamon Pálnak a dolgozatban bemutatott munkához való hozzájárulásukat. Továbbá köszönöm a munkám első éveiben a tanítást, a segítséget és a sok kedvességet Ślaska-Kiss Krystynának és Antonné Papp Ibolyának.

Köszönöm Ferenc Györgyinek és Balikó Gabriellának is a tanácsokat és kedvességüket.

Végül, de nem utolsó sorban, hálás vagyok a családomnak és a páromnak a kitartó támogatásukért.

Saját közlemények

- **A disszertáció alapjául szolgáló publikáció:**

1. Szentés, S., Zsibrita, N., Koncz, M., Zsigmond, E., Salamon, P., Pletl, Z. and Kiss, A. (2020) I-Block: a simple *Escherichia coli*-based assay for studying sequence-specific DNA binding of proteins. *Nucleic Acids Res.*, 48, e28.

IF: 16,971

- **Egyéb publikációk:**

2. Ślaska-Kiss, K., Zsibrita, N., Koncz, M., Albert, P., Csábrádi, Á., Szentés, S. and Kiss, A. (2021) Lowering DNA binding affinity of SssI DNA methyltransferase does not enhance the specificity of targeted DNA methylation in *E. coli*. *Scientific Reports*, 11, 15226.

3. Albert, P., Varga, B., Zsibrita, N., and Kiss, A. (2018). Circularly permuted variants of two CG-specific prokaryotic DNA methyltransferases. *PLoS One* 13, e0197232–e0197255. doi:10.1371/journal.pone.0197232

Az 1. és 2. publikáció megosztott első szerzője vagyok.

MTMT azonosító: 10083767

Összesített impakt faktor: 24,708

Hivatkozások száma: 6

- **Előadások:**

- 2021 Nikolett Zsibrita - I-Block: A simple assay for studying sequence-specific DNA-protein interactions in *E.coli*
10. Jubileumi Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia, Pécs
- 2017 Zsibrita Nikolett: Új megközelítések az irányított DNS metiláció módszerének javításához
XXXIII.OTDK, Agrár-tudományi Szekció, Mosonmagyaróvár
- 2016 Zsibrita Nikolett: Új megközelítések az irányított DNS metiláció módszerének javításához SZIE MKK TDK, Genetika és Biotechnológia Szekció, Gödöllő

- **Poszterek:**

- 2019 N. Zsibrita; S. Szentes; A. Kiss - I-Block: A simple *E. coli*-based assay for studying sequence-specific DNA-binding of proteins
6th International Synthetic & Systems Biology Summer School, Pisa
- 2019 N. Zsibrita; S. Szentes; A. Kiss: A simple *E. coli* system for studying sequence-specific DNA binding of proteins
Molekuláris Élettudományi Konferencia, Eger

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott Szentés Sarolta nyilatkozom, hogy Zsibrita Nikolett doktori disszertációjában bemutatott eredmények tükrözik a jelölt „Szentés, S.*, Zsibrita, N.*, Koncz, M., Zsigmond, E., Salamon, P., Pletl, Z. and Kiss, A. (2020) I-Block: a simple *Escherichia coli*-based assay for studying sequence-specific DNA binding of proteins. *Nucleic Acids Res*, 48, e28” közleményben bemutatott hozzájárulását. A doktori értekezésben bemutatott eredményekben a jelölt munkája meghatározó fontosságú, és nem használtam fel a tudományos fokozat megszerzésekor, és a jövőben sem teszem.

Szeged, 2023. 06. 14.



Szentés Sarolta

Megosztott elsőszerző

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott Konkcz Mihály nyilatkozom, hogy Zsibrita Nikolett doktori disszertációjában bemutatott eredmények tükrözik a jelölt „Szentes, S.*, Zsibrita, N.*, Konkcz, M., Zsigmond, E., Salamon, P., Pletl, Z. and Kiss, A. (2020) I-Block: a simple *Escherichia coli*-based assay for studying sequence-specific DNA binding of proteins. *Nucleic Acids Res*, 48, e28” közleményben bemutatott hozzájárulását.

Zsibrita Nikolett doktori értekezésében bemutatott eredményekben a jelölt munkája meghatározó fontosságú, és nem használok fel tudományos fokozat megszerzéséhez.

Szeged, 2023. 06. 14.


Konkcz Mihály

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott Sági-Zsigmond Eszter nyilatkozom, hogy Zsibrita Nikolett doktori disszertációjában bemutatott eredmények tükrözik a jelölt „Szentes, S.*, Zsibrita, N.*, Konkcz, M., Zsigmond, E., Salamon, P., Pletl, Z. and Kiss, A. (2020) I-Block: a simple *Escherichia coli*-based assay for studying sequence-specific DNA binding of proteins. *Nucleic Acids Res*, 48, e28” közleményben bemutatott hozzájárulását. A doktori értekezésben bemutatott eredményekben a jelölt munkája meghatározó fontosságú, és nem használtam fel a tudományos fokozat megszerzésekor, és a jövőben sem teszem.

Szeged, 2023. 06. 14.

Sági-Zsigmond Eszter



Társszerzői nyilatkozat

Alulírott Simon-Pletl Zita nyilatkozom, hogy Zsibrita Nikolett doktori disszertációjában bemutatott eredmények tükrözik a jelölt „Szentés, S.*, Zsibrita, N.*, Koncz, M., Zsigmond, E., Salamon, P., Pletl, Z. and Kiss, A. (2020) I-Block: a simple *Escherichia coli*-based assay for studying sequence-specific DNA binding of proteins. *Nucleic Acids Res*, 48, e28” közleményben bemutatott hozzájárulását.

Zsibrita Nikolett doktori értekezésében bemutatott eredményekben a jelölt munkája meghatározó fontosságú, és nem használok fel tudományos fokozat megszerzéséhez.

Szeged, 2023. 06. 14.



Simon-Pletl Zita

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott Salamon Pál nyilatkozom, hogy Zsibrita Nikolett doktori disszertációjában bemutatott eredmények tükrözik a jelölt „Szentés, S.*, Zsibrita, N.*, Koncz, M., Zsigmond, E., Salamon, P., Pletl, Z. and Kiss, A. (2020) I-Block: a simple *Escherichia coli*-based assay for studying sequence-specific DNA binding of proteins. *Nucleic Acids Res*, 48, e28” közleményben bemutatott hozzájárulását.

Zsibrita Nikolett doktori értekezésében bemutatott eredményekben a jelölt munkája meghatározó fontosságú, és nem használtam fel a tudományos fokozat megszerzésékor, és a jövőben sem teszem.

Szeged, 2023. 06. 14.



Salamon Pál