

Szekvenciaspecifikus DNS-fehérje kölcsönhatások vizsgálatára alkalmas módszerek kidolgozása *Escherichia coliban*

Ph.D. értekezés

Zsibrita Nikolett

Témavezető: Dr. Kiss Antal

Kutatás helye: ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Biokémiai Intézet



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



Szeged

2023

TARTALOMJEGYZÉK

I. Rövidítések jegyzéke	4
II. Bevezetés.....	6
II.1 A DNS-fehérje kölcsönhatások szerepe.....	6
II.2 A DNS-fehérje kötődés jellemzése	8
II.3. TF funkcionális domének, csoportosítás	9
II.3.1. DNS-felismerés α -hélix doménnel	10
II.3.2. DNS felismerés β -redővel vagy hurkonon keresztül.....	11
II.3.3. α -hélix-szet és β -redőt is használó DNS-kötő fehérjék	11
II.4. RNS-közvetített DNS felismerés (CRISPR-Cas rendszer).....	12
II.5. DNS-Fehérje kötődés vizsgálatára alkalmas módszerek	12
III. Előzmények és célkitűzés	16
IV. Anyagok és Módszerek	17
IV.1 Baktériumtörzsek és tenyésztési körülmények, táptalajok.....	17
IV.1.1. Baktériumtörzsek	17
IV.1.2. Tenyésztési körülmények, táptalajok	17
IV.2. Plazmidok	17
IV.3. Oligonukleotidok.....	18
IV.4. Kompetens sejtek készítése és transzformációja	18
IV.4.1. Transzformálás kémiai kompetens sejtrel	18
IV.4.2. Elektroporáció	18
IV.5. Pontmutációk létrehozása.....	19
IV.5.1. QuikChange:.....	19
IV.5.2. Inverz-PCR.....	19
IV.6. Genomi integrációk, mutációk és deléciók.....	20
IV.7. β -galaktozidáz aktivitás mérése.....	20
IV.8. Promoter aktivitás mérés	21
IV.9. Lemezteszt.....	21
IV.10. DNS nukleotidszekvencia meghatározása	22
IV.11. Restrikciós és módosító enzimek, egyéb anyagok, eszközök	22
IV.12. Statisztikai elemzés	22
V. Eredmények.....	23
V.1 Az I-Block módszer működésének elve	23
V.1.1 Az <i>ER1821 $\Delta lacI$</i> törzs	24
V.1.2. pLacI plazmidok.....	24
V.1.3. pDBP plazmidok	26

V.2. Az I-Block módszer kivitelezése	27
V.2.1. β -galaktozidáz aktivitás mérése	27
V.2.2. A felismerőszekvencia klónozóhelyének megválasztása	28
V.2.3 pLacI _N variáns promoter aktivitásának mérése	29
V.2.4. A kötőhely beépülési irányának hatása	31
V.2.5. A <i>lacO3</i> operátor szekvencia hatása a plazmidon lévő <i>lacI</i> gén transzkripciójára	34
V.3. Az I-Block módszer működésének bemutatása különböző DNS-kötő fehérjékkel	36
V.3.1. A beépített felismerőszekvencia hatásának vizsgálata a <i>lacI</i> transzkripcióra	36
V.3.2. A DNS-kötő fehérjék specifikus kötésének kimutatása	37
V.4. Az I-Block módszer teljesítőképességének vizsgálata	39
V.4.1. Random szekvenciát hordozó, pLacI plazmidkönyvtár létrehozása	39
V.4.2. Kísérlet a gátolt <i>lacI</i> transzkripció helyreállítására	43
V.4.3. LacI ⁻ sejtek eliminálása pLacI _{NE} -N18 plazmidkönyvtárból	48
V.4.4. A pLacI-ApR plazmidon lévő <i>lacI</i> promoter erősségének növelése	54
V.4.5. A transzkripció blokk mérséklése az inszertszekvencia nukleotidarányának eltolásával ..	58
V.4.6. A plazmidkönyvtár komplexitásának növelése erősebb <i>lac</i> promoter alkalmazásával	60
V.4.7. Az <i>ER1821 ΔlacI</i> törzs átalakítása direkt szelektáláshoz	61
VI. Diskusszió	69
VII. Jövőbeli tervek	73
VIII. Köszönetnyilvánítás	74
IX. Irodalomjegyzék	75
X. Saját publikációk jegyzéke	80
XI. Magyar és angol nyelvű összefoglaló	81
XI.1. Magyar nyelvű összefoglaló	81
XI.2. Angol nyelvű összefoglaló	83
XII. Témavezetői nyilatkozat	86
XIII. Függelék	87
XIII.1. A felhasznált plazmidok listája; Függelék 1. táblázat	87
XIII.2. A munka során alkalmazott oligonukleotidok; Függelék 2. táblázat	91
XIII.3. Kék-fehér telepszín aránya a plazmidkönyvtár szelektálása előtt és után, <i>ER1821 ΔlacI</i> gazdában; Függelék 3. táblázat	96
XIII.4. Kék-fehér telepszín aránya a plazmidkönyvtár szelektálása előtt és után, <i>ER1821 ΔlacI</i> CAT _{HOB} gazdában; Függelék 4. táblázat	98
XIII.5. A transzformáns telepek száma kloramfenikol tartalmú lemezen <i>ER1821 ΔlacI</i> CAT _{HOB} gazdában; Függelék 5. táblázat	99
XIII.6. pLacI-ApR könyvtárak elemzése Illumina szekvenálással; Függelék 6. táblázat	99

XIII.7.: Egytényezős varianciaanalízis (ANOVA), Post Hoc teszttel (Bonferroni korrigált); Függelékek 7. táblázat.....	100
XIV. Ábra- és táblázatjegyzék	104
XIV.1. Ábrajegyzék	104
XIV.2 Táblázatjegyzék.....	105

I. Rövidítések jegyzéke

Ap: ampicillin

Ap^R / Ap^S: ampicillinre rezisztens/érzékeny sejtek

ara: arabinóz

ATAC-seq: Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing

B1H: Bakteriális-egy-hibrid módszer

bHLH: Basic Helix-Loop-Helix (hélix-hurok-hélix)

bZIP: Basic Leucine Zipper Domain (leucin-cipzár)

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

CAP: katabolit aktivátor fehérje

Cas: CRISPR-kapcsolt

CAT: kloramfenikol-acetiltranszferáz

ChIP: kromatin immunprecipitáció

Cm: kloramfenikol

Cm^R/Cm^S: kloramfenikolra rezisztens/érzékeny sejtek

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

crRNS: CRISPR RNS

CTAB: Cetrimónium-bromid

DamID: DNA adenine methyl-transferase identification

DBP: DNA Binding Protein (DNS kötő fehérje)

dCas9: 'dead' Cas9 (inaktív Cas9 fehérje)

EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay (Elektroforetikus Mobilitás Eltolódás Vizsgálat)

glü: glükóz

HTH: helix-turn-helix

ITS: Initial Transcribed Sequence (kezdeti átírt szekvencia)

Km: kanamicin

LacI⁺ β-gal: Lac represszort termelő sejtek, β-galaktozidáz génexpresszió gátolt

LacI⁻ β-gal: *lacI* transzkripció gátolt, β-galaktozidázt termelő sejtek

ONPG: o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid

PDB: Protein Data Base (fehérje adatbázis)

PWM: Position Weight Matrix (helysúlyozott mátrix)

RCSB: Research Collaboratory for Structural Bioinformatics

RE: Relatív Egység (OD_{420}/OD_{600})

RHH: ribbon-hélix-hélix

SCOP: Structural Classification of Proteins (fehérjeszerkezeti adatbázis)

SD: Shine–Dalgarno szekvencia

SELEX: Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment

sgRNS: 'single guide RNS' (crRNS + tracrRNS)

SMF: Single Molecule Footprinting

TBP: TATA-binding protein (TATA-kötő fehérje)

Tet: tetraciklin

TF: Transzkripció Faktor

TKH: transzkripció kezdőhely

tracrRNS: transzaktivátor crRNS

X-gal: 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid

Y1H: élesztő egy-hibrid módszer

II. Bevezetés

II.1 A DNS-fehérje kölcsönhatások szerepe

A DNS-kötő fehérjék szerepe kulcsfontosságú számos biológiai folyamatban, mint a transzkripció szabályozás, a replikáció, a DNS hibajavítás és módosítás (1-3). A DNS-ben kódolt genetikai információnak pontosan kell kifejeződnie térben és időben egyaránt, hogy a celluláris folyamatok végbemenjenek, elősegítve a sejtnövekedést, a szaporodást, valamint a környezethez való alkalmazkodást. A génkifejeződés szabályozása nem egy izolált folyamat, inkább egy génregulációs hálózat, mely több száz transzkripciós faktorból, cisz-regulátor szekvenciából és koregulátorból épül fel (4,5).

A transzkripciós faktorok közvetlen és specifikus kölcsönhatásba lépnek a DNS-sel, ahol aktiválják vagy represszálják a célgén kifejeződését (1,6). A transzkripciós faktorok egy egyedi felismerőhelyhez kötődve szabályozzák a transzkripciót. Ez a szabályozóhely általában rövidebb, mint 20 bp, amely a promoterhez közel vagy attól távolabb is előfordulhat (5). Az első röntgenkristallográfiával vizsgált DNS-fehérje komplexek a katabolit gén aktivátor fehérje (CAP) (7), a Cro represszor (8) és a λ represszor (9) voltak. Mára már több, mint 204.000 fehérjestruktúra és közel 16.000 fehérje-DNS komplex érhető el a PDB fehérje adatbank oldalán (RCSB.org; 10). Számos fajban, a baktériumoktól az emberekig bezárólag, a transzkripciós faktorok 3-10%-át teszik ki a fehérjét kódoló géneknek a genomban. A *Saccharomyces cerevisiae* genomja közel 200, a humán genom 1400 prediktált transzkripciós faktort kódol. A transzkripció szabályozása pontos és precíz folyamat, így a transzkripciós faktorok mutációi gyakran megbetegedéshez vezetnek. A legtöbb humán rákos sejtben bizonyos transzkripciós faktorok túlzott aktivitást mutatnak (4,5), például az EGP-2, más néven az EpCAM (epiteliális sejt adhéziós molekula) erősen expresszálódik a ráktípusok többségében, azonban csak korlátozott mértékben az egészséges szövetekben (11,12). A baktériumokban a szabályozó helyek általában a promoterekkel átfednek vagy szomszédosak, az eukariótákban azonban ez a szoros kapcsoltság kevésbé jellemző.

A génektől távol upstream vagy downstream található szabályozó helyeket enhancereknek nevezzük, mely helyekre kötődött fehérjék gyakran aktiválják a transzkripciót. Eukariótákban általában több transzkripciós faktor együttműködve irányítja a transzkripciót. Annak ellenére, hogy az eukarióta génregulációs rendszer sokkal összetettebb, a transzkripciós faktorok

működési alapelve két széleskörűen ismert példán, a *lac*-operonon és a λ bakteriofág geneikái szabályozásán keresztül jól jellemezhető (13).

A *lac*-operon, a laktóz-katabolizmusban fontos szerepet játszó enzimek génjeiből és azok kifejeződését szabályozó elemekből áll. A három struktúrgén: a *lacZ*, mely a β -galaktozidázt kódolja, valamint a *lacY*, a laktóz permeáz és a *lacA*, a laktóz transzacetiláz génjei. A struktúrgének kifejeződését pozitív és negatív szabályozás segíti, hogy a sejt a több cukorforrás közül mindig a könnyebben hasznosítható szénforrást részesítse előnyben. Így például a glükóz és laktóz jelenlétében először a monoszacharid glükózt bontja le, és csak annak hiányában indul meg a laktóz feldolgozása. A *lac* operon szabályozásában a glükóz is részt vesz. A magas glükóz koncentráció gátolja az adenilát cikláz enzim működését, így alacsony cAMP szint van jelen. Ellentétes esetben, vagyis alacsony glükóz és magas cAMP koncentráció mellett a cAMP molekulák a katabolit aktivátor fehérjéhez (CAP) kötnek. A kialakult CAP-cAMP komplex a *lac* operon promotere előtt található felismerőhelyhez kötődik és fokozza a *lacZYA* gének transzkripcióját. A CAP kötődés hiányában alacsony szintű marad a génkifejeződés. A katabolit represszióknak nevezett mechanizmus tehát a valóságban pozitív szabályozás. Egy további, független szabályozás is segíti a sejtet a környezethez való alkalmazkodáshoz. A bakteriális kromoszómán, a *lac*-operonhoz közel helyezkedik el a Lac represszor génje, a *lacI*, melynek átíródása egy gyenge, konstitutív promoter, P_{lacI} irányítása alatt áll. A *lac* operonon belül három operátor szekvencia található (*lacO1*, *lacO2* és *lacO3*), melyekhez eltérő affinitással kötődik a Lac represszor, meggátolva a struktúrgének kifejeződését. A *lac* operon indukálószer a laktózból képződő allolaktóz, amely a Lac represszorhoz kötődve úgy változtatja meg a represszor konformációját, hogy az már nem lesz képes kötődni az operátor szekvenciákhoz. A gátlás alól felszabadult promotert az RNS polimeráz foglalja el és átírja a laktóz metabolizmusához szükséges géneket (14).

A λ bakteriofág két életciklusa, a lizogén és a litikus életciklus közötti kapcsolás két fehérje kötődésétől függ. A két fehérje, a λ represszor és a Cro fehérje, a λ fág genomon található három kötőhelyhez, az O_{R1} , O_{R2} , O_{R3} operátorhoz kötődésért versenyez. A két gén promotere átfed, azonban róluk ellenkező irányban indul transzkripció. A Cro fehérje promotere (P_R) az O_{R1} és O_{R2} operátorral, a λ represszor promotere (P_{RM}) pedig az O_{R3} operátorral fed át. A *cro* gén kifejeződése leáll, akár a Cro fehérje, akár a λ represszor kötődik az O_{R1} és O_{R2} operátor szekvenciához. A λ represszor termelődését pedig az O_{R3} operátoron keresztül gátolhatja mindkét fehérje. A λ represszor elsődlegesen egy másik promoterről, a P_{RE} promoterről

szintetizálódik gyengén. Azonban az O_R1 , O_R2 operátorhoz kötődve a λ represszor fokozza a saját génexpresszióját (míg a *cro* gén transzkripciót gátolja). Ez a visszacsatolás segít a megfelelő szinten tartani a represszor koncentrációját. A λ represszor az O_R1 , az O_R2 és az O_R3 operátor szekvenciákhoz különböző erősséggel kötődik. A legmagasabb affinitása az O_R1 szekvenciához van, de az O_R2 szekvenciához is magas. Az O_R3 operátorhoz csak akkor kötődik, ha magas koncentrációban van jelen a λ represszor. Összefoglalva, a Cro és a λ represszor 3 különböző szekvenciához képes kötődni, de a kötődés erőssége nagyban függ a pontos szekvenciától. Továbbá a λ represszor negatív és pozitív irányban is eltolhatja a génexpressziót, ezáltal szabályozó hatással lehet saját génkifejeződésére (13).

II.2 A DNS-fehérje kötődés jellemzése

A DNS és a hozzá kötődő fehérje közötti kölcsönhatás lehet specifikus és nem specifikus. A specifitás alatt általában azt értjük, hogy a fehérje mennyivel nagyobb affinitást mutat egy adott, egyedi kötőhelyhez, mint a többi DNS szekvenciához. A specifitás úgy is értelmezhető, hogy hogyan oszlik meg az affinitás a felismerőszekvenciák között (13). Mivel minden bázis jellemző funkcionális csoporttal rendelkezik, minden DNS szekvencia sajátos kémiai tulajdonsággal bír. A DNS kémiai felszíne, a szekvencia által meghatározott struktúrája és rugalmassága meghatározza a kölcsönhatások jellegét, amely lehet többek között hidrogén kötés, elektrosztatikus vagy van der Waals-kölcsönhatás. A kötések kétharmada az erősen negatív cukorfoszfát gerinccel létesül. Ezek a kölcsönhatások segítenek stabilizálni a DNS-fehérje komplexet, azonban a szekvenciától független, vagyis nem specifikus az egyedi DNS helyekre. Vannak fehérjék, melyek nem tesznek különbséget a DNS szekvenciák között, így kizárólag nem specifikus kölcsönhatásba lépnek azzal (15).

A specifikus kötőhelynek nevezett szekvenciához kötődik a fehérje a legnagyobb affinitással, amely 10^3 - 10^6 -szor erősebb lehet, mint általánosan a DNS-hez. A specifikus kölcsönhatás lehet kizárólagos egy szekvenciára, vagy megengedőbb. A restriktív enzimeknél csak a tökéletesen egyező szekvenciánál jön létre a specifikus kölcsönhatás, már egyetlen változás a szekvenciában meggátolja a kötődést (16,17). Ez a magas szekvenciaspecifitás a sejt védelméhez szükséges, hogy a saját és a nem saját örökítőanyagot megkülönböztesse, és csak az idegen DNS-t eliminálja. A saját DNS-en található restriktív felismerőhelyeket metilációval védi a sejt. A specifikusan metilált felismerőhelyet már nem képes hasítani az enzim. A restriktív enzimekkel ellentétben, a transzkripció faktorok általában nem csak egy preferált

kötőhellyel rendelkeznek, a csak egy pozícióban eltérő szekvenciákhoz hasonló erősséggel kötődnek, sőt néhány jelentősen eltérő szekvenciához is hasonló affinitást mutathatnak. A specifikus kölcsönhatást kialakító fehérjék először nem specifikus kötést is létesíthetnek, míg a DNS-t végigpásztázva egy nagyobb affinitással rendelkező, egyedi szekvenciához érnek (13). A fehérjék szekvenciaspecifikus kötést leginkább bázisfelismerés által alakítanak ki, melyet főleg az aminosav és a bázisok közötti hidrogénkötések biztosítanak. A DNS nagy árki felszínén sokkal több hidrogén kötés kialakítására van lehetőség, mint a kis árokban. A specifikus fehérje-DNS komplexekben van néhány tipikus, egyes aminosav oldalláncok és –bázisok közötti kötés. Ez jellemzően hidrogén-kötés, melyre kimelkedő példa a guaninnak az arginin oldallánccal kialakított kapcsolata, valamint az adeninnek az aszparagin és a glutamin oldallánccal létrejövő specifikus H-kötése. Előfordul bázisfüggő van der Waals-kölcsönhatás is, azonban ez csak treonin és aromás aminosavaknál ismert. Vannak tehát preferált kölcsönható partnerek, azonban ez kontextus függő, nem egységes az összes fehérje-DNS komplexnél (13,18,19).

II.3. TF funkcionális domének, csoportosítás

A DNS-kötő fehérje különböző feladatot ellátó domén alegységekből állhat. Az egyes alegységek akár önmagukban is funkcióképesek lehetnek. A transzkripció faktorok a funkciójuk betöltéshez legalább két fehérjedoménnel kell rendelkezzenek, egy DNS-kötő doménnel és egy aktiváló vagy gátló doménnel. Ritkán a transzkripció fehérjék akár több azonos vagy különböző DNS-kötő doménnel is rendelkezhetnek. Jobban jellemző azonban, hogy nem azonos, hanem több, különböző funkciót betöltő doménnel rendelkezzen a fehérje, mint például a homo- vagy heterodimerek kialakításához szükséges alegységgel, vagy a fehérje-fehérje kölcsönhatást biztosító alegységgel.

A transzkripció faktorok a felépítésük szerint csoportosíthatóak. A hasonló szerkezetű fehérjék általában hasonló funkcióval rendelkeznek, valamint általában hasonló DNS-kötő doméneken keresztül lépnek kölcsönhatásba a specifikus DNS szekvenciával (13,20). A DNS-kötő doménekről az első átfogó taxonómiát Harrison készítette 1991-ben, aki 4 csoportba sorolta az akkor ismert DNS-kötő fehérjéket: 1. 'helix-turn-helix', 2. cink-kötő, 3. leucin-cipzár, 4. β -ribbon (21). Később, a kísérleti és informatikai módszerek fejlődésével egyre szélesedett a DNS-kötő doménekről szerzett ismeret. A 2012-ben publikált adatbázis, a TFClass (22) a humán DNS-kötő doméneket rendszerezte, ahol már 9 szuperosztály található, ezen belül 40

osztály és 111 család. Szinte minden fehérje mutat szerkezetbeli hasonlóságot más fehérjékkel, ezek közül néhány fehérje egy filogenetikai ághoz tartozik. A SCOP adatbázis átfogó képet alkot az ismert szerkezetű fehérjék strukturális és evolúciós kapcsolatairól. A SCOP adatbázis tavalyi frissítésekor 72.544 nem redundáns domént tartalmazott (SCOP; 23,24). A DNS-kötő fehérjék az alapján is csoportosíthatók, hogy milyen másodlagos szerkezetű doménnel alakítják ki a DNS-fehérje kötést. Vannak fehérjék, melyek kizárólag α -hélixet alkalmaznak, mások főleg β -redőt, azonban vannak, melyek kombináltan vagy hurkon keresztül ismerik fel a specifikus kötőhelyet (18).

II.3.1. DNS-felismerés α -hélix doménnel

A DNS-kötő fehérjék leggyakrabban az α -hélix segítségével kötődnek a DNS nagy árkában. A 'helix-turn-helix' (HTH) csoportba tartozik a legtöbb prokarióta transzkripció szabályozó fehérje. A prokarióta HTH fehérjék többnyire dimerként kötődnek a DNS nagy árkába. Vannak fehérjék, például a Lac represszor, amelyek a DNS kis árki felszínével is kölcsönhatásba lépnek. A Lac represszor a bakteriális represszorok közül az egyik legismertebb példa a HTH DNS-kötő családból. A Lac represszor homotetramert alkot, azonban minden monomere külön kötődik a specifikus DNS felismerőhelyhez (1.A ábra).



1. ábra: Különböző DNS-kötő fehérjék DNS-sel alkotott komplexe

A: A HTH családhoz tartozó Lac represszor dimer O1 operátorhoz kötődve (PDB: 2KEI).

B: A három cink-ujjból álló Zf268 (EGR1) fehérje a konszenzus szekvenciához kötődve (PDB: 1AAY)

Számos HTH motívummal rendelkező fehérje egy anti-paralell β -redőt is hordoz. Az ilyen típusú fehérjéket 'szárnyas helix-turn-helix' fehérjéknek (wHTH, 'winged helix-turn-helix') nevezik. A 'szárny' általában a kis árokhoz kötődik. A csoportba tartoznak például a MarR-szerű transzkripció faktorok.

A homeodomén fehérjék eukarióta transzkripció faktorok, melyek HTH domént használnak a szekvenciaspecifikus DNS kötéshez. A felismerő hélix hosszabb, mint a legtöbb HTH felismerő hélix, és általában 3 hélix formál egy homeodomént. Nem alkotnak dimert, de együttműködnek más TF fehérjékkel.

Két transzkripciócsalád hosszú α hélixet hordoz, amely specifikusan köti a DNS-t, valamint dimerizálódik. Az egyik család az úgynevezett leucin-cipzár, amely a karboxil végén hordoz leucinban gazdag szekvenciát. Ezt az elrendeződést bZIP-nek nevezik (bZIP: 'Basic Leucine Zipper Domain'). A bZIP fehérjék dimerizálódhatnak homo- vagy heterodimerként, vagy mindkettőként. A másik család a bHLH ('Basic Helix-Loop-Helix'), ahol a dimerizációs doménben van egy hurok (loop) a két hélix között (13,15,18).

II.3.2. DNS felismerés β -redővel vagy hurkonon keresztül

A legtöbb DNS-kötő fehérje α -hélixet használ a DNS szekvencia felismeréshez, azonban vannak olyan fehérjék, amelyekben a DNS-felismerésért kizárólagosan β -redő felel. Ilyen fehérjék például a TATA-kötő fehérjék (TBP), amely a kis árokban lép kölcsönhatásba a DNS-sel. Az immunoglobulin-szerű strukturális ' β -szendvics' domének, mint a p53-szerű transzkripciósfaktorok és Runt domének, leginkább a köztes hurkokon keresztül ismerik fel a specifikus DNS szekvenciát (13,15,18).

II.3.3. α -hélix-szet és β -redőt is használó DNS-kötő fehérjék

Számos fehérje α - és β -domént is hordoz. Ezeknél a fehérjéknél a DNS-felismerésért egy típusú domén is felelhet, azonban akár kombináltan, α -hélixen, β -redőn és hurkon keresztül is történhet a DNS-kötés. Az eukariótákban az egyik leggyakorabban előforduló DNS-kötő fehérje a cink-ujj fehérje, amely cink-iont használ a fehérjeszerkezet stabilizálásához (13,25). A cink-ujjak általában 30 aminosavból felépülő DNS-kötő domének. A cink-ujjak egy rövid α -hélixből és egy antiparalell β -redőből állnak, a cink-iont cisztein és hisztidin aminosavak koordinálják. A felismerő hélix a DNS nagy árkában általában 3-4 bázist köt. A DNS-felismerő hely aminosav cseréjével megváltozik a felismerőszekvencia is. A cink-ujjakat a cink atomot koordináló aminosavak szerint csoportosítják, így megkülönböztetnek C_2H_2 , C_4 és C_6 cink-ujjakat. Az egyik legjobban jellemzett cink-ujj fehérje a C_2H_2 cink-ujj, ahol a cink atomot két hisztidin és két cisztein aminosav koordinálja. Az egyik legismertebb C_2H_2 cink-ujj fehérje a Zf268, más néven EGR1 fehérje, melynek szerkezetét csaknem 30 éve publikálták (26). Az egérből izolált Zf268 fehérje értékes modellszerkezetként szolgált a cink-ujjak tanulmányozásához (25). A 3 cink-ujjból álló C_2H_2 fehérje 9 bp hosszú szekvenciát ismer fel, az α -hélix első 6 aminosava felel a szekvenciafelismerésért (1. ábra, B). Az alegységek sorrendjének változtatásával elméletileg bármely DNS szekvenciához tervezhető mesterséges cink-ujj fehérje, amely specifikusan felismeri az adott génszakaszt.

A C₄ típusú fehérjéknél a cink-ion 4 cisztein között helyezkedik el. A C₄ cink-ujjakhoz tartoznak a GATA faktorok, melyek nevüket a feilszert szekvencia után kapták. Minden GATA faktor két monomerből áll, melyek homo- és heterodimert is képezhetnek. A gombákban gyakori szerkezet a C₆, 'cink-kluszer' motívum, melynek monomerjei 6 ciszteinnel koordinálják a cink atomot. Ilyen fehérje például a Gal4 fehérje, amely CGGN₁₁CCG szekvenciát ismer fel. A csoporthoz tartozó más fehérjék is CGG szekvenciát ismernek fel.

Egy bakteriális transzkripció faktor család ribbon-hélix-hélix (RHH) motívumot hordoz, amely kétszálú anti-paralell β -ribbonból és két α -hélix-ből áll. A β -ribbon domén a DNS nagy árkához kötődik. A két α -hélix tartalmazza a hidrofób mag nagy részét, valamint részt vesz a dimerizációban. A családhoz tartozik a MetJ és az Arc represszor (13,15,18).

II.4. RNS-közvetített DNS felismerés (CRISPR-Cas rendszer)

A baktériumokban felfedeztek egy RNS-közvetített DNS felismerő rendszert, amely a baktériumok védekező mechanizmusa vírushatás vagy bármely idegen eredetű nukleinsav ellen. A CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) a baktérium genomában előforduló rövid, ismétlődő DNS-szakaszok, melyeket a fág vagy egyéb idegen genetikai elemekkel egyező, úgynevezett spacer (helykitöltő) DNS-szekvenciák követnek. Az ismétlődő és spacer szekvenciák együttesen íródnak át egy hosszú crRNS-sé, melyet a CRISPR-kapcsolt (Cas) endonukleáz kisebb részekre feldarabol. A II-es típusú rendszerben a transzaktivátor crRNS (tracrRNS) hibridizál a komplementer ismétlődő CRISPR szekvenciával. A kettős szálú RNS-t az RNáz III ismeri fel és hasítja, csak a helykitöltő szekvenciát hátrahagyva. A fennmaradt crRNS-sel komplexet alkot a Cas9 fehérje, amely így képes felismerni és vágni az idegen eredetű DNS-t(27-29).

II.5. DNS-Fehérje kötődés vizsgálatára alkalmas módszerek

A specifikus DNS-fehérje kölcsönhatás átfogó vizsgálata elengedhetetlen a transzkripció szabályozás mélyebb megértéséhez. Az elmúlt pár évtizedben ugrásszerűen megnőtt az alkalmazható módszerek száma. Az *in vitro* technikák célja legfőképpen a DNS-kötő fehérjék konszenzus kötőhelyeinek azonosítása és a kötés biofizikai paramétereinek meghatározása. Az *in vivo* technikák előnye, hogy a szekvenciaspecifikus DNS-fehérje kölcsönhatás biológiai körülmények között vizsgálható (30).

Az EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) egy gyors és egyszerű kvalitatív és megfelelő körülmények között kvantitatív *in vitro* technika (31,32). Lényege az, hogy egy viszonylag stabilan kötődő fehérje lassítja a DNS fragmentum elektroforetikus mobilitását. A fragmentum és a komplex elválasztható, mennyiségük meghatározható. A módszer hátránya, hogy az elektroforetikus futás során előfordulhat, hogy a DNS-fehérje komplex részlegesen vagy teljesen disszociál (2).

A fág-display technikát (33) széleskörűen alkalmazzák, többek között DNS-fehérje kölcsönhatások elemzéséhez. A fág-display technikával eleinte leginkább cink-ujj fehérjék által felismert DNS-szekvenciákat azonosítottak. Ennek oka, hogy a cink-ujjak ideális modellek a DNS-fehérje kötés vizsgálatához, mivel néhány, hasonló felépítésű mikrodoménből épülnek fel. A cink-ujj monomerek 3 bp DNS szekvenciát ismernek fel. Az ismert specifitású cink-ujj monomereket kombinálva elméletileg a genom bármely pontjára tervezhető specifikusan kötődő mesterséges cink-ujj fehérje, amely egy célzott gén mesterséges szabályozásához felhasználható (11-13,34-39). A kötés specifikusságához a felismerőszekvencia megfelelő hosszúsága szükséges, hogy egyedi szekvencia legyen az adott genomon. Például az *Escherichia coli* baktérium $4\text{-}5 \times 10^6$ bp hosszú genomja esetén legalább 12 bp hosszú szekvencia szükséges ($4^{12} \rightarrow 10^7$, ami $>10^6$), a 3×10^9 bp hosszú humán genomnál azonban már 18 bp ($4^{18} \rightarrow 10^{10} > 10^9$). A megfelelő tervezés ellenére, a valóságban mégsem annyira specifikus a kötés, mint az várható az előzetes eredményekből. A transzkripció faktoroknak nem kizárólagos a specifitásuk, mint a restrikciós endonukleázoknak, különböző szekvenciákhoz más-más affinitással kötődhetnek. Habár potenciális kötőhelyek jósolhatók az aminosav sorrend alapján, a specifikus kötőszekvencia nem következtethető ki egyértelműen. Nagy áteresztőképességű technikákkal, mint a PBM (Protein Binding Microarrays) és a SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) a transzkripció faktor specifitása már átfogóan vizsgálható. A PBM technikával egyszerre nagyszámú szekvencia próbához adják hozzá a tisztított fehérjét, majd a nem kötődött fehérjéket lemossák, így azonosíthatók a specifikus kötőhelyek (40). A SELEX (41) segítségével a DNS-kötő fehérje legnagyobb affinitású kötőhelyei azonosíthatók egy DNS oligonukleotid könyvtárból több ciklusos, progresszív szelekcióval (42,43).

Habár az *in vitro* technikák nélkülözhetetlenek a DNS-fehérje kölcsönhatások biofizikai és kvantitatív jellemzéséhez, azonban nehézséget okoz az információt a valódi, *in vivo* funkcióra

átvezetni (30). A specifikus kötés a kromatinszerkezettől, az epigenetikai állapottól, valamint egyéb tényezőktől, mint a kofaktorok kötődésétől is függhet (20).

A „DNase I footprint” technika a „lábnyom” technikák legelterjedtebb változata, melyet Galas és Schmitz fejlesztett ki a Lac represszor és az operátor szekvencia közötti kötés elemzéséhez (44). Az alapvetően *in vitro* technika *in vivo* változata is ismert (45). Szekvenálással kiegészítve (DNase-seq) genomszintű tanulmányok is végezhetők (46).

A genomi célhely vizsgálatához széleskörűen alkalmazott *in vivo* technika a kromatin immunprecipitáció, ahol a DNS-fehérje komplexet keresztkötik a kromatinon, majd a mintát szegmentálják és a vizsgált fehérjére specifikus antitest segítségével elkülönítik a fehérjét és az ahhoz kötött DNS-t. Szekvenálással (ChIP-seq) vagy 'microarray' analízissel (ChIP-Chip) társítva nagy áteresztőképességű mérések végezhetők (47-50). A ChIP alapú technikákkal feltárható, hogy a vizsgált transzkripciós faktor mely gének szabályozásában vesz részt, habár a reguláció helyének lokalizációja általában csak 100 vagy annál több bp pontosságú. A módszer további hátránya, hogy a keresztkötés adhat álpozitív eredményeket is.

A DNS metiláción alapuló technika, a DamID módszer (51) kikerüli a keresztkötés és ellenanyag alkalmazását. A módszer során az *Escherichia coli* DNS Adenin Metiltranszferázzal fúzióba hozzák a vizsgálni kívánt fehérjét, így a tesztfehérje irányítódoméknként működve, a metiltranszferázt a preferált kötőhelyhez irányítja, ahol a metiltranszferáz kifejti aktivitását. A metilációs állapot vizsgálatával lokalizálható a fehérje preferált kötőhelye. A módszer hátránya azonban, hogy a fúzióval időigényessé válik a vizsgált fehérje termeltetése.

Az ATAC-seq és a 'single-molecule footprinting' (SMF) további kiváló módszerek, melyekkel átfogóan, ellenanyag vagy keresztkötő ágens nélkül tanulmányozható a génregulációs hálózat. Az ATAC-seq módszer során a Tn5 transzpozáz segítségével azonosíthatók a kromatinszerkezet vagy a DNS-kötő fehérjék által védett szekvenciariészek (52). Az SMF technikával a fehérje DNS-kötőhelyei a citozin-metiltranszferáztól védett helyekként azonosíthatóak. Ellenben más módszerekkel, ahol a specifikus kötést több millió sejt méréséből kapott átlag alapján jellemzik, az SMF módszerrel a transzkripciós faktorok felismerőhelyeinek azonosítása molekuláris szinten történik, köszönhetően a metilációs állapot molekulánkénti feltérképezésének (53).

A DNS-fehérje kölcsönhatások *in vivo* vizsgálatához költséghatékony megoldást kínálnak a „hibrid” módszerek, ahol tipikusan baktériumban vagy élesztőben vizsgálják a specifikus DNS-fehérje kötést. A hibrid módszerek előnye, hogy nincs szükség a tesztelt fehérje tisztítására, és

a DNS-fehérje kölcsönhatások a sejten belül vizsgálhatóak. A DNS-fehérje kölcsönhatások *in vivo* vizsgálatához egyik legáltalánosabban alkalmazott módszer a bakteriális egy-hibrid (B1H) rendszer (54), amely a korábbról ismert bakteriális két-hibrid módszer (55) továbbfejlesztett változata. A DNS-fehérje kötés kimutatásához a tesztelt fehérjét fúzióba hozzák az RNS-polimeráz α vagy ω alegységével. A tesztelni kívánt DNS szekvenciát egy riporter gén (*lacZ/HIS3/gfp*) promoterétől upstream építik be. A riporter gén transzkripciója aktiválódik, amennyiben a tesztfehérje kötődik az inszertszekvenciához, így kimutatható a specifikus kötés. A polimeráz alegységgel fuzionált DNS-kötő fehérje génje plazmidon kódolt. Külön, egy kompatibilis plazmid kódolja a riporter gént, az inszertált tesztszekvenciával. A DNS tesztszekvencia és a tesztelt fehérje génje is könnyen kicserélhető a plazmidon. A random szekvencia beépítésével nagyszámú DNS kötőszekvencia tesztelhető egy időben, a potenciális DNS felismerőhelyet tartalmazó könyvtár egy szelekciós körrel létrehozható (1,20). A módszer alkalmas egy adott kötőszekvenciához legnagyobb affinitással rendelkező fehérje szelekciójához is. Az α alegység nélkülözhetetlen, ezért a fúziós fehérje erős túltermelése szükséges, hogy beépüljön a holoenzimbe és aktiválja a riportergént. Az ω alegység nem esszenciális, az alegységet kódoló *rpoZ* gén deletálásával már kisebb affinitású DNS-fehérje kölcsönhatások is detektálhatóak (56). Habár a B1H módszer elvben hasonló, mint az élesztő egy-hibrid módszer, a baktériumra jellemző nagy transzformációs hatékonyság miatt több mint 100-szor nagyobb komplexitás vizsgálható, mint élesztőben. Hátránya, hogy nem minden eukarióta fehérje vizsgálható, mivel toxikus hatással lehet a fehérje túltermelése a baktérium sejtre, valamint a fehérje nem esik át poszt-transzlációs módosításon. Továbbá a DNS-fehérje kölcsönhatás kimutatásához fúziós partner alkalmazása szükséges, amely körülményessé teszi a módszert, valamint a fúziós partner gyengítheti a tesztelendő fehérje termelődését és zavarhatja a működését.

A nagy áteresztőképességű *in vitro* és *in vivo* módszerek számos TF kötőspecifitását tárták fel. A felhalmazott adatokat olyan motívum adatbázisokban gyűjtötték össze, mint TRANSFAC (57), CIS-BP (58), UniPROBE (59), HOCOMOCO (60) és JASPAR (61). Az egy DNS-kötő családba tartozó fehérjék általában nagyon hasonló kötődési mechanizmust alkalmaznak, így közel azonos DNS szekvenciát ismernek fel (58). Ezen DNS szekvenciák alapján kötő specifikus modellek építhetők (59,62-64). Egy TF számos DNS kötőhelyet képes felismerni, változatos kötődési affinitással. A transzkripciós faktorok kötőspecifitását ennek okán gyakran kötőhely motívumokkal jellemzik, amely a preferált DNS kötőhelyek gyűjteménye. A kötőhely

motívumokat felhasználva prediktálható a TF valós kötőszekvenciája. A specifikus kötőhely meghatározásához többféle modell használható. A legáltalánosabban használt modell a „helysúlyozott mátrix” (PWM=Position Weight Matrix), amely az adott nukleotid előfordulási gyakoriságát adja meg a kötőhely minden pozíciójában. A PWM grafikusán ábrázolható szekvencia logóként (65,66).

III. Előzmények és célkitűzés

A munkám kezdetén egy olyan témához csatlakoztam, ahol a cél egy egyszerű irányított DNS-metilációs módszer kialakítása volt, valamint a metiláció specifikusságának javítása. Az irányított DNS-metiláció módszer alapelve, hogy egy CG-specifikus DNS metiltranszferázt egy DNS-kötő fehérjéhez kapcsoljuk, amely irányítodoménként működve a célzott CG hely közelébe köt és ezáltal segíti a kiválasztott CG hely preferenciális metilálódását (67). Irányító modulként mesterségesen létrehozott cink-ujjakat és a CRISPR-Cas családhoz tartozó, nukleáz aktivitással nem rendelkező, dCas9 fehérjét használtuk.

A munkánk során alkalmazott két mesterséges cink-ujjat a 6-ZFP-A és 6-ZFP-B fehérjéket rákterápiás célból hozták létre az EGP-2 fehérje génregulációjához. A fehérjék az EGP-2 promoterben található szekvenciát célozzák, segítségükkel sikeresen csendesítették a célzott gén kifejeződését (11,12). A két cink-ujj, a 6-ZFP-A és a 6-ZFP-B kötődését a célzott génszakaszhoz igazolták, azonban saját körülményeink között, *in vivo*, *Escherichia coliban* is fontos volt ellenőriznünk a specifikus kötést. A DNS-fehérje kölcsönhatás *in vivo* ellenőrzéséhez a legkézenfekvőbb módszernek a B1H módszer tűnt. Azonban a technika túl munka- és időigényesnek ígérkezett egy olyan egyszerű kérdés megválaszolásához, mint hogy egy bizonyos DNS-kötő fehérje kötődik-e *in vivo* az ismert felismerőszekvenciájához. Elhatároztuk, hogy kifejlesztünk egy egyszerű módszert, amellyel *in vivo*, *Escherichia coliban* gyorsan kimutatható a DNS és fehérje közötti specifikus kötés a fehérje módosítása, fúzióba hozatala és tisztítása nélkül. Ez az új célkitűzés a doktori témámmá vált.

IV. Anyagok és Módszerek

IV.1 Baktériumtörzsek és tenyésztési körülmények, táptalajok

IV.1.1. Baktériumtörzsek

A munkám során a klónozási munkákhoz eleinte *Escherichia coli* DH10B (F⁻ *endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 80dlacZΔM15 araD139 Δ(ara leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) relA1 spoT1 λ-*) (68) törzset használtam, majd áttértem az MG1655 törzs csökkentett genomú MDS42 törzs (69) módosított változatainak, az MDS42*recA* és az MDS66 törzsek alkalmazásához. Az I-Block vizsgálat alapvetően az ER1821 *ΔlacI* törzsben történik. Ezt a törzset az *E.coli* ER1821 (F⁻ *glnV44 e14-(McrA-) rfbD1? relA1? endA1 spoT1?thi-1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10*) (70) törzsből, a kromoszómális *lacI* gén deléciójával hoztuk létre az úgynevezett „öngyilkos plazmid” technikával (71). Később, az ER1821 *ΔlacI* törzs genomjába építettük be a *tac* promoterral fúzionált kloramfenikol-acetiltranszferáz (CAT) gént. Ezt az ER1821 *ΔlacI* CAT_{HOB0}-nak elnevezett törzset alkalmaztuk a továbbfejlesztett I-Block módszerhez.

IV.1.2. Tenyésztési körülmények, táptalajok

A baktériumkultúrákat LB folyadéktáptalajban (72), kémcsőben vagy mikrotiter lemezben rázatva növesztettük 30°C-on az I-Block méréshez, valamint 37°C-on a plazmidizoláláshoz. Az antibiotikumokat a következő koncentrációban alkalmaztuk: ampicillin (Ap) 100 µg/ml, kanamicin (Km) 50 µg/ml, kloramfenikol (Cm) 25 µg/ml, tetraciklin (Tet) 12,5 µg/ml. A LacI⁺ klónok szelekciójához csökkentett ampicillin koncentrációkat is alkalmaztunk (75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml). A β-galaktozidáz termelő kolóniáknál a lemeztesztet 40 µg/ml X-gal-t (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid) tartalmazó LB agar lemezen végeztük. Az arabinózt induktorként 0,1% koncentrációban, a glükózt a katabolit represszióhoz 0,2% koncentrációban alkalmaztuk.

IV.2. Plazmidok

A felhasznált plazmidok listája a függelék 1. táblázatban látható.

A plazmid DNS-t oszlopos tisztítással izoláltuk, a forgalmazók utasításait követve ('Thermo Scientific: GeneJet Plasmid Miniprep Kit'; 'Macherey-Nagel: NucleoSpin Plasmid mini plasmid isolation kit', 'NucleoBond Xtra midi plasmid isolation kit'). Amikor nem volt szükség nagyobb tisztaságú mintákra, alkalikus feltárással izoláltuk a plazmid DNS-t (70), bizonyos esetekben a fenol-kloroform extrakció lépés kihagyásával.

IV.3. Oligonukleotidok

Az oligonukleotidokat az ELKH SzBK Nukleinsav Szintézis Laborból rendeltük. Az oligonukleotidok listáját a függelékek 2. táblázata tartalmazza.

IV.4. Kompetens sejtek készítése és transzformációja

IV.4.1. Transzformálás kémiai kompetens sejtrel

A DNS bejuttatáshoz az *Escherichia coli* baktériumsejtek kompetenssé tételét és transzformálását a Lederberg és Cohen által javasolt módszer (73) alapján végeztük, kisebb változtatásokkal. 20 ml LB tápoldatban egész éjszakán át növesztett folyadékkultúrákat másnap átoltottunk 100x higítással új 20 ml-es LB tápfolyadékba, majd növesztettük $OD_{600}=0,6-0,8$ sejtsűrűségig. A sejteket leüleptítettük 4°C-on 4000 rpm-en 8 percig, majd fél térfogat (10 ml) 0,1M $MgCl_2$ oldattal mostuk. Ezt követően újra centrifugáltuk 4°C-on 4000 rpm-en, 10 percig. Végül a sejteket $1/10$ -ed térfogat (2 ml) 0,1M $CaCl_2$ -ben vettük fel, és egy órán át jégen hagytuk. A transzformáláshoz a kémiaiilag kompetenssé tett sejteket a plazmid DNS-sel fél órán át jégen hagytuk, majd hősokknak tettük ki 42°C-on 90 másodpercig. Egy ml LB tápoldatot adtunk a hősokkon átesett sejtekhez és egy órán át regeneráltattuk 37°C-on, majd 150 µl kultúrát szélesztettünk ki a megfelelő antibiotikumot tartalmazó agarlemezre.

IV.4.2. Elektroporáció

Az elektrokompetens sejt készítéséhez az éjszakán át LB-ben növesztett sűrű starter kultúrából a sejteket 100-szoros higítással átoltottuk friss, 100 ml LB tápoldatba és növesztettük, míg el nem érték az $OD_{600}=0,6$ értéket. A sejteket leüleptítettük 4°C-on 4000 rpm-en 10 perc alatt, majd egész térfogat (100 ml), hideg, steril vízben vettük fel a sejteket és újra centrifugáltuk 4°C-on 4000 rpm-en, 10 percig. A második mosás fél térfogat (50 ml) hideg, steril vízzel történt, majd újra leüleptítettük a sejteket. Végül 20%-os glicerinnel mostuk át és újra lecentrifugáltuk. A sejteket 200 µl 20%-os glicerinnel oldatban vettük fel és 40 µl-ként szélesztettük steril csövekbe. Az így előkészített sejtekhez adtuk a plazmid DNS-t, majd rövid ideig jégen hagytuk.

Az elektroporáció ('MicroPulser' elektroporátor, BioRad) után a sejtekhez 1 ml LB-t adtunk, majd 1 óra rázatást követően, 37°C-on a megfelelő antibiotikum tartalmú agarlemezre szélesztettük.

IV.5. Pontmutációk létrehozása

A pontmutációkat a QuikChange módszerrel (Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA) és más inverz-PCR módszerrel (74) hoztuk létre. Az inverz-PCR során a primerpár, a hagyományos PCR-rel ellentétben, fordított irányban helyezkedik el a cirkuláris DNS templáton. A primereket háromféle elrendezésben alkalmazzák általában: nem-átfedő, részben átfedő és teljesen átfedő. Mi a két szélső esetet alkalmaztuk. A nem átfedő primerpárnál a beépíteni kívánt szekvenciárészt az egyik primer oligonukleotid 5' vége tartalmazza. A QuikChange módszernél a primerek teljesen átfednek, ezért a reakció végén egyszálú nick-ek keletkeznek, így nincs szükség a termék foszforilálására és ligálására sem a transzformálás előtt.

IV.5.1. QuikChange:

A reakcióelegy, amely teljes térfogata 50 μ l volt, a komponenseket a következő koncentrációban tartalmazta: primerek 0,4 μ M, dNTP 0,08 mM, GC Phusion puffer 1x, Phusion DNS polimeráz 0,04 U/ μ l. A PCR elegyhez 200 ng DNS templátot adtunk. A PCR reakció körülményei a következők voltak: 98°C-on 5 perc elődenaturálás; 18 ciklus: 98°C 30", adott hőmérsékleten 30", 72°C adott ideig; utópolimerizáció 72°C-on 8 percig. A reakció után a PCR terméket DpnI enzimmel emésztettük, a Dam-metilált szülői szál eliminálásához. A DpnI emésztésen átesett DNS mintákat, a restrikciós enzim hőinaktiválását követően, bejuttattuk *E. coli DH10B* törzsbe vagy az *MDS66/MDS42recA* törzsbe.

IV.5.2. Inverz-PCR

A PCR elegy 20 μ l végtérfogatban a HF Phusion polimeráz puffert 1x, a primereket 0,25 μ M, a dNTP mixet 0,2 mM, a Phusion DNS polimerázt 0,05 U/ μ l koncentrációban tartalmazta. A reakcióelegyhez 20-50 ng DNS templátot adtunk. A reakciót 2 perces denaturációval kezdtük 98°C-on, melyet 25, a következő lépésekből álló ciklus követett: 98°C 30", adott hőmérsékleten 30", majd 72°C megfelelő időn át. Végül 72°C-on, 10 perces utópolimerizációval zárult a PCR. A PCR termékhez közvetlen hozzáadtuk a DpnI enzimet, a Dam-metilált templát DNS eliminálásához. Az emésztés után a DpnI enzimet 80°C-on 20 percen át végzett hőkezeléssel inaktiváltuk. A DpnI enzimmel kezelt PCR terméket egy lépésben foszforiláltuk és ligáltuk 20 μ l végtérfogatban. Az elegy összetétele: 0,05 U/ μ l T4 ligáz, 0,5 U/ μ l T4 polinukleotid-kináz, 1X T4 ligáz puffer. Az elegyhez 4 μ l PCR terméket adtunk. A 'foszfoligátumot' az *E. coli DH10B* vagy az *ER1821 Δ lacI* törzsbe vagy az *MDS66/MDS42recA* törzsbe vittük be.

IV.6. Genomi integrációk, mutációk és deléciók

A genomon végzett módosításokat a Fehér Tamás és munkatársai által közölt (71), a homológ rekombináción alapuló, „öngyilkos plazmid” technikával hajtottuk végre.

IV.7. β -galaktozidáz aktivitás mérése

A β -galaktozidáz aktivitás mérését az eredeti Miller protokoll (75) egyszerűsített változatával végeztük, a [https://openwetware.org/wiki/Beta-Galactosidase_Assay_\(A_better_Miller\)](https://openwetware.org/wiki/Beta-Galactosidase_Assay_(A_better_Miller)) oldalon látható leírás alapján. A méréseknél 3-10 biológiai ismétléssel dolgoztunk.

A kultúrákat a megfelelő antibiotikum és szükség esetén induktor mellett éjszakán át növesztettük 30°C-on. Másnap a sejtsűrűséget meghatároztuk a 600 nm fényhullámhosszon mért optikai denzitás alapján, majd feltártuk a sejteket a permeabilizációs oldattal (100 mM Na₂HPO₄, 20 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0.8 mg/ml CTAB, 0.4 mg/ml nátrium deoxikolát és 5.4 μ l/ml β -merkaptotanol). Először 80 μ l permeabilizációs oldatot mértünk ki steril eppendorf csövekbe, majd minden mintából 20 μ l sejtkultúrát adtunk hozzá. Minden biológiai ismétlésnél három technikai ismétlést végeztünk. A csöveket 20 percre 30°C-ra helyeztük. Az előmelegített, feltárt sejtekhez 600 μ l szubsztrát oldatot (1 mg/ml ONPG, 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄ és 2.7 μ l/ml β -merkaptotanol) adva indítottuk a reakciót és egy órán át inkubáltuk 30°C-on. A reakcióidő leteltével, 700 μ l STOP pufferrel (1M Na₂CO₃) leállítottuk a folyamatot. 13000 rpm-en 5 percig centrifugáltuk a mintákat, majd meghatároztuk a tiszta felülúszó 420 nm-en mutatott optikai denzitását. Mivel a centrifugálási lépéssel megszabadultunk a fényszórást okozó részecskéktől, egy egyszerűsített egyenlettel számítottuk ki a Miller egységekben kifejezett β -galaktozidáz aktivitást:

$$1000 \times A_{420} / A_{600} \times \text{térfogat (0,02 ml)} \times \text{reakcióidő (60 min)}.$$

A módszert adaptáltuk mikrotiter lemezes mérésekhez is, Synergy™ HT vagy Synergy™ 2 Multi-Mode Microplate Readers (BioTek) multidetekciós olvasók bevonásával. A sejtkultúrákat mikrotiter lemezben éjszakán át 30°C-on rázattuk, majd megmértük a sejtsűrűséget 600 nm-en mért optikai denzitása alapján. 5 μ l sejtkultúrát tártunk fel 45 μ l permeabilizációs oldattal (100 mM Na₂HPO₄, 20 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0.8 mg/ml CTAB, 0.4 mg/ml nátrium deoxikolát és 5.4 μ l/ml β -merkaptotanol). 150 μ l (korábbi méréseknél 300 μ l) szubsztrát oldatot adtunk a feltárt sejtekhez, majd egy órán át 10 percenként mértük az optikai denzitást 420 nm-en.

A sejttörmeléket nem ülepítettük ki a reakcióelegyből, ezért a β -galaktozidáz aktivitást az eredeti Miller egységgel fejeztük ki, vagy egyszerűen, 'Relatív Egységet' adtunk meg. A Relatív egység alatt a sejtsűrűséggel normalizált, 420 nm-en mért optikai denzitást értjük (OD_{420}/OD_{600}).

IV.8. Promoter aktivitás mérés

A promoter aktivitást Synergy™ 2 Multi-Mode Microplate Readers (BioTek) multidetekciós olvasóban mértük. A vizsgált promoterrel fúzióba hozott *gfp* gént hordozó plazmidokkal transzforámltuk az *E. coli* ER1821 $\Delta lacI$ baktériumtörzset, majd M9 tápoldatban (72) növesztettük 0,2% kazamínosavval és 0,4% glükózzal, valamint 25 μ g/ml kanamicinnel kiegészítve. A mintákat egész éjszakán át rázattuk 37°C-on 96 lyukú mikrotiter lemezben, közepes sebességgel. A következő napon a folyadékkultúrát 1:100 arányban meghígítottuk friss, kiegészített M9 tápoldattal és új, steril 96 lyukú mikrotiter lemezbe mértük át. A fluoreszcencia és az abszorbancia értékeket 22 órán át mértük 5 perces időközönként 500/27 nm gerjesztési filterrel és 528/20 nm emissziós filterrel. A sejtsűrűséget is rögzítettük 600 nm-en mért abszorbancia alapján. 8 biológiai ismétléssel mértünk. A *gfp* génjét nem kódoló plazmidokat hordozó ER1821 $\Delta lacI$ kultúrák szolgáltak negatív kontrollként. A GFP nyers adatait az OD_{600} -on mért értékkel elosztva normalizáltuk. Az OD és GFP görbékét időben eltoltuk, hogy ugyanabban az időpontban ériék el a maximális OD érték 20%-át.

IV.9. Lemezteszt

Szilárd táptalajon a β -galaktozidáz aktivitást X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid) kromogén szubsztrát segítségével, a hagyományos kék-fehér szelekcióval detektáltuk. A megbízhatóbb vizuális értékelés érdekében néhány esetben az LB táptalajhoz csökkentett mennyiségű élesztőkivonatot adtunk (10 g NaCl, 10 g Tripton, 2,5 g élesztőkivonat 1 liter végtérfogathoz), így az indikátor lemezek halványabb sárga háttérrel rendelkeztek. Az indukáláshoz 0,1% arabinózt adtunk a táptalajhoz. Szélesztést követően éjszakán át növesztettük a baktériumokat 37°C-on. Reggelre a kék és fehér telepek már jól megkülönböztethetőek voltak.

IV.10. DNS nukleotidszekvencia meghatározása

A DNS nukleotidszekvenciákat a SeqOmics Kft.-vel, majd később a DeltaBio2000 Kft.-vel határoztattuk meg. A plazmidkönyvtárak ellenőrzéséhez az Illumina szekvenálást a DeltaBio2000 Kft.-től rendeltük meg.

IV.11. Restrikciós és módosító enzimek, egyéb anyagok, eszközök

A restrikciós és a modifikációs enzimeket a Thermo Scientific és a New England Biolabs cégektől rendeltük. Az emésztett DNS minták izolálásához 'Viogene^R Gel DNS isolation kit'-jét alkalmaztuk. A PCR termékek tisztításához 'Thermo Scientific GeneJet PCR purification kit'-jét használtuk. További Thermo Scientific termékek, melyeket felhasználtunk a munka során: 10mM dNTP mix, ONPG és X-gal szubsztrátok.

A centrifugálást eppendorf csőben (2 ml-ig) VWR MICRO STAR centrifugával, 2 ml térfogat felett Thermo Scientific Heraeus 400R centrifugával végeztük.

IV.12. Statisztikai elemzés

Az eredményeket összefoglaló táblázat a függelékek 6. táblázatában található (XIII/6).

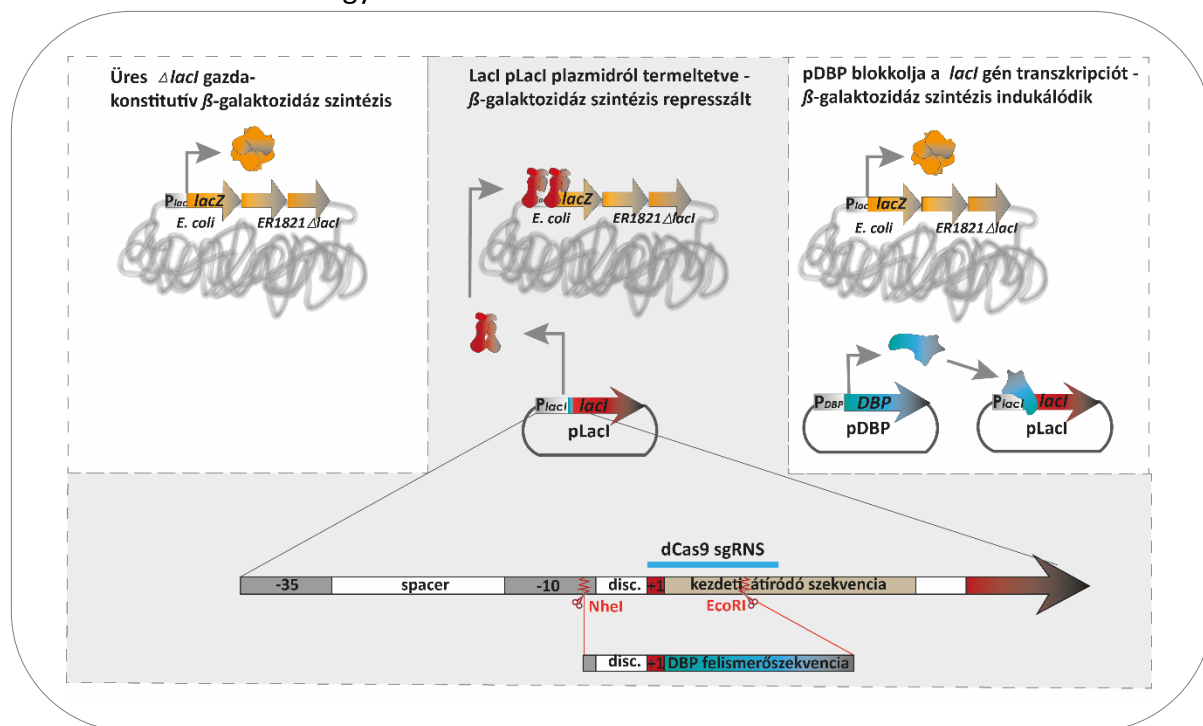
Az I-Block mérések statisztikai elemzését egytényezős varianciaanalízissel (ANOVA), Post Hoc teszttel kiegészítve (Bonferroni korrigált) végeztem excelben (függelékek 7. táblázat). A plazmidkönyvtárak bioinformatikai kiértékelését a szolgáltató, DeltaGene (DeltaBio2000 Kft) végezte. A plazmidkönyvtáron belül az egyedi szekvenciák eloszlásának jellemzéséhez Shannon-egyenletesség indexet adtam meg, ahol az index 0, ha a minta teljesen "egyenlőtlen", azaz csak egyféle szekvencia van jelen és 1, ha a teljes az egyenletesség, minden szekvencia ugyanannyiszor fordul elő.

V. Eredmények

Csoportunkban kidolgoztunk egy *Escherichia coli* baktériumban használható módszert, amely alkalmas szekvenciaspecifikus DNS-fehérje kölcsönhatások kimutatására *in vivo* (76). Az I-Block módszer előnye más hasonló célra kidolgozott módszerekkel szemben, hogy a specifikus DNS-fehérje kötődés kimutatásához nincs szükség sem a vizsgált fehérje tisztítására, sem fehérjefúzió létrehozására. Az I-Block módszer alkalmazásához elegendő egy átlagos molekuláris biológiai labor felszereltsége. Eredeti változatában a módszer egy időben egy fehérje – egy DNS szekvencia kölcsönhatását képes kimutatni (76). Dolgozatom részben arról szól, hogyan próbáltuk az I-Block módszert alkalmassá tenni több nukleotidszekvencia egyidejű vizsgálatára, adott fehérjéhez legjobban kötődő DNS szekvencia megtalálására.

V.1 Az I-Block módszer működésének elve

Az I-Block módszer az *E. coli* *lac* operon szabályozási mechanizmusát használja ki úgy, hogy amennyiben a specifikus fehérje-DNS kötődés megtörténik, az a β -galaktozidáz aktivitás mérésével detektálható legyen.



2 ábra: Az I-Block módszer működésének sematikus ábrázolása

Az ER1821 $\Delta lacI$ gazda konstitutívan termeli a β -galaktozidázt, azonban pLacI jelenlétében a *lacZ* génexpresszió visszaszorul. A tesztfehérje kötődése által blokkolja a *lacI* transzkripciót, így indukálódik a β -galaktozidáz szintézis. A kék vonal a dCas9 fehérje kötődési helyét jelöli.

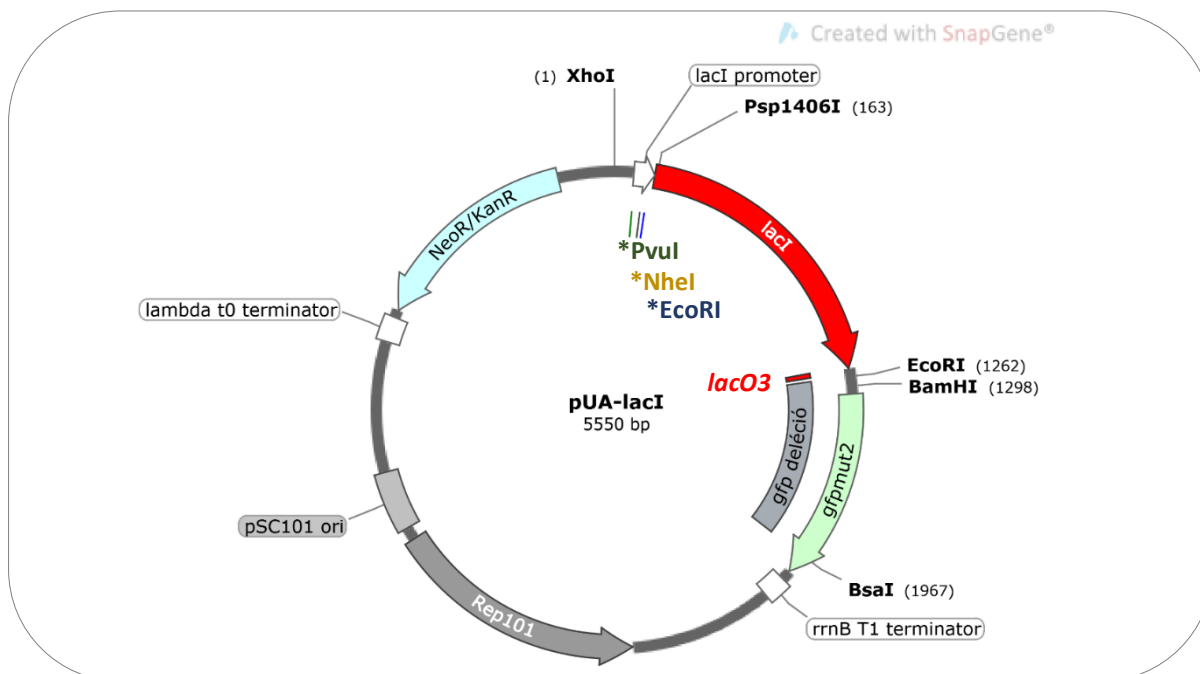
V.1.1 Az ER1821 $\Delta lacI$ törzs

A β -galaktozidázt folytonosan termelő baktériumtörzset a genomi *lacI* gén deletálásával hoztuk létre. A delécio a *lacI* gén végén található CAP kötőhelyet és a *lacO3* operátor szekvenciát is érintette, így az ER1821 $\Delta lacI$ törzsben nem érvényesül a katabolit represszió, valamint az eredetileg 3 *lac* operátor helyett csak kettő van.

V.1.2. pLacI plazmidok

A Lac represszort expresszáló pUA-lacI plazmid kialakítása során azt tapasztaltuk, hogy alacsony Lac represszor szint elegendő a β -galaktozidáz transzkripció blokkolásához, ami megkönnyíti a vizsgált, specifikus DNS-fehérje kölcsönhatás kimutatását. Magasabb represszor koncentráció - amely elérhető az intenzív transzkripciót biztosító *lacI^Q* promoter vagy magasabb kópiaszámú plazmid alkalmazásával - megnehezíti a tesztfehérje kötődésének kimutatását, mert annak kötődése ellenére is elegendő Lac represszor termelődik a β -galaktozidáz transzkripció gátlásához.

Az alacsony kópiaszámú, pUA66 vektorból létrehoztuk a pUA-lacI plazmidot (76), amelyben a LacI represszor génjének transzkripciója saját gyenge, konstitutív promoteréről történik, alacsony LacI szintet biztosítva. (3. ábra).

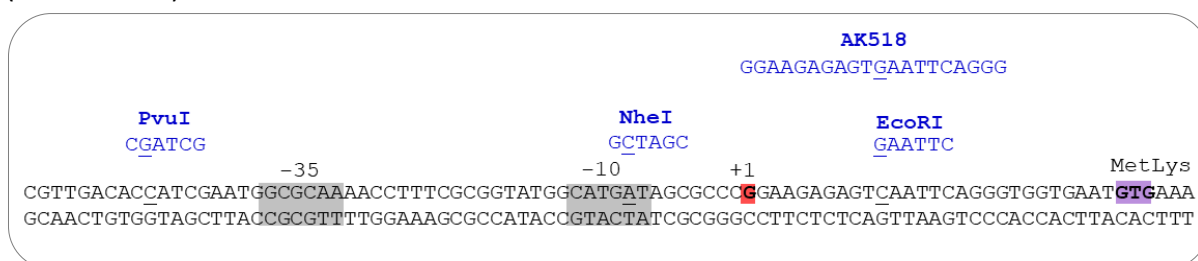


3. ábra: A pUA-lacI plazmid térképe

A különböző variánsok kialakításához szükséges restrikciós enzimek felismerőhelyeit jelöltem. A *lacI* promoterén belül létrehozott klónozóhelyek zölddel, sárgával és kézzel kiemelt. A *lacI* gén végén található *lacO3* operátor szekvencia pirossal szerepel.

A pUA66 plazmidvektort különböző promoterek teszteléséhez alkalmazzák, így a zöld fluoreszcens fehérje (*gfp*) promoter nélküli génjét hordozza (77). A *gfp* gént EcoRI-BsaI kettős emésztéssel elimináltuk a pUA-lacI plazmidból úgy, hogy az *rrnB1* T1 terminátor érintetlen maradjon. A keletkezett 5' túlnyúló végeket Klenow polimerázzal feltöltöttük, majd ligáltuk. Az új vektort pdUA-lacI plazmidnak neveztük el. A továbbiakban a rövidség kedvéért a pdUA-lacI név helyett valamennyi erre a plazmidra épülő variáns nevében a pLacI előtagot fogom használni.

Az I-Block mérés során, a tesztelni kívánt fehérje kötődése a Lac represszor kifejeződésének gátlása által mutatható ki. A tesztszekvenciát hordozó oligonukleotid-duplex beépítése egyedi restriktációs klónozóhelyeken keresztül történt. Az egyedi restriktációs helyeket a promoter régió 3 kritikus pontján hoztuk létre. Az NheI hely részben átfed a -10-es motívummal, a PvuI hely a -35-ös elemtől upstream, az EcoRI hely a transzkripció kezdőhelytől downstream található (3. és 4. ábra).



4. ábra: A *lacI* promoter és közvetlen környezetének nukleotidszekvenciája

A -10 és -35 hexamerek szürkével, a transzkripció kezdőhely pirossal van kiemelve.

A létrehozott klónozóhelyek és az *sgRNS*-nek megfelelő szekvencia (*dCas9* kötőhelye) kékkel jelölt.

Annak érdekében, hogy megtaláljuk, a promoter mely pontja alkalmas a célhely inszerciójához úgy, hogy az idegen szekvencia ne gátolja lényegesen a *lacI* transzkripciót, különböző plazmidváltozatokat készítettünk. A plazmidok nevében az alsó indexben szereplő P, N és E betűk a PvuI, NheI és EcoRI helyeket tartalmazó promotervariánsokat jelölik. A promotervariánsok egy (P/N/E), két (PN/PE/NE) vagy három (PNE) pontmutációt (és az ezáltal létrejött klónozó helyet) hordoztak. Így például, a pLacI_N NheI helyet, a pLacI_P PvuI helyet, a pLacI_{PN} PvuI és NheI klónozóhelyet, a pLacI_{PNE} mindhárom klónozóhelyet (PNE) hordoz. Az egyes klónozóhelyekbe beépített DNS szekvenciát, mely a tesztelt fehérje potenciális felismerőhelye, zárójelbe írtuk a plazmidnév végén. Például a pLacI_N(N-6ZB) plazmid az NheI helybe klónozott 6ZB cink-ujj fehérje felismerőszekvenciát hordozza. A PvuI és NheI restriktációs felismerőhelyek korábban, Kunkel mutagenézissel lettek létrehozva (76), az EcoRI felismerőhelyet később QuikChange módszerrel készítettük el.

Az EcoRI helyet hordozó AK510-511 oligonukleotidpár segítségével az alábbi konstrukciókat alakítottuk ki: pUA-lacI_E, pUA-lacI_{NE}, pUA-lacI_{PE}, pUA-lacI_{PNE} és pUA-lacI_{NE}(N-6ZB). A pUA-lacI plazmidvektoron volt EcoRI felismerőhely (3. ábra), azonban a deléciós pLacI plazmidváltozatában már nem. A QuikChange módszerrel létrehozott pUA-lacI plazmidváltozatok promoter régiói XhoI-Psp1406I fragmentumon lettek átklónozva pLacI (pLacI=pdUA-lacI) vektorba, hogy már csak a *lacI* promoterben hordozzák az EcoRI helyet egyedi klónozóhelyként (3. és 4. ábra). Az így létrejött plazmidok elnevezése a következő: pLacI_E, pLacI_{NE}, pLacI_{PE}, pLacI_{PNE} és pLacI_{NE}(N-6ZB).

V.1.3. pDBP plazmidok

A pDBP-nek (DNA-Binding Protein) nevezett plazmid a tesztelendő DNS-kötő fehérjét kódolja. Többféle típusú DNS-kötő fehérjével is dolgoztunk, két cink-ujj fehérjével, két HTH típusú represszorral és a CRISPR-Cas rendszerhez tartozó Cas9 fehérje inaktív változatával (dCas9). Az egyes plazmidok elnevezése a vektort és a kódolt fehérjét jelöli (függelék 1. táblázat). A cink-ujjak génjeit indukálható és konstitutív promoterral is fúzionáltuk. Az indukálható rendszer kialakításához a 6ZA és 6ZB cink-ujj fehérjék (eredeti elnevezés: 6-ZFP-A és 6-ZFP-B (11,12) génjeit pBAD24 vektorba klónoztuk (76). Az így kapott plazmidokban (pB6ZA és pB6ZB) a 6ZA és 6ZB fehérje expressziója arabinózzal indukálható. A pSEVA3513 vektorplazmidba beklónoztuk a 6ZA génjét EcoRI és Sall helyek közé, a 6ZB fehérje génjét pedig az EcoRI helyre. Az így létrejött pS6ZA és pS6ZB plazmidban a 6ZA és 6ZB gének az EM7 konstitutív promoterről íródnak át.

A lambda fág hőérzékeny represszor mutáns (cI857) a pORTMAGE-2 (78) plazmidból létrehozott pdOM2 expressziós plazmidról konstitutívan termeltethető. A pdOM2 a pORTMAGE-2 plazmid BstBI és BglII kettős emésztésével, majd Klenow feltöltés utáni recirkularizálásával lett létrehozva, kiejtve a két restrikciós hely közötti rekombinációs rendszer elemeit.

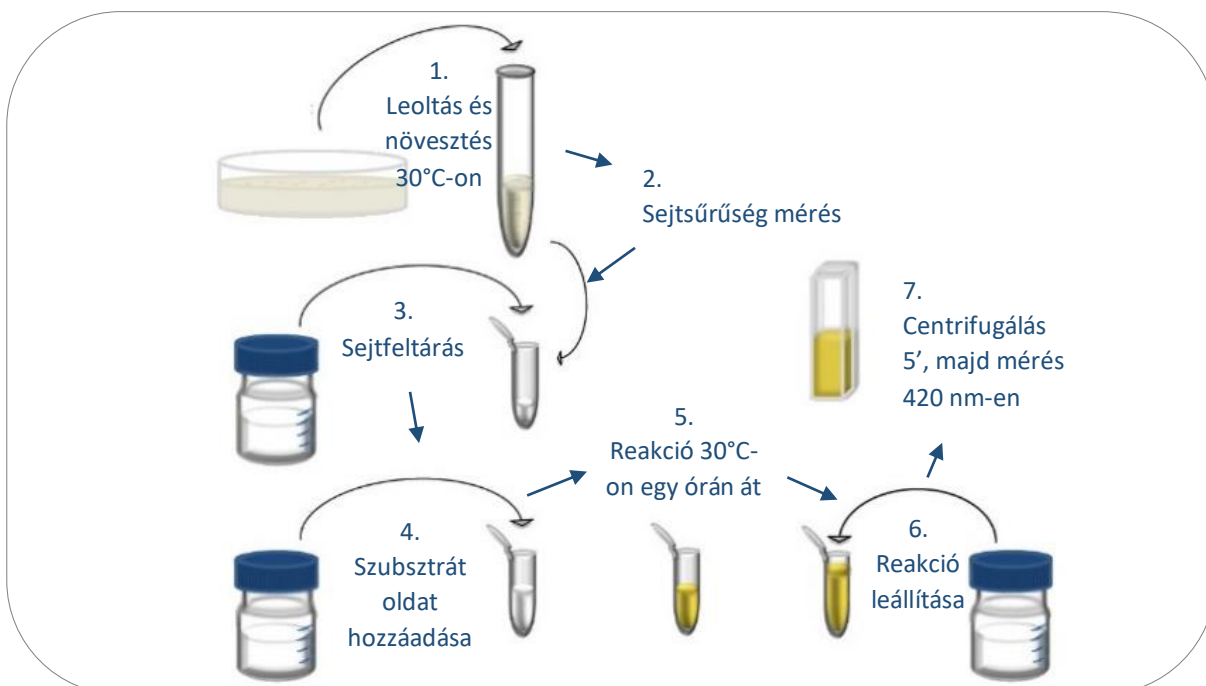
A Tet-represszor génjét *E. coli DH5αZ1* törzs DNS-éről AK895-896 oligonukleotid párral amplifikáltuk, majd a pBAD24 vektor araBAD promotere mögé, EcoRI-NcoI helyek közé klónoztuk. A rekombináns pBTetR plazmidról a Tet-represszor kifejeződése arabinózzal indukálható.

A dCas9 fehérjét kódoló pdCas9 (Addgene plaszmid #46569; <http://n2t.net/adgene:46569>; RRID:Addgene_46569) a katalitikusan inaktív D10A, H840B dupla mutáns Cas9 nukleáz kódolja és a tracrNS-t is expresszálja. A pdCas9 plazmidba, a target szekvenciát kódoló oligonukleotid duplexet Bsal helyre építettük be (73).

V.2. Az I-Block módszer kivitelezése

V.2.1. β -galaktozidáz aktivitás mérése

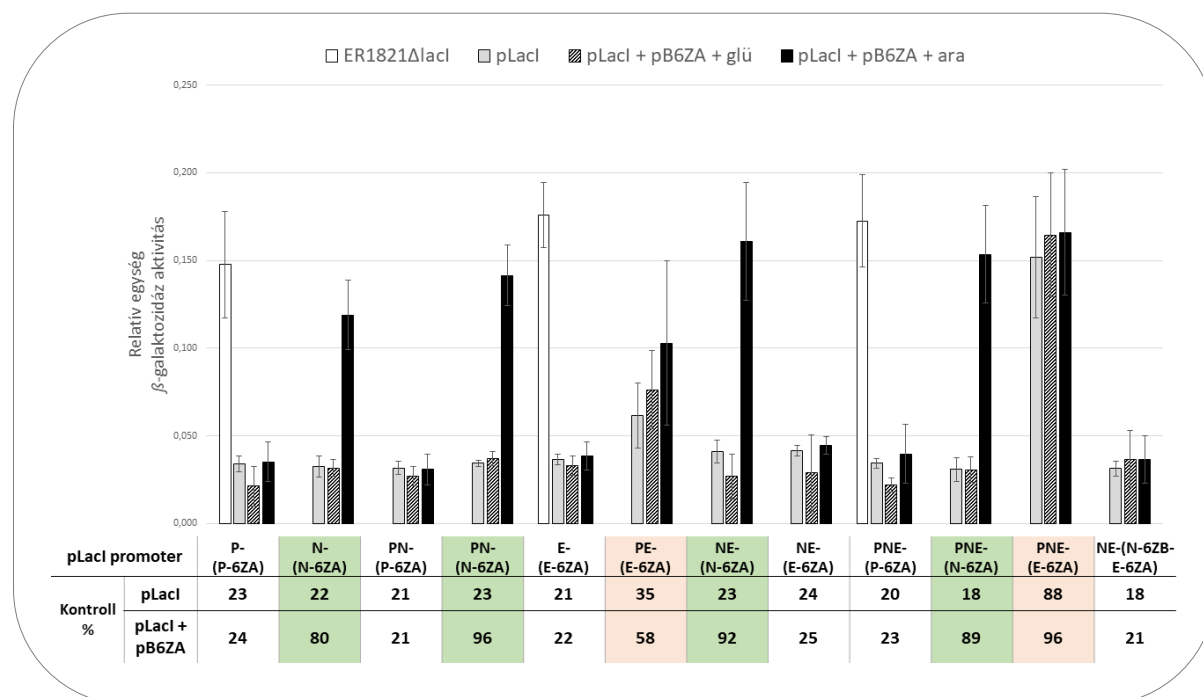
A vizsgált DNS-kötő fehérje kötődése a tesztelt szekvenciához a β -galaktozidáz aktivitás révén detektálható. A β -galaktozidáz szintet a jól ismert Miller módszer (75) egy módosított változatával (79) határoztuk meg, melyről bővebben a módszertani részben írok (IV.7). A módosított módszer előnye, hogy kisebb térfogatú mintát igényel, valamint a mérés előtt a reakciótermék elkülöníthető a zavaró szennyeződésektől egy centrifugálási lépéssel. Szubsztrátként ONPG (o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid) szintetikus kromogén laktózanalógot használtunk, melyből a β -galaktozidáz enzim hatására sárga, 420 nm fényelnyelési maximummal rendelkező o-nitrofenol termék keletkezik. A reakciótermék optikai denzitását vagy küvettában, spektrofotométerrel (5. ábra), vagy, ha nagyobb mintaszámmal dolgoztunk, mikrotiter lemez olvasóban mértük. A kötődés kvalitatív kimutatása X-gal kromogén szubsztrátot tartalmazó agar lemezen történt.



5. ábra: Az I-Block mérés folyamata

V.2.2. A felismerőszekvencia klónozóhelyének megválasztása

Annak érdekében, hogy kiválasszuk, melyik a legalkalmasabb hely a vizsgált kötőhely beépítéséhez és a *lacI* transzkripciónak a kötődő fehérje általi blokkolásához, a pLacI plazmidból egy olyan plazmid sorozatot hoztunk létre, amelyek a 6ZA és 6ZB cink-ujj fehérjék kötőhelyeit a plazmid három klónozóhelyének valamelyikében tartalmazták. A 6ZA fehérje felismerőhelye GCC-GGG-GCT-GGG-GGA-GGG, a 6ZB fehérje felismerőhelye pedig GGA-GTT-GGG-GGA-GTG-AGT. Minden esetben csak egy klónozóhelybe építettük be a cink-ujj fehérje felismerőhelyét. Ez alól kivételt képez a pLacI_{NE}-(N-6ZB, E-6ZA), amely az NheI helyben a 6ZB cink-ujj kötőhelyét, az EcoRI helyben pedig a 6ZA cink-ujj fehérje kötőhelyét hordozza. Összesen 24 plazmidváltozatot hoztunk létre (függelék 1. táblázat). Az elnevezésben a korábbiakhoz hasonlóan, alsó indexben a kialakított klónozóhellyel jellemzett promóterváltozatot (P/N/E), zárójelben pedig a klónozás helyét és a beépített szekvenciát jelöltük. Például pLacI_{NE}-(N-6ZA) variáns NheI és EcoRI klónozóhelyeket hordoz, a 6ZA cink-ujj felismerőhely beépítése az NheI klónozóhelyre történt. A β -galaktozidáz aktivitás mérését mikrotiter lemezben végeztük, mivel párhuzamosan így több mintát tudunk egyszerre vizsgálni (6. ábra).



6. ábra: *I-Block* mérés 6ZA kötőhelyet hordozó különböző *lacI* promóter variánsokkal

Üres oszlop: plazmid nélkül, szürke oszlop: pLacI plazmidvariánst hordozó sejt, csíkos oszlop: nem indukált, mindkét plazmidot hordozó sejt, fekete oszlop: indukált, mindkét plazmidot hordozó sejt. Kontroll%: a plazmid nélkül kapott Relatív Egységhez viszonyított érték. 3 biológiai ismétléssel kapott eredmény. Relatív Egység: OD_{420}/OD_{600}

Először azt vizsgáltuk, hogy a beépített szekvencia megzavarja-e a *lacI* génexpressziót, és a hatás függ-e a beépítés helyétől. Az eredmények azt mutatták, hogy a -10 konszenzus szekvenciával átfedő NheI hely és a -35 motívumtól upstream található PvuI hely alkalmas klónozóhely lehet, mivel az ide beépített szekvenciák mellett alacsony β -galaktozidáz aktivitást mértünk, ami a Lac represszor akadálytalan kifejeződésére utalt. A transzkripció kezdőhelytől downstream található EcoRI helyre inszertált szekvencia azonban két esetben (pLacI_{PE}(E-6ZA) és pLacI_{PNE}(E-6ZA)) zavart okozhatott *lacI* gén transzkripciójában, mivel magas β -galaktozidáz szintet detektáltunk (6. ábra, pirossal kiemelt, szürke oszlopok).

A következő fontos kérdés a módszer használhatóságához, hogy ha a tesztfehérje a *lacI* promoterbe épített felismerőszekvenciájához kötődik, lecsökken-e kellő mértékben a Lac represszor koncentrációja ahhoz, hogy a β -galaktozidáz termelődése indukálódjon. Ennek vizsgálatához kotranszformáltuk a sejtet a pLacI plazmidsorozat elemeivel és a megfelelő cink-ujj fehérjét expresszáló plazmidokkal. A méréshez a pBAD24 alapú, pB6ZA és pB6ZB plazmidokat használtuk, ahol a cink-ujj fehérjék génjeinek átíródása arabinózzal indukálható, glükóz hozzáadásával pedig visszaszorítható. A cink-ujj fehérjék expressziójának indukálása után megemelkedett β -galaktozidáz szintet csak az NheI helyre klónozott felismerőhelynél detektáltunk (6ZA: 6. ábra, zölddel kiemelt, fekete oszlopok; 6ZB: (76)). A PvuI és EcoRI helyekre klónozott kötőhelyekhez a fehérjék valószínűleg kötődtek, azonban az nem gátolta meg kellőképpen a LacI kifejeződését, így a kötődés ellenére sem mértünk emelkedett β -galaktozidáz szintet. A különbség oka feltehetően az, hogy egyedül az NheI hely van olyan pozícióban, hogy az oda kötődött fehérje gátolni tudja az RNS polimeráznak a promoterhez való kötődését és ezáltal a *lacI* transzkripciót.

Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a potenciális kötőhelyek beépítésére a -10-es konzervált motívummal részben átfedő NheI hely alkalmas lehet.

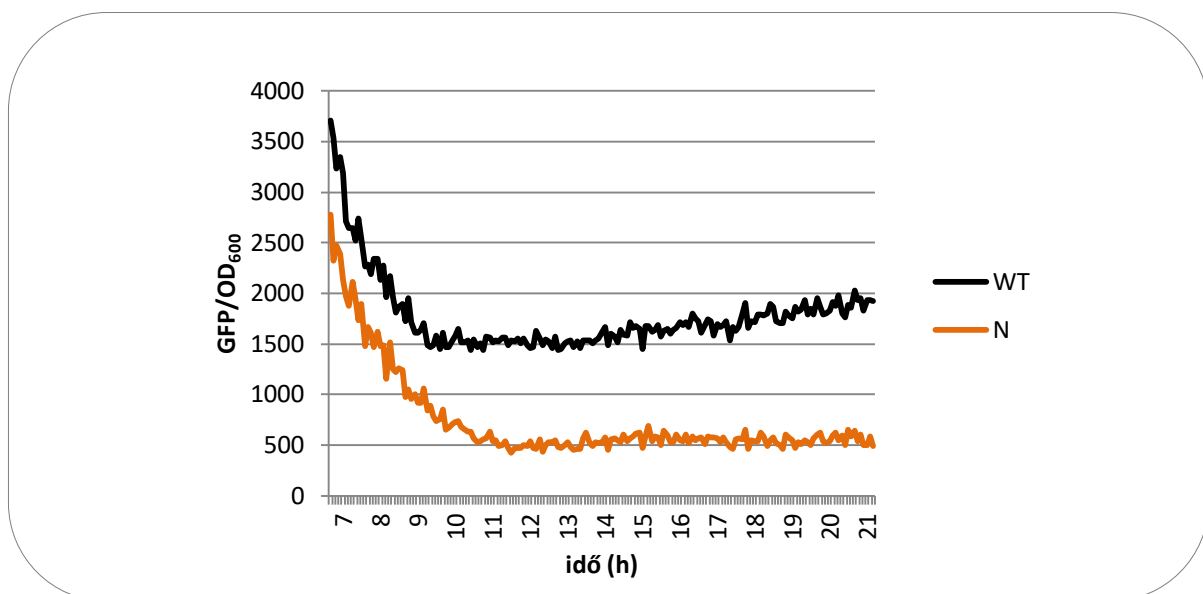
V.2.3 pLacI_N variáns promoter aktivitásának mérése

A -10-es konszenzus hexamer tisztán A és T nukleotidokból áll (5' – TATAAT – 3'), minél nagyobb a konszenzus szekvenciától való eltérés, annál jobban gyengül a promoter aktivitása, vagyis a transzkripció hatékonysága. Az RNS polimeráz kötődése után a -10-es szekvenciaelem upstream végén felnyitja a kettős szálát. A polimeráz σ alegysége a templát és nem templát szállal is kölcsönhatásba lép. A hexamer legkonzerváltabb bázisai - a transzkripció kezdőhelytől downstream számolva - a T₋₇ és az A₋₁₁, a legkevésbé konzervált része pedig a

T₋₁₀A₋₉A₋₈ (80). A nemkonzervált szakasz mutációja nem, de a hexamer AT gazdagsága befolyásolja a transzkripció hatékonyságát (81). A *lacI* promotere két bázissal tér el a konszenzus szekvenciától (C₋₁₂ATG₋₉AT) (4. ábra).

A *lacI* promoteren belül, az NheI klónozóhely kialakításához szükséges -10-es elem A-C₋₈ báziscserével a hexamer még jobban eltér a konszenzus szekvenciától, valamint csökkent az AT gazdagsága is (C₋₁₂ATG₋₉C₋₈T). Feltételeztük, hogy az NheI létrehozásához szükséges pontmutáció a promoter további gyengüléséhez vezetett, ami előnyt jelenthet a tesztelt fehérje kötődésének kimutatásánál. Amennyiben a *lacI* transzkripció alapszintje alacsony, könnyebb a β -galaktozidáz szintre is hatással lévő transzkripciógátlást elérni. Annak igazolására, hogy az NheI hely létrehozása gyengítette a *lacI* promotert, létrehoztuk a pLacI_N és a pLacI_{wt} plazmidok promoter aktivitás tesztre alkalmas változatait.

A pUA-lacI variánsokban a *gfpmut2* gén (77) elé lett klónozva a *lacI* gén vad típusú vagy NheI pontmutációt hordozó promoterrel (76). A pUA-lacI és pUA-lacI_N plazmidokból kiindulva Psp1406I-BamHI fragment kihasításával elimináltuk a *lacI* gént (3. ábra). A deléción a *lacI*, valamint a *lacI_N* promotereket fúzióba hozta a zöld fluoreszcens fehérje génjével, így a GFP fluoreszcens fehérje génjének transzkripciója a vad típusú *lacI* és az NheI pontmutációt hordozó *lacI_N* promoter irányítása alá került. A *lacI_N* promoter gyengébb promoter aktivitást mutatott, mint a vad típusú, így az eredmény igazolta a feltételezésünket (7. ábra).



7. ábra: A *lacI_N* és a vad típusú *lacI* promoter aktivitásának összehasonlítása

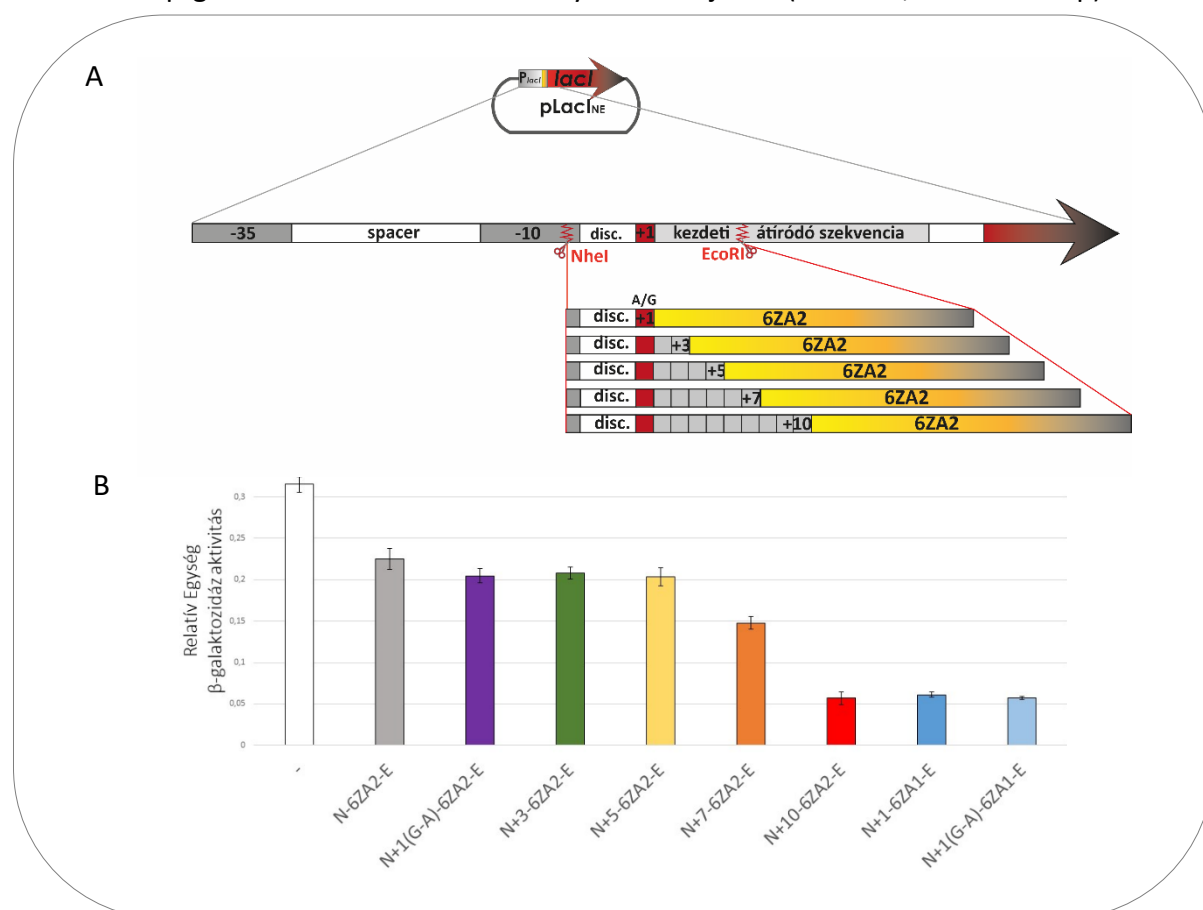
Sejtsűrűséggel normalizált, 8 biológiai ismétlésből kapott átlag.

V.2.4. A kötőhely beépülési irányának hatása

Az I-Block módszerrel kimutattuk a hat cink-ujjból felépülő 6ZA és 6ZB cink-ujj fehérjék kötődését az ismert felismerőszekvenciájukhoz (6. ábra). Ezután megvizsgáltuk, hogy kimutatható-e a specifikus kötés, ha a 6 cink-ujjból álló fehérje méretét felére, vagyis 3 cink-ujjra csökkentjük. Először a *lacI* promoterhez közel beépített felismerőszekvenciák hosszát csökkentettük le. Egy cink-ujj 3 bp szekvenciát ismer fel, így 6 cink-ujj felismerőszekvenciája 18 bp hosszú, 3 cink-ujj kötőszekvenciája pedig 9 bp hosszú. A beépített 9 bp méretű felismerőszekvencia a 3ZA fehérje esetén GGG-GGA-GGG, a 3ZB esetén GGA-GTG-AGT. A teszt során váratlan akadályba ütköztünk. A rövidített felismerőszekvenciák beépítését követően a β -galaktozidáz szint emelkedett maradt a tesztelt fehérje jelenléte nélkül is, aminek legvalószínűbb magyarázata a csökkent *lacI* génexpresszió volt. Szekvenálással ellenőriztük a pLacI_N-(N-3ZA) és a pLacI_N-(N-3ZB) plazmidok *lacI* gént kódoló szekvenciáját, de nem találtunk eltérést a beépített szekvencián kívül, így a *lacI* expresszió gátlását maga az inszertszekvencia okozhatta. Észrevettük, hogy az oligoduplex-szek nem abban az orientációban épültek be, mint korábban a 6ZA és 6ZB felismerőszekvenciák. A pLacI_N-(N-3ZA) plazmid esetében a felső szálon, az NheI helyet a GGG-GGA-GGG szekvencia helyett CCC-TCC-CCC szekvencia követte, a pLacI_N-(N-3ZB) plazmid esetében pedig GGA-GTG-AGT helyett ACT-CAC-TCC. Azt az orientációt, amelyben a guaninban gazdag szekvencia a felső szál, 1-es, míg azt, amelyben a citozinban gazdag szekvencia a felső szál, 2-es orientációnak neveztük el. A plazmidvariánsoknál a felismerőszekvencia megnevezése után számmal jelöltük a beépülés irányát, így például a pLacI_N-(N-3ZA1) plazmidnál a 3ZA targetszekvencia 1-es orientációban, a pLacI_N-(N-3ZB2) esetén 3ZB 2-es orientációban található.

A β -galaktozidáz szint visszaszorítása a pLacI plazmidról termeltetett Lac represszorral kritikus pontja az I-Block rendszernek, mivel a β -galaktozidáz aktivitás emelkedése utal a specifikus kötés fennállására. Amennyiben az inszert LacI⁻ fenotípushoz vezet, az adott DNS szekvenciával nem végezhető el az I-Block teszt. A módszer általános felhasználhatósága érdekében igyekeztünk felmérni, hogy mely szekvenciák vezetnek transzkripció gátláshoz, valamint feltárni a transzkripció gátlás kiváltó okát. Megvizsgáltuk, hogy az eredeti 18 bp hosszú kötőhely 2-es orientációban (6ZA2: CCC-TCC-CCC-AGC-CCC-GGC, 6ZB2: ACT-CAC-TCC-CCC-AAC-TCC) hogyan hat *lacI* transzkripciójára. A szimmetrikus NheI végekre hagyatkozó klónozás hátránya, hogy nem határozható meg a beépülés iránya, azt utólag kell ellenőrizni.

Ezért a 6ZA felismerőhelyet hordozó oligoduplex beépülési orientációjának irányításához a pLacI_N plazmid helyett a korábban létrehozott, NheI és EcoRI restrikciós felismerőhelyet hordozó pLacI_{NE} vektort használtuk (V.2.2.). Ez a konstrukció abban különbözik a korábban kialakított pLacI_{NE}-N(6ZA) plazmidváltozattól, hogy az NheI és EcoRI felismerőhelyek közötti szekvencia helyére kerül a 6ZA kötőszekvencia, melyre pLacI_{NE}-(N-6ZA-E) jelöléssel utalunk. Az NheI és EcoRI helyek közé beépített 6ZA2 szekvencia (N-6ZA2-E) az (N-3ZA2)-höz hasonlóan emelkedett β -galaktozidáz szintet eredményezett a sejtben (8.B ábra, szürke oszlop).



8. ábra: A lacI_{NE}(N-6ZA-E) promotervariánsok hatása a β -galaktozidáz termelésre

A: A promotervariánsok szerkezetének sematikus ábrázolása

B: A promotervariánsokkal mért β -galaktozidáz aktivitás, 1 óra reakcióidőt követően.

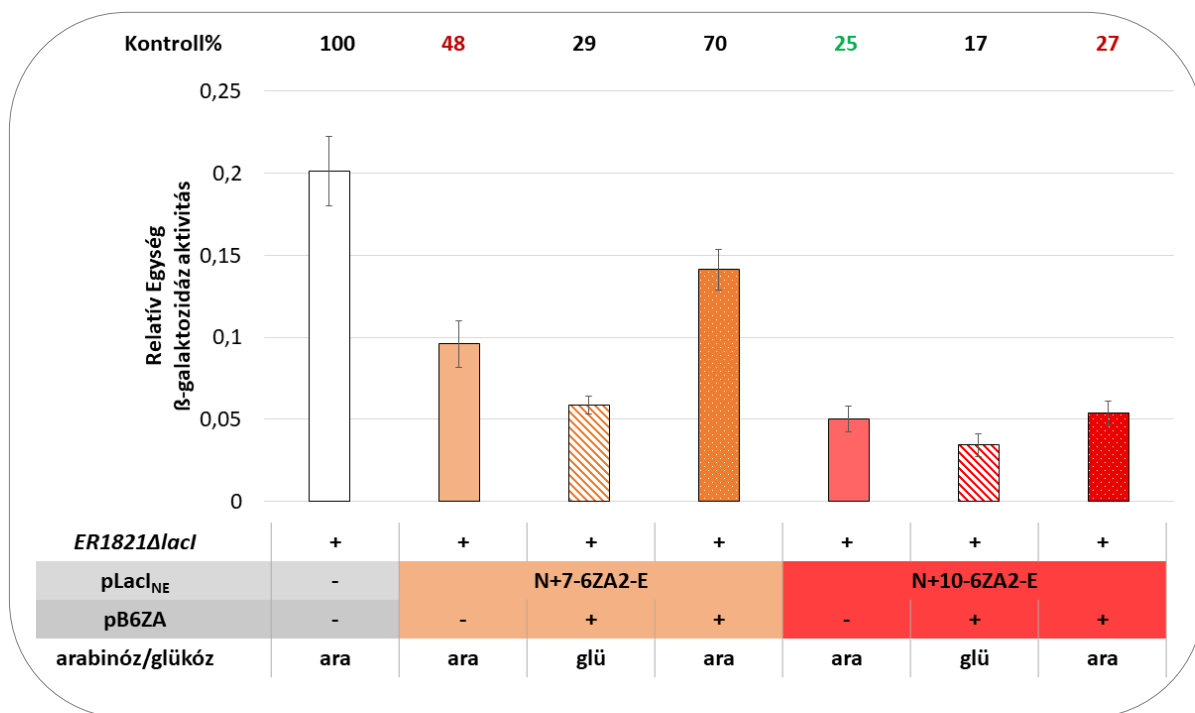
Relatív Egység: OD_{420}/OD_{600} . Minden mintát 8 biológiai ismételéssel mértünk.

A kísérlet értékelésénél azt is figyelembe kell venni, hogy a kötőhelyek NheI hely utáni, vagy az NheI – EcoRI helyek közé építésével jelentősen módosult a promotor utáni, a promotor -10-es eleme és a transzkripció kezdőhely közötti úgynevezett diszkriminátor szekvencia és a transzkripció kezdőhely (+1), valamint a +3 - +20 szekvenciarsz között található kezdeti átírózó szekvencia (ITS) egy része.

Újabb oligonukleotid párokat terveztünk (8.A ábra), melyek közös jellemzője, hogy az eredeti szekvenciát megőriztük a transzkripció kezdőpontig. Az irodalomban található adatok szerint a transzkripció a -10-es elemtől 6-7 nukleotid távolságban, általában adeninnél kezdődik (80). A *lacI* promoterben ezekben a pozíciókban G van, ezért létrehoztunk egy variánst (N+1(G-A)-6ZA2-E), amely a promotertől a transzkripció iniciációhoz optimális távolságban egy G – A cserét tartalmaz. Sajnos, a módosítással sem sikerült normalizálni a *lacI* génkifejeződést (8.B ábra, lila oszlop). Kontrollként a 6ZA1 targetszekvenciával is létrehoztunk olyan promotervariánsokat, amelyekben a 6ZA targethely szekvenciakörnyezete megegyezett az előbbiekben leírt 6ZA2 targethelyet tartalmazó plazmidokéval: (N+1-6ZA1-E) és (N(+1(G-A)-6ZA1-E)). A 6ZA1 szekvencia beépülése egyik variációban sem vezetett a *lacI* transzkripció gátlásához (8.B ábra, kék oszlopok). Ezek az eredmények azt mutatták, hogy fontos, hogy milyen szekvencia szerepel a nem-templát és templát szálon, azok nem felcserélhetők.

Következőként megvizsgáltuk, hogy a beépítés helyének eltolásával javítható-e a génkifejeződés. A pLacI_{NE}-(N-6ZA2-E) plazmidvariánsból létrehoztunk egy plazmidsorozatot, ahol az NheI klónozóhely után egyre hosszabban őriztük meg az eredeti szekvenciát a 6ZA2 kötőhely beépítése előtt. Az új plazmidvariánsok pLacI_{NE}-(N+3-6ZA2-E), pLacI_{NE}-(N+5-6ZA2-E), pLacI_{NE}-(N+7-6ZA2-E) és pLacI_{NE}-(N+10-6ZA2-E) nevében az 'N' (mint NheI hely) után található szám jelöli, hogy a transzkripció kezdőhelytől (+1) számítva hanyadik nukleotidig őriztük meg az eredeti szekvenciát (8.A ábra). A beépítés helyének eltolása hatástalan volt a +5 helyig, azonban +7 után inszertálva a 6ZA2 szekvenciát, már csökkenést láttunk a β -galaktozidáz aktivitásban, míg +10 hely után beépített 6ZA2 szekvencia nem zavarta meg a *lacI* génkifejeződést (8.B ábra, sárga, narancs és piros oszlopok).

A pLacI_{NE}-(N+7-6ZA2-E) vagy pLacI_{NE}-(N+10-6ZA2-E) plazmiddal együtt a 6ZA fehérjét kódoló pB6ZA plazmiddal kotranszformáltuk a sejtet annak ellenőrzéséhez, hogy a szekvencia beépítésének eltolása ellenére hatékonyan kimutatható-e a 6ZA cink-ujj kötődése a specifikus kötőhelyére. Korábban, az EcoRI helyre beépített felismerőhelyhez irányított 6ZA cink-ujj fehérje kötődésével nem tudtuk a *lacI* transzkripciót visszaszorítani (6. ábra). A pLacI_{NE}-(N+10-6ZA2-E) plazmidnál a klónozás helye csaknem azonos, ezért negatív eredmény volt várható. A pLacI_{NE}-(N+10-6ZA2-E) variánssal nem láttunk szignifikáns különbséget a β -galaktozidáz aktivitásban a 6ZA fehérje hiányában és jelenlétében (9. ábra, piros oszlopok), azonban pLacI_{NE}-(N+7-6ZA2-E) plazmidvariánsnál látszott némi β -galaktozidáz szintemelkedés (9. ábra, narancs oszlopok).



9. ábra: pLac_{NE}(N+7-6ZA-E) és pLac_{NE}(N+10-6ZA-E) promotervariánsok β-galaktoszidáz aktivitása 6ZA cink-ujj fehérje jelenlétében

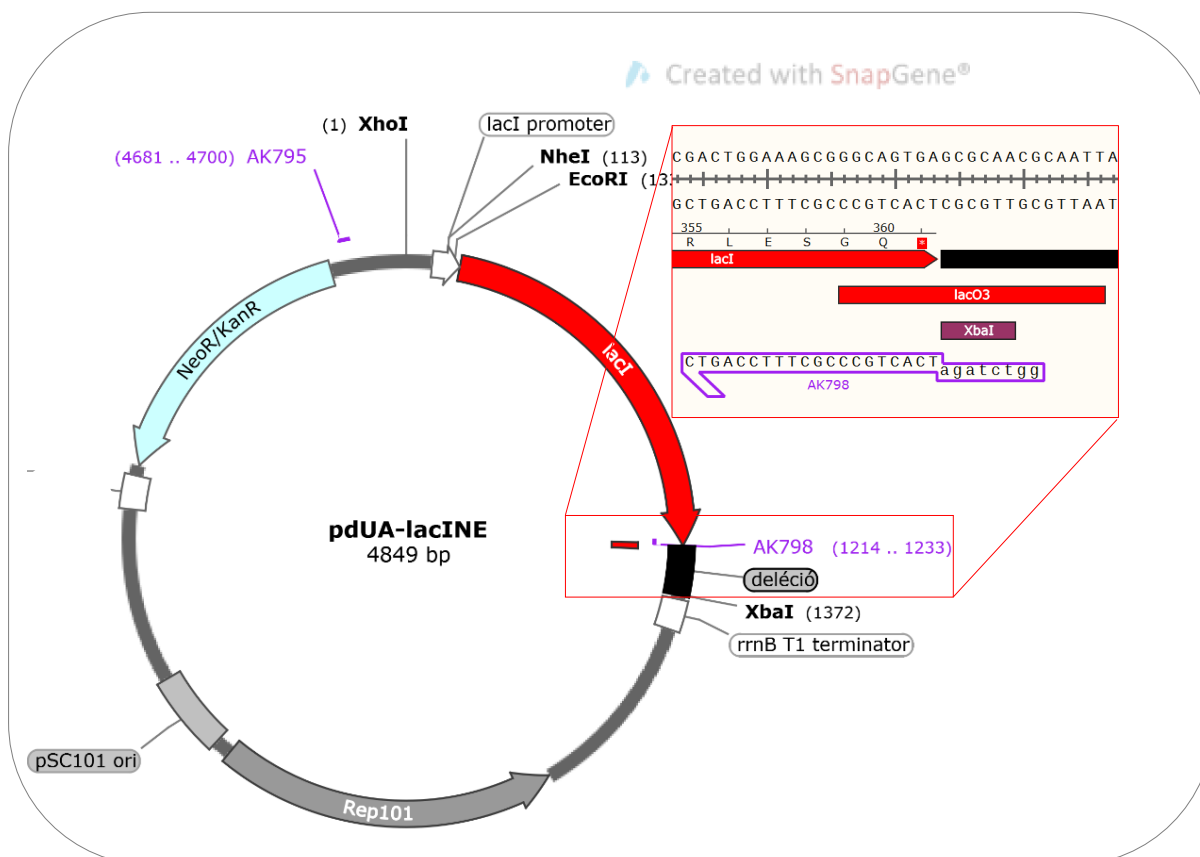
Relatív egység: OD₄₂₀/OD₆₀₀. Minden mintát 8 biológiai ismételéssel mértünk.

Figyelemre méltó, hogy pár bázispár távolság nagy hatással lehet a kötődött fehérje represszálo hatására. A pLac_{NE}-(N+7-6ZA2-E) plazmid, csak a kontroll szint felére volt képes visszaszorítani a plazmid nélküli gazda β-galaktoszidáz aktivitását, feltehetően a gyenge *lacI* transzkripció miatt, így a cink-ujj fehérje kötődése nem ad jelentős különbséget a β-galaktoszidáz szintben. A különböző inszetek hatását később tovább vizsgáltuk (V.3.1., V.4).

V.2.5. A *lacO3* operátor szekvencia hatása a plazmidon lévő *lacI* gén transzkripciójára

A pLacI plazmidban, a *lacI* gén végén található a *lac* operon három *lac* operátor szekvenciája közül a *lacO3* (3. ábra). Bár a pLacI plazmidok alacsony kópiaszámúak, az operátorok mérsékelten megnövekedett példányszáma is elég lehet arra, hogy a sejtben lévő Lac represszor molekulákat kititrálja, megkösse (82). A pdU-lacI plazmid a pUA66 alacsony kópiaszámú plazmidból lett létrehozva, így a *lacO3* szekvencia 5-10 példányban fordulhat elő a sejtben. A Lac represszor különböző affinitással kötődik a *lac*-operonban található 3 operátor szekvenciájához, leggyengébben az O3-hoz. A gyenge affinitás miatt nem látszott valószínűnek, hogy nagy hatással van az O3 operátor szekvencia jelenléte a pLacI plazmidokon.

A lehetőség kizárásához létrehoztuk a pLacI_{NE} vektor egy *lacO3* deletált változatát (K.I. klónozása), melyet pLacI_{NE}^{dO3}-nak neveztünk el. A *lacO3* szekvencia aláhúzással jelölt részét ejtettük ki: 5' – GGCAGT**GAGCGCAACGCAATT** – 3', megőrizve a *lacI* gént a stop kodonig (vastagon kiemelt rész). Először a pLacI_{NE} plazmidról amplifikáltuk a *lacI* génszakaszt, úgy, hogy az aláhúzással jelölt *lacO3* szekvenciárészt már nem tartalmazta. A PCR során használt primerpár az AK795-798 volt. Az AK795 a *lacI* promotertől upstream, az AK798 pedig a *lacI* gén 3' végéhez hibridizál (10. ábra).



10. ábra: A pLacI_{NE} vektor *lacO3* szekvenciájának részleges eliminálása

A deléciohoz használt oligonukleotidok lilával, a *lacO3* szekvencia pirossal, a keletkező *XbaI* hely a kinagyított szekvenciárésznél sötétlilával jelölt. A deletált szekvencia feketével kiemelt.

Az AK798 oligonukleotid végére *XbaI* helyet terveztünk. Az amplicont beépítettük a pLacI_{NE} vektor *XhoI*-*XbaI* helyei közé, amelyben a *XhoI* hely eredetileg a promotertől upstream, a *XbaI* felismerőhely pedig a *lacO3* szekvenciától 126 bp-ra volt található. A pLacI_{NE}^{dO3} plazmiddal a korábban mértekkel megegyező eredményeket kaptunk (11 és 12. ábra). Tehát a *lacO3* jelenléte valóban nem befolyásolja az I-Block mérés során kapott eredményt.

V.3. Az I-Block módszer működésének bemutatása különböző DNS-kötő fehérjékkel

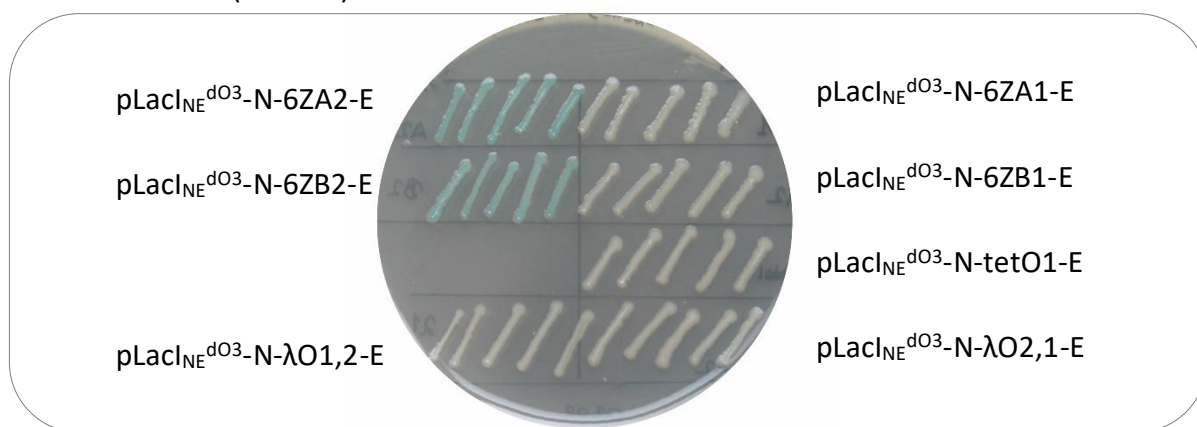
Az I-Block módszer működését - a 6ZA és 6ZB cink-ujj fehérjéket is beleértve - 5 különböző DNS-kötő fehérjével igazoltuk, melyek 3 különböző DNS-kötő domén családba tartoznak (1. táblázat). Ez azt mutatja, hogy a módszer a DNS-kötő fehérjék széles körénél alkalmas lehet a specifikus DNS-fehérje kölcsönhatás kimutatására.

1. táblázat: A felhasznált DNS-kötő fehérjék csoportosítása

DNS-kötő domén	cink-ujj	HTH	RNS közvetített (CRISPR)
tesztelt fehérjék	6ZA, 6ZB	λ represszor Tet represszor	dCas9

V.3.1. A beépített felismerőszekvencia hatásának vizsgálata a *lacI* transzkripcióra

Fontos volt tesztelni, hogy a $pLacI_{NE}^{dO3}$ plazmidvektorba beépített DNS-kötő fehérjék kötőszekvenciái önmagukban ne gátolják meg a Lac represszor génkifejeződését, mivel így a fehérje kötődése nélkül is magas marad a β -galaktozidáz szint és álpozitív eredményhez vezet. A kötőszekvenciákat, a 6ZA felismerőszekvenciához hasonlóan, aszimmetrikus klónozással építettük be a *lacI* promoter régió NheI-EcoRI helyére (10. ábra; függelék 2. táblázat). Minden fehérje kötőszekvenciáját mindkét irányban beklónoztuk, kivéve a Tet represszorét. Mindegyik DNS-kötő fehérje felismerőszekvenciájánál volt olyan beépülési irány, ahol a kötőszekvencia jelenléte nem okozott változást a *lacI* transzkripcióban, így alkalmas volt az I-Block méréshez (11 ábra).



11. ábra: *lacI_{NE}* promotervariánsok β -galaktozidáz aktivitásának tesztelése X-gal lemezen

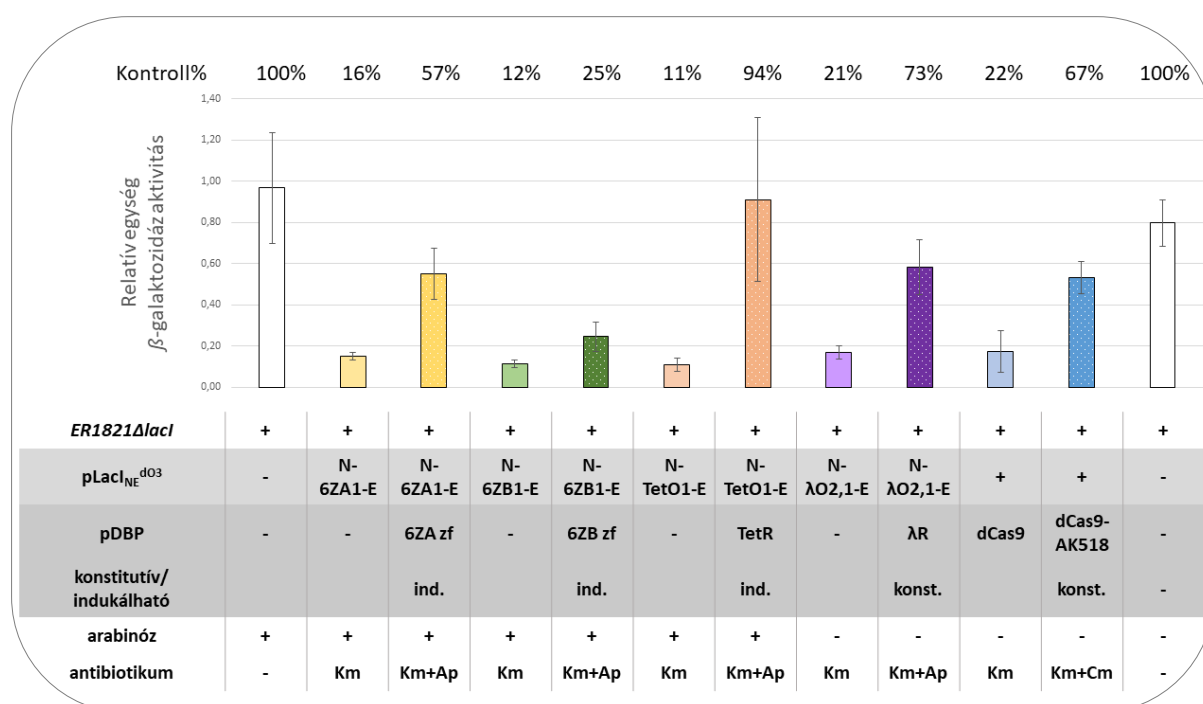
6 külön telepől átszurkált biológiai ismétlések.

Kék telepszín: $LacI^- \beta-gal^+$, fehér telepszín: $LacI^+ \beta-gal^-$ fenotípus.

A λ represszor felismerőszekvenciája közel 50 bp hosszú volt, mivel ez az O1 és O2 operátor szekvenciát is hordozta, azonban a beépülés irányától függetlenül, nem gátolta a *lacI* transzkripciót. Ellenben, ahogy korábban tapasztaluk, a 6ZA és 6ZB cink-ujjak kötőszekvenciái csak az 1-es orientációban nem vezetnek LacI^- fenotípushoz, a 6ZA2 és 6ZB2 szekvenciák blokkolják a *lacI* transzkripcióját.

V.3.2. A DNS-kötő fehérjék specifikus kötődésének kimutatása

A sejtet kotranszformáltuk a DNS-kötő fehérje felismerőhelyét hordozó pLacI plazmid-variánsokkal és a tesztfehérjét kódoló plazmiddal, majd I-Block méréssel vizsgáltuk a specifikus kötést a β -galaktozidáz aktivitásuk alapján (12. ábra).

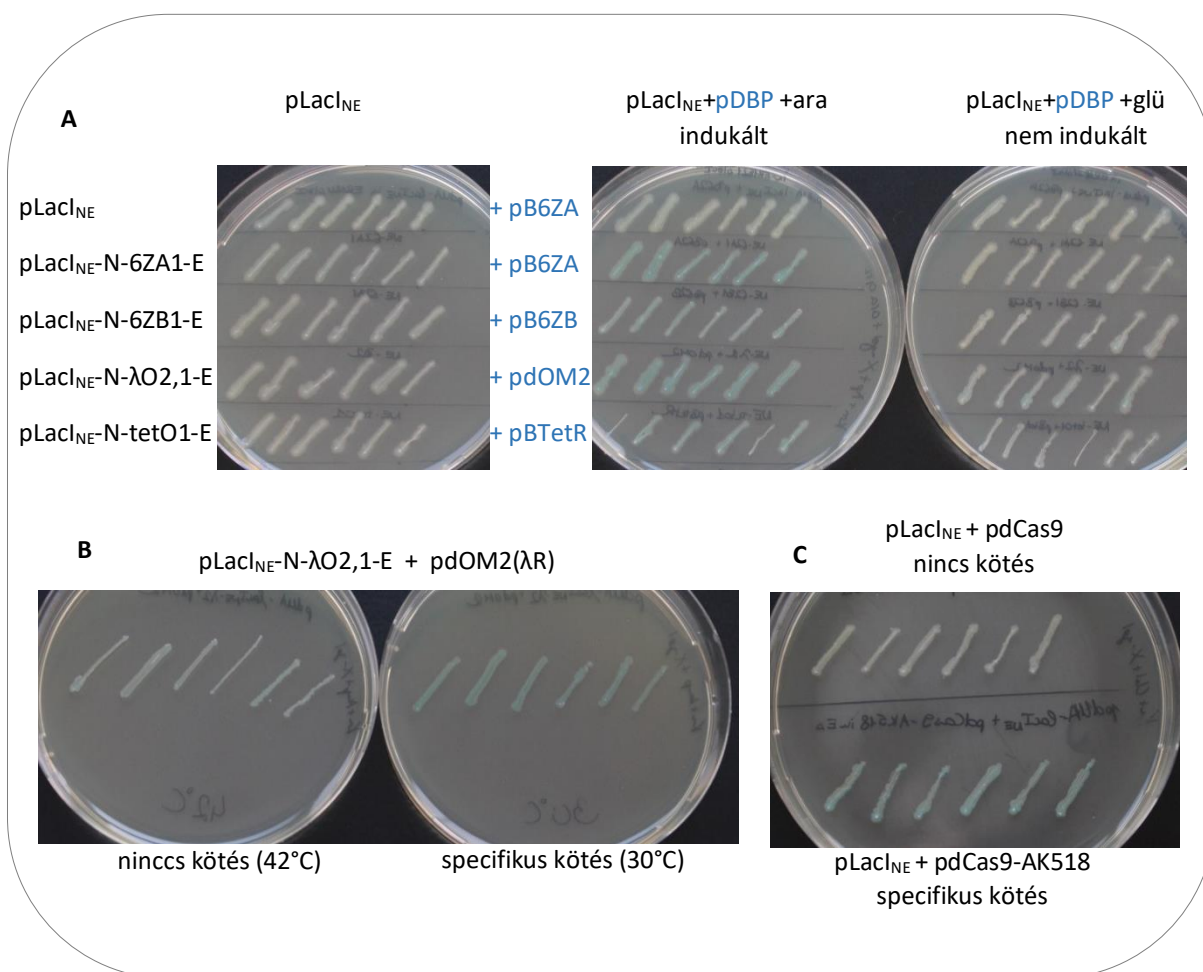


12. ábra: Különböző DNS-kötő fehérjék specifikus kötődésének kimutatása I-Block módszerrel

Az oszlopok fölött százalékban kifejezett értékek a β -galaktozidáz aktivitásnak a plazmid nélküli gazda β -galaktozidáz szintjéhez viszonyított értékét mutatják. Bal oldali üres gazda arabinóz mellett, jobb oldalon ábrázolt üres gazda cukor nélkül volt növesztve, így az arabinózzal indukált mintákat a bal oldali, míg a konstitutívan termelődő mintákat a jobb oldali kontrollhoz viszonyítottuk. 5 biológiai ismétlés.

Relatív Egység: OD_{420}/OD_{600} .

A mérést mikrotiter lemezben végeztük. Mind az 5 különböző DNS-kötő fehérje kötődését igazoltuk a *lacI* promoterbe beépített felismerőszekvenciájához. A tesztfehérje hiányában a β -galaktozidáz szint alacsony maradt (LacI^+ β -gal⁻), azonban a fehérje jelenlétében emelkedett β -galaktozidáz szintet mértünk (LacI^- β -gal⁺). A különböző fehérjéknél a β -galaktozidáz aktivitás változó volt a plazmidot nem hordozó kontrollhoz képest. A legalacsonyabb β -galaktozidáz szintet 6ZB cink-ujj fehérjével, a legmagasabb szintet Tet represszorral kaptunk.



13. ábra: DNS-kötő fehérjék specifikus kötődésének kimutatása X-gal tartalmú lemezen

A: A tesztelt fehérjék termelődése arabinózzal indukálható. Bal oldalon a tesztelt fehérje felismerőhelyét hordozó pLacI_{NE} plazmidvariánsokat hordozó sejtek, jobb oldalon a pLacI_{NE} és pDBP párokat hordozó sejtek láthatók. pDBP plazmid jelenléte nélkül és indukálás nélkül fehér, míg indukálás után, a specifikus kötődés okán, kék telepszín látható. Kontroll: a kötőhelyet nem hordozó pLacI_{NE} és pB6ZA plazmiddal kotranszformált sejt.

B: λ represszor specifikus kötődésének ellenőrzése a megengedő 30°C-on (kék telepek) és az inaktív állapotot fenntartó 42°C-on (fehér telepek).

C: dCas9 fehérje specifikus kötődésének ellenőrzése 'guide RNS' nélkül, pdCas9 plazmiddal (fehér telepek) és az irányításhoz szükséges oligoduplexet hordozó pdCas9-AK518 plazmidvariánssal (kék telepek).

kék telepszín: LacI⁻ β-gal⁺, fehér telepszín: LacI⁺ β-gal⁻, 5 biológiai ismétlés

Az I-Block mérések során különböző kontrollok alkalmazásával ellenőriztük a kötődés specifikusságát. Az *araBAD* promoterral fuzionált fehérje génjének expressziója arabinózzal indukálható, ezért annak hiányában az nem fejeződik ki. Glükóz hozzáadásával, a katabolit represszióval biztosítottuk, hogy alacsony koncentrációban se legyen jelen a tesztelt fehérje. A pDBP variánsokkal és a felismerőhelyüket hordozó pLacI_{NE} plazmidvariánsokkal kotranszformáltuk a tesztörzset.

A vártak megfelelően, β -galaktozidáz aktivitást csak arabinóz hozzáadásával láttunk. Glükóz jelenlétében, valamint a kötőhelyet nem hordozó pLacI_{NE} alapvektorral kotranszformálva a sejtet LacI⁺ β -gal⁻ fenotípus jelent meg (13.A ábra). A λ represszor cl857 hőérzékeny változatával dolgoztunk, amely aktív 30°C-on, azonban 42°C-ban inaktív. A megengedő 30°C-on magas, míg 42°C-os hőmérsékleten alacsony β -galaktozidáz aktivitást mértünk, ami a vártak megfelelő eredmény (13.B ábra). A dCas9 specifikus kötődésének igazolásához kontrollként a sejtet pLacI_{NE} vektorral és pdCas9 alapplazmiddal kotranszformáltuk. Utóbbiból hiányzik az irányítást biztosító AK518 oligoduplex. Magas β -galaktozidáz aktivitást csupán a sejtet pdCas-AK518 plazmiddal kotranszformálva kaptunk (13.C ábra és 12. ábra).

V.4. Az I-Block módszer teljesítőképességének vizsgálata

Jelenleg az I-Block módszerrel egyszerre egy fehérje kötődése vizsgálható egy bizonyos DNS szekvenciához. Az I-Block módszert olyan irányba kívántuk továbbfejleszteni, hogy alkalmassá váljon egy DNS-kötő fehérje legjobban kötő DNS szekvenciájának vagy egy bizonyos DNS szekvenciához legnagyobb affinitással kötődő fehérjeváltozat azonosításához. Az I-Block módszer használatának kibővítéséhez a rendszer jelentős átalakításra volt szükség. Korábban, pár esetben azt figyeltük meg, hogy egyes kötőszekvenciák gátolják a *lacI* gén átíródását, álpozitív klónokat eredményeznek, ezért ilyen esetekben az I-Block módszer nem alkalmazható (lásd fentebb).

Annak érdekében, hogy kiderítsük, milyen típusú szekvenciák gátolják a *lacI* átíródást, létrehoztunk egy olyan plazmidkönyvtárat (pLacI_{NE}-N18), amelyben a pLacI_{NE} plazmid NheI és EcoRI helyei között egy 18 bp random szekvencia található.

V.4.1. Random szekvenciát hordozó, pLacI plazmidkönyvtár létrehozása

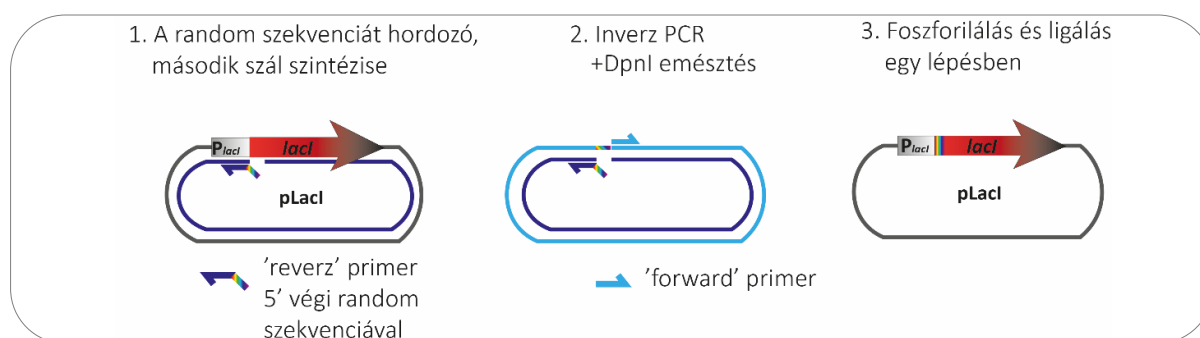
Először egy 9 bp, majd egy 18 bp hosszú random szekvenciárészt klónoztunk a *lacI* promoter 3' oldalán található NheI és EcoRI klónozóhelyek közé. Az irodalomból ismert több módszer random szekvencia beépítéséhez (83,84). Azonban ezen klónozási stratégiák során gondot okozhat a nem teljes restriktió emésztés. Emellett, a lépések között szükséges tisztítás is körülményessé teszi a beépítést. Mutagenézisnél, legyen szó delécióról, inszercióról vagy pontmutációról, széleskörűen alkalmazott módszer az inverz-PCR technika (74). A módosítások bevezetéséhez legtöbb esetben mi is ezt a technikát alkalmazzuk (IV.5.2.). Mivel a beépíteni kívánt szekvencia viszonylag hosszú, ezért a láncreakció során valószínűtlen, hogy

a random szekvenciát az 5' végén hordozó primer teljes hosszában tudjon hibridizálni, így esetleg hibákat generálva. Ennek a lehetőségnek a mérsékléséhez, hasonló megoldást alkalmaztunk, mint QuikChange mutagenézis módosított változatánál (85). Az első lépésben csak a randomizált szekvenciát hordozó primert adtuk a reakcióhoz, melynek következtében újonnan szintetizált, az 5' végén változatos szekvenciát hordozó, egyszálú DNS templát keletkezett. Pár ciklussal később, a polimeráz láncreakciót az újonnan szintetizált templát 3' végéhez hibridizáló primer hozzáadásával indítottuk el (14. ábra). A random szekvenciát hordozó 'reverz' primer: AK848 (5' – NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN CCGGGCGCTAGCATG), a 'forward' primer pedig AK849 (5' – GAATTCAGGGTGGTGAATGTGA) volt. A reakció pontos körülményeit a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: A random szekvenciát hordozó oligonukleotid könyvtár beépítésének reakciókörülményei

Módosított inverz-PCR			
Reakcióelegy			Reakciókörülmény
	1. lépés (lineáris amplifikáció)	2. lépés (PCR)	1. és 2. lépés
5X HF Phusion puffer	5 µl	5 µl	1. 98°C 2'
10µM AK848 primer	1 µl	-	2. 98°C 30"
10µM AK849 primer	-	1 µl	62,8/ 64°C 30"
10mM dNTP mix	0,4 µl	0,4 µl	72°C 3'
templát DNS	1 µl (20-50 ng)	25 µl (1. lépés terméke)	10X
2 U/µl Phusion polimeráz	0,5 µl	0,5 µl	3. 72°C 10'
H ₂ O	25 µl-ig	50 µl-ig	

A PCR reakciót követően a módszertani részben ismertetett módon (IV.5.2. és 14. ábra) elimináltuk a templát DNS-t, majd a foszforilálás és ligálást követően a random szekvenciát hordozó pLacI_{NE}-N18 plazmidkönyvtárat alkalmazva transzformáltuk az *ER1821 ΔlacI* törzset.



14. ábra: Random szekvencia beépítése *lacI* promoterbe módosított iPCR technikával

Ideális esetben, az összes transzformáns sejt fehér telepszínt ad, azonban 14-18%-ban kék telepszínű klónokat számoltunk (függelék 3. táblázat, szürke). A kék szín megjelenése β -galaktozidáz aktivitásra utal, vagyis Lac represszor hiányára (β -gal⁺ LacI⁻ fenotípus). Ellenőrzésképp, először csak pár klón szekvenciáját határoztuk meg hagyományos, kapilláris szekvenálással, melyek releváns szekvenciáit a 3. táblázatban mutatom.

3. táblázat: Az NheI és EcoRI klónozóhelyek közé beépült szekvenciák elemzése

inszert	telep-szín	+1 - +20 (ITS szekvencia)	inszert hossz	purin%	GC%	bázis eloszlás
N18	fehér	GGAGCAAATAACTTCGCCAG	18	60	50	A=7 T=3 C=5 G=5
		GGGTTCTGTTTCGAGAAGTGG	18	60	55	A=3 T=6 C=2 G=9
		GGACAGAACTTAGGGAAGGT	18	75	50	A=7 T=3 C=2 G=8
		GGATTTAATTGTAACCGAG	18	55	35	A=6 T=7 C=2 G=5
		GGATCTTTACACACACGGTC	18	45	50	A=5 T=5 C=6 G=4
		GGTGTTATTGGCGTGTTCG	18	45	50	A=1 T=9 C=2 G=8
		GGTAGTAAAGGATCTTTGTC	18	55	40	A=5 T=7 C=2 G=6
		GGTCCTACTCAATCCAGGGG	18	50	60	A=4 T=4 C=6 G=6
N18	kék	GGGGAACCTGAAGCGTGTGT	18	65	55	A=4 T=5 C=2 G=9
		GGAGAGTAATTTCGCACCCAG	17	60	55	A=6 T=3 C=5 G=6
		GGTGCGTATCCTGAGGGAAT	14	60	55	A=4 T=5 C=3 G=8
		GGARAGTAATTTCRCACCCAG	17	60	50	A=5-7 T=3 C=5 G=5-7
		GGGTTACATCCTGGTCCCC	18	35	65	A=2 T=5 C=8 G=5
		GGACTCTGATCGGGACCGAA	15	60	60	A=5 T=3 C=5 G=7
		GGTCTTTACGACCCTGTTT	18	30	50	A=2 T=8 C=6 G=4
		GGTGCACGACCAACCGAGGA	16	65	65	A=6 T=1 C=6 G=7
6ZA	fehér	GGCCGGGGCTGGGGGAGGGA	18	80	85	A=2 T=1 C=3 G=14
	kék	GGACCCCTCCCCCAGCCCCGG	18	35	85	A=2 T=1 C=12 G=5
6ZB	fehér	GGGGAGTTGGGGGAGTGAGT	18	80	65	A=3 T=4 C=0 G=13
	kék	GGACTCACTCCCCCAACTCC	18	30	65	A=4 T=3 C=11 G=2
λ O	fehér	GGATTATCACCGCCAGAGGT	45	55	55	A=5 T=4 C=5 G=6
	fehér	GGTCTAACACCGTGCGTGTT	45	45	55	A=3 T=6 C=5 G=6
tetO	fehér	GGTCCCTATCAGTGATAGAG	20	55	50	A=5 T=5 C=4 G=6

Zölddel kiemelt szekvencia a pLacI_{NE} plazmid eredeti szekvenciája, a sárgával kiemelt szekvencia az inszert kezdeti átíródo szekvencián (ITS) belül található szakaszát jelöli. Az inszerthossz az NheI és EcoRI helyek közé beépült szekvenciárész hosszát (bp-ban) jelöli. Purin % és GC % az ITS szekvencián belüli purin-pirimidin és G-C nukleotidok százalékban megadott arányát jelöli. A bázisok eloszlása a négy nukleobázis előfordulásának számát adja meg.

A fehér telepszínű klónoknál szinte kivétel nélkül szabályos, 18 bp hosszú beépülést láttunk. A kék telepszínű klónok esetében azonban előfordult, hogy kevesebb bázispár épült be a tervezettnél, ráadásul pár esetben nagyobb szekvenciárész kiesését is megfigyeltük.

Az ITS szekvencia megváltozásának hatása a promoter erősségre régóta ismert (86). A bakteriális promoterek ITS szekvenciáinak sebességmeghatározó szerepe lehet a transzkripció iniciáció-elongáció átmenetében, azonban a szabályozás hátterében álló okok még nem teljesen ismertek. Prokariótákban a transzkripció kezdeti szakasza, az iniciáció irányításában legfőképp az RNS polimeráz σ alegysége vesz részt, amely specifikusan felismeri a konzervált -10 és -35 elemeket, majd a transzkripciós komplex kialakulásával megkezdődik a transzkriptum szintézise. Az elongáció, vagyis lánchosszabodás korai szakaszán 9-11 nt hosszú RNS transzkriptum keletkezésével az RNS polimeráz szekvenspecifitását felőrs σ^{70} alegysége és a transzkripciós komplex közötti kölcsönhatás egyre gyengül. A σ^{70} faktor részleges vagy teljes leválásával a keletkező naszcens RNS el tudja foglalni az 'exit', kilépő csatornát, biztosítva a lánchosszabodás akadálymentes folyamatát. Azonban az ITS szakaszon előforduló bizonyos szekvenciák, például a -10 konszenzus szekvenciához hasonló szekvenciák, a σ^{70} faktoralal kölcsönhatásba léphetnek, a transzkripciós komplexet a promoterhez kötve. A promoterekről általában maximum 10 nt abortív rövid RNS-ek keletkeznek, az ennél hosszabb abortív, 13-18 nt hosszú transzkriptumok felhalmozódása az ITS- σ^{70} kölcsönhatás miatt bekövetkező promoterhez kötött állapotra jellemző (87-89).

Az elemzett szekvenciák között is találtunk -10-es elemhez hasonló szekvenciákat, 3 esetben a kék telepszínt adó klónok között, egy esetben azonban fehér telepszíntű klónban (3. táblázat). A purinban gazdag szekvencia a nem templát szálon elősegítheti a transzkripció elongációba történő továbbhaladását (90). A korábban tanulmányozott 6ZA és 6ZB felismerőszekvenciák-nál a beépülés irányától függően guaninban gazdag (1-es orientáció) vagy citozinban gazdag szekvencia (2-es orientáció) került a nem templát szálra. Az 1-es orientációban 80%-os volt a purinok előfordulásának gyakorisága, míg a 2-es orientációban csupán 30%-os (3. táblázat). A purinban gazdag szekvencia (6ZA1 és 6ZB1) LacI^+ $\beta\text{-gal}^-$ fenotípust adott, míg a pirimidinben gazdag szekvencia (6ZA2 és 6ZB2) gátolta a *lacI* transzkripciót, így a $\beta\text{-galaktozidáz}$ akadálytalanul kifejeződhetett (LacI^- $\beta\text{-gal}^+$). Ez az eredmény összhangban van azzal a megfigyeléssel, mely szerint a purinban gazdag szekvencia segíti a hatékony transzkripciót.

A $\text{pLacI}_{\text{NE-N18}}$ plazmidkönyvtár elemzett szekvenciáinál nem láttunk szignifikáns különbséget a purin-pirimidin eloszlásnál, azonban a fehér telepszínt adó (LacI^+ $\beta\text{-gal}^-$) sejtekenél a *lacI* promoter ITS szekvenciájában a citidin alulreprezentált volt (3. táblázat). Ez összhangban van azzal a korábbi megfigyelésünkkel, hogy a 6ZA és a 6ZB target szekvencia abban az orientációban, amelyben a felső szál citidinben gazdag, gyengíti a *lacI* transzkripciót.

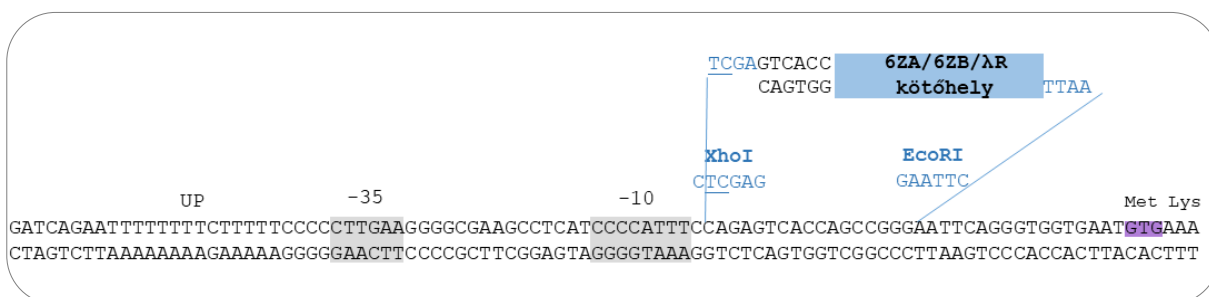
V.4.2. Kísérlet a gátolt *lacI* transzkripció helyreállítására

E. coli-ban az RNS polimeráz σ alegységei közül a σ^{70} a leggyakrabban használt, más σ alegységek specifikus gének transzkripcióját biztosítják. Ismert, hogy a σ^{70} és egyes ITS szekvenciák közötti kölcsönhatás gátolja az iniciációból az elongációba való átmenetet (89,91). A σ^{32} faktor által felismert promotereknel nem találtak példát az ITS szekvencia transzkripcióra gyakorolt hatására (89). Erre a megfigyelésre alapozva megvizsgáltuk, hogy azokban az esetekben, amelyekben a beépített szekvencia gátolja a *lacI* transzkripciót (6ZA és 6ZB 2-es orientáció, lásd fenn), meg lehet-e szüntetni a gátlást, ha a σ^{70} által felismert *lacI* promotert σ^{32} RNS polimeráz alegység által felismert promoterre cseréljük.

V.4.2.1. σ^{32} faktor által irányított *lacI* génátíródás

A *lacI* gént σ^{32} faktor által felismert *groE* promoterrel fuzionáltuk, majd létrehoztunk a *lacI*_{NE} promoterhez hasonlóan, egyedi klónozóhelyeket. A σ^{32} által felismert *groE* promotert *E. coli* ER1821 törzsből amplifikáltuk AK813 és AK814 primerekkel (függelék 2. táblázat). Az amplikont a pLacI_{NE} plazmid XhoI-EcoRI felismerőhelyek által határolt helyre klónoztuk be (10. ábra). A plazmidvektort először megemésztettük XhoI enzimmal, majd az 5' túlnyúló végeket feltöltöttük, végül a lineáris vektort megemésztettük EcoRI enzimmal. A *groE* promoter amplifikálásához alkalmazott 'forward' primer 5' végére EcoRI helyet terveztünk. Az amplikon EcoRI emésztését követően ligáltuk az előkezelt plazmidvektorba. A rekombinációs pLacI_{NE} plazmidon a *lacI* gén fúzióba került a *groE* promoterrel, amely ITS szekvenciáján belül EcoRI felismerőhelyet hordozott.

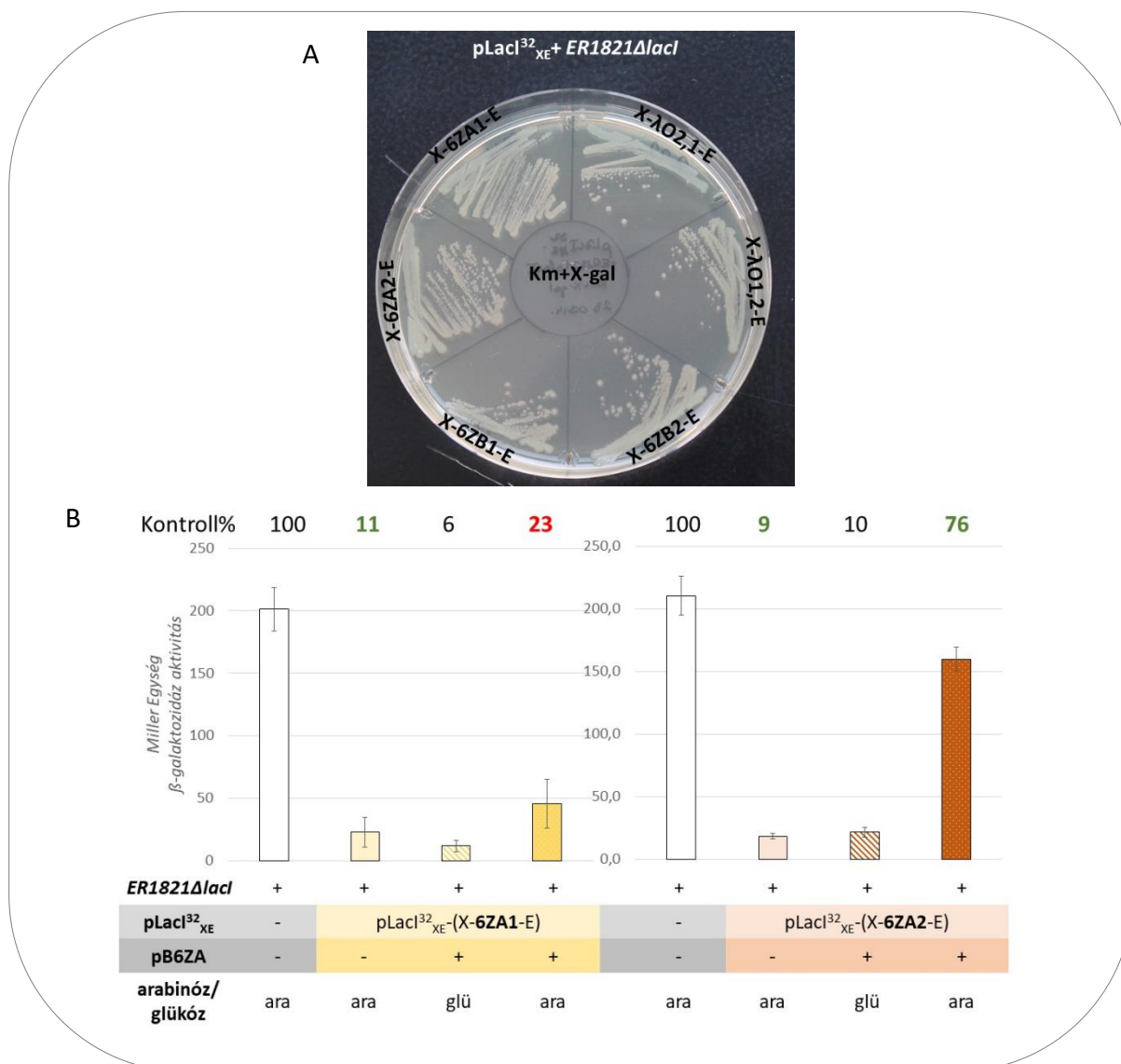
Ahhoz, hogy a *lacI*_{NE} promoterhez hasonlóan aszimmetrikus klónozással tudjuk beépíteni a tesztelni kívánt DNS szekvenciákat az ITS régióba, létrehoztunk a -10 elemhez közel egy egyedi XhoI restrikciós felismerőhelyet (*lacI*_{NE}³² promoterváltozat) (15. ábra).



15. ábra: A *groE-lacI* promoter nukleotidszekvenciája

Szürkével kiemelt részek: -10 és -35 hexamerek. A létrehozott klónozóhelyek késsel jelöltek. A tesztelt felismerőszekvenciákat XhoI-EcoRI kompatibilis végű oligoduplexeken keresztül építettük be.

A XhoI helyet kialakító pontmutációt AK815-816 mutagén oligonukleotid párral (függelék 2. táblázat) hoztuk létre, inverz-PCR technikával (74). A korábban tesztelt, 6ZA, 6ZB és λ represszor fehérjék felismerőhelyeit XhoI-EcoRI aszimmetrikus klónozással építettük be (AK820-833), úgy, hogy az eredeti szekvenciát megőriztük a -10-es elemtől a 9. bázispárig. Ezzel megőriztük az eredeti szekvenciát egészen a transzkripció kezdőhelyig (15. ábra). Mindhárom fehérje felismerőhelyét, mindkét orientációban beépítettük. LacI⁺ és β -gal⁻ fenotípust tapasztaltunk minden esetben, beépülés irányától függetlenül (16.A ábra).



16. ábra: I-Block mérés *groE-lacI* változatot hordozó plazmidvariánsokkal

A: Különböző felismerőhelyeket hordozó pLacI³²_{XE} plazmidvariánsok tesztelése X-gal tartalmú agar lemezen. Az összes variáns fehér telepszínű (LacI⁺, β -gal⁻)

B: pLacI³²_{XE}(X-6ZA-E) variáns tesztelése 1. és 2. orientációban beépült 6ZA kötőhellyel. A specifikus kötődést jelentő megemelkedett β -galaktosidáz aktivitást csak a 6ZA2 szekvenciával tudtuk kimutatni.

Ez megerősíti azt a feltételezést, hogy az egyes beépített szekvenciákkal tapasztalt *lacI* expresszió csökkenés a σ^{70} faktorhoz, és a *lacI* promoterhez köthető. A sejtet kotranszformáltuk a pLacI_{XE}³² plazmidvariánsokkal és a beépített szekvenciát felismerő fehérjét termelő plazmiddal, hogy teszteljük az új variáns felhasználhatóságát az I-Block rendszerben. A tesztelt fehérje specifikus kötődése kimutatható volt, de függött a beépített szekvencia irányától. Például a 6ZA cink-ujj fehérjénél az 1-es orientációban beépült szekvenciával nem volt kimutatható a specifikus kötődés, míg a 2-es orientációban beépült szekvenciával igen (16.B ábra).

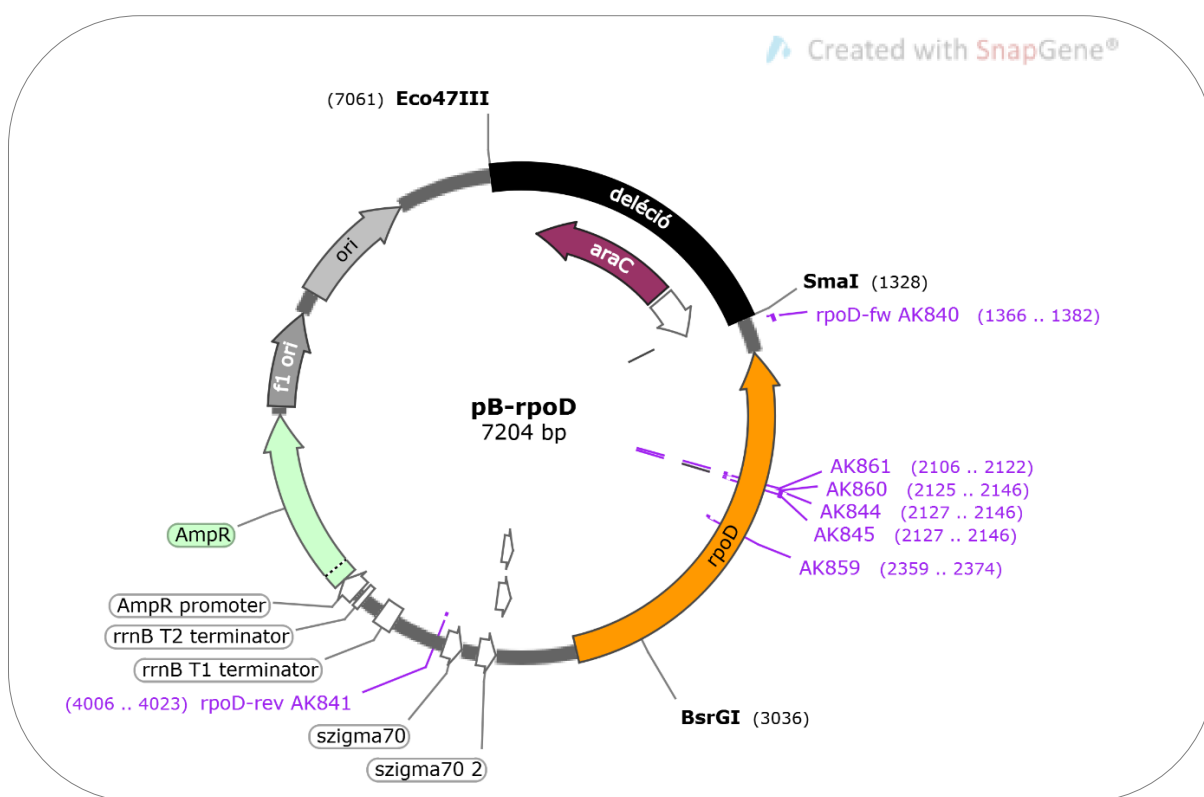
A *groE-lacI* fúzióval hiába sikerült az inszertszekvencia hatását csökkenteni a *lacI* transzkripcióra, újabb kérdések merültek fel. Miért függ a beépítés irányától a tesztelt fehérje kötődésének kimutatása? Vajon stabil, megbízható eredményt kapunk σ^{32} faktor által felismert *groE* promoter alkalmazásával? A σ^{32} faktor alapvetően a stresszindukált gének átírásáért felel, koncentrációja erősen fluktuálhat különböző környezeti hatásokra (92), így például egy, a sejtre toxikus hatású fehérje túltermelésére. Megoldást jelenthet, ha a σ^{32} faktort plazmidról, konstitutív promoterről termeltetjük. A *groE-lacI* rendszert tovább nem teszteltük, habár még látunk potenciált a felhasználásában.

V.4.2.2. A *lacI* transzkripció helyreállítása σ^{70} mutánssal

A *groE-lacI* promotervariánssal kapott eredmény azt jelezte, hogy a 6ZA2 és 6ZB2 szekvenciák hatása a σ^{70} faktorhoz kötött. A σ^{70} és az elakadást-előidéző szekvenciák specifikus kölcsönhatását többen tanulmányozták (86,93-96). A legismertebb példa a λ fág kései génjeinek átíródásáért felelős P_{R'} promoter és λ Q fehérje kapcsolata (97).

Azonosítottak olyan σ^{70} mutáns faktorokat, melyek az elakadást-előidéző szekvenciák jelenléte ellenére sem mutatják a jellemző fenotípust, a teljes transzkriptum hatékonyan átíródik. A transzkripció kezdetekor az RNS core ($\alpha_2\beta\beta'$) enzimhez kötődik σ alegység, funkcionális holoenzimet alkotva ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$). A holoenzim σ^{70} faktorának 2-es és 4-es doménjén keresztül lép specifikus kölcsönhatásba a konzervált -10 és -35 promoter elemekkel (80). Valószínűsíthető, hogy ugyanazon σ^{70} régió felelős az elakadást kiváltó kötődésért az ITS szekvencián belül, mint amely a -10-es elem nem-templát szálához is specifikusan kötődik. A promotertől való elszakadást és az elongációba történő továbbhaladást segíti a σ^{70} faktor 2.2 régió belüli mutáció, mint L402F és Q406A, amely valószínűleg gyengíti a kölcsönhatást a core és σ faktor között (97,98).

Az ismert, promoter-elakadást gátló L402F és Q406A mutációkat bevezetve próbáltuk az inszertszekvenciák hatását csökkenteni a *lacI* transzkripcióra. Először a plazmidról termeltetett mutáns σ faktorokkal ellenőriztük a mutáció hatását a *lacI* termelődésére. A döntés mellett szólt, hogy az L402F mutációval még életképes, de a Q406A mutációt hordozó σ^{70} faktort csak a vad típusú σ^{70} faktor mellett tudja tolerálni a sejt. A plazmidról termeltetett mutáns σ faktor nagyobb koncentrációban van az endogén, vad típusú σ faktoral szemben, így a promoter-elakadást csökkentő hatásuk megnyilvánulhat a vad típusú faktor jelenléte ellenére (97,98). A σ faktort kódoló *rpoD* gént *ER1821* törzsről amplifikáltuk AK840 és AK841 primereket alkalmazva (17. ábra).



17. ábra: A σ^{70} faktor génjét hordozó pB-rpoD plazmid

Az *rpoD* gén amplifikálásához és mutagenéziséhez alkalmazott oligonukleotidok lilával jelöltek.

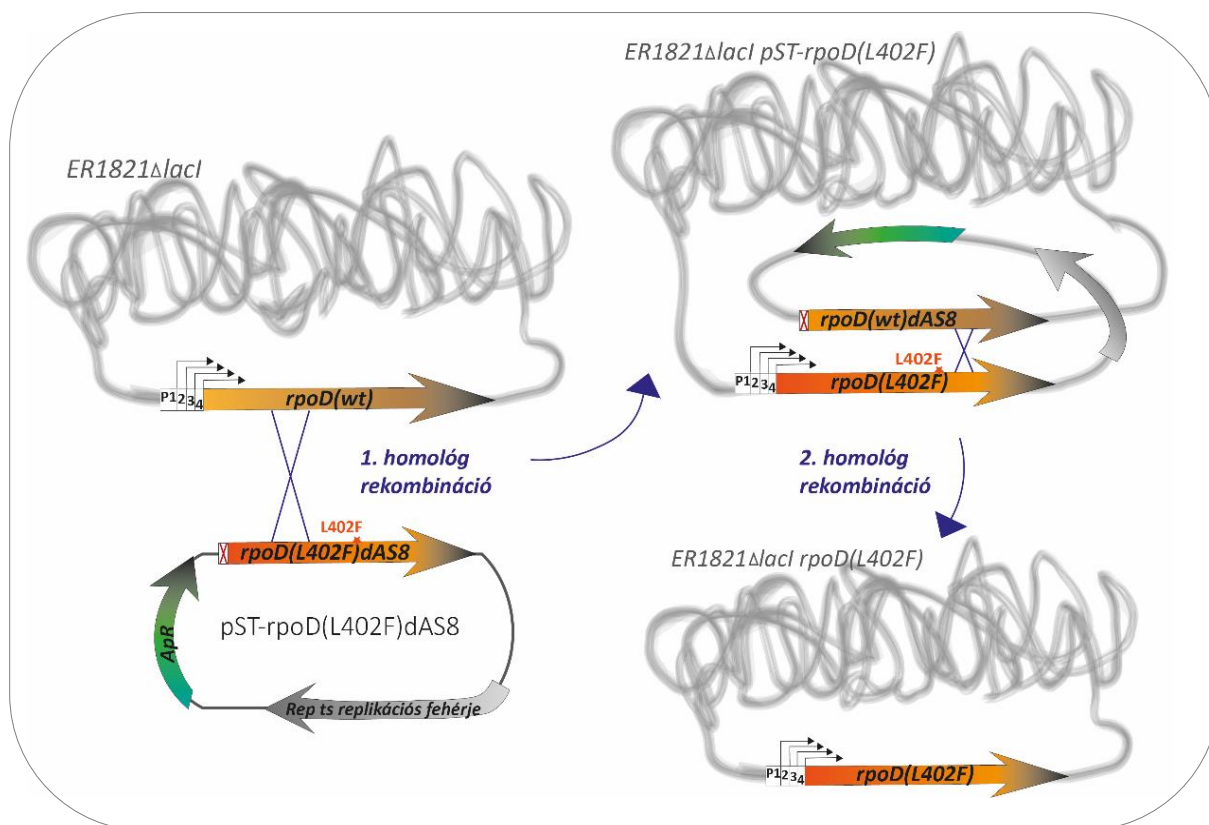
A kettős emésztéssel deletált *araC*-*P_{BAD}* szekvencia feketével kiemelt.

Az *rpoD* gén 4 promoterral is rendelkezik, kettő a σ^{70} , egy a σ^{32} és egy a σ^{24} faktor irányítása alatt áll. Az ampikon hordozta mind a négy eredeti promotert, valamint a gén utáni terminátort. Az ampikont pBAD24 vektorplazmid HindIII helyére építettük be, a HindIII 5' túlnyúló végek feltöltését követően. A rekombináns plazmidot pB-rpoD-nak neveztük el. pB-rpoD plazmidon az *rpoD* gén L402F mutációját QuikChange módszerrel, Q406A mutációját pedig inverz-PCR technikával hoztuk létre. Az L402F mutáns egy C-T cserével jött létre.

A Q406A mutációhoz két bázispárt kellett cserélni, mellyel az eredeti glutamint kódoló CAG kodon helyett alanint kódoló GCG kodon keletkezett. Az L402F mutációt bevezető mutagén oligonukleotidpár AK844/845, Q406A mutációhoz pedig az AK860-861 oligonukleotidokat alkalmaztuk (függelék 2. táblázat, 17. ábra).

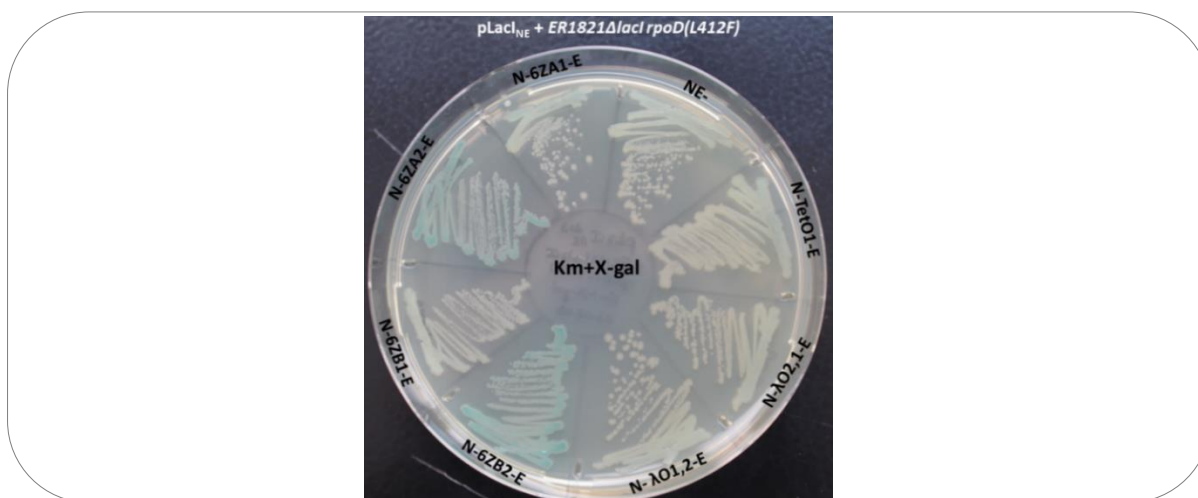
A pB-rpoD(L402F) és pB-rpoD(Q406A) variánsok mellett LacI^- fenotípust mutató pLacI_{NE} variánsokkal kotranszformált sejtekben nem állt helyre a *lacI* transzkripció, továbbra is emelkedett β -galaktozidáz szintet mértünk. Mivel az *rpoD* gén a tervezettel ellentétesen, az *araBAD* promotterrel ellentétes irányban épült be, megvizsgáltuk, hogy az *araBAD* promoterről induló átíródás megszüntetésével növelhető-e a mutáns σ faktor kifejeződése. Létrehoztuk a pB-rpoD plazmid *araC*-*P_{BAD}* deléciós változatát, az Eco47III-SmaI közé eső szekvencia kivágásával (17. ábra). Az I-Block mérés során, a deléció ellenére, továbbra is LacI^- β -gal⁺ fenotípust láttunk.

A plazmidról termeltett σ^{70} mutánssal nem sikerült visszaállítanunk a *lacI* transzkripciót, ezért létrehoztuk az ER1821 Δ *lacI* törzs egy olyan változatát, amelyben a genomon lévő *rpoD* gén az L402F mutációt hordozza. Mivel a mutációt hordozó gén már a kezünkben volt, a genomi mutációt az úgynevezett „öngyilkos plazmid” technikával, egy hőszenzitív plazmidon keresztül, két homológ rekombinációval (71) vittük be a genomba (18. ábra).



18. ábra: Az *rpoD* gén L402F genomi mutációjának létrehozása

Az *rpoD(L402F)* gént az pB-*rpoD(L402F)* plazmidról amplifikáltuk, majd emésztettük BsrGI enzimmal, a gént megrövidítve 24 bp-ral, ami az első 8 aminosavat kódolja (17. ábra). Ezt követően a megrövidített gént az „öngyilkos plazmidra” (pST76A) klónoztuk, létrehozva a pST-*rpoD(L402F)dAS8* plazmidot. Az első homológ rekombinációval beépült a pST-*rpoD(L402F)dAS8* plazmid a genomra. Előnyös esetben a gén első felében történt a rekombináció, így a mutációt hordozó gén maradt épen és az eredeti szekvenciát hordozó gén lett deléciós. A második homológ rekombinációval a plazmid többi részét ejtettük ki (18. ábra). A létrehozott *ER1821 ΔlacI rpoD(L402F)* törzsről AK840-841 primerekkel amplifikáltuk a mutáns *rpoD* gént, majd AK859 primerrel szekvenálással ellenőriztük a genomi mutáció meglétét. A pLacI_{NE}^{do3} variánsokat, melyek a tesztelt DNS-kötő fehérjék kötőszekvenciáit hordozzák betranszformáltuk a létrehozott *ER1821 ΔlacI rpoD(L402F)* törzsbe. A LacI⁻ fenotípust mutató pLacI_{NE} variánsokat (pLacI_{NE}-(N-6ZA2-E) és -(N-6ZB2-E)) hordozó sejtek az *rpoD(L402F)* mutáció ellenére kék telepszínűek maradtak, ami Lac represszor hiányára utal (LacI⁻ β-gal⁺) (19. ábra). Tehát, 6ZA2 és 6ZB2 szekvenciát hordozó pLacI_{NE}^{do3} plazmidvariánsoknál, az L402F mutáció bevezetése nem elegendő a hatékony *lacI* transzkripció helyreállításához.



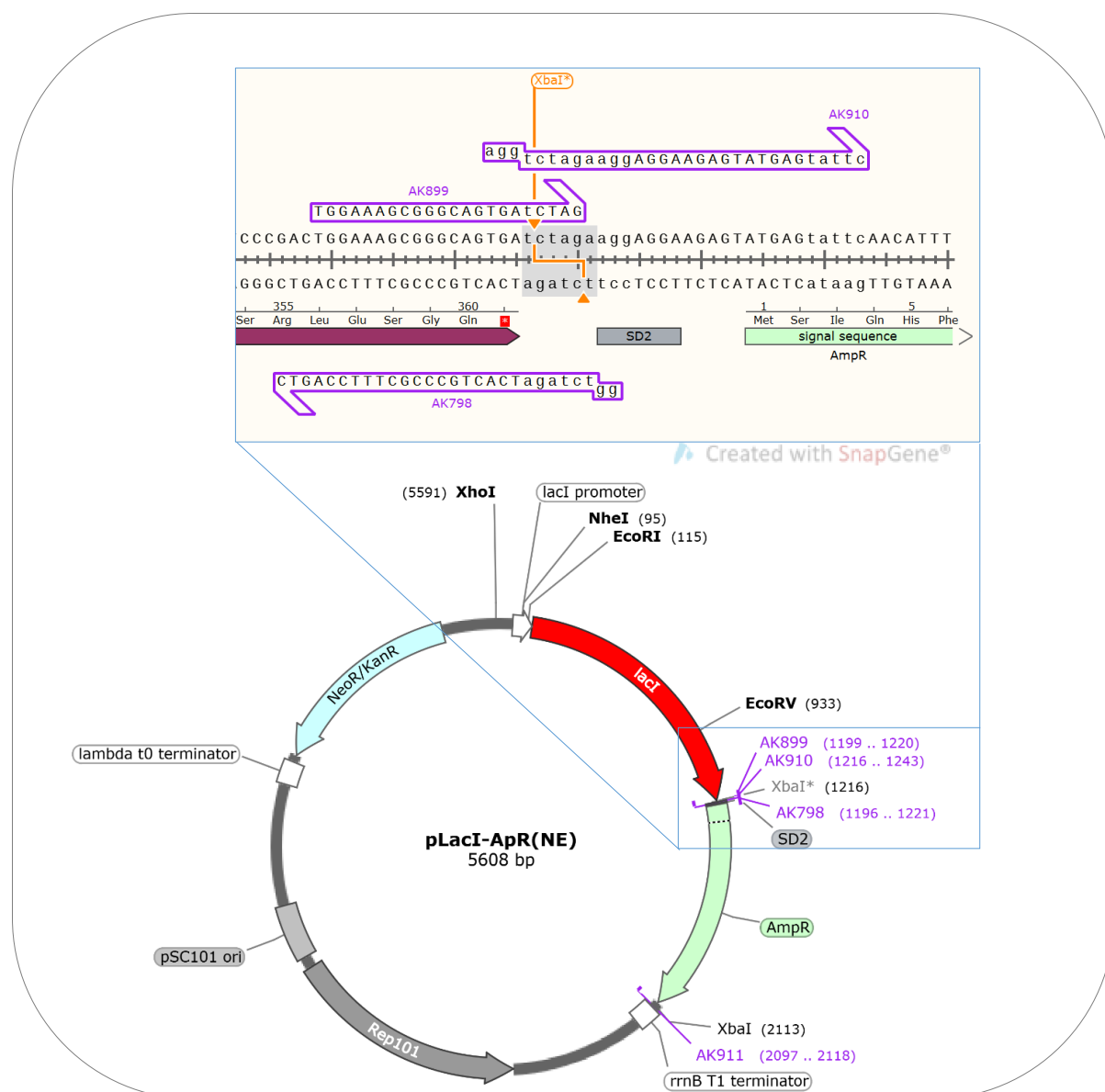
19. ábra: L402F genomi mutációt hordozó *rpoD* hatásának ellenőrzése LacI termelődésre

fehér telep: LacI⁺ β-gal⁻, kék telep: LacI⁻ β-gal⁺

V.4.3. LacI⁻ sejtek eliminálása pLacI_{NE}-N18 plazmidkönyvtárból

A pLacI_{NE}-N18 plazmidkönyvtár létrehozásának célja nem csupán az elakadást-előidéző szekvenciák vizsgálata volt, hanem az első lépés az I-Block módszer továbbfejlesztéséhez, amely segítségével azonosítani tudjuk a tesztelt fehérje kötőszekvenciáját. A pLacI_{NE}-N18 plazmidkönyvtárban azonban túl magas volt az álpozitív eredményt adó, LacI⁻ klónok száma.

A háttérben álló problémát nem sikerült egyértelműen azonosítani és kompenzálni, ezért megpróbáltunk kidolgozni egy olyan módszert, amellyel az álpozitív klónokat eliminálni tudjuk. A $LacI^+$ sejtek szelekciójához egy bicisztronos operont alakítottunk ki, amelyben a *lacI* promotert a *lacI* gén majd az ampicillin rezisztenciát biztosító β -laktamáz génje (ApR) követi. Az első és második cisztron 'stop' és kezdő kodonja között rövid, 18 bp hosszú DNS szakasz található, amely egy második SD szekvenciát kódol (20. ábra). Ez az elrendezés *lacI* és az ApR gén között transzkripció kapcsoltságot biztosít, azonban fúziós fehérje nem szintetizálódik (99).

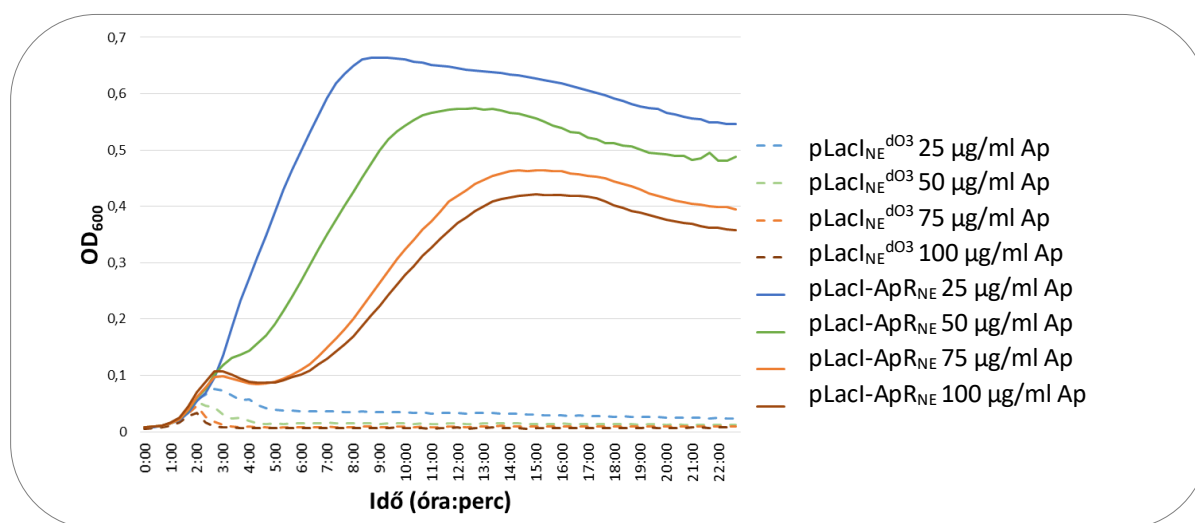


20. ábra: A *lacI*-ApR bicisztronos konstrukciót kódoló *pLacI-ApR_{NE}* plazmid

A klónozáshoz használt oligonukleotidok lilával jelöltek. Az ApR gén *XbaI* helyre lett beépítve, a *Dam* hellyel átfedő *XbaI* hely narancssárgával kiemelt.

A bicisztronos konstrukciót hordozó pLacI-ApR_{NE} plazmidot a pLacI_{NE}^{d03} plazmidot felhasználva alakítottuk ki. Utóbbiban a XbaI klónozóhely közvetlen a *lacI* gén stop kodonja mellett található (10. és 20. ábra). A β-laktamázt kódoló gént a pBAD24 vektorról amplifikáltuk AK910-AK911 primerekkel, melyek 5'-végére XbaI felismerőhelyeket terveztünk. Mivel a Dam metilációra érzékeny XbaI felismerőhelye átfed egy Dam metiláz felismerőhellyel, nem hagyományos restrikciós klónozással építettük be a rezisztencia gént. A pLacI_{NE}^{d03} vektorplazmidot AK899-AK798 oligopárral amplifikáltuk, majd az újonnan szintetizált, metilátlan plazmid DNS-t emésztettük XbaI enzimmal. Az emésztett PCR fragmentumot a XbaI kompatibilis végű, lineáris pLacI_{NE}^{d03} vektorhoz ligáltuk (20. ábra).

Az így kapott plazmidot *E. coli* ER1821 Δ*lacI* gazdában (pLacI-ApR_{NE}) X-galt és/vagy ampicillint tartalmazó agarlemezeken teszteltük. A sejtek fehér színűek maradtak, tehát LacI⁺ β-gal fenotípust mutattak, valamint nőttek ampicillin jelenlétében. Ez az eredmény bizonyította, hogy a bicisztronos konstrukcióban lévő mindkét gén kifejeződött. Megvizsgáltuk, hogy a pLacI-ApR_{NE} plazmid milyen szintű ampicillin rezisztenciát biztosít. Míg a kontrollként alkalmazott pLacI_{NE}^{d03} már 25 μg/ml ampicillin mellett életképtelen volt, a *lacI*-ApR_{NE} bicisztronos génkonstrukciót hordozó sejt jól nőtt 25 és 50 μg/ml ampicillin mellett, sőt bár gyengébben, még 100 μg/ml ampicillin mellett is képes volt növekedni (21. ábra).



21. ábra: A pLacI-ApR_{NE} plazmidot hordozó sejt növekedése különböző ampicillin koncentráció mellett. Kontroll plazmid: pLacI_{NE}^{d03}.

Elsőként megvizsgáltuk, hogy a korábban tesztelt fehérjék hogyan viselkednek az I-Block rendszerben akkor, ha a felismerőhelyük a pLacI-ApR_{NE} vektorban van. A fehérjék felismerőhelyeit NheI és EcoRI helyek közé aszimmetrikus restrikciós klónozással építettük be.

A vártak megfelelően azt láttuk, hogy minél hatékonyabb a *lacI* transzkripció, annál magasabb ampicillin koncentráció mellett életképes a sejt. Azonban, ha a Lac represszor nem fejeződik ki, akkor a sejt nem életképes ampicillin jelenlétében (22. ábra).



22. ábra: *pLacI-ApR_{NE}* variánsok ellenőrzése X-gal tartalmú lemezen és különböző ampicillin koncentrációk mellett

Fehér telep: *LacI⁺ β-gal⁻*, kék telep: *LacI⁻ β-gal⁺*. Csak *LacI⁺ β-gal⁻* sejt képes ampicillin jelenlétében növekedni, mivel a *β*-laktamáz és a *lacI* gén transzkripciója kapcsolt.

A random szekvenciát hordozó plazmidkönyvtárat *pLacI-ApR_{NE}* plazmidvektorral is elkészítettük. A *lacI* promoter ITS szakaszába inszertált szekvencia, szelektálás nélkül, nagy számban adott álpozitív, vagyis *LacI⁻ β-gal⁺* eredményt. Mivel a *lacI* gén és *β*-laktamáz gén transzkripciója kapcsolt, amennyiben a *lacI* transzkripció sérült, úgy várhatóan az ampicillin rezisztencia sem fejeződik ki. A módosított iPCR technikával létrehozott plazmidkönyvtárat a bejuttattuk a tesztözsbe, majd a megszokottól eltérően, nem szilárd táptalajra szélesztettük a sejteket, hanem 100x-os hígításban átolva, új tápoldatban növesztettük, különböző ampicillin koncentráció mellett. A transzfomálást és átolást követően a 25 és 50 µg/ml ampicillin koncentráció mellett a sejt kultúra szépen felnőtt másnapra, de 75 µg/ml mellett nem. Mielőtt hozzáadtuk nagyobb koncentrációban az ampicillint, előnövesztettük a sejteket 4 órán át, kanamicin mellett. Az így növesztett kultúrák már életképesek voltak 75 µg/ml ampicillin mellett is (4. táblázat).

4. táblázat: *pLacI_{NE}-N18 plazmidkönyvtár szelekciója ampicillinnel LacI⁺ sejtekre*

Alkalmazott ampicillin koncentráció	Másnap mért sejtsűrűség (A ₆₀₀)	X-gal lemezen számolt kék telepek százaléka
0 µg/ml		17-21%
25 µg/ml	3,22	~1%
50 µg/ml	3,06	0,8%
75 µg/ml	0,2	-
Előnövesztés 50 µg/ml Km mellett (4 óra), majd 75 µg/ml Ap	2,75	0%

A másnapra felnőtt tenyészetekből plazmidot izoláltunk. A plazmid preparátumokkal transzformáltuk az *ER1821 ΔlacI* törzset és szélesztettük X-gal tartalmú lemezre, majd másnap megszámtoltuk a kék ($\text{LacI}^- \beta\text{-gal}^+$) és fehér ($\text{LacI}^+ \beta\text{-gal}^-$) telepszínű transzformánsokat (függelék 3. táblázat, kék). Szelektálás nélkül a transzformánsok között a kék telepek aránya 17-21% körül mozgott. 25 és 50 µg/ml ampicillin mellett szelektálva az álpozitív klónok száma jelentősen csökkent, ~1%-ra (függelék 3. táblázat, kék). Előnövesztett, majd 75 µg/ml ampicillin mellett szelektált plazmidkönyvtárban nem fordult elő LacI^- változat. Az eredmények a szelekció megfelelő működését támasztják alá. Várhatóan a hosszú szelekciós idővel jelentősen csökken a plazmidkönyvtár komplexitása, vagyis az egyedi szekvenciák száma. A *lacI* promoterbe beépített szekvenciák komplexitását Illumina szekvenálással ellenőriztük. Szelekció nélkül a 47501 olvasatból 29633 esetben (62%) a tervezett, 18 bp hosszúságú szekvencia épült be, a különböző inszertszekvenciák eloszlása pedig egyenletes volt. A komplexitás azonban a hosszú szelekció alatt drasztikusan lecsökkent (5. táblázat, 23. ábra). Annak érdekében, hogy a szelekció során ne essen le az egyedi szekvenciák száma, rövidebb ideig növesztettük a sejteket ampicillin jelenlétében. Az éjszakán át kanamicin mellett növesztett kultúrát 100x hígítással átoltottuk friss LB tápfolyadékba, amely 75 µg/ml ampicillint tartalmazott és növesztettük 0,6-0,8=OD₆₀₀ értékig. A megfelelő sejtsűrűséget 5 óra alatt érte el a kultúra, melynek ¼-ed részéből kompetens sejtet készítettünk és ¼-ed részéből plazmidot izoláltunk.

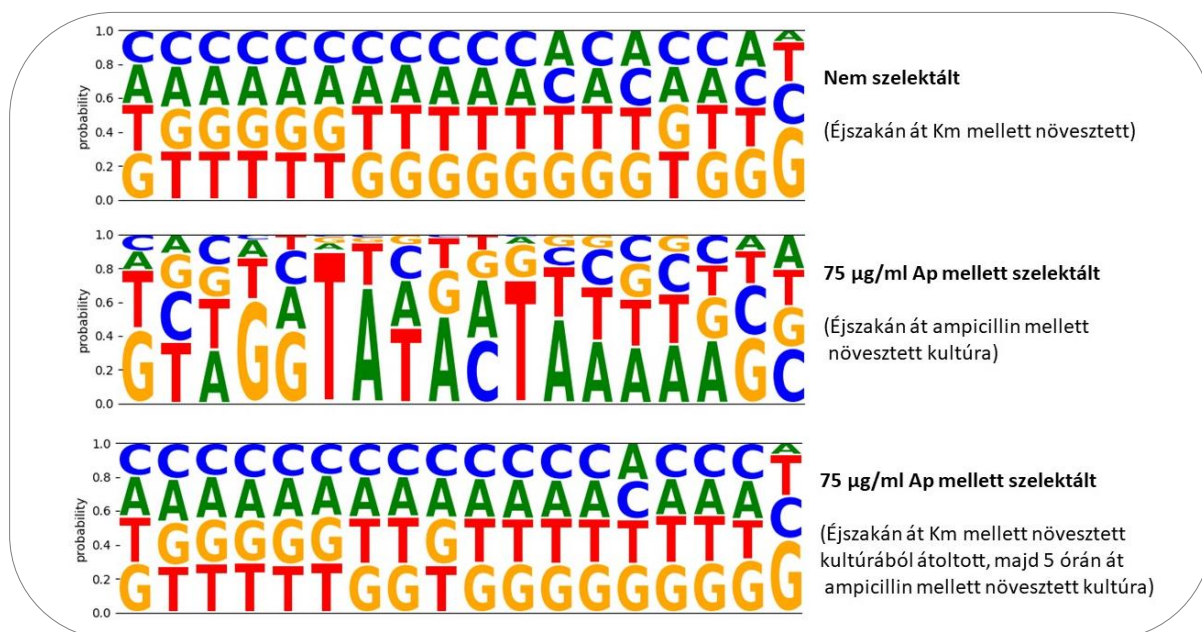
5. táblázat: *pLacI-ApR_{NE}* plazmidkönyvtár komplexitásának ellenőrzése Illumina szekvenálással

75 µg/ml Ap mellett szelektált pLacI-ApR _{NE} -N18 „plazmidkönyvtár”				
Elemzett könyvtár	18 bp inszerthossz gyakorisága	Egyedi szekvencia	Shannon-egyenletesség index	Álpozitív klónok*
Nem szelektált	62%	23%	0,96	17-21%
Hosszú szelekciós idő (16 óra)	58%	0,8%	0,36	0%
Rövid szelekciós idő (5 óra)	61%	24%	0,93	1,5-5%

*Kék telepek száma az össztelepszámhoz viszonyítva, X-gal tartalmú lemezen

(Teljes elemzés: függelékek 6. táblázat, kék)

A szekvenciákat Illumina szekvenálással határoztuk meg. A komplexitás közel azonos volt a kiinduló, nem szelektált plazmidkönyvtárával (23. ábra). Az álpozitív klónok (LacI⁻) számát X-gal lemezen ellenőriztük. A kiindulási arányhoz mérten jelentősen csökkent a kék telepszínt adó, LacI⁻ sejtek aránya, 1,5-5%-ra (5. táblázat és függelékek 3. táblázat, kék).

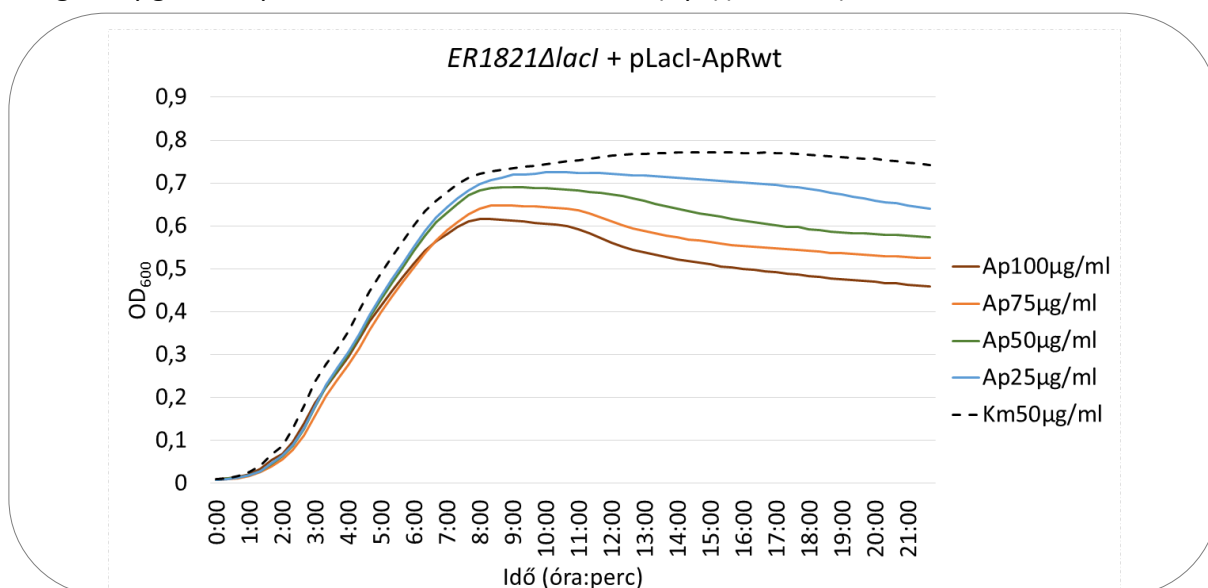


23. ábra: Illumina szekvenálással ellenőrzött szekvenciákból készített szekvencia logók

Az éjszakán át tartó szelekcióval a plazmidkönyvtár komplexitása drasztikusan lecsökken. Az 5 órás szelekcióval az egyedi szekvenciák eloszlása nem változik jelentősen a kontroll, nem szelektált könyvtárhoz képest. (Teljes elemzés: függelékek 6. táblázat, kék)

V.4.4. A pLacI-ApR plazmidon lévő *lacI* promoter erősségének növelése

A bicisztronos konstrukcióban feltételezhetően a 2. cisztronról kifejeződő β -laktamáz nagyon alacsony koncentrációban van a sejtben. Korábban kimutattuk, hogy a *lacI_{NE}* promoter gyengébb, mint a vad típusú *lacI* promoter (7. ábra). Annak érdekében, hogy növeljük a bicisztronos konstrukció által biztosított ampicillin rezisztenciát, a *lacI_{NE}* promotert az eredeti *lacI* promoterre (*lacI_{wt}*) cseréltük a pLacI-ApR plazmidon. A *lacI_{wt}* promotert hordozó XhoI-EcoRI fragmentumot a pUA-lacI plazmidról klónoztuk át a pLacI-ApR_{NE} vektorra (20. ábra). Az így kapott, vad típusú *lacI* promotert hordozó plazmidot pLacI-ApR_{wt}-nak neveztük el. A plazmidot hordozó telepek fehérek maradtak az X-gal tartalmú lemezen (LacI^+ β -gal) és nőttek még 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin koncentráció mellett is (Ap^R)(24. ábra).



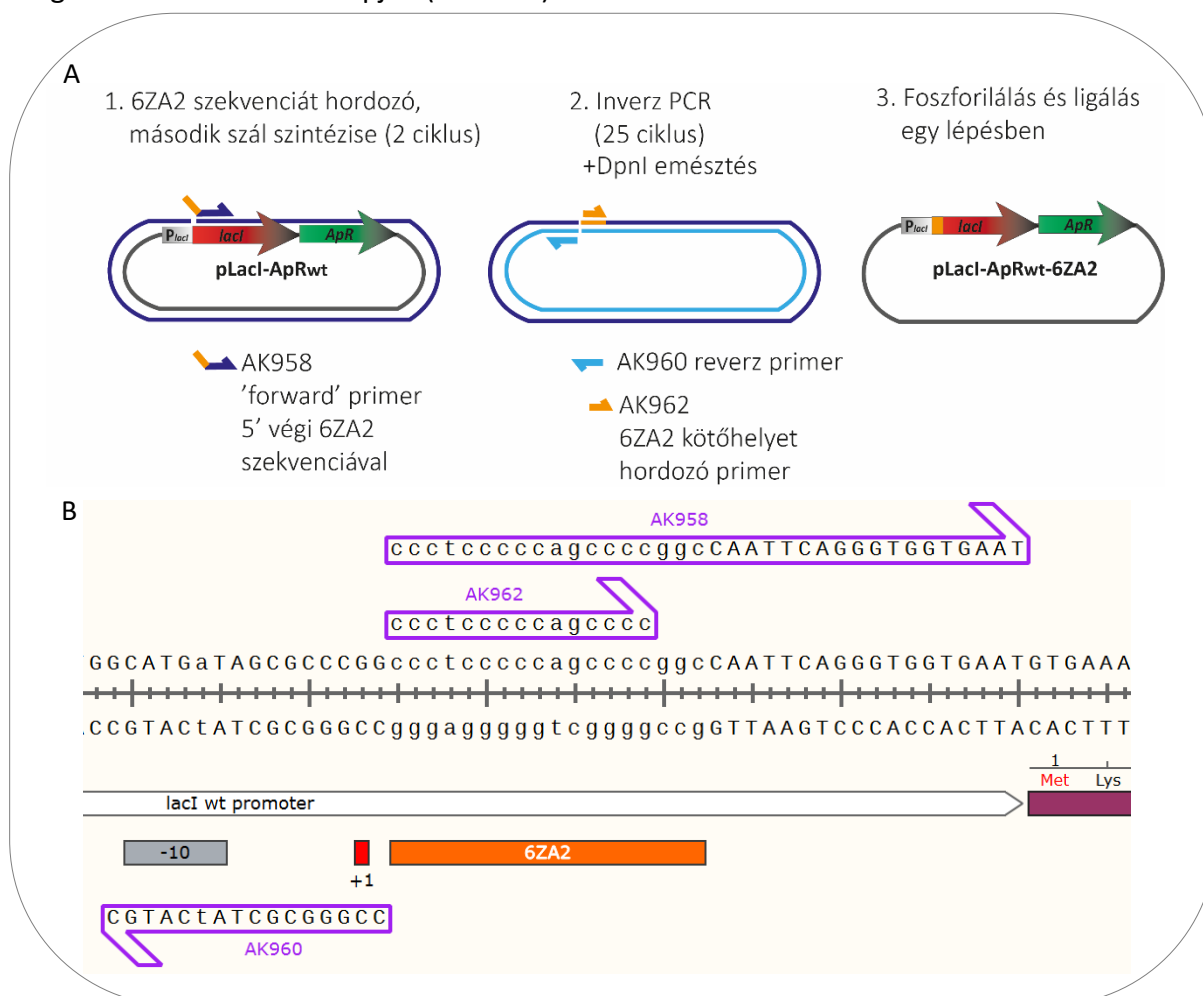
24. ábra : A pLacI-ApR_{NE} plazmid által kiváltott ampicillin rezisztencia.

A pLacI-ApR_{wt} plazmidot hordozó sejt növekedése különböző ampicillin koncentráció mellett.

Kontroll: kanamicin mellett növesztett kultúra (szaggatott vonal).

Korábban megfigyeltük, hogy a *lacI_{NE}* promoterbe inszertált 6ZA2 szekvencia gátolta a *lacI* gén kifejeződését (LacI^- β -gal⁺). Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy a 6ZA cink-ujj fehérje felismerőszekvencia beépítése a *lacI_{wt}* promoterbe hogyan befolyásolja annak működését. A *lacI_{wt}* promoterben nincs NheI és EcoRI klónozóhely, így restrikciós klónozás helyett inverz-PCR technikával építettük be a felismerőszekvenciákat a *lacI_{wt}* promoter ITS szekvenciájába. Hasonló körülményeket alkalmaztunk, mint korábban a random szekvencia beépítésénél (14. ábra, 2. táblázat), azonban a random szekvencia helyett a 6ZA1 vagy 6ZA2 szekvenciát hordozta a 'reverz' primer az 5' végén (6ZA1: AK951, 6ZA2: AK952; függelék 2. táblázat).

A reakcióköörülményeken több ponton is változtatnunk kellett annak érdekében, hogy a megfelelő PCR terméket kapjuk (25. ábra).



25. ábra: A pLacI-ApRwt-6ZA2 plazmidváltozat létrehozása iPCR technikával

A: A 6ZA2 szekvencia beépítése módosított iPCR technikával

B: A pLacI-ApRwt-6ZA2 plazmid lacI promotere a klónozást követően (SnapGene)

Először megcseréltük a primereket olyan értelemben, hogy a 6ZA felismerőszekvenciát ne a 'reverz' primer, hanem a 'forward' primer hordozza az 5' végén. Ez azért volt indokolt, mert a -10-es elem és a +2 közötti szekvencia önmagában is GC gazdag (GC%=67%), a csaknem tisztán GC nukleotidokból álló (GC%=89%) 6ZA szekvenciával együtt a GC% tovább emelkedett, 79%-ra. Az AK951 és AK952 'reverz' primerek helyett új, 6ZA szekvenciát hordozó 'forward' primereket terveztünk (6ZA1: AK957, 6ZA2: AK958, függelékek 2. táblázat). Az AK957 vagy AK958 primerekkel elkészítettük az új, 6ZA kötőhelyet hordozó templátot, ahol a 6ZA kötőszekvencia a transzkripció kezdőhely után (+2) kezdődik, a korábbiakkal megegyezően. A második szál szintézise során alacsonyabb (0,4 μ M végkoncentráció helyett, 0,2 μ M) koncentrációban adtuk hozzá az inszertszekvenciát hordozó primereket (AK957/AK958) és 10

ciklus helyett csak 2 ciklust alkalmaztunk. A második szál szintézisét követően a PCR reakciót a 6ZA szekvenciát hordozó újonnan szintetizált templát DNS két végéhez hibridizáló primerek hozzáadásával indítottuk (6ZA1: AK961, 6ZA2: AK962, 'reverz' primer: AK960). A szokásos módon, a reakció végén DpnI enzimmel elimináltuk az eredeti vektor DNS-t és a PCR terméket egy reakcióelegyben foszforiláltuk és ligáltuk (25. ábra). A transzformálást követően izoláltuk és restrikciós emésztéssel, valamint szekvenálással ellenőriztük a rekombináns plazmidokat. Az eredmények alapján hatékonyan beépíthető az egyedi inszertszekvencia az alkalmazott módosított iPCR technikával.

A pLacI-ApR_{wt}-6ZA1 és pLacI-ApR_{wt}-6ZA2 plazmidváltozatok után a pLacI-ApR_{wt}-λO_R1 plazmidot is létrehoztuk hasonló módon, az AK963 és AK964 oligonukleotidok felhasználásával (függelék 2. táblázat). Az új variánsok LacI termelődését először X-gal tartalmú lemezen ellenőriztük. LacI⁺ β-gal⁻ fenotípust (fehér telepek) láttunk a 6ZA1 és a 6ZA2 szekvenciát hordozó promoterváltozattal is (26. ábra). Tehát, a *lacI_N* és *lacI_{NE}* promoterrel kapott eredményekkel szemben, a vad típusú promoterbe épített 6ZA2 szekvencia nem gátolja meg a *lacI* transzkripciót. Ez összhangban van azzal a korábbi eredményünkkel, amely szerint a vad típusú *lacI* promoter erősebb, mint a *lacI_N* változat (7. ábra). Meglepő módon a λO_R1 operátort hordozó variáns LacI⁻ β-gal⁺ fenotípust mutatott (26. ábra).



26. ábra: pLacI-ApR_{wt} variánsok tesztelése Km+X-gal tartalmú agar lemezen

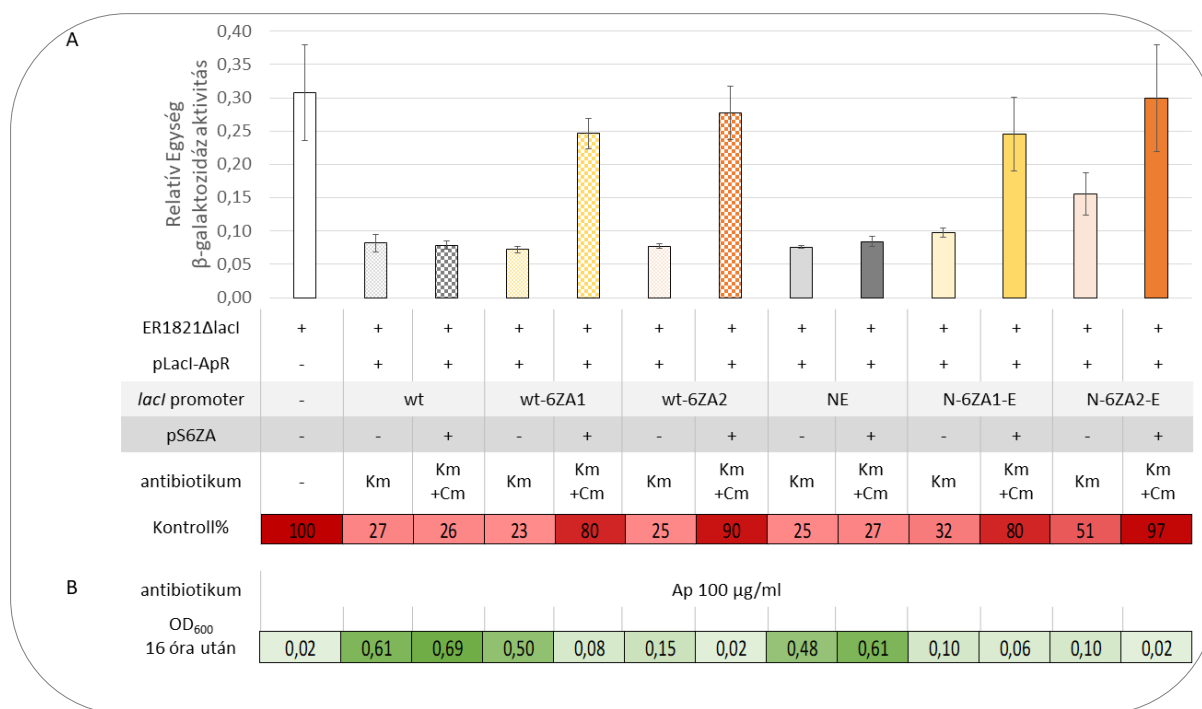
Kék telep: LacI⁻ β-gal⁺, fehér telep: LacI⁺ β-gal⁻ fenotípus.

6 biológiai ismételés

A pLacI_{NE}-N-λO_{1,2}-E és pLacI_{NE}-N-λO_{2,1}-E plazmidokkal korábban nem láttuk ezt a problémát, pedig az egymást követő O_R1 és O_R2 operátor közel 50 bp hosszú szekvencia, mégsem gátolta meg a LacI termelődést egyik orientációban sem (LacI⁺ β-gal⁻) (11. ábra).

A két inszertszekvencia az O_R1 szekvencia végéig megegyezett a $pLacI_{NE}$ -N- $\lambda O1,2$ -E és a $pLacI$ - ApR_{wt} - λO_R1 plazmidoknál, mégis a rövidebb szekvencia volt negatív hatással a transzkripcióra. Ezt a furcsa viselkedést az magyarázhatja, hogy az O_R1 operátor szekvencia beépülését követően a határoló szekvenciával egy 5' – TACAAT – 3' szekvencia alakult ki, amely nagyon hasonlít a -10-es elem konszenzus szekvenciájához (5' – TATAAT – 3', az eltérést aláhúzással jelöltem). Ez a korábbi hipotézisünkkel is összhangban van, amely szerint a -10-es elem konszenzus szekvenciához hasonló szekvenciáknál a polimeráz elakad. A jövőben tervezzük a beépítés helyét eltolni pár nukleotiddal downstream irányban (3' irányban), hogy az inszertszekvenciát ne 'CAATTC' szekvencia kövesse, mellyel könnyedén kialakulhat -10-es elemhez hasonló szekvencia.

Korábbi méréseink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az I-Block módszer során a specifikus kötés kimutatásához alacsony $LacI$ koncentrációra van szükség a sejtben. A $lacI_{wt}$ promoterre való áttéréssel valószínűleg megemelkedett a Lac represszor szintje, ezért megvizsgáltuk, hogy a megemelkedett Lac represszor koncentráció nem gátolja-e a 6ZA fehérje specifikus kötődésének kimutatását. A méréshez a 6ZA fehérjét konstitutíven termelő $pS6ZA$ plazmiddal transzformáltuk az $ER1821 \Delta lacI$ sejtet, majd a transzformánsokból kompetens sejtet készítettünk. A $pLacI$ - ApR_{wt} és $pLacI$ - ApR_{NE} plazmidvariánsokat $ER1821 \Delta lacI$ kompetens sejtbe, valamint a $pS6ZA$ plazmidot hordozó $ER1821 \Delta lacI$ kompetens sejtbe transzformáltuk. Mikrotiter lemezben éjszakán át, megfelelő antibiotikum mellett felnövesztett sejteket másnap áttöltöttük a β -galaktozidáz szint meghatározásához. Egy másik lemezbe áttöltve a starter kultúrát, ellenőriztük a sejtek növekedését 100 $\mu g/ml$ ampicillin mellett (27. ábra). A $lacI_{NE}$ promoternél a 6ZA1 szekvencia nem, de a 6ZA2 szekvencia meggátolta a Lac represszor kifejeződését, valamint a plazmidot hordozó sejt nem volt képes növekedni magas ampicillin koncentráció mellett. Ezzel szemben a vad típusú promoterbe inszertált 6ZA szekvencia egyik orientációban sem zavarta meg a $lacI$ - ApR transzkripcót. A $pLacI$ - ApR_{wt} variánsokat hordozó sejtekben alacsony β -galaktozidáz szintet mértünk és még magas koncentrációjú ampicillin jelenlétében is nőttek, habár a 6ZA2 szekvenciát hordozó plazmiddal alacsonyabb sejtsűrűséget mértünk. Ez arra utal, hogy a promoter aktivitás növelése miatt ugyan megemelkedett a $LacI$ koncentráció, azonban a 2. cisztronról kifejeződő β -laktamáz szintje nem elegendő, hogy kellő mértékben megnyilvánuljon az ampicillin rezisztencia.



27. ábra: I-Block mérés pLacI-ApR_{wt} és pLacI-ApR_{NE} plazmidvariánsokkal

A: β-galaktózidáz szint mérése a 6ZA cink-ujj fehérje nélkül és jelenlétében. Az oszlopok alatt százalékban kifejezett értékek a β-galaktózidáz aktivitásnak a plazmid nélküli gazda β-galaktózidáz szintjéhez viszonyított értékét mutatják. 5 biológiai ismétlés. Relatív egység: OD₄₂₀/OD₆₀₀

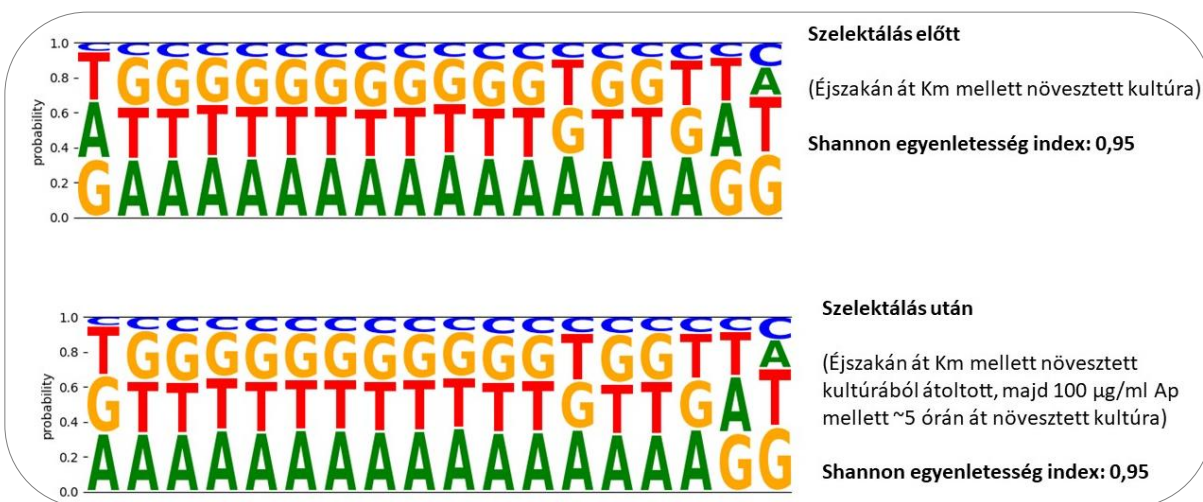
B: Ampicillinnel szembeni rezisztencia mérése.

A 6ZA cink-ujj jelenlétében mindkét promoterral kimutatható a specifikus kötés. A különbség a 6ZA fehérje jelenlétében és hiányában minden esetben szignifikáns, azonban X-gal tartalmú lemezen *lacI*_{NE} promotert hordozó sejtek 6ZA hiányában is kék telepszínűek, ami álpozitív eredményhez vezethet. A pLacI-ApR_{NE}-6ZA2 plazmidot hordozó sejtek a 6ZA cink-ujj fehérje jelenléte nélkül sem képesek növekedni ampicillin mellett (*LacI*⁻ β-gal⁺ Ap^S). Ellenben a vad típusú promoterral, a pLacI-ApR_{wt}-6ZA2 plazmidot hordozó sejt 6ZA cink-ujj hiányában *LacI*⁺ β-gal⁻ Ap^R fenotípust, a 6ZA fehérje mellett pedig *LacI*⁻ β-gal⁺ Ap^S fenotípust mutat, a vártak megfelelően. Tehát a vad típusú promoterral az I-Block mérés a 6ZA cink-ujj felismerőhely mindkét irányával működik.

V.4.5. A transzkripció blokk mérséklése az inszertszekvencia nukleotidarányának eltolásával

A 6ZA cink-ujj fehérje felismerőhelye az 1. orientációban az ábrázolás szerinti felső (nem-templát) szálon 72%-ban guanin nukleobázist hordoz, a 2. orientációban pedig citozint. Az eredményeink arra mutatnak, hogy az ITS szekvencián belül előnytelen a citidinben gazdag szekvencia.

A hipotézis igazolásához újabb plazmidkönyvtárat készítettünk, ahol az inszertált random szekvencia citozinban szegény a felső, nem templát szálon. Az AK848 primer mintájára újratervezetük az 5' végen random szekvenciát hordozó oligonukleotidot, úgy hogy a random szekvenciárészen a nukleobázisok aránya A:G:C:T=30:10:30:30 legyen, vagyis a guanozin előfordulását $1/10$ -re csökkentettük a random szekvencián belül. A random szekvencia beépítését azonos körülmények között, módosított inverz-PCR technikával végeztük (2. táblázat, 14. ábra), csak az AK848 primer helyett a random szekvenciánál a guanozinban csökkentett, AK933 primerrel (függelék 2. táblázat). Mivel az alsó szála épül be a guanozinban szegény szekvencia, a komplementer felső szál citidinben lesz szegény. Templátként pLacI-ApR_{NE} vagy pLacI-ApR_{wt} plazmidot használtuk, létrehozva a pLacI-ApR_{NE}-N18($1/10$ C) vagy a pLacI-ApR_N-N18($1/10$ C) plazmidkönyvtárakat. A plazmidkönyvtárakat bejuttattuk *ER1821 ΔlacI* kompetens sejtbe, majd Km+X-gal tartalmú lemezekre szélesztettük. A korábbiakhoz mérten az álpozitív klónok száma (kék telep: LacI⁻ β-gal⁺ Ap^S) felére, 17-21%-ról 8-14%-ra csökkent (függelék 3. táblázat, zöld és piros). Ez a jelentős különbség alátámasztja a hipotézisünket, miszerint az ITS nem-templát szálán a citidinben gazdag szekvencia gátolhatja a génátíródást. A LacI⁺ sejtek szelektálásához a pLacI-ApR_N-N18($1/10$ C) plazmidkönyvtárat hordozó transzformáns sejtetket éjszakán át kanamicin mellett növesztettük. Másnap 100 μg/ml ampicillin mellett 5 órán növesztettük, míg a tenyészet el nem érte a megfelelő sejtsűrűséget. Végül plazmidot izoláltunk és kompetens sejtet készítettünk a kultúrából. A szelekció hatását Km+X-gal tartalmú lemezen ellenőriztük. A kék telepek száma az összelepszámhoz viszonyítva 0,19%-ra esett le a szelektálást követően, ami a kiindulási 17-21%-hoz képest jelentős különbség (függelék 3. táblázat, piros).



28. ábra: A pLacI-ApR_N-N18($1/10$ C) könyvtár komplexitásának ellenőrzése Illumina szekvenálással

(Teljes elemzés: függelék 6. táblázat, piros)

Illumina szekvenálással ellenőriztük a plazmidkönyvtárban az egyedi szekvenciák előfordulását. A kiindulási, nem szelektált könyvtárhoz szinte azonos komplexitású maradt a 100 µg/ml ampicillin mellett szelektált könyvtár. Tehát az álpozitív klónok számának csökkenése valóban a citozinban szegény szekvenciának köszönhető, nem az egyedi szekvenciák számának csökkenése (28. ábra).

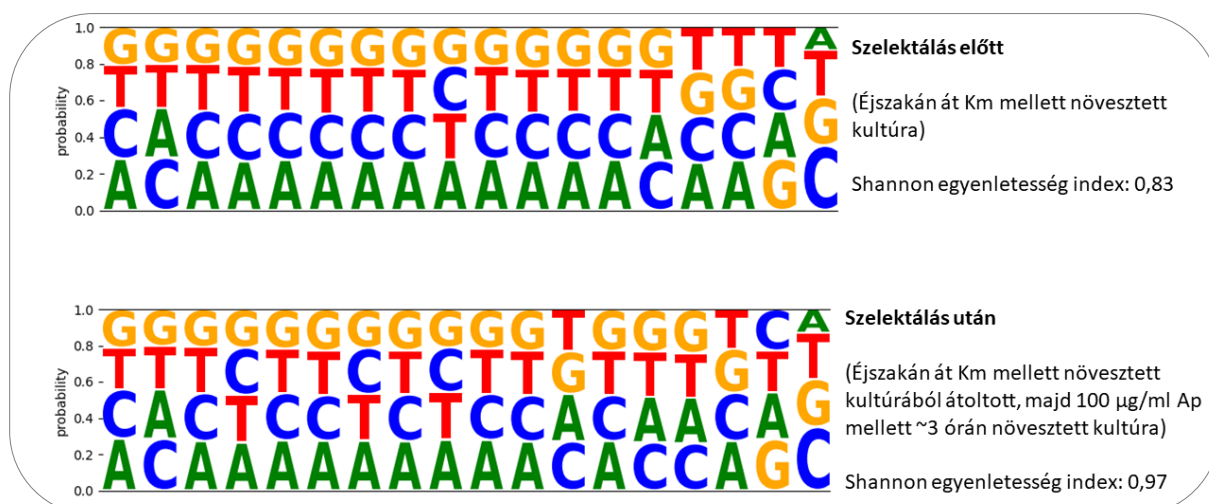
V.4.6. A plazmidkönyvtár komplexitásának növelése erősebb *lac* promoter alkalmazásával

Fenti eredményeink azt mutatták, hogy a citidinben gazdag szekvencia az ITS-en belül csökkent a *lacI* transzkripció hatékonyságát. A 6ZA2 szekvencia, amely kimondottan gazdag citidinben, a vad típusú promoterbe építve nem vezetett transzkripció blokkhoz. A *lacI_{wt}* promoter alkalmazása várhatóan más, transzkripció elakadást előidéző szekvenciák jelenléte ellenére is magasabb Lac represszor szinthez vezet. Az AK936 és AK900 (függelékek 2. táblázat) az AK848-AK849 primerpárhoz hasonló oligonukleotidok, de nem hordozzák az NheI és EcoRI felismerőhelyeket, a szekvenciájuk a vad típusú *lacI* promoterével azonos. A korábbiakban ismertetett módon (2. táblázat, 14. ábra) az AK936-AK900 primerpárral beépítettük a 18 bp hosszú random szekvenciát a *lacI_{wt}* promoter ITS szakaszába. A Km és X-gal tartalmú lemezen felnőtt transzformánsok között 23% volt az álpozitív ($LacI^- \beta\text{-gal}^+$), kék telepek százalékos aránya az összelepszámhoz képest (függelékek 3. táblázat, sárga). Ez hasonló eredmény volt, mint az AK848-849 primerpárral, azonban a telepek jelentős része halványabb kék színű volt, amely emelkedett Lac represszor és csökkent β -galaktozidáz szintre utalt, amely előnyös az I-Block módszernél.

A $LacI^-$ sejteket eliminálásához a pLacI-ApR_{wt}-N18 plazmidkönyvtárat, a transzformálást követően, 100 µg/ml ampicillin mellett növesztettük. A vad típusú promoterrel a kultúra már 3-3,5 óra alatt elérte a 600 nm-en mért, 0,8 optikai denzitást. A kultúrából kompetens sejtet készítettünk és plazmid DNS-t tisztítottunk. A plazmidpreparátum szekvenciakomplexitásának jellemzésére Illumina szekvenálást végeztünk, melynek eredményét a 29. ábra mutatja. A kompetens sejtekből hígítási sort készítettünk és különböző hígításokból meghatároztuk az álpozitív klónok számát Km és X-gal tartalmú lemezen. A szelekció nélküli értékhez (23%) viszonyítva jelentősen lecsökkent a kék telepek aránya (0,73%-ra) (függelékek 3. táblázat, sárga).

Az álpozitív klónok száma a pLacI-ApR_{wt}-N18 plazmidkönyvtár szelektálása után 0,5%-kal több, mint a pLacI-ApR_N-N18(¹/₁₀C) könyvtárnál, azonban a pLacI-ApR_{wt}-N18 plazmidkönyvtárban a

citidinben gazdagabb szekvenciák is fennmaradhattak, amely növeli a vizsgált DNS-kötő fehérje kötőhelyének azonosításának esélyét. Tehát a vad típusú promotert hordozó pLacI-ApR_{wt}-N18 plazmidkönyvtár alkalmasabb a specifikus kötőhelyek kereséséhez.



29. ábra: A vad típusú promotert hordozó, pLacI-ApR_{wt}-N18 könyvtár komplexitásának ellenőrzése Illumina szekvenálással

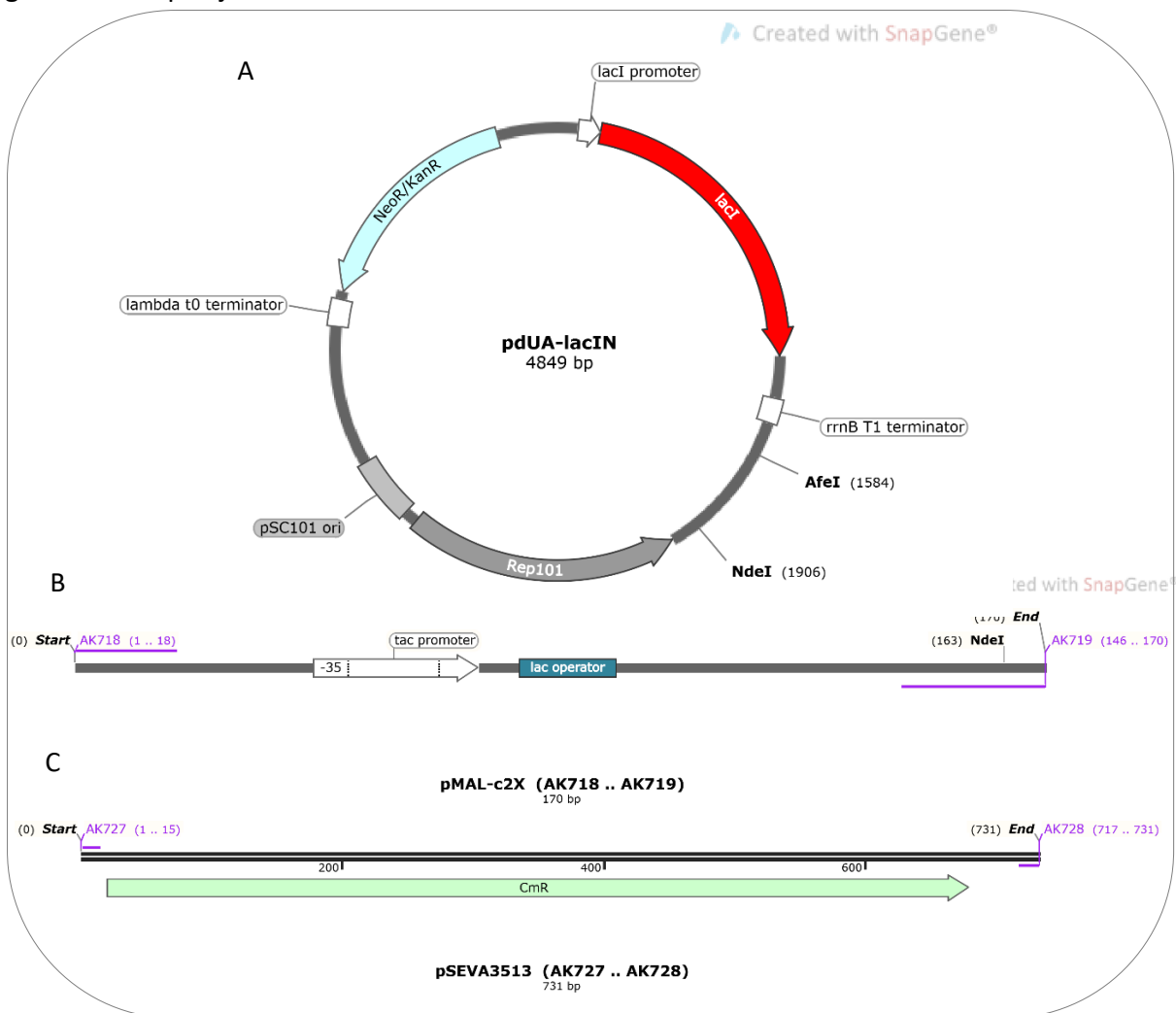
(Teljes elemzés: függelék 6. táblázat, sárga)

V.4.7. Az ER1821 $\Delta lacI$ törzs átalakítása direkt szelektáláshoz

A telepszín alapján való megkülönböztetés nem alkalmas arra, hogy egy specifikus kötést mutató klónt nagy telepszámú háttérből izoláljunk, így az I-Block módszer eredeti változatában nem használható nagy komplexitású szekvenciakönyvtár kezelésére, tehát például arra, 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 antibiotikum rezisztencia megjelenésén alapszik.

A pLacI könyvtárfejlesztéssel párhuzamosan kezdtük el az antibiotikum rezisztencián alapuló szelekciós rendszer kialakítását, ezért a pLacI_N plazmiddal dolgoztunk a később létrehozott pLacI-ApR_{wt} konstrukció helyett (30.A ábra, 36. ábra). A pLacI_N plazmidra klónoztuk a kloramfenikol-acetiltransferáz gént, fúzióba hozva az erős és általánosan használt *tac* promoterrel (100,101). A *tac* promoter -10 régiójától downstream *lacO1* operátor szekvenciát hordoz, így azt vártuk, hogy az azonos plazmidon kódolt Lac represszor jelenlétében visszaszorul a rezisztencia gén kifejeződése (30. ábra). pLacI_N-CAT_{tacO1} plazmid létrehozásához először pMALc2x plazmidról AK718-719 primerekkel amplifikáltuk a *tac* promotert a *lacO1* operátor szekvenciával együtt.

Az ampikont a pLacI_N plazmid NdeI-AfeI helyei közé klónoztuk, így létrehozva pLacI_N-tac plazmidot. pSEVA3513 plazmidról AK720-721 primerekkel amplifikált *cat* gént a pLacI_N-tac plazmid NdeI helyére építettük be. A beépítés előtt az NdeI végeket feltöltöttük Klenow fragmenttel. Az így létrehozott pLacI_N-CAT_{tacO1} plazmidvariáns működését *ER1821 ΔlacI* törzsben ellenőriztük, IPTG induktor jelenlétében és hiányában. Az IPTG a represszorhoz kötődve annak konformációváltozását idézi elő, így a represszor fehérje elveszíti specifikus affinitását az operátor DNS szekvenciához. IPTG jelenlétében a transzformáns sejtek nőttek kloramfenikolt tartalmazó lemez felszínén, tehát a pLacI_N-CAT_{tac} plazmidról kifejeződött a kloramfenikol-acetiltransferáz. Azonban a sejtek IPTG hiányában is nőttek gyengén, ami arra utal, hogy a plazmidról termeltetett Lac represszor nem volt képes teljesen represszálni a *cat* gén transzkripcióját.



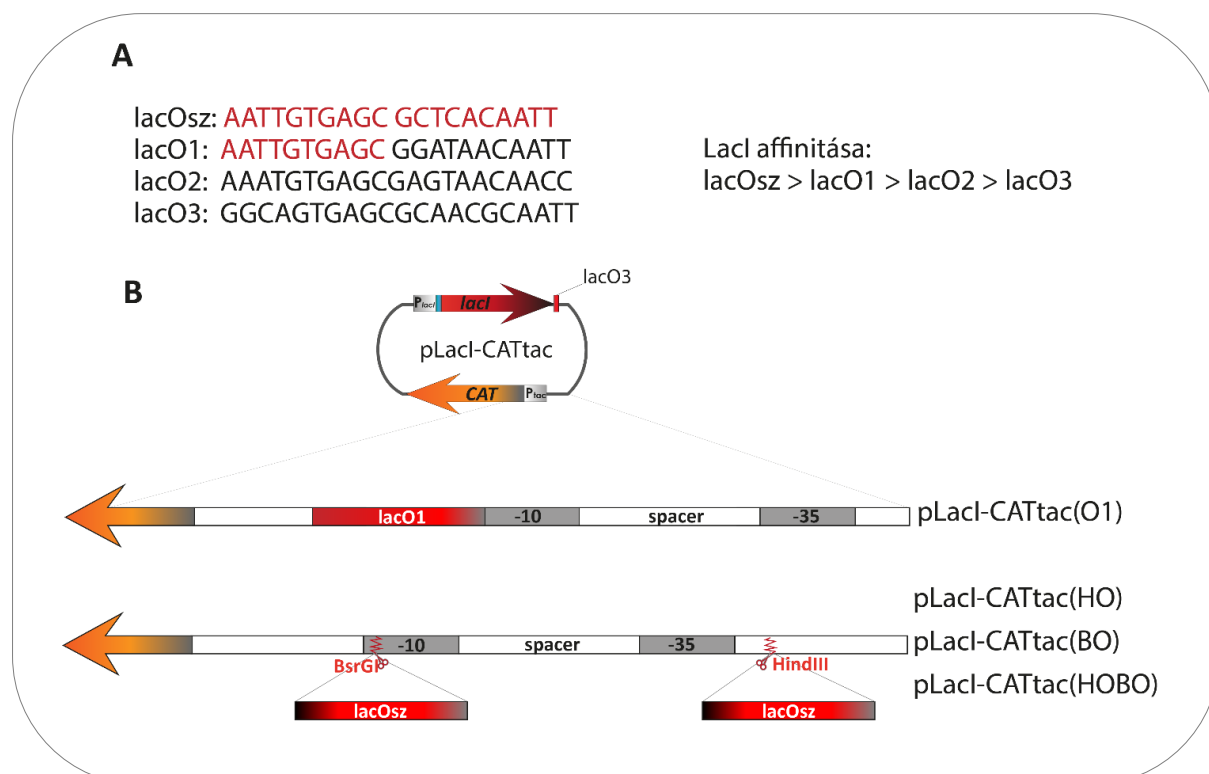
30. ábra: A *tac* promoter és *cat* gén klónozása pLacI_N plazmidvektorra

A: A pLacI_N plazmid térképe, klónozáshoz használt AfeI és NdeI helyek jelölve

B: A pMAL-c2x plazmidról amplifikált *P_{tac-lacO1}* szekvencia;

C: pSEVA3513 plazmidról amplifikált *cat* gén

A *lac-operon*ban található három operátor közül az O1 szekvenciához kötődik legerősebben a LacI represszor. Létrehoztak egy szimmetrikus operátorváltozatot, mely az O1 szekvencia nagyobb affinitású felének palindrom változata. A szintetikus, szimmetrikus „Osz” operátorhoz a LacI represszor nagyobb affinitással kötődik, mint az eredeti O1 szekvenciához (31.A ábra) (14). Az O1 operátor helyett a szintetikus operátort (Osz) klónoztuk be a *tac* promoter -10 elem és/vagy -35 elem közelébe. Először a pLacI_N plazmid NdeI-AfeI helyére építettük be a *tac* promotert hordozó AK742-743 oligoduplexet (30.A és 31.B ábra).



31. ábra: A kloramfenikol rezisztencia gén szabályozásához készített *tac* promoter változatok

A: A Lac represszor felismerőszekvenciái. Legnagyobb affinitással a szintetikus operátorhoz (Osz) kötődik a LacI, amely a lacO1 szekvencia felének (pirossal kiemelve) palindrom változata.

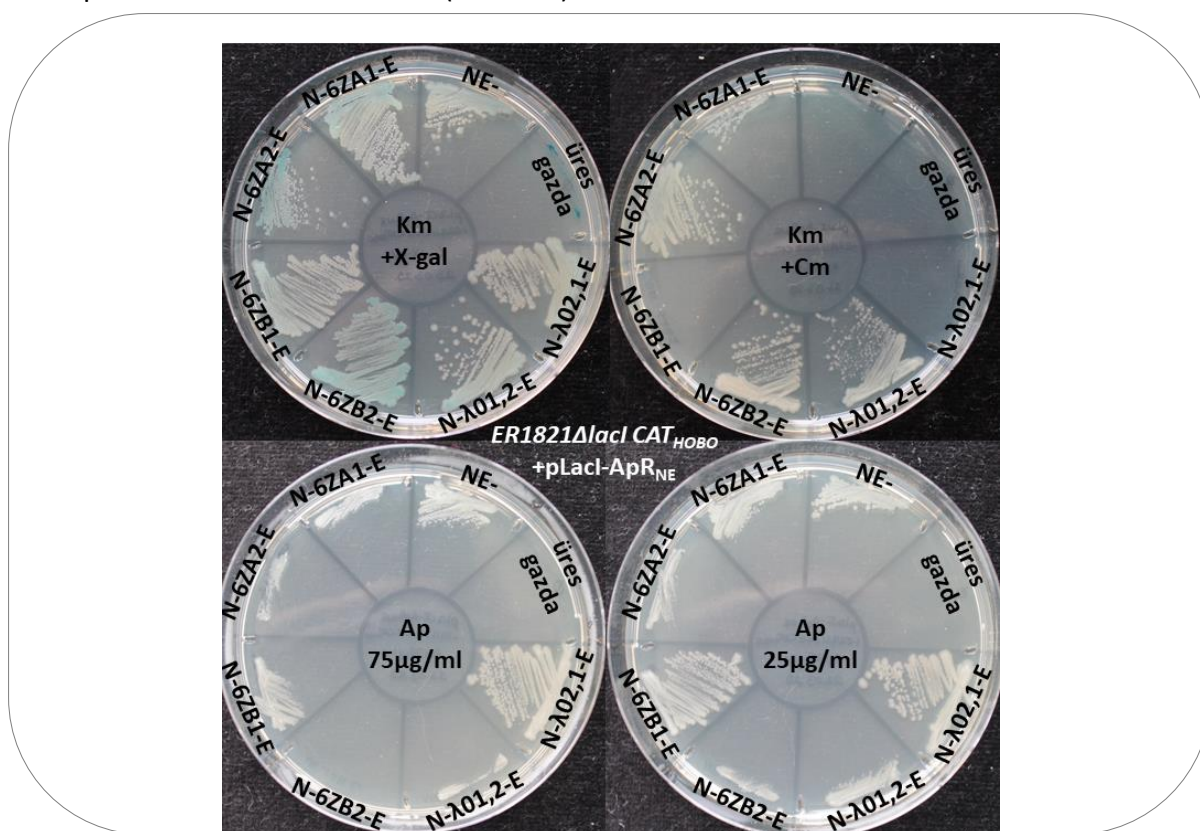
B: pLacI-CAT_{tac} plazmidváltozatok *tac* promoterei.

Beépülés után a *tac* promoter -10-es elemével átfedő BsrGI hely keletkezik, valamint a -35 elemével átfedve is létrejön egy egyedi HindIII restrikciós hely. A rekombináns plazmid NdeI helyére építettük be a *cat* gént. Két, önmagával duplexet alkotó oligonukleotiddal (AK744 és AK745), építettük be a szintetikus *lac operátort* (O_{sz}), a vektor BsrGI és/vagy HindIII helyébe (függelék 2.táblázat, 31.B ábra).

Különböző plazmidvariánsokat hoztunk létre, attól függően, hogy egy vagy két kópiában tartalmazza a lacO_{sz} szekvenciát. A pLacI_N-CAT_{tacHO} a HindIII helyben, a pLacI_N-CAT_{tacBO} a BsrGI helyben, a pLacI_N-CAT_{tacHOB} pedig mindkét helyben hordozza a szintetikus operátor-

szekvenciát. Amennyiben az 'Osz' operátort csak egy kópiában hordozta a *tac* promotor, a LacI nem tudta teljesen represszálni a génátíródást, így kloramfenikol jelenlétében is nőttek gyengén a sejtek. A $pLacI_N-CAT_{tac(HOBO)}$ plazmidon már nem volt tapasztalható a promotor „szivárgása”. Tehát, a promotor két kritikus pontjára beépített lac_{Osz} operátor teljes génrepresszióhoz vezetett az azonos plazmidról termeltetett Lac represszor jelenlétében.

A rendszer egyszerűsítése és stabilitása érdekében, a $tac_{HOBO}-cat$ génkonstrukciót az *ER1821 $\Delta lacI$* törzs genomjába integráltuk. A genomi beépítést egy Tn7 transzpozon alapú technika segítségével végeztük (102). A $tac_{HOBO}-cat$ génkonstrukció az *ER1821 $\Delta lacI glmS$* gén közelében épült be. Az *ER1821 $\Delta lacI$ CAT_{HOBO}* törzset először $pLacI-ApR_{NE}$ plazmidváltozatokkal ellenőriztük. Különböző DNS-kötő fehérjék felismerőszekvenciáját hordozó $pLacI-ApR_{NE}$ plazmidvariánsokat bejuttattuk az *ER1821 $\Delta lacI$ CAT_{HOBO}* törzsbe, majd a kanamicin tartalmú lemezen felnőtt transzformánsokat áthúztuk kanamicin és X-gal, kanamicin és kloramfenikol és ampicillin tartalmú lemezekre. (32. ábra).

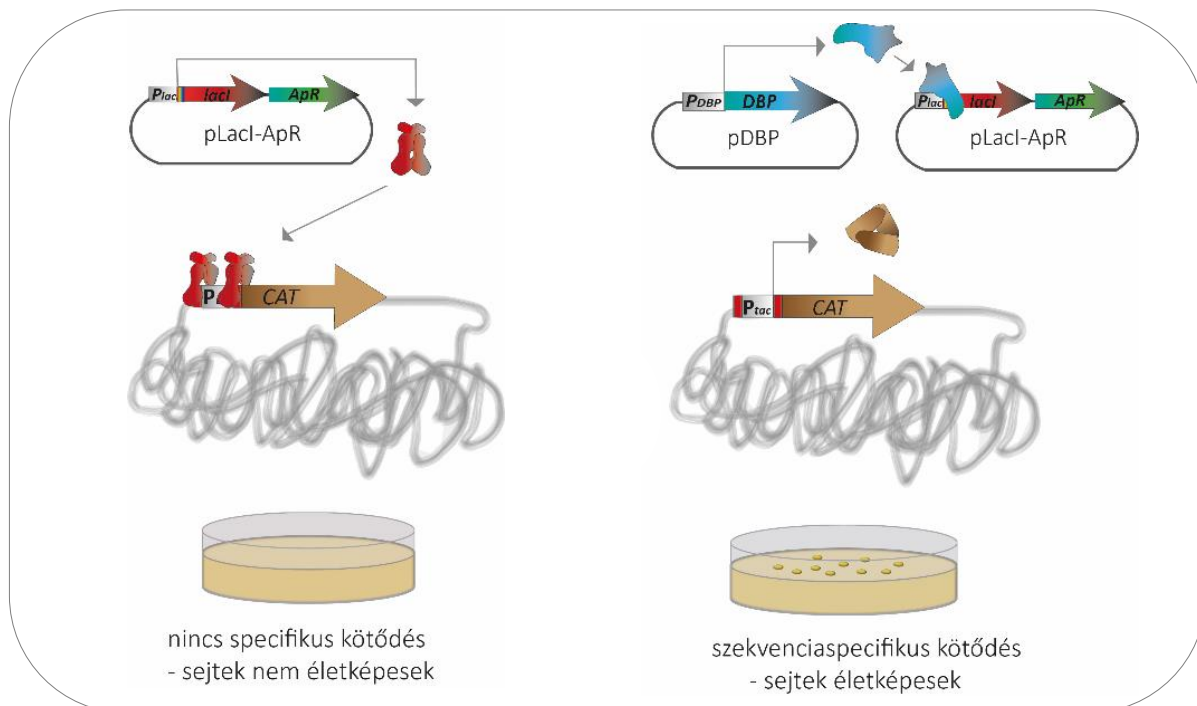


32. ábra: *ER1821 $\Delta lacI$ CAT_{HOBO}* törzs tesztelése $pLacI-ApR_{NE}$ plazmidvariánsokkal

X-gal tartalmú lemezen fehér telep: $LacI^+$ β -gal, kék telep: $LacI^-$ β -gal⁺. Csak $LacI^+$ β -gal⁺ sejt képes ampicillin jelenlétében növekedni, mivel a β -laktamáz gén transzkripciója kapcsolt a *lacI* génnel, ellenben a csak $LacI^-$ sejtek képesek kloramfenikol jelenlétében növekedni, mert a Lac represszor gátolja a kloramfenikol rezisztencia gén kifejeződését.

Az X-gal lemez felületén LacI^+ $\beta\text{-gal}^-$ sejtek fehér színűek maradtak. Amennyiben az inszertált szekvencia meggátolta a Lac represszor kifejeződését, a $\beta\text{-galaktozidáz}$ aktivitás következtében a telepek kékesen elszíneződtek. A kék szín megjelenését (LacI^- $\beta\text{-gal}^+$ fenotípus), az *ER1821 ΔlacI* sejtekkel megegyezően pLacI-ApR_{NE}-N-6ZA2-E és pLacI-ApR_{NE}-N-6ZB2-E variánsokkal láttunk. Halványkék szín jelent meg azonban pLacI-ApR_{NE}-N-6ZA1-E és pLacI-ApR_{NE}- $\lambda\text{O1,2-E}$ plazmidokat hordozó *ER1821 ΔlacI CAT_{HOB0}* sejteknél is.

Az *ER1821 ΔlacI CAT_{HOB0}* törzsben a genomi O1 és O2 *lac* operátorok mellett a *cat* gén előtt két nagy affinitású szintetikus operátor is található, így azt feltételezzük, hogy ezek kititrálják a Lac represszor hatását. A *lacI* és $\beta\text{-laktamáz}$ gének transzkripciója kapcsolt, tehát az X-gal lemezen kék vagy kékes telepszínű sejtek (LacI^- $\beta\text{-gal}^+$) kevésbé ellenállóak ampicillinnel szemben. Kloramfenikol jelenlétében ellentétes hatást várunk, mivel a LacI fehérje represszálja a CAT kifejeződését, így a kloramfenikol rezisztencia megnyilvánulását. Kloramfenikol tartalmú lemezen a pLacI-ApR_{NE}-N-6ZA2-E, pLacI-ApR_{NE}-N-6ZB2-E és pLacI-ApR_{NE}- $\lambda\text{O1,2-E}$ plazmidot hordozó sejtek jól nőttek, valamint gyengén nőttek a sejtek pLacI-ApR_{NE}-N-6ZA1-E plazmiddal. Ez összhangban van a X-gal és ampicillin tartalmú lemezekén kapott eredményekkel, tehát a *ER1821 ΔlacI CAT_{HOB0}* törzs a vártan megfelelően működik. Tehát a vizsgálni kívánt DNS-kötő fehérje specifikus kötésének kimutatásához az *ER1821 ΔlacI CAT_{HOB0}* törzs az előzetes eredmények alapján felhasználható szelekciós törzsként (33. ábra).



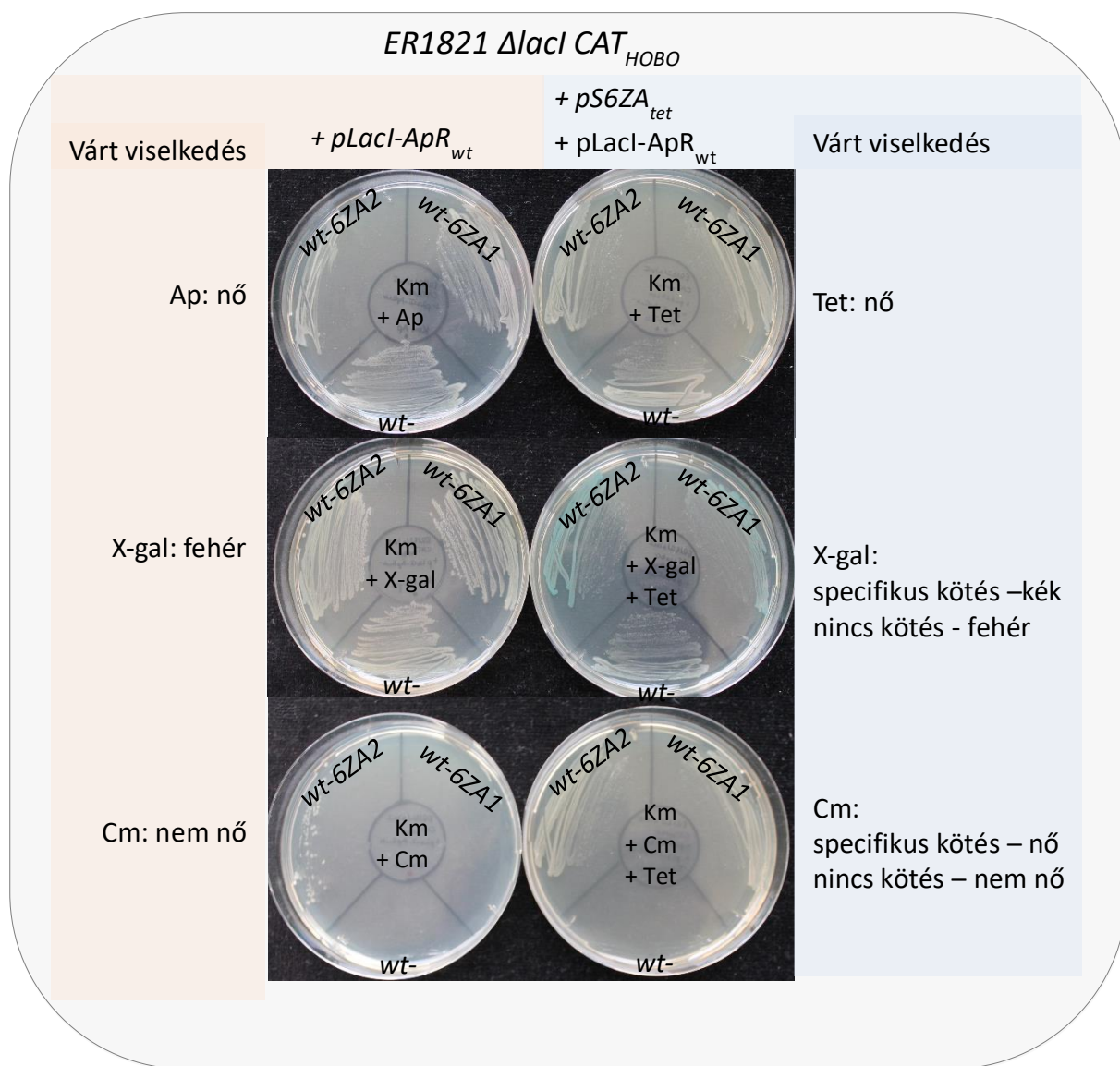
33. ábra: A specifikus DNS-fehérje kötés szelekciója *ER1821 ΔlacI CAT_{tacHOB0}* törzsszel

V.4.8. A specifikusan kötődő partnermolekulák szelektálása életképességük alapján

Következőként azt vizsgáltuk, hogy a *ER1821 ΔlacI CAT_{HOB0}* törzzsel kimutatható-e a DNS-fehérje között kialakult specifikus kötés. Mivel a szelekciós törzs kloramfenikol rezisztens, valamint a pLacI-ApR_{wt} plazmid ampicillin rezisztencia gént hordoz, a pB6ZA és a pS6ZA plazmidok alkalmazása nem ajánlott. Létrehoztuk a 6ZA fehérjét konstitutíven termelő pS6ZA plazmid tetraciklin rezisztens változatát, melyet pS6ZA_{tet} plazmidnak neveztünk el (K.I. klónozása). A pS6ZA_{tet} plazmiddal transzformáltuk az *ER1821 ΔlacI CAT_{HOB0}* törzset, majd kompetenssé tettük a sejtet transzformálásához. A pLacI-ApR_{wt}-6ZA1 és a pLacI-ApR_{wt}-6ZA2 plazmidokat is bejuttattuk a pS6ZA_{tet} mellé a tesztörzsbe, valamint az *ER1821 ΔlacI CAT_{HOB0}* törzsbe. A csak pLacI-ApR_{wt}-6ZA1 vagy pLacI-ApR_{wt}-6ZA2 plazmidot hordozó sejteket és a pLacI-ApR_{wt}-6ZA1 és a pLacI-ApR_{wt}-6ZA2 mellett pS6ZA_{tet} plazmidot is hordozó, dupla transzformáns sejteket X-gal és kloramfenikol jelenlétében teszteltük.

A kontrollként használt pLacI-ApR_{wt} plazmidot (kötőhely nélküli kontroll) hordozó sejt LacI⁺ β-gal⁻ Ap^R Cm^S fenotípust mutatott, amely nem változott a 6ZA cink-ujj fehérje jelenlétében sem. A kötőhelyet 1-es orientációban hordozó pLacI-ApR_{wt}-6ZA1 plazmiddal a sejt szintén LacI⁺ β-gal⁻ Ap^R Cm^S viselkedést mutatott. A vártan megfelelően a 6ZA cink-ujj specifikus kötődésével azonban a sejt már nőtt kloramfenikol mellett és kék telepszínűek lettek a sejtek X-gal-t tartalmazó lemezen (LacI⁻ β-gal⁺ Cm^R). A másik orientációban (C-gazdag szekvencia) beépült, 6ZA2 kötőhellyel szintén LacI⁺ β-gal⁻ fenotípust láttunk, habár a cink-ujj fehérje hiányában is részben életképes maradt a sejt kloramfenikol mellett, valamint gyengébben nőtt ampicillin tartalmú lemezen, amely a Lac represszor és a β-laktamáz alacsonyabb szintjére utal. A 6ZA cink-ujj jelenlétében a várt eredményt kaptuk 6ZA2 kötőhellyel is, vagyis LacI⁺ β-gal⁻ Cm^R fenotípust (34. ábra).

Az eredmények alapján az *ER1821 ΔlacI CAT_{HOB0}* gazda alkalmas a specifikus kötés kimutatásához. A 6ZA cink-ujj fehérje a specifikus felismerőhelyéhez kötődve blokkolja a Lac represszor kifejeződését, így indukálva a β-galaktozidáz és a kloramfenikol-acetiltranszferáz gének átíródását. Korábban *lacI_{NE} promoterbe épített* 6ZA1 szekvenciával gyengén, a 6ZA2 szekvenciával jól nőttek a sejtek kloramfenikol jelenlétében. A vad típusú *lacI_{wt}* promoterral mindkét esetben megemelkedhetett a Lac represszor szintje, melynek következtében a pLacI-ApR_{wt}-6ZA1 plazmidot hordozó sejt teljesen a vártan megfelelően viselkedik, pLacI-ApR_{wt}-6ZA2 plazmiddal pedig jelentős javulás látható (32. és 34. ábrák).



34. ábra: 6ZA cink-ujj fehérje specifikus kötésének kimutatása ER1821 $\Delta lacI$ -CAT_{HOB0} törzsben

X-gal tartalmú lemezen fehér telep: LacI⁺ β -gal, kék telep: LacI⁻ β -gal⁺.

Ampicillin mellett LacI⁺ β -gal sejtek életképesek, LacI⁻ β -gal⁺ sejtek nem.

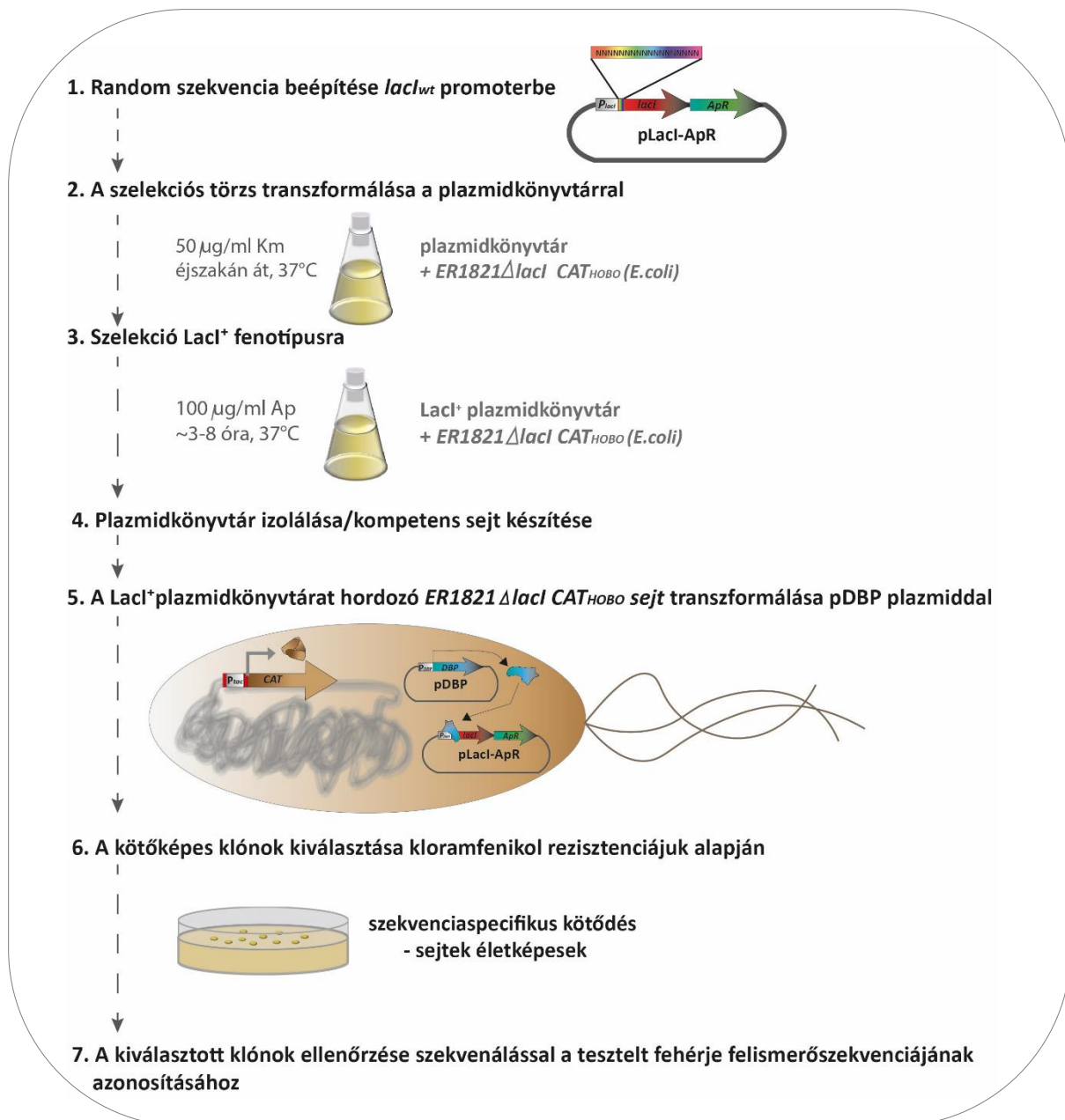
Kloramefenikol jelenlétében azonban ellenkezőleg, LacI⁻ β -gal⁺ sejtek életképesek,

LacI⁺ β -gal sejtek nem.

Kontroll plazmid: pLacI-ApR_{wt}. A tetraciklin rezisztenciát a pS6ZA_{tet} plazmid biztosítja.

Megvizsgáltuk, hogy ER1821 $\Delta lacI$ CAT_{HOB0} törzsszel is létrehozható-e az alacsony álpozitív klónokat tartalmazó, magas komplexitású pLacI-ApR_{wt} plazmidkönyvtár. Az ER1821 $\Delta lacI$ sejttel kapott eredményhez (függelék 3. táblázat, sárga) képest magasabb lett az álpozitív klónok száma (29%), azonban ampicillinnel szelektálva az arány visszaszorult 0,5%-ra (függelék 4. táblázat, sárga).

Kloramfenikol tartalmú lemezen is ellenőriztük az álpozitív klónok előfordulási gyakoriságát. A kanamicin lemezen felnőtt sejtek számával osztva a kloramfenikol tartalmú lemezen felnőtt sejtekkel megkapjuk az álpozitív klónok számát, amely 0,23% közeli érték lett (függelék 5. táblázat). Az eredmények alapján az *ER1821 ΔlacI CAT_{HOB0}* törzsben létrehozott pLacI-ApR_{wt}-N18 könyvtár alkalmas lehet a specifikus kötőhelyek direkt szelektálásához (35. ábra).



35. ábra: A specifikus kötőhely direkt szelektációjához tervezett I-Block módszer folyamatának ábrázolása

VI. Diszkusszió

Célunk egy egyszerű, *in vivo* módszer kialakítása volt, ahol egy DNS-kötő fehérje célhelyéhez való kötődése egyszerűen kimutatható *Escherichia coli*-ban. A módszerhez, mely az *Escherichia coli* laktóz-operon jól jellemzett működési mechanizmusára épül, létrehoztunk egy *lacI* deléció *E. coli* törzset, amelyben a β -galaktozidáz konstitutívan kifejeződik. A módszer másik eleme egy általánosan pLacI-nek nevezett plazmid, amely az *E. coli* Lac represszor génjét (*lacI*) hordozza. A vizsgált célhelyeket közvetlenül a *lacI* gén promoterébe építjük be. A vizsgált fehérje egy másik, a pLacI-vel kompatibilis és általánosan pDBP-nek nevezett plazmidon kódolt. Ha a vizsgált fehérje kötődik a pLacI-be inszertált célhelyhez, az alapállapotban konstitutívan kifejeződő *lacI* gén átíródása blokkolódik, ami a β -galaktozidáz enzim szintézis indukcióját eredményezi. A módszer elnevezése (I-Block) a *lacI* transzkripció gátlására utal.

Az I-Block módszer működéséhez az alábbi feltételek szükségesek:

- 1) A Lac represszor viszonylag alacsony koncentrációban kell hogy legyen a sejtben, hogy a vizsgált fehérjének a *lacI* transzkripcióra kifejtett gátló hatása kimutatható legyen. Az I-Block módszer különböző változatai különböző LacI koncentráció mellett működnek legjobban. Az eredeti változat működéséhez optimális Lac represszor szintet a -10-es elemmel átfedő NheI helyet tartalmazó, gyengített *lacI_N* promoter biztosította (76). A szelekcióra alkalmas bicisztronos konstrukció megfelelő működéséhez nagyobb LacI koncentrációra volt szükség, melyhez a vad típusú *lacI* promoter jobbnak bizonyult. A kissé erősebb *lacI_{wt}* promoter további előnye volt, hogy növelte a módszer számára elfogadható célszekvenciák körét.
- 2) Fontos a vizsgált kötőszekvencia beépítésének helye. Maga a beépített szekvencia nem gátolhatja, ugyanakkor a kötődött fehérjének gátolnia kell a *lacI* transzkripciót. Ennek a kettős követelménynek legjobban a transzkripció kezdete utáni néhány nukleotid látszik legalkalmasabbnak. Segíti a vizsgált szekvenciák összehasonlítását, ha a transzkripció kezdőhelyig (a -10-es elemtől számított 8. nukleotid) terjedő eredeti szekvenciát megőrizzük.

A módszer eredeti változatának publikálása (76) után figyeltünk fel egy hasonló módszerre, amelyben a DNS-fehérje kölcsönhatás *in-vivo* kimutatása szintén a *lac* operonra épül (103). A két módszer azonban jelentősen különbözik. A korábbi módszerben az inszert a *lac* promoter -10 és -35 hexamer között található spacer régió helyére épül be, amely korlátozza a beépülés hosszát és vizsgálható kötőszekvenciákat. Az I-Block módszernél a vizsgálandó DNS szekvencia beépítése a könnyen kezelhető plazmidra történik, míg a korábbi módszernél genomi integráció szükséges, ami időigényes lehet, különösen, ha többféle DNS szekvenciát kívánunk tesztelni. További különbség, hogy az I-Block módszerben a tesztelt fehérje specifikus kötődésére a β -galaktozidáz szint növekedése, míg a korábban publikált módszerben a β -galaktozidáz aktivitás csökkenése utal. Mivel a vizsgált fehérje specifikus kötődése a *lac* operonban kódolt fehérjék transzkripcióját represszálja, a korábbi módszer, ellentétben az I-Block módszerrel, nem alkalmazható a kötőszekvenciák direkt szelektálásához.

Öt különböző DNS-kötő fehérje specifikus kötődését mutattuk ki az I-Block módszerrel, melyek 3 különböző DNS felismerő domén családba tartoznak. A 6ZA és 6ZB cink-ujj fehérjék, a λ represszor és Tet represszor HTH fehérjék, a dCas9 pedig a CRISPR-Cas rendszerhez tartozik. Az I-Block módszer előnye, hogy alkalmas a szekvensspecifikus fehérje-DNS kölcsönhatás kimutatására a DNS-kötő fehérje tisztítása és fúzióba hozatala nélkül, valamint hogy használatához elegendőek a standard molekuláris biológiai ismeretek és eszközök.

Az I-Block módszer eredeti változatával (76) egy időben csak egy fehérje – DNS kapcsolat vizsgálható. A dolgozat részben arról a munkáról szól, amellyel megpróbáltuk a módszert alkalmassá tenni egy DNS-hez specifikusan kötődő fehérje célszekvenciája azonosításához. A célhoz az eredeti I-Block módszer néhány elemét módosítani kellett. A módosítások érintették a célszekvenciák beépítésének helyét és módját és az ER1821 $\Delta lacI$ gazdatörzset is, amelyet úgy alakítottunk át, hogy a keresett klón(ok) azonosítása ne telepszín, hanem antibiotikum rezisztencia alapján történjen. Ezen kívül kidolgoztunk egy közbeiktatott szelekciós lépést, amelynek segítségével meg tudunk szabadulni azoktól az álpozitív klónoktól, amelyekben az inszertszekvencia gátolja a *lacI* transzkripciót.

Már az eredeti módszer alkalmazásánál is megfigyeltük, hogy bizonyos beépített célszekvenciák esetében akkor is megemelkedik a β -galaktozidáz szint, amikor nincs jelen a kötődő fehérje. Elsősorban a nem-templát szálon C-ben gazdag szekvenciáknál volt megfigyelhető ez a jelenség, amely jelentősen rontotta a módszer használhatóságát.

Kísérleteink arra utaltak, hogy a jelenség az RNS polimeráz σ^{70} alegységéhez köthető és valószínűleg az okozza, hogy a *lacI* transzkripció iniciációs fázisából az elongációba való átmenet megakad.

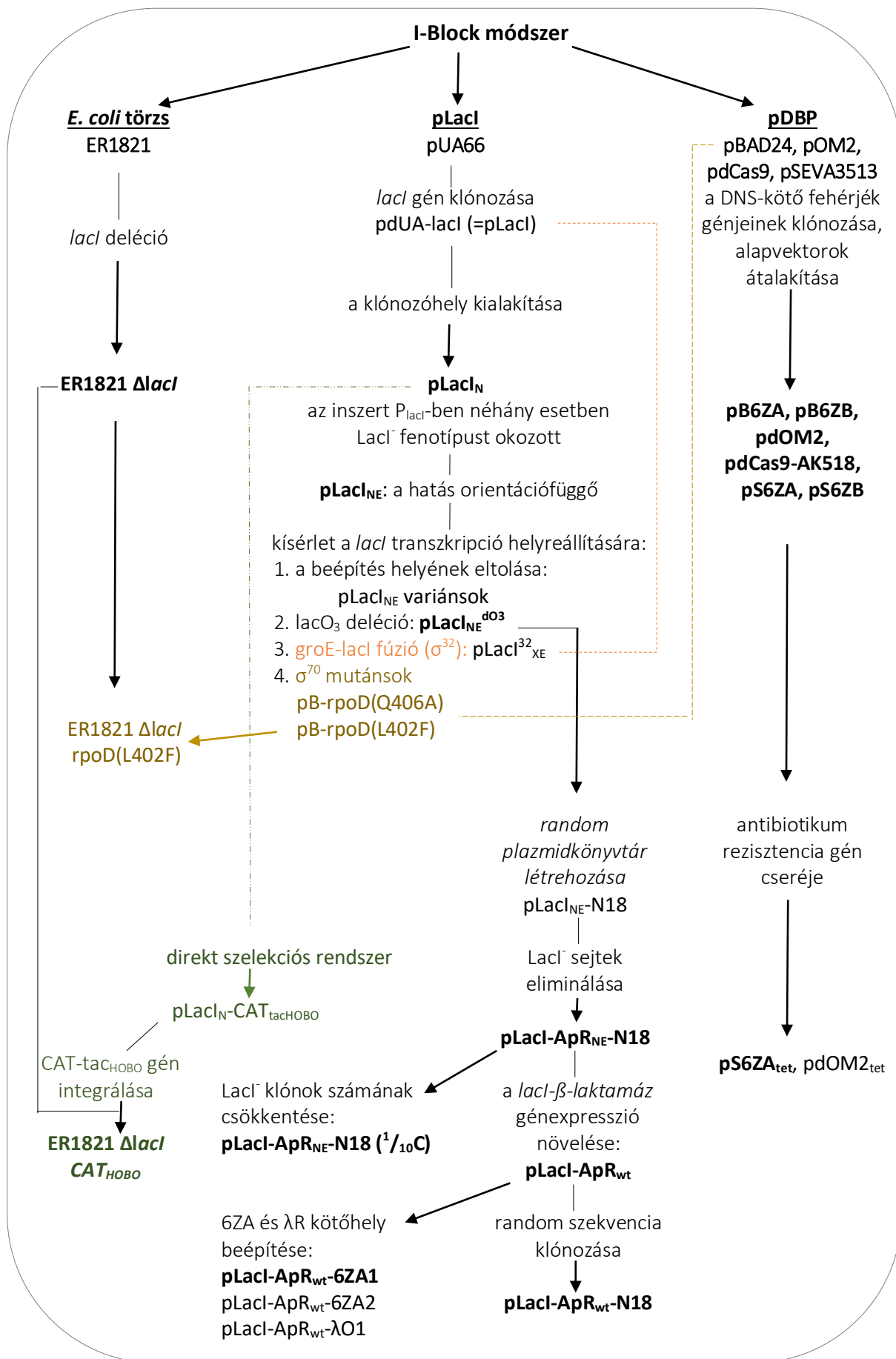
A vizsgálható célszekvenciák körét két módosítás bővítette:

- 1) A gyengített *lacI_N* promotert az erősebb vad típusú *lacI* promoterre cseréltük.
- 2) A vizsgálandó célszekvenciákat nem közvetlenül a -10-es elem után, hanem a transzkripció kezdő nukleotid utáni (+2-es) pozíciótól kezdve építettük be. Ez utóbbi módosítás azzal az előnnyel járt, hogy a transzkripció indítása szempontjából fontos, a promoter és a transzkripció kezdőhely közötti ún. diszkriminátor szekvencia a beépített célhelyektől függetlenül minden esetben ugyanaz, megfelel a vad típusnak. Az oligonukleotid-könyvtárat a megszokottól eltérően, módosított inverz-PCR technikával inszertáltuk. A beépítés kimondottan hatékonynak bizonyult az Illumina szekvenálás eredményei alapján.

Annak érdekében, hogy kiszűrjük azokat a klónokat, amelyekben a beépített célszekvencia gátolja a *lacI* transzkripciót, kidolgoztunk egy rendszert, amelyben a *lacI* gén és az ampicillin-rezisztencia gén transzkripciója kapcsolt, ezáltal ampicillin rezisztenciára való szelekcióval a *lacI* gén átíródására is szelektálunk.

A törzs genomjába integráltuk a kloramfenikol-acetiltranszferáz gént úgy, hogy átíródása egy módosított *tac* promoter irányítása alatt álljon. A *tac* promoter módosítása a *lac* operátor Lac represszorhoz nagy affinitást mutató szintetikus változatának két példányban való beépítését jelentette és azt a célt szolgálta, hogy a kloramfenikol rezisztencia csak Lac represszor hiányában nyilvánuljon meg. A LacI⁺ sejtekben a represszorfehérje blokkolja az acetiltranszferáz kifejeződését, így nem képesek túlélni kloramfenikol jelenlétében.

Az I-Block módszer egy egyszerű és olcsó alternatívát nyújthat a publikált DNS-fehérje kölcsönhatást *in vivo* vizsgáló módszerek mellett. A könnyű és gyors klónozás és mérés remélhetőleg megkönnyíti a DNS kötő-fehérjék specifikus kölcsönhatásának kimutatását egy adott DNS-szekvenciához, vagy akár egy eddig ismeretlen kötőszekvenciához, a DNS-kötő fehérjék széles körénél.



36. ábra: A munkafolyamat ábrázolása

VII. Jövőbeli tervek

A dolgozat második felében leírt eredmények reményt adnak arra, hogy az I-Block módszer továbbfejlesztett változata alkalmas lehet DNS-hez specifikusan kötődő fehérjék ismeretlen célszekvenciáinak azonosítására. Itt azonban figyelembe kell vennünk a transzformáció határfoka és az egyéb kísérleti feltételek által szabott technikai korlátokat. Egy 18 bp hosszú random szekvencia $\sim 6.8 \times 10^{10}$ számú egyedi szekvenciát jelent, ilyen nagyságrendű klón kezelésére baktériumtranszformációtól függő rendszerek csak korlátozottan alkalmasak. A módszer hatékonyságát segítheti a kisebb komplexitású szekvenciahalmaz alkalmazása, például rövid kötőhely, vagy olyan hosszabb kötőhely, amelynek egyes pozíciói ismertek.

Azt tervezzük, hogy az I-Block rendszerben a már vizsgált fehérjéket felhasználva felderítjük a módosított módszer teljesítőképességének határait. Ehhez a munkához elsősorban a 6ZA és a λ represszor tűnik alkalmasnak. Modellkísérletekben megpróbáljuk meghatározni azt a komplexitást, amelyet a módszer még megbízhatóan kezelni tud. Ennek a határnak az ismeretében - és valószínűleg kollaborációs munka keretében – ki fogjuk próbálni a módszert ismeretlen DNS-kötő fehérjék ismeretlen célhelyének azonosítására.

Az I-Block módszer potenciálisan felhasználható egy adott fehérje mutációit hordozó fehérjekönyvtár vizsgálatához is. A fehérje génjét a DNS-kötő domént kódoló szekvenciárészen irányított vagy random mutagenesisnek vetnénk alá. A mutáns fehérjekönyvtárból azonosíthatóak a legjobban kötő fehérjeváltozatok, vagy akár a DNS-kötést gátló vagy mérséklő mutációk.

Az I-Block módszert további DNS-kötő fehérjékkel is tervezzük validálni, melyek változatos organizmusokból származnak. Például a *Drosophila* mag-kötő faktor (CBF) Runt és Big-brother (Bgb) doménjeit, melyek heterodimert alkotva kötődnek a felismerőszekvenciához (52). Az I-Block módszerrel a dimert alkotó fehérjék közül eddig csak homodimert teszteltünk (λ -represszor, Tet represszor), azonban a Runt-Bgb komplex alkalmas tesztfehérje lehet annak igazolásához, hogy heterodimerek kötődését is ki tudjuk mutatni az I-Block módszerrel. A Runt és Bgb önállóan is képes kötődni az egyedi felismerőszekvenciájához, azonban egymással komplexet alkotva nagyobb affinitással, ezért a fehérjedomének elvben az I-Block módszer kvantitatívitásának felméréséhez is felhasználhatók.

VIII. Köszönetnyilvánítás

Elsőként a témavezetőmnek, Dr. Kiss Antalnak köszönöm, hogy a pályafutásom kezdetétől támogatta a fejlődésem. Köszönöm a sok évnyi tanítását és türelmét, valamint, hogy irányítása alatt alapos elméleti és gyakorlati tapasztalra tehettem szert.

Hálás vagyok Karcagi Ildikónak a közös munkáért és barátságáért. Köszönöm Varga Bencének is a biztatást és a beszélgetéseket.

Köszönöm Szentes 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.

IX. Irodalomjegyzék

1. Xie, Z., Hu, S., Qian, J., Blackshaw, S. and Zhu, H. (2011) Systematic characterization of protein-DNA interactions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **68**, 1657-1668.
2. Ferraz, R.A.C., Lopes, A.L.G., da Silva, J.A.F., Moreira, D.F.V., Ferreira, M.J.N. and de Almeida Coimbra, S.V. (2021) DNA-protein interaction studies: a historical and comparative analysis. *Plant Methods*, **17**, 82.
3. Dey, B., Thukral, S., Krishnan, S., Chakrobarty, M., Gupta, S., Manghani, C. and Rani, V. (2012) DNA-protein interactions: methods for detection and analysis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **365**, 279-299.
4. Arda, H.E. and Walhout, A.J. (2010) Gene-centered regulatory networks. *Brief Funct Genomics*, **9**, 4-12.
5. Walhout, A.J.M. (2006) Unraveling transcription regulatory networks by protein–DNA and protein–protein interaction mapping. *Genome Research*, **16**, 1445-1454.
6. Ádám, V. (2016) *Orvosi Biokémia*. Semmelweis Kiadó, Budapest.
7. McKay, D.B. and Steitz, T.A. (1981) Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA. *Nature*, **290**, 744-749.
8. Anderson, W.F., Ohlendorf, D.H., Takeda, Y. and Matthews, B.W. (1981) Structure of the cro repressor from bacteriophage lambda and its interaction with DNA. *Nature*, **290**, 754-758.
9. Pabo, C.O. and Lewis, M. (1982) The operator-binding domain of lambda repressor: structure and DNA recognition. *Nature*, **298**, 443-447.
10. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. and Bourne, P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, **28**, 235-242.
11. Gommans, W.M., Haisma, H.J. and Rots, M.G. (2005) Engineering zinc finger protein transcription factors: the therapeutic relevance of switching endogenous gene expression on or off at command. *J Mol Biol*, **354**, 507-519.
12. Gommans, W.M., McLaughlin, P.M., Lindhout, B.I., Segal, D.J., Wiegman, D.J., Haisma, H.J., van der Zaal, B.J. and Rots, M.G. (2007) Engineering zinc finger protein transcription factors to downregulate the epithelial glycoprotein-2 promoter as a novel anti-cancer treatment. *Mol. Carcinog.*, **46**, 391-401.
13. Stormo, G.D. (2013) *Introduction to protein-DNA interactions. Structure, thermodynamics, and bioinformatics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
14. Lewis, M. (2005) The lac repressor. *C R Biol*, **328**, 521-548.
15. Garvie, C.W. and Wolberger, C. (2001) Recognition of Specific DNA Sequences. *Molecular Cell*, **8**, 937-946.
16. Pingoud, A. and Jeltsch, A. (1997) Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases. *Eur J Biochem*, **246**, 1-22.
17. Pingoud, A., Wilson, G.G. and Wende, W. (2014) Type II restriction endonucleases--a historical perspective and more. *Nucleic Acids Res*, **42**, 7489-7527.
18. Rohs, R., Jin, X., West, S.M., Joshi, R., Honig, B. and Mann, R.S. (2010) Origins of Specificity in Protein-DNA Recognition. *Annu Rev Biochem*, **79**, 233-269.
19. Luscombe, N.M., Laskowski, R.A. and Thornton, J.M. (2001) Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Res*, **29**, 2860-2874.
20. Xu, D.J. and Noyes, M.B. (2014) Understanding DNA-binding specificity by bacteria hybrid selection. *Briefings in Functional Genomics*, **14**, 3-16.
21. Harrison, S.C. (1991) A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature*, **353**, 715-719.
22. Wingender, E., Schoeps, T. and Dönitz, J. (2013) TFClass: an expandable hierarchical classification of human transcription factors. *Nucleic Acids Res*, **41**, D165-170.

23. Andreeva, A., Howorth, D., Chothia, C., Kulesha, E. and Murzin, A.G. (2014) SCOP2 prototype: a new approach to protein structure mining. *Nucleic Acids Res*, **42**, D310-314.
24. Andreeva, A., Kulesha, E., Gough, J. and Murzin, A.G. (2020) The SCOP database in 2020: expanded classification of representative family and superfamily domains of known protein structures. *Nucleic Acids Res*, **48**, D376-D382.
25. Bulyk, M.L., Huang, X., Choo, Y. and Church, G.M. (2001) Exploring the DNA-binding specificities of zinc fingers with DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7158-7163.
26. Elrod-Erickson, M., Rould, M.A., Neklodova, L. and Pabo, C.O. (1996) Zif268 protein-DNA complex refined at 1.6 Å: a model system for understanding zinc finger-DNA interactions. *Structure*, **4**, 1171-1180.
27. Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L.A., Doudna, J.A., Weissman, J.S., Arkin, A.P. and Lim, W.A. (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, **152**, 1173-1183.
28. Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. and Marraffini, L.A. (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, **31**, 233-239.
29. Bikard, D., Jiang, W., Samai, P., Hochschild, A., Zhang, F. and Marraffini, L.A. (2013) Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res*, **41**, 7429-7437.
30. Geertz, M. and Maerkl, S.J. (2010) Experimental strategies for studying transcription factor-DNA binding specificities. *Brief Funct Genomics*, **9**, 362-373.
31. Garner, M.M. and Revzin, A. (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res*, **9**, 3047-3060.
32. Gaudreault, M., Gingras, M.E., Lessard, M., Leclerc, S. and Guerin, S.L. (2009) Electrophoretic mobility shift assays for the analysis of DNA-protein interactions. *Methods Mol Biol*, **543**, 15-35.
33. Smith, G.P. and Petrenko, V.A. (1997) Phage Display. *Chem Rev*, **97**, 391-410.
34. Koscielska, K., Kiczak, L., Kasztura, M., Wesolowska, O. and Otlewski, J. (1998) Phage display of proteins. *Acta Biochim Pol*, **45**, 705-720.
35. Beerli, R.R., Segal, D.J., Dreier, B. and Barbas, C.F., 3rd. (1998) Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14628-14633.
36. Beerli, R.R. and Barbas, C.F., 3rd. (2002) Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. *Nat Biotechnol*, **20**, 135-141.
37. Beerli, R.R., Dreier, B. and Barbas, C.F., 3rd. (2000) Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1495-1500.
38. Lund, C.V., Blancafort, P., Popkov, M. and Barbas, C.F., 3rd. (2004) Promoter-targeted phage display selections with preassembled synthetic zinc finger libraries for endogenous gene regulation. *J Mol Biol*, **340**, 599-613.
39. Bae, K.H., Kwon, Y.D., Shin, H.C., Hwang, M.S., Ryu, E.H., Park, K.S., Yang, H.Y., Lee, D.K., Lee, Y., Park, J. et al. (2003) Human zinc fingers as building blocks in the construction of artificial transcription factors. *Nat Biotechnol*, **21**, 275-280.
40. Stormo, G.D. and Zhao, Y. (2010) Determining the specificity of protein-DNA interactions. *Nat Rev Genet*, **11**, 751-760.
41. Tuerk, C. and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, **249**, 505-510.
42. Chai, C., Xie, Z. and Grotewold, E. (2011) SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment), as a powerful tool for deciphering the protein-DNA interaction space. *Methods Mol Biol*, **754**, 249-258.

43. Cain, B., Webb, J., Yuan, Z., Cheung, D., Lim, H.W., Kovall, R.A., Weirauch, M.T. and Gebelein, B. (2023) Prediction of cooperative homeodomain DNA binding sites from high-throughput-SELEX data. *Nucleic Acids Res.*
44. Galas, D.J. and Schmitz, A. (1978) DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res*, **5**, 3157-3170.
45. Pfeifer, G.P. and Riggs, A.D. (1991) Chromatin differences between active and inactive X chromosomes revealed by genomic footprinting of permeabilized cells using DNase I and ligation-mediated PCR. *Genes Dev*, **5**, 1102-1113.
46. Song, L. and Crawford, G.E. (2010) DNase-seq: A High-Resolution Technique for Mapping Active Gene Regulatory Elements across the Genome from Mammalian Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2010**, pdb.prot5384.
47. Raha, D., Hong, M. and Snyder, M. (2010) ChIP-Seq: a method for global identification of regulatory elements in the genome. *Curr Protoc Mol Biol*, **Chapter 21**, Unit 21 19 21-14.
48. Valouev, A., Johnson, D.S., Sundquist, A., Medina, C., Anton, E., Batzoglou, S., Myers, R.M. and Sidow, A. (2008) Genome-wide analysis of transcription factor binding sites based on ChIP-Seq data. *Nat Methods*, **5**, 829-834.
49. Johnson, D.S., Mortazavi, A., Myers, R.M. and Wold, B. (2007) Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science*, **316**, 1497-1502.
50. Liu, X., Noll, D.M., Lieb, J.D. and Clarke, N.D. (2005) DIP-chip: rapid and accurate determination of DNA-binding specificity. *Genome Res*, **15**, 421-427.
51. van Steensel, B. and Henikoff, S. (2000) Identification of in vivo DNA targets of chromatin proteins using tethered dam methyltransferase. *Nat Biotechnol*, **18**, 424-428.
52. Luo, L., Gribskov, M. and Wang, S. (2022) Bibliometric review of ATAC-Seq and its application in gene expression. *Brief Bioinform*, **23**.
53. Kleinendorst, R.W.D., Barzaghi, G., Smith, M.L., Zaugg, J.B. and Krebs, A.R. (2021) Genome-wide quantification of transcription factor binding at single-DNA-molecule resolution using methyl-transferase footprinting. *Nat Protoc*, **16**, 5673-5706.
54. Meng, X., Brodsky, M.H. and Wolfe, S.A. (2005) A bacterial one-hybrid system for determining the DNA-binding specificity of transcription factors. *Nat Biotechnol*, **23**, 988-994.
55. Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
56. Noyes, M.B., Meng, X., Wakabayashi, A., Sinha, S., Brodsky, M.H. and Wolfe, S.A. (2008) A systematic characterization of factors that regulate Drosophila segmentation via a bacterial one-hybrid system. *Nucl. Acids Res.*, **36**, 2547-2560.
57. Wingender, E. (2008) The TRANSFAC project as an example of framework technology that supports the analysis of genomic regulation. *Brief Bioinform*, **9**, 326-332.
58. Weirauch, M.T., Yang, A., Albu, M., Cote, A.G., Montenegro-Montero, A., Drewe, P., Najafabadi, H.S., Lambert, S.A., Mann, I., Cook, K. *et al.* (2014) Determination and inference of eukaryotic transcription factor sequence specificity. *Cell*, **158**, 1431-1443.
59. Hume, M.A., Barrera, L.A., Gisselbrecht, S.S. and Bulyk, M.L. (2015) UniPROBE, update 2015: new tools and content for the online database of protein-binding microarray data on protein-DNA interactions. *Nucleic Acids Res*, **43**, D117-122.
60. Kulakovskiy, I.V., Vorontsov, I.E., Yevshin, I.S., Soboleva, A.V., Kasianov, A.S., Ashoor, H., Ba-Alawi, W., Bajic, V.B., Medvedeva, Y.A., Kolpakov, F.A. *et al.* (2016) HOCOMOCO: expansion and enhancement of the collection of transcription factor binding sites models. *Nucleic Acids Res*, **44**, D116-125.
61. Mathelier, A., Fornes, O., Arenillas, D.J., Chen, C.Y., Denay, G., Lee, J., Shi, W., Shyr, C., Tan, G., Worsley-Hunt, R. *et al.* (2016) JASPAR 2016: a major expansion and update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res*, **44**, D110-115.
62. Emamjomeh, A., Choobineh, D., Hajieghrari, B., MahdiNezhad, N. and Khodavirdipour, A. (2019) DNA-protein interaction: identification, prediction and data analysis. *Mol Biol Rep*, **46**, 3571-3596.

63. de Boer, C.G., Vaishnav, E.D., Sadeh, R., Abeyta, E.L., Friedman, N. and Regev, A. (2020) Author Correction: Deciphering eukaryotic gene-regulatory logic with 100 million random promoters. *Nat Biotechnol*, **38**, 1211.
64. Qiu, J., Bernhofer, M., Heinzinger, M., Kemper, S., Norambuena, T., Melo, F. and Rost, B. (2020) ProNA2020 predicts protein-DNA, protein-RNA, and protein-protein binding proteins and residues from sequence. *J Mol Biol*, **432**, 2428-2443.
65. Inukai, S., Kock, K.H. and Bulyk, M.L. (2017) Transcription factor-DNA binding: beyond binding site motifs. *Curr Opin Genet Dev*, **43**, 110-119.
66. Sarai, A. and Kono, H. (2005) Protein-DNA recognition patterns and predictions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **34**, 379-398.
67. Ślaska-Kiss, K., Zsibrita, N., Koncz, M., Albert, P., Csábrádi, Á., Szentes, 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.
68. Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Petrosino, J.F., Qin, X., Muzny, D.M., Ayele, M. *et al.* (2008) The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J. Bacteriol.*, **190**, 2597-2606.
69. Umenhoffer, K., Feher, T., Baliko, G., Ayaydin, F., Posfai, J., Blattner, F.R. and Posfai, G. (2010) Reduced evolvability of *Escherichia coli* MDS42, an IS-less cellular chassis for molecular and synthetic biology applications. *Microb Cell Fact*, **9**, 38.
70. Waite-Rees, P.A., Keating, C.J., Moran, L.S., Slatko, B.E., Hornstra, L.J. and Benner, J.S. (1991) Characterization and expression of the *Escherichia coli* Mrr restriction system. *J. Bacteriol.*, **173**, 5207-5219.
71. Feher, T., Karcagi, I., Gyorfy, Z., Umenhoffer, K., Csorgo, B. and Posfai, G. (2008) Scarless engineering of the *Escherichia coli* genome. *Methods Mol Biol*, **416**, 251-259.
72. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2006) *The Condensed Protocols. From Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
73. Lederberg, E.M. and Cohen, S.N. (1974) Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol*, **119**, 1072-1074.
74. Silva, D., Santos, G., Barroca, M. and Collins, T. (2017) In Domingues, L. (ed.), *PCR: Methods and Protocols*. Springer New York, New York, NY, pp. 87-100.
75. Miller, J.H. (1992) *A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
76. Szentes, 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.
77. Zaslaver, A., Bren, A., Ronen, M., Itzkovitz, S., Kikoin, I., Shavit, S., Liebermeister, W., Surette, M.G. and Alon, U. (2006) A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nat. Methods*, **3**, 623-628.
78. Nyerges, A., Csorgo, B., Nagy, I., Balint, B., Bihari, P., Lazar, V., Apjok, G., Umenhoffer, K., Bogos, B., Posfai, G. *et al.* (2016) A highly precise and portable genome engineering method allows comparison of mutational effects across bacterial species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **113**, 2502-2507.
79. Zhang, X. and Bremer, H. (1995) Control of the *Escherichia coli* rrnB P1 promoter strength by ppGpp. *J Biol Chem*, **270**, 11181-11189.
80. Ruff, E.F., Record, M.T., Jr. and Artsimovitch, I. (2015) Initial events in bacterial transcription initiation. *Biomolecules*, **5**, 1035-1062.
81. Feklistov, A. and Darst, S.A. (2011) Structural basis for promoter -10 element recognition by the bacterial RNA polymerase sigma subunit. *Cell*, **147**, 1257-1269.
82. Wang, T., Tague, N., Whelan, S.A. and Dunlop, M.J. (2021) Programmable gene regulation for metabolic engineering using decoy transcription factor binding sites. *Nucleic Acids Res*, **49**, 1163-1172.

83. Meng, X. and Wolfe, S.A. (2006) Identifying DNA sequences recognized by a transcription factor using a bacterial one-hybrid system. *Nat Protoc*, **1**, 30-45.
84. Worthington, M.T., Pelo, J. and Luo, R.Q. (2001) Cloning of random oligonucleotides to create single-insert plasmid libraries. *Anal Biochem*, **294**, 169-175.
85. Wang, W. and Malcolm, B.A. (1999) Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques*, **26**, 680-682.
86. Kammerer, W., Deuschle, U., Gentz, R. and Bujard, H. (1986) Functional dissection of Escherichia coli promoters: information in the transcribed region is involved in late steps of the overall process. *EMBO J*, **5**, 2995-3000.
87. Sidorenkov, I., Komissarova, N. and Kashlev, M. (1998) Crucial role of the RNA:DNA hybrid in the processivity of transcription. *Mol Cell*, **2**, 55-64.
88. Hsu, L.M., Vo, N.V. and Chamberlin, M.J. (1995) Escherichia coli transcript cleavage factors GreA and GreB stimulate promoter escape and gene expression in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11588-11592.
89. Chan, C.L. and Gross, C.A. (2001) The anti-initial transcribed sequence, a portable sequence that impedes promoter escape, requires sigma70 for function. *J Biol Chem*, **276**, 38201-38209.
90. Hsu, L.M., Cobb, I.M., Ozmore, J.R., Khoo, M., Nahm, G., Xia, L., Bao, Y. and Ahn, C. (2006) Initial transcribed sequence mutations specifically affect promoter escape properties. *Biochemistry*, **45**, 8841-8854.
91. Nickels, B.E., Mukhopadhyay, J., Garrity, S.J., Ebright, R.H. and Hochschild, A. (2004) The sigma 70 subunit of RNA polymerase mediates a promoter-proximal pause at the lac promoter. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 544-550.
92. Guo, M.S. and Gross, C.A. (2014) Stress-induced remodeling of the bacterial proteome. *Curr Biol*, **24**, R424-434.
93. Winkelman, J.T., Pukhrambam, C., Vvedenskaya, I.O., Zhang, Y., Taylor, D.M., Shah, P., Ebright, R.H. and Nickels, B.E. (2020) XACT-Seq Comprehensively Defines the Promoter-Position and Promoter-Sequence Determinants for Initial-Transcription Pausing. *Mol Cell*, **79**, 797-811 e798.
94. Hsu, L.M. (2008) Promoter Escape by Escherichia coli RNA Polymerase. *EcoSal Plus*, **3**.
95. Heyduk, E. and Heyduk, T. (2018) DNA template sequence control of bacterial RNA polymerase escape from the promoter. *Nucleic Acids Res*, **46**, 4469-4486.
96. Ellinger, T., Behnke, D., Bujard, H. and Gralla, J.D. (1994) Stalling of Escherichia coli RNA polymerase in the +6 to +12 region in vivo is associated with tight binding to consensus promoter elements. *J Mol Biol*, **239**, 455-465.
97. Ko, D.C., Marr, M.T., Guo, J. and Roberts, J.W. (1998) A surface of Escherichia coli sigma 70 required for promoter function and antitermination by phage lambda Q protein. *Genes Dev*, **12**, 3276-3285.
98. Sharp, M.M., Chan, C.L., Lu, C.Z., Marr, M.T., Nechaev, S., Merritt, E.W., Severinov, K., Roberts, J.W. and Gross, C.A. (1999) The interface of sigma with core RNA polymerase is extensive, conserved, and functionally specialized. *Genes Dev*, **13**, 3015-3026.
99. Rosé, J.R. and Craik, C.S. (1996) In Carey, P. R. (ed.), *Protein Engineering and Design*. Academic Press, San Diego, pp. 75-104.
100. Amann, E., Brosius, J. and Ptashne, M. (1983) Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in Escherichia coli. *Gene*, **25**, 167-178.
101. de Boer, H.A., Comstock, L.J. and Vasser, M. (1983) The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 21-25.
102. Sibley, M.H. and Raleigh, E.A. (2012) A versatile element for gene addition in bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res*, **40**, e19.
103. Whipple, F.W. (1998) Genetic analysis of prokaryotic and eukaryotic DNA-binding proteins in Escherichia coli. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3700-3706.

104. Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J. and Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.*, **177**, 4121-4130.
105. Martinez-Garcia, E., Aparicio, T., Goni-Moreno, A., Fraile, S. and de Lorenzo, V. (2015) SEVA 2.0: an update of the Standard European Vector Architecture for de-/re-construction of bacterial functionalities. *Nucleic Acids Res*, **43**, D1183-1189.

X. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció alapjául szolgáló publikáció:

1. Szentes, 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.

Egyéb publikációk:

2. Ślaska-Kiss, K., Zsibrita, N., Koncz, M., Albert, P., Csábrádi, Á., Szentes, 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.

XI. Magyar és angol nyelvű összefoglaló

XI.1. Magyar nyelvű összefoglaló

Kidolgoztunk egy egyszerű módszert, amellyel a szekvenciaspecifikus DNS-fehérje kölcsönhatás vizsgálható *in vivo*, *Escherichia coli*-ban. Az I-Block-nak nevezett módszer a laktóz-operon jól ismert szabályozási mechanizmusán alapszik. A módszer három alapvető eleme a *lacI* deléciós *E. coli* törzs *ER1821 ΔlacI*, az *E. coli lacI* gént hordozó pLacI plazmid, valamint az azzal kompatibilis pDBP plazmid, amely a vizsgált fehérje génjét kódolja. A vizsgált fehérje potenciális kötőhelyét a pLacI plazmid *lacI* promoterébe klónoztuk. Ha a vizsgált fehérje kötődik a célhelyhez, a konstitutív *lacI* transzkripció gátlódik, ami indukálja a genomban kódolt β-galaktozidáz termelődését. A specifikus DNS-fehérje kölcsönhatás így egyszerűen, a β-galaktozidáz aktivitás mérésével kimutatható. Az I-Block módszer működését 5 DNS-kötő fehérjével (két mesterségesen előállított cink-ujj fehérjével, a természetes 'helix-turn-helix' DNS-felismerő doménnel rendelkező cI857 lambda fág represszorral és a Tet represszorral, valamint a CRISPR-dCas9 fehérjével) demonstráltuk. Az 5 fehérje 3 különböző DNS-felismerő fehérje-családba tartozik, ez azt jelzi, hogy a módszer várhatóan a DNS-kötő fehérjék széles körénél alkalmazható lesz.

A módszer megfelelő működéséhez a Lac represszor alacsony szintű konstitutív termelésére van szükség, melyet egy kis kópiaszámú plazmidvektor használatával értünk el. Annak érdekében, hogy megtaláljuk a teszt szekvencia beépítésének a módszer működése szempontjából legjobb helyét, a *lacI* promoter 3 különböző pontján pontmutációval restrikciós klónozóhelyeket hoztunk létre. A legalkalmasabbnak a -10-es elemmel átfedő NheI hely bizonyult, amelyhez valószínűleg az is hozzájárult, hogy az NheI helyet létrehozó pontmutáció gyengítette a *lacI* promotert (*lacI_N* promoter). A módszer működésének fontos feltétele, hogy a *lacI* promoterbe beépített szekvencia önmagában ne gátolja a *lacI* transzkripciót. A nagyon eltérő guanin- ill. citozintartalmú szálakkal rendelkező cink-ujj felismerőhelyekkel való munka során figyeltünk fel arra, hogy a nem-templát szálon a citozinban gazdag célszekvenciák gátolják a *lacI* transzkripciót.

A módszer korábbi változatában a célszekvenciákat a -10-es promoter-elemmel átfedő NheI helybe, vagy az NheI és a tőle 3' irányban lévő EcoRI hely közé építettük be. Újabb eredményeink azt mutatták, hogy a -10-es elemtől a transzkripció kezdőhelyig (+1) terjedő szakaszon célszerű meghagyni az eredeti szekvenciát. Ez azzal az előnnyel jár, hogy a

transzkripció intenzitására hatással bíró diszkriminátor szekvencia és a transzkripció kezdőhely a beépített célszekvenciáktól függetlenül mindig ugyanaz marad.

Az I-Block módszer eredeti változatában csak kis számú fehérje – DNS kombináció vizsgálatára alkalmas. Továbbfejlesztettük a módszert egy „nagy áteresztőképességű” technika irányába azzal a céllal, hogy alkalmas legyen DNS-kötő fehérjék kötőhelyének egy komplex oligonukleotid-könyvtárból való azonosíthatására. Egy 18 bp hosszú randomizált szekvenciát, mint célhelyeket tartalmazó pLacI könyvtárból kapott transzformánsok között magas volt a LacI⁻ klónok száma, ezek az álpozitív klónok zavarják a módszert. Összhangban korábbi, egyedi célszekvenciákkal tett megfigyelésünkkel, az Illumina szekvenálás azt mutatta, hogy a randomizált szekvenciákkal kapott LacI⁻ klónok jelentős részében a beépített szekvencia nem-templát szála citozinban gazdag. A jelenségnek az inszertszekvencia citozintartalmától való függését az is alátámasztotta, hogy ha a random szekvencia kémiai szintézisekor a nukleotidarányt úgy módosítottuk, hogy $\frac{1}{4}$ helyett csak $\frac{1}{10}$ arányban tartalmazzon citidint - az álpozitív, LacI⁻ β -gal⁺ sejtek aránya a felére csökkent.

A σ^{32} faktor függő promoterral kapott eredményeink azt sugallják, hogy az egyes inszertszekvenciák következtében megjelenő LacI⁻ fenotípus hátterében egy ismert jelenség, a transzkripció iniciációs fázisából az elongációba való átmenet megakadása áll. Ilyenkor az RNS polimeráz σ^{70} alegysége a kezdeti átírt szekvenciához tartósan kötődik, ezáltal megakadályozza vagy lelassítja az elongációba való átmenetet. Azonban a *lacI* transzkripciót olyan σ^{70} mutánsokkal, melyekről ismert, hogy toleránsabbak az elakadást kiváltó szekvenciákkal szemben, nem sikerült helyreállítani. A beépítés helyének 3' irányba való tolásával megemelkedett a LacI koncentráció, azonban a transzkripciós kezdőhelytől távol (+10) beépített szekvenciával már nem volt hatékony a specifikus kötés kimutatása, mivel a tesztfehérje kötődése nem represszálta a *lacI* transzkripciót. A *lacI* transzkripció gátlását okozó szekvenciák számát sikerült azzal csökkenteni, és ezáltal az I-Block módszerrel vizsgálható szekvenciák számát növelni, hogy a *lacI_N* promotert az erősebb, vad típusú *lacI* promoterre cseréltük.

Kidolgoztunk egy rendszert a LacI⁺ sejtek szelektálásához. A *lacI* gént transzkripciós kapcsoltságba hoztuk az ampicillin rezisztenciát biztosító β -laktamáz génnel. Ez a bicisztronos konstrukció lehetővé teszi, hogy a LacI⁻ sejteket ampicillin rezisztenciára szelektálva elimináljuk.

Az *ER1821 ΔlacI* törzs genomjába integráltuk a kloramfenikol-acetiltranszferáz génjét úgy, hogy a gén egy módosított *tac* promoterről íródjon át. A módosított *tac* promoter szintetikus *lac* operátorok és a Lac represszor kontrollja alatt áll. Az így létrehozott *ER1821 ΔlacI CAT_{HOB}* törzs akkor válik kloramfenikol-rezisztenssé, ha a Lac represszor szintézise gátlódik. Így kloramfenikol rezisztencia alapján szelektálhatunk a keresett, specifikus DNS-fehérje kötődést mutató klónra.

A fenti módosítások megnyitották a lehetőségét annak, hogy az I-Block módszer a szekvenciaspeciaspecifikus DNS-fehérje kölcsönhatás vizsgálatának széles körben alkalmazható módszere legyen.

XI.2. Angol nyelvű összefoglaló

We have developed a simple method (I-Block) for studying sequence specific DNA-protein interactions *in vivo*, in *Escherichia coli*. The technique is largely based on the well-known regulatory mechanism of the *lac* operon and has three essential constituents: the *E. coli ER1821 ΔlacI lacI* deletion strain, and two compatible plasmids. The pLacI plasmid carries the *E. coli lacI* gene and the pDBP plasmid encodes the gene of the tested protein. The potential binding site of the investigated protein is inserted into the *lacI* promoter on the pLacI plasmid. If the protein of interest binds to the target site, the constitutive *lacI* transcription is blocked, and the synthesis of β-galactosidase is induced. Thus, specific DNA-protein interaction can be detected by measuring β-galactosidase activity. We demonstrated functioning of the I-Block assay using five DNA binding proteins: two custom-made zinc finger proteins, two proteins utilizing helix-turn-helix domain for DNA recognition (the lambda phage cI857 repressor and the Tet repressor) and the CRISPR-dCas9 protein. Because these proteins belong to three different classes of DNA recognizing proteins, we assume that the technique can be used for a wide range of DNA binding proteins.

For proper functioning of the method, low constitutive production of Lac repressor is needed, which was achieved with the use of a low copy number plasmid vector. To find the insertion site that is optimal for the assay, three restriction sites were created within the *lacI* promoter by site-directed mutagenesis. Of the three cloning sites, the NheI site overlapping the -10 conserved element proved best, partly because it weakened the strength of the promoter (the *lacI_N* promoter).

An important precondition of the method is that the inserted target sequence should not impair transcription of the *lacI* gene. The zinc-finger recognition sites have highly unequal distribution of guanines and cytosines in the two strands. We observed that the cytosine-rich sequences in the non-template strand block *lacI* transcription.

In the earlier version of the assay, the target sites were inserted into the NheI site, or between the NheI site and the EcoRI site located downstream of the NheI site. More recent results showed that consistency of the assay is improved if the sequence between the -10 conserved element and the transcriptional initiation site (+1) is left intact. Inserting the foreign sequence at the +2 transcriptional position has the advantage that the discriminator sequence and the transcriptional start site, which have an effect on the rate of transcription, remain the same independently of the inserted target sequence.

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. We have cloned an 18 bp random sequence as target site into pLacI. The transformants obtained with the plasmids contained a high proportion of LacI⁻ clones, which disturb the assay. Consistently with our previous observations made with individual sequences, Illumina sequencing showed that in a substantial number of LacI⁻ clones, the non-template strand of the inserted sequence was rich in cytosines. Dependence of the phenomenon on the cytosine content of the inserted target sites was also supported by the results of the experiment, in which during the chemical synthesis the molar ratio of cytosines was decreased from 0.25 to 0.1. The proportion of LacI⁻ clones obtained from this library decreased by half.

Results with σ^{32} –dependent promoter suggest that the appearance of LacI⁻ phenotype in the case of certain inserted sequences is caused by a known phenomenon, the blockage of transition from transcriptional initiation to elongation. In such cases the σ^{70} subunit of RNA polymerase stays bound to the initial transcribed sequence and blocks or slows down the transition to elongation. Transcription of the *lacI* gene was not restored by σ^{70} mutants, which are known to be more tolerant towards sequences blocking the transition. Transcriptional blockage by the inserted foreign sequence could be abolished by moving the insertion site in the 3' direction, but position +10 was already too far, because binding of the protein at this position did not block the *lacI* transcription.

It was possible to decrease the number of blocking sequences thus increase the searchable sequence space by replacing the *lacI_N* with the stronger wild-type *lacI* promoter.

We have developed a system for the selection of LacI⁺ clones. The *lacI* and the β -lactamase genes were cloned in a tandem arrangement to ensure coupled transcription. Transcriptional coupling allows elimination of LacI⁻ clones by selecting for ampicillin resistance.

The gene of chloramphenicol-acetyltransferase was fused to a modified *tac* promoter and inserted into the genome of *ER1821 Δ lacI*. The modified *tac* promoter is controlled by synthetic *lac* operators and the Lac repressor. The new strain *ER1821 Δ lacI CAT_{HOB0}* becomes resistant to chloramphenicol when synthesis of the Lac repressor is blocked. The strain allows selection of binding positive clones by chloramphenicol resistance.

The modifications described above open the possibility for the I-Block method to become a widely used technique for studying sequence specific DNA-protein interactions.

XII. Témavezetői nyilatkozat

Az I-Block módszer kidolgozását Szentes Sarolta kezdte a rövidebb ideig csoportunkban dolgozó Sági-Zsigmond Eszter és Salamon Pál segítségével. A használható módszer kialakítása azonban már elsősorban a disszertáció szerzőjének, Zsibrita Nikolettnek a nevéhez fűződik, aki Szentes Sarolta csoportból való távozása után vette át a munkát. A módszer továbbfejlesztett változatának kidolgozása is nagyrészt az ő érdeme a kísérletek tervezése, végrehajtása és értékelése tekintetében is.

Más csoporttagok hozzájárulása az alábbi volt:

Koncz Mihály végezte a dCas9 felhasználásával járó kísérleteket.

Karcagi Ildikó hozta létre a kloramfenikol rezisztencia gént a genomon hordozó gazdatörzset és dolgozta ki felhasználásának körülményeit. Ezen kívül klónozásokkal segítette a direkt szelekcióra alkalmas módszerváltozat feltételeinek meghatározását.

Pletl Zita egy rövidebb ideig laboránsként segítette a munkát.

Tanusítom, hogy a disszertációban leírt eredmények nagyrészt Zsibrita Nikolett munkájából származnak aki joggal használhatja fel őket disszertációja megírásához.

Dr. Kiss Antal

témavezető

XIII. Függelék

XIII.1. A felhasznált plazmidok listája; Függelék 1. táblázat

6. Függelék 1.táblázat

plazmid	vektor	rez.	megjegyzés	referencia/forrás
pBAD24		Ap	expressziós vektor	(104)
pB6ZA	pBAD24	Ap	6ZA cink-ujj fehérje expressziója	(76)
pB6ZB			6ZB cink-ujj fehérje expressziója	(76)
pBTetR			Tet represszor expressziója	Jelen munka
pORTMAGE-2	pBBR1	Ap	λ cl857 represszor expressziója	(78)
pdOM2	pBBR1	Ap	pORTMAGE-2 delóciós változata	Jelen munka
pdCas9		Cm	vektor CRISPR-dCas9 irányításhoz	(29)
pdCas9-AK518	pdCas9	Cm	CRISPR-dCas9 <i>lacI_E</i> ptomoterhez irányítva, AK518-519 spacer	(76)
pUA66		Km	alacsony kópiaszámú vektor	(77)
pUA-lacI	pUA66	Km	<i>lacI</i> gén	(76)
pUA-lacI _E			EcoRI hely <i>lacI</i> promoterben	
pUA-lacI _{NE}			NheI és EcoRI hely <i>lacI</i> promoterben	
pUA-lacI _{PE}			PvuI és EcoRI hely <i>lacI</i> promoterben	
pUA-lacI _{PNE}			PvuI, NheI és EcoRI hely <i>lacI</i> promoterben	
pUA-lacI _{NE} -(N-6ZB)			<i>lacI_{NE}</i> promoter, 6ZB kötőhely NheI helyen	
pUA-lacI_N			NheI hely <i>lacI</i> promoterben	
pUA-lacI _N -(N-6ZA1)			<i>lacI_N</i> promoter, 6ZA1 kötőhely NheI helyen	
pUA-lacI _N -(N-6ZA2)			<i>lacI_N</i> promoter, 6ZA2 kötőhely NheI helyen	
pUA-lacI _N -(N-3ZA1)			<i>lacI_N</i> promoter, 3ZA1 kötőhely NheI helyen	Jelen munka
pUA-lacI _N -(N-3ZA2)			<i>lacI_N</i> promoter, 3ZA2 kötőhely NheI helyen	
pUA-lacI _N -(N-3ZB2)			<i>lacI_N</i> promoter, 3ZB2 kötőhely NheI helyen	
pUA-dlacI			<i>lacI</i> promoter fúzióban <i>gfp</i> génnel	
pUA-dlacI_N			<i>lacI_N</i> promoter fúzióban <i>gfp</i> génnel	
pLacI (pdUA-lacI)			<i>lacI</i> gén (pUA-lacI deléciós változata)	
pLacI _E			EcoRI hely <i>lacI</i> promoterben	
pLacI _{NE}			NheI és EcoRI hely <i>lacI</i> promoterben	
pLacI _{PE}			PvuI és EcoRI hely <i>lacI</i> promoterben	
pLacI _{PNE}			PvuI, NheI és EcoRI hely <i>lacI</i> promoterben	
pLacI _{NE} -(N-6ZB)			<i>lacI_{NE}</i> promoter, 6ZB kötőhely NheI helyen	

pLacI _N	pUA66	Km	NheI hely <i>lacI</i> promoterben	Jelen munka
pLacI _P -(P-6ZA)			<i>lacI_P</i> promoter, 6ZA kötőhely PvuI helyen	
pLacI _P -(P-6ZB)			<i>lacI_P</i> promoter, 6ZB kötőhely PvuI helyen	
pLacI _N -(N-6ZA)			<i>lacI_N</i> promoter, 6ZA kötőhely NheI helyen	
pLacI _N -(N-6ZB)			<i>lacI_N</i> promoter, 6ZB kötőhely NheI helyen	
pLacI _{PN} -(P-6ZA)			<i>lacI_{PN}</i> promoter, 6ZA kötőhely PvuI helyen	
pLacI _{PN} -(P-6ZB)			<i>lacI_{PN}</i> promoter, 6ZB kötőhely PvuI helyen	
pLacI _{PN} -(N-6ZA)			<i>lacI_{PN}</i> promoter, 6ZA kötőhely NheI helyen	
pLacI _{PN} -(N-6ZB)			<i>lacI_{PN}</i> promoter, 6ZB kötőhely NheI helyen	
pLacI _E -(E-6ZA)			<i>lacI_E</i> promoter, 6ZA kötőhely EcoRI helyen	
pLacI _E -(E-6ZB)			<i>lacI_E</i> promoter, 6ZB kötőhely EcoRI helyen	
pLacI _{NE} -(E-6ZA)			<i>lacI_{NE}</i> promoter, 6ZA kötőhely EcoRI helyen	
pLacI _{NE} -(E-6ZB)			<i>lacI_{NE}</i> promoter, 6ZB kötőhely EcoRI helyen	
pLacI _{NE} -(N-6ZA)			<i>lacI_{NE}</i> promoter, 6ZA kötőhely NheI helyen	
pLacI _{NE} -(N-6ZB)			<i>lacI_{NE}</i> promoter, 6ZB kötőhely NheI helyen	
pLacI _{NE} -(N-6ZB, E-6ZA)			<i>lacI_{NE}</i> promoter, 6ZB kötőhely NheI helyen, 6ZA kötőhely EcoRI helyen	
pLacI _{PE} -(E-6ZA)			<i>lacI_{PE}</i> promoter, 6ZA kötőhely EcoRI helyen	
pLacI _{PE} -(E-6ZB)			<i>lacI_{PE}</i> promoter, 6ZB kötőhely EcoRI helyen	
pLacI _{PNE} -(P-6ZA)			<i>lacI_{PNE}</i> promoter, 6ZA kötőhely PvuI helyen	
pLacI _{PNE} -(P-6ZB)			<i>lacI_{PNE}</i> promoter, 6ZB kötőhely PvuI helyen	
pLacI _{PNE} -(N-6ZA)			<i>lacI_{PNE}</i> promoter, 6ZA kötőhely NheI helyen	
pLacI _{PNE} -(N-6ZB)			<i>lacI_{PNE}</i> promoter, 6ZB kötőhely NheI helyen	
pLacI _{PNE} -(E-6ZA)			<i>lacI_{PNE}</i> promoter, 6ZA kötőhely EcoRI helyen	
pLacI _{PNE} -(E-6ZB)			<i>lacI_{PNE}</i> promoter, 6ZB kötőhely EcoRI helyen	
pLacI _N -(N-λOR)			<i>lacI_N</i> promoter, λ fág O _R 1 és O _R 2 operátor NheI helyen	
pLacI _{NE} -(N+1-6ZA1-E)			<i>lacI_{NE}</i> promoter, 6ZA1 kötőhely +1 és EcoRI hely közé integrált	
pLacI _{NE} -(N+1(G-A)-6ZA1-E)			<i>lacI_{NE}</i> promoter, 6ZA1 kötőhely +1 és EcoRI hely közé integrált, TKH (+1) G-A csere	
pLacI _{NE} -(N-6ZA2-E)			<i>lacI_{NE}</i> promoter, 6ZA2 kötőhely NheI és EcoRI hely közé integrált	

pLacI _{NE} -(N+1(G-A)-6ZA2-E)	pUA66	Km	<i>lacI</i> _{NE} promoter, 6ZA2 kötőhely +1 és EcoRI hely közé integrált, TKH (+1) G-A csere	Jelen munka
pLacI _{NE} -(N+3-6ZA2-E)			<i>lacI</i> _{NE} promoter, 6ZA2 kötőhely +3 és EcoRI hely közé integrált	
pLacI _{NE} -(N+5-6ZA2-E)			<i>lacI</i> _{NE} promoter, 6ZA2 kötőhely +5 és EcoRI hely közé integrált	
pLacI _{NE} -(N+7-6ZA2-E)			<i>lacI</i> _{NE} promoter, 6ZA2 kötőhely +7 és EcoRI hely közé integrált	
pLacI _{NE} -(N+10-6ZA2-E)			<i>lacI</i> _{NE} promoter, 6ZA2 kötőhely +10 és EcoRI hely közé integrált	
pLacI_{NE}^{d03}			<i>lacI</i> gén, <i>lacO3</i> operátor deletált	
pLacI _{NE} ^{d03} -(N-6ZA1-E)			<i>lacI</i> _{NE} promoter, 6ZA1 kötőhely +1 és EcoRI hely közé integrált	
pLacI _{NE} ^{d03} -(N-6ZA2-E)			<i>lacI</i> _{NE} promoter, 6ZA2 kötőhely +3 és EcoRI hely közé integrált	
pLacI _{NE} ^{d03} -(N-6ZB1-E)			<i>lacI</i> _{NE} promoter, 6ZB1 kötőhely +2 és EcoRI hely közé integrált	
pLacI _{NE} ^{d03} -(N-6ZB2-E)			<i>lacI</i> _{NE} promoter, 6ZB2 kötőhely +2 és EcoRI hely közé integrált	
pLacI _{NE} ^{d03} -(N-λO1,2-E)			<i>lacI</i> _{NE} promoter, λ fág O _R 2-O _R 1 kötőhely +2 és EcoRI hely közé integrált	
pLacI _{NE} ^{d03} -(N-λO2,1-E)			<i>lacI</i> _{NE} promoter, λ fág O _R 1-O _R 2 kötőhely +2 és EcoRI hely közé integrált	
pLacI _{NE} ^{d03} -(N-tetO1-E)			<i>lacI</i> _{NE} promoter, Tet represszor O1 operátor +2 és EcoRI hely közé integrált	
pLacI _{NE} -N18			<i>lacI</i> _{NE} promoter, 18 bp hosszú, random szekvencia +2 és EcoRI hely közé integrált	
pLacI _{NE} ^{d03} -N18			<i>lacI</i> _{NE} promoter, 18 bp hosszú, random szekvencia +2 és EcoRI hely közé integrált	
pLacI_{XE}³²			<i>lacI</i> gén <i>groE</i> promoterrel fúzióban, XhoI és EcoRI hely <i>groE</i> promoterben	
pLacI _{XE} ³² -(X-6ZA1-E)			<i>groE</i> _{XE} promoter, 6ZA1 kötőhely TKH és EcoRI hely közé integrált	
pLacI _{XE} ³² -(X-6ZA2-E)			<i>groE</i> _{XE} promoter, 6ZA2 kötőhely TKH és EcoRI hely közé integrált	
pLacI _{XE} ³² -(X-6ZB1-E)			<i>groE</i> _{XE} promoter, 6ZB1 kötőhely TKH és EcoRI hely közé integrált	
pLacI _{XE} ³² -(X-6ZB2-E)			<i>groE</i> _{XE} promoter, 6ZB2 kötőhely TKH és EcoRI hely közé integrált	
pLacI _{XE} ³² -(X-λO1,2-E)			<i>groE</i> _{XE} promoter, λ fág O _R 2-O _R 1 kötőhely TKH és EcoRI hely közé integrált	
pLacI _{XE} ³² -(X-λO2,1-E)			<i>groE</i> _{XE} promoter, λ fág O _R 1-O _R 2 kötőhely TKH és EcoRI hely közé integrált	
pB-rpoD	pBAD24	Ap	<i>rpoD</i> gén	
pB-rpoD(L402F)	pBAD24	Ap	L402F mutációt hordozó <i>rpoD</i> gén	
pB-rpoD(Q406A)			Q406A mutációt hordozó <i>rpoD</i> gén	
pST76A		Ap	„öngyilkos” plazmid, genomi módosításhoz; <i>ts ori</i> (hőérzékeny)	(71)
pST-rpod(L402F)dAS8	pST76A	Ap	<i>rpoD</i> gén L402F mutáció genomi bevezetéséhez	Jelen munka
pSTKST		Km	<i>I-SceI</i> endonukleáz	(71)
pLacI-ApR_{NE}	pUA66	Km, Ap	<i>lacI</i> gén, ApR gén (β-laktamáz), <i>lacI</i> _{NE} promoter	Jelen munka

pLacI-ApR _{NE} -(N-6ZA1-E)	pUA66	Km, Ap	<i>lacI</i> _{NE} promoter, 6ZA1 kötőhely +1 és EcoRI helyek közé integrált	Jelen munka
pLacI-ApR _{NE} -(N-6ZA2-E)			<i>lacI</i> _{NE} promoter, 6ZA2 kötőhely +3 és EcoRI helyek közé integrált	
pLacI-ApR _{NE} -(N-6ZB1-E)			<i>lacI</i> _{NE} promoter, 6ZB1 kötőhely +2 és EcoRI helyek közé integrált	
pLacI-ApR _{NE} -(N-6ZB2-E)			<i>lacI</i> _{NE} promoter, 6ZB2 kötőhely +2 és EcoRI helyek közé integrált	
pLacI-ApR _{NE} -(N-λO1-E)			<i>lacI</i> _{NE} promoter, λ O _R 2-O _R 1 operátorok +2 és EcoRI helyek közé integrált	
pLacI-ApR _{NE} -(N-λO2-E)			<i>lacI</i> _{NE} promoter, λ O _R 1-O _R 2 operátorok +2 és EcoRI helyek közé integrált	
pLacI-ApR _{NE} -(N-tetO1-E)			<i>lacI</i> _{NE} promoter, Tet represszor O1 operátor +2 és EcoRI helyek közé integrált	
pLacI-ApR_{NE}-N18			<i>lacI</i> _{NE} promoter, 18 bp hosszú, random szekvencia +2 és EcoRI helyek közé integrált	
pLacI-ApR_{wt}			<i>lacI</i> gén, ApR gén (β-laktamáz) vad típusú <i>lacI</i> promoter	
pLacI-ApR_{wt}-N18			<i>lacI</i> promoter, 18 bp hosszú, random szekvencia ITS szekvenciához beépített	
pLacI-ApR_{wt}-6ZA1			<i>lacI</i> promoter, 6ZA1 felisemrőszekvencia az ITS szekvenciába inszertálva	
pLacI-ApR_{wt}-6ZA2			<i>lacI</i> promoter, 6ZA2 felisemrőszekvencia az ITS szekvenciába inszertálva	
pMALc2x		Ap	<i>tac</i> promoter amplifikálása	New England BioLabs
pSEVA3513	pSEVA351	Cm	Vektor plazmid (SEVA-DB)	(105) (ajándék Tímár Edittől)
pS6ZA	pSEVA351	Cm	6ZA fehérje expressziója EM7 promoterről	Jelen munka
pS6ZB			6ZB fehérje expressziója EM7 promoterről	
pLacI_N-CAT_{tac(O1)}	pUA66	Km, Cm	<i>lacI</i> gén <i>lacI</i> _N promoterrel; CAT gén <i>tac</i> promoterrel fúzióban és <i>lacO</i> 1 operátorral	
pLacI_N-CAT_{tac(HO)}			<i>lacI</i> gén <i>lacI</i> _N promoterrel; CAT gén <i>tac</i> promoterrel fúzióban és <i>lacO</i> sz operátorral HindIII helyen	
pLacI_N-CAT_{tac(BO)}			<i>lacI</i> gén <i>lacI</i> _N promoterrel; CAT gén <i>tac</i> promoterrel fúzióban és <i>lacO</i> sz operátorral BsrGI helyen	
pLacI_N-CAT_{tac(HOBO)}			<i>lacI</i> gén <i>lacI</i> _N promoterrel; CAT gén <i>tac</i> promoterrel fúzióban és két <i>lacO</i> sz operátorral BsrGI és HindIII helyeken	

Az alapvektorokat szürkével emeltem ki. Az alapvektorokból létrehozott, a további klónozásokhoz felhasznált fontos plazmidvektorokat vastagon eltem ki. A restriktációs klónozóhelyek egybetűs rövidítései: P=PvuI, N=NheI, E=EcoRI, H=HindIII, B=BsrGI. További rövidítések: TKH=transzkripció kezdőhely, ITS=kezdeti átíró szekvencia, CAT=kloramfenikol-acetiltranszferáz, O=operátor, *lacO*_{sz}=szintetikus *lac* operátor, rez=rezisztencia.

XIII.2. A munka során alkalmazott oligonukleotidok; Függelék 2. táblázat

7. Függelék 2. táblázat

oligo	szekvencia (5' – 3')	megjegyzés
AK276	AATTGCCGGGGCTGGGGGAGGG	6ZA kötőhely (sárga háttér) komplementer AK277 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK277	AATTCCCTCCCCAGCCCCGGC	6ZA kötőhely (sárga háttér) komplementer AK276 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK278	AATTGGAGTTGGGGGAGTGAGT	6ZB kötőhely (zöld háttér) komplementer AK279 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK279	AATTACTCACTCCCCAACTCC	6ZB kötőhely (zöld háttér) komplementer AK278 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK330	CTAGCTTAACACCGTGCGTGTGACTATTTTAC CTCTGGCGGTGATAAT	λ fág O _R 1 és O _R 2 operátor szekvencia (kék háttér) komplementer AK331 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK331	CTAGATTATCACCGCCAGAGGTAATAAGTCA ACACGCACGGTGTTAGA	λ fág O _R 1 és O _R 2 operátor szekvencia (kék háttér) komplementer AK330 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK405	CTAGGCCGGGGCTGGGGGAGGG	6ZA kötőhely (sárga háttér) komplementer AK406 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK406	CTAGCCCTCCCCAGCCCCGGC	6ZA kötőhely (sárga háttér) komplementer AK405 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK407	GCCGGGGCTGGGGGAGGGAT	6ZA kötőhely (sárga háttér) komplementer AK408 oligoval; PvuI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK408	CCCTCCCCAGCCCCGGCAT	6ZA kötőhely (sárga háttér) komplementer AK407 oligoval; PvuI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK409	CTAGGGAGTTGGGGGAGTGAGT	6ZB kötőhely (zöld háttér) komplementer AK410 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK410	CTAGACTCACTCCCCAACTCC	6ZB kötőhely (zöld háttér) komplementer AK409 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK411	GGAGTTGGGGGAGTGAGTAT	6ZB kötőhely (zöld háttér) komplementer AK412 oligoval; PvuI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK412	ACTCACTCCCCAACTCCAT	6ZB kötőhely (zöld háttér) komplementer AK411 oligoval; PvuI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK510	GAAGAGAGTGAATTCAGGGT	mutagén oligonukleotid EcoRI hely (kék) létrehozásához <i>lacI</i> promoterben QuikChange módszerrel; kódoló szál; mutáció aláhúzva; komplementer AK511 oligoval
AK511	ACCCTGAATTCACTCTCTTC	mutagén oligonukleotid EcoRI hely (kék) létrehozásához <i>lacI</i> promoterben QuikChange módszerrel; nem-kódoló szál; mutáció aláhúzva; komplementer AK510 oligoval
AK518	AAACGGAAGAGAGTGAATTCAGGGG	spacer CRISPR-dCas9-irányításhoz; komplementer AK519 oligoval; BsaI kompatibilis vég (aláhúzva)

AK519	<u>AAA</u> ACCCTGAATTCACCTCTCTCC	spacer CRISPR-dCas9-irányításhoz; komplementer AK518 oligoval; BsaI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK595	<u>CTAG</u> TGGGGGAGGG	3ZA kötőhely (sárga háttér) komplementer AK596 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK596	<u>CTAG</u> CCCTCCCCA	3ZA kötőhely (sárga háttér) komplementer AK595 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK597	<u>CTAG</u> GGAGTGAGT	3ZB kötőhely (zöld háttér) komplementer AK598 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK598	<u>CTAG</u> ACTCACTCC	3ZB kötőhely (zöld háttér) komplementer AK597 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva)
AK718	ACGGTCCGACATCATAACGGTTC	PCR primer <i>tac</i> promoter amplifikálásához pMAL-c2x plazmidről; komplementer AK719 oligoval
AK719	TTT <u>CATATG</u> CTATGGTCCTTGTTGG	PCR primer <i>tac</i> promoter amplifikálásához pMAL-c2x plazmidről; komplementer AK718 oligoval; NdeI hely (kék)
AK720	CAG <u>CATATG</u> GAGAAAAAATCACTGG	PCR primer CAT gén amplifikálásához pSEVA3513 plazmidről; komplementer AK721 oligoval; NdeI hely (kék)
AK721	CTG <u>CATATG</u> GATACACCAAGGAAAG	PCR primer CAT gén amplifikálásához pSEVA3513 plazmidről; komplementer AK720 oligoval; NdeI hely (kék)
AK742	TTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAA <u>TGTACA</u>	<i>tac</i> promotert (dőlt) hordozó oligonukleotid; BsrGI hely (kék); komplementer AK743 oligoval
AK743	<u>TAT</u> <u>TGTACA</u> ATTATACGAGCCGATGATTAATTGTC AA	<i>tac</i> promotert (dőlt) hordozó oligonukleotid; BsrGI hely (kék); NdeI kompatibilis vég (aláhúzva); komplementer AK742 oligoval
AK744	<u>GTACA</u> AATTGTGAGCGCTCACAATT	szintetikus, szimmetrikus <i>lac</i> operátort (piros háttér) hordozó oligonukleotid; BsrGI kompatibilis vég (aláhúzva); önmagával duplexet alkot
AK745	<u>AGCT</u> AATTGTGAGCGCTCACAATT	szintetikus, szimmetrikus <i>lac</i> operátort (piros háttér) hordozó oligonukleotid; HindIII kompatibilis vég (aláhúzva); önmagával duplexet alkot
AK787	<u>CTAG</u> CGCCCGGCCGGGGCTGGGGGAGGG	6ZA1 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK788 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva), kódoló szál, TKH (G ₊₁) (vastagon)
AK788	<u>AATT</u> CCCTCCCCAGCCCCGGCCGGGCG	6ZA1 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK787 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem kódoló szál
AK789	<u>CTAG</u> CGCCA GCCGGGGCTGGGGGAGGG	6ZA1 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK790 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva), kódoló szál, TKH (A ₊₁) (vastagon)
AK790	<u>AATT</u> CCCTCCCCAGCCCCGGCTGGGCG	6ZA1 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK789 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem kódoló szál
AK791	<u>CTAG</u> CCCTCCCCAGCCCCGGC	6ZA2 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK792 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva), kódoló szál
AK792	<u>AATT</u> GCCGGGGCTGGGGGAGGG	6ZA2 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK791 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem kódoló szál

AK795	CCTGCGCCATCAGATCCTTG	szekvenáló és PCR primer pLacI plazmidon, upstream <i>lacI</i> promotertől
AK796	<u>CTAGCGCCA</u> CCCTCCCCAGCCCCGGC	6ZA2 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK797 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva), kódoló szál, TKH (A ₊₁) (vastagon)
AK797	<u>AATT</u> GCCGGGGCTGGGGGAGGGTGGCG	6ZA2 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK796 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem kódoló szál
AK798	GGTCTAGATCACTGCCCCTTTCCAGTC	PCR primer <i>lacI</i> gén amplifikálásához; XbaI hely (kék)
AK801	<u>CTAGCGCCCGGA</u> CCCTCCCCAGCCCCGGC	6ZA2 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK802 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva), kódoló szál, TKH (G ₊₁) (vastagon)
AK802	<u>AATT</u> GCCGGGGCTGGGGGAGGGTCCGGGCG	6ZA2 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK801 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem kódoló szál
AK803	<u>CTAGCGCCCGGAAG</u> CCCTCCCCAGCCCCGGC	6ZA2 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK804 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva), kódoló szál, TKH (G ₊₁) (vastagon)
AK804	<u>AATT</u> GCCGGGGCTGGGGGAGGGCTTCCGGCG G	6ZA2 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK803 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem kódoló szál
AK805	<u>CTAGCGCCCGGAAGAG</u> CCCTCCCCAGCCCCG GC	6ZA2 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK806 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva), kódoló szál, TKH (G ₊₁) (vastagon)
AK806	<u>AATT</u> GCCGGGGCTGGGGGAGGGCTCTTCCGG GCG	6ZA2 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK805 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem kódoló szál
AK813	TTAATTAAGAATTCCTGGCTGGTGA	'forward' PCR primer groE promoter amplifikálásához; EcoRI hely (kék)
AK814	TAGCACTGGAAGTGGCAC	'reverz' PCR primer groE promoter amplifikálásához
AK815	<u>TCGAGAAATGGGGATGAGGC</u>	mutagén ('reverz') oligonukleotid XhoI hely létrehozásához groE promoterben, inverz-PCR módszerrel; mutáció aláhúzva
AK816	GTCACCAGCCGGGAATT	mutagén ('forward') oligonukleotid XhoI hely létrehozásához groE promoterben, inverz-PCR módszerrel
AK820	<u>TCGAGTCACC</u> GCCGGGGCTGGGGGAGGG	6ZA1 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK821 oligoval; XhoI kompatibilis vég (aláhúzva), kódoló szál
AK821	<u>AATT</u> CCCTCCCCAGCCCCGGCGGTGAC	6ZA1 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK820 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem kódoló szál
AK822	<u>TCGAGTCACC</u> CCCTCCCCAGCCCCGGC	6ZA2 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK823 oligoval; XhoI kompatibilis vég (aláhúzva), kódoló szál
AK823	<u>AATT</u> GCCGGGGCTGGGGGAGGGGGTGAC	6ZA2 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK822 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem kódoló szál
AK826	<u>TCGAGTCACC</u> GGAGTTGGGGGAGTGAGT	6ZB1 kötőhely (zöld háttér); komplementer AK827 oligoval; XhoI kompatibilis vég (aláhúzva), kódoló szál

AK827	AATT <u>ACTCACTCCCCAACTCC</u> GGTGAC	6ZB1 kötőhely (zöld háttér); komplementer AK826 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem kódoló szál
AK828	TCGAGTCACC <u>ACTCACTCCCCAACTCC</u>	6ZB2 kötőhely (zöld háttér); komplementer AK829 oligoval; XhoI kompatibilis vég (aláhúzva), kódoló szál
AK829	AATT <u>GGAGTTGGGGGAGTGAGT</u> GGTGAC	6ZB2 kötőhely (zöld háttér); komplementer AK828 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem kódoló szál
AK830	TCGAGTCACCATATCACC GCCAGAGGTA AAA TAGTCAACACGCACGGTGTTAGA	λ fág O _R 1 és O _R 2 operátor szekvencia (kék háttér); komplementer AK831 oligoval; XhoI kompatibilis vég (aláhúzva), kódoló szál
AK831	AATTTCTAACACCGTGCGTGTTGACTATTTTAC CTCTGGCGGTGATAATGGTGAC	λ fág O _R 1 és O _R 2 operátor szekvencia (kék háttér); komplementer AK830 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem kódoló szál
AK832	TCGAGTCACCTCTAACACCGTGCGTGTTGACT ATTTTACCTCTGGCGGTGATAAT	λ fág O _R 1 és O _R 2 operátor szekvencia (kék háttér); komplementer AK833 oligoval; XhoI kompatibilis vég (aláhúzva), kódoló szál
AK833	AATTATTATCACC GCCAGAGGTA AAAATAGTCA ACACGCACGGTGTTAGAGGTGAC	λ fág O _R 1 és O _R 2 operátor szekvencia (kék háttér); komplementer AK832 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem kódoló szál
AK838	CTAGCGCCCGGAAGAGAGTCCCTCCCCAGCC CCGGC	6ZA2 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK839 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva), kódoló szál, TKH (G ₊₁) (vastagon)
AK839	AATTGCCGGGGCTGGGGGAGGGACTCTCTTC CGGGCG	6ZA2 kötőhely (sárga háttér); komplementer AK838 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem kódoló szál
AK840	CTGGTTGAAGCGTATCG	PCR 'forward' primer <i>rpoD</i> gén amplifikálásához
AK841	AGGCATACTTGATGACAG	PCR 'reverz' primer <i>rpoD</i> gén amplifikálásához
AK844	TCAGGTCAAAGAACTGCAAG	mutagén oligonukleotid; L402F mutáció bevezetése <i>rpoD</i> génben QuikChange módszerrel; kódoló szál; mutáció aláhúzva; komplementer AK845 oligoval
AK845	CTTGCACTTCITTGACCTGA	mutagén oligonukleotid; L402F mutáció bevezetése <i>rpoD</i> génben QuikChange módszerrel; nem-kódoló szál; mutáció aláhúzva; komplementer AK844 oligoval
AK848	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCGGGCGCTAG CATG	18 bp hosszú, random szekvenciát (piros, A:G:C:T=1:1:1:1) hordozó 'reverz' primer; random szekvencia integrálása <i>lacI_{NE}</i> promoterbe módosított inverz-PCR módszerrel
AK849	GAATTCAGGGTGGTGAATGTGA	'forward' primer (AK848 párja); random szekvencia integrálása <i>lacI_{NE}</i> promoterbe módosított inverz-PCR módszerrel
AK851	CTAGCGCCCGGGAGTTGGGGGAGTGAGT	6ZB1 kötőhely (zöld háttér); komplementer AK852 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva); kódoló szál, TKH (G ₊₁) (vastagon)
AK852	AATTACTCACTCCCCAACTCCCGGGCG	6ZB1 kötőhely (zöld háttér) komplementer AK851 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem-kódoló szál
AK853	CTAGCGCCCGGACTCACTCCCCAACTCC	6ZB2 kötőhely (zöld háttér) komplementer AK854 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva); kódoló szál, TKH (G ₊₁) (vastagon)

AK854	AATTGGAGTTGGGGGAGTGAGTCCGGGCG	6ZB2 kötőhely (zöld háttér); komplementer AK853 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem-kódoló szál
AK855	CTAGCGCCCGGATTATCACCGCCAGAGGTAATAAGTCAACACGCACGGTGTTAGA	λ fág O _R 1 és O _R 2 operátor szekvencia (kék háttér); komplementer AK856 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva), kódoló szál; TKH (G ₊₁) (vastagon)
AK856	AATTCTTAACACCGTGCGTGTTGACTATTTTACCTCTGGCGGTGATAATCCGGGCG	λ fág O _R 1 és O _R 2 operátor szekvencia (kék háttér); komplementer AK855 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem kódoló szál
AK857	CTAGCGCCCGGTCTAACACCGTGCGTGTTGACTATTTTACCTCTGGCGGTGATAAT	λ fág O _R 1 és O _R 2 operátor szekvencia (kék háttér); komplementer AK858 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva), kódoló szál; TKH (G ₊₁) (vastagon)
AK858	AATTATATCACCGCCAGAGGTAATAAGTCAACACGCACGGTGTTAGACCGGGCG	λ fág O _R 1 és O _R 2 operátor szekvencia (kék háttér); komplementer AK857 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem kódoló szál
AK859	GAACAAGCCGTGGTCTG	szekvenáló primer <i>rpoD</i> génen
AK860	AATCAGGTCAAGGAACTGCAAG	mutagén oligonukleotid; Q406A mutáció bevezetése <i>rpoD</i> génben inverz-PCR módszerrel; kódoló szál
AK861	GCGGAAGGCAACATCGGTC	mutagén oligonukleotid; Q406A mutáció bevezetése <i>rpoD</i> génben inverz-PCR módszerrel; nem-kódoló szál; mutáció aláhúzva
AK893	CTAGCGCCCGGTCCCTATCAGTGATAGAGA	tetO1 operátor (keki-zöld háttér); komplementer AK894 oligoval; NheI kompatibilis vég (aláhúzva); kódoló szál, TKH (G ₊₁) (vastagon)
AK894	AATTCTCTATCACTGATAGGGAACCGGGCG	tetO1 operátor (keki-zöld háttér); komplementer AK893 oligoval; EcoRI kompatibilis vég (aláhúzva); nem-kódoló szál
AK895	AATTCCATGGCTACTCAGCTATCTAG	PCR primer <i>tetR</i> gén amplifikálásához (downstream); NcoI hely (kék);
AK896	TCTATCGATTGTGAGGGAAATCAT	PCR primer <i>tetR</i> gén amplifikálásához (upstream)
AK899	TGGAAAGCGGGCAGTGATCTAG	PCR primer <i>lacI</i> gén amplifikálásához
AK900	CAATTCAGGGTGGTGAATGTGA	'forward' primer (AK936 párja); random szekvencia integrálása <i>lacI_{wt}</i> promoterbe módosított inverz-PCR módszerrel
AK910	ACTTCTAGAGGAGGAAGAGTATGAGTATTC	PCR primer ('forward') β-laktamáz gén amplifikálásához
AK911	GGATCTAGAGTAACTTGGTCTGAC	PCR primer ('reverz') β-laktamáz gén amplifikálásához
AK933	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCGGGCGCTATCATG	18 bp hosszú, random szekvenciát (piros) hordozó 'reverz' primer; megegyezik AK848 primerrel, azonban az A:G:C:T arány 30:10:30:30 volt a random szekvenciárésznél
AK936	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCGGGCGCTAGCATG	18 bp hosszú, random szekvenciát (piros) hordozó 'reverz' primer; random szekvencia integrálása <i>lacI_{wt}</i> promoterbe módosított inverz-PCR módszerrel

AK951	CCCTCCCCAGCCCCGGCCGGGCGCTATCATG	6ZA2 szekvenciát (sárga háttér) hordozó 'reverz' primer; 6ZA1 szekvencia integrálása <i>lacI_{wt}</i> promoter nem templát szálára, módosított inverz-PCR módszerrel
AK952	GCCGGGGCTGGGGGAGGGCCGGGCGCTATCATG	6ZA1 szekvenciát (sárga háttér) hordozó 'reverz' primer; 6ZA2 szekvencia integrálása <i>lacI_{wt}</i> promoter nem templát szálára, módosított inverz-PCR módszerrel
AK957	GCCGGGGCTGGGGGAGGGCAATTCAGGGTGTGAAT	6ZA1 szekvenciát (sárga háttér) hordozó 'forward' primer; 6ZA1 szekvencia integrálása <i>lacI_{wt}</i> promoter nem templát szálára, módosított inverz-PCR módszerrel
AK958	CCCTCCCCAGCCCCGGCCCAATTCAGGGTGGTGAAT	6ZA2 szekvenciát (sárga háttér) hordozó 'forward' primer; 6ZA2 szekvencia integrálása <i>lacI_{wt}</i> promoter nem templát szálára, módosított inverz-PCR módszerrel
AK959	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAATTCAGGGTGGTGAAT	18 bp hosszú, random szekvenciát (piros) hordozó 'forward' primer; random szekvencia integrálása <i>lacI_{wt}</i> promoterbe módosított inverz-PCR módszerrel
AK960	CCGGGCGCTATCATGC	reverse primer (AK957/AK958/AK959 párja); 6ZA/random szekvencia integrálása <i>lacI_{wt}</i> promoterbe módosított inverz-PCR módszerrel
AK961	GCCGGGGCTGGGGGA	6ZA1 kötőhely (első 15 nt) hordozó primer
AK962	CCCTCCCCAGCCCC	6ZA2 kötőhely (első 15 nt) hordozó primer
AK963	TATACCGCCAGAGGTACAATTCAGGGTGGTGAAT	λ fág O _R 1 operátor szekvenciát (kék háttér) hordozó 'forward' primer; λ fág O _R 1 operátor integrálása <i>lacI_{wt}</i> promoter nem templát szálára, módosított inverz-PCR módszerrel
AK964	TATACCGCCAGAGGTA	λ fág O _R 1 operátor szekvenciát hordozó primer

Rövidítések: oligo=oligonukleotid, TKH=transzkripció kezdőhely, CAT=kloramfenikol-acetiltranszferáz,

O=operátor

XIII.3. Kék-fehér telepszín aránya a plazmidkönyvtár szelektálása előtt és után, *ER1821 ΔlacI* gazdában; Függelék 3. táblázat

8. Függelék 3. táblázat

templát	random szekvenciát hordozó primer	2. primer	lemezek	fehér telepek száma	kék telepek száma	össz telepszám	kék telepek aránya össz telepszámhoz viszonyítva (%)
50 µg/ml Km mellett éjszakán át növesztett kultúra							
pLacI ^{d03}	AK848	AK849	1	2427	403	2830	14,2
			2	951	203	1154	17,5
			3	1438	272	1710	15,9
			4	1518	315	1833	17,1
			5	1198	254	1452	17,4
			Σ	7532	1447	8979	16,1

Szelektálás előtt (50 µg/ml Km mellett éjszakán át növesztett kultúra)							
pLacI-ApR _{NE}	AK848	AK849	1	481	105	586	17,9
			2	447	115	562	20,46
			***3	15	3	18	16,7
			***4	39	8	47	17
			Σ	982	231	1213	19
Szelektálás után (25 µg/ml Ap mellett növesztett kultúrából szélesztett)							
pLacI-ApR _{NE}	AK848	AK849	1	1200	12	1212	0,99
			Σ	1200	12	1212	0,99
Szelektálás után (50 µg/ml Ap mellett növesztett kultúrából szélesztett)							
pLacI-ApR _{NE}	AK933	AK849	1	531	10	541	1,8
			2	367	3	370	0,8
			3	405	2	407	0,49
			4	427	1	428	0,23
			5	386	3	389	0,7
			Σ	2116	19	2135	0,88
Szelektálás után (5 órán át 50 µg/ml Ap mellett növesztett kultúra)							
pLacI-ApR _{NE}	AK848	AK849	*1	107	4	111	3,6
			**2	1100	47	1147	4,1
			**3	630	5	635	0,78
			**4	101	1	102	0,98
			**5	797	12	809	1,5
			Σ	2735	69	2804	2,46
Szelektálás után (5 órán át 75 µg/ml Ap mellett növesztett kultúra)							
pLacI-ApR _{NE}	AK848	AK849	*1	126	2	128	1,56
			*2	199	4	203	1,97
			**3	85	3	88	3,4
			*4	101	3	104	2,9
			*5	20	1	21	4,76
			*6	23	0	23	0
			Σ	13	554	567	2,29
Szelektálás előtt (50 µg/ml Km mellett éjszakán át növesztett kultúra)							
pLacI-ApR _{NE}	AK933	AK849	1	845	125	970	12,8
			2	863	110	973	11,3
			3	381	59	440	13,4
			4	142	27	169	16,0
			5	200	32	232	13,8
			6	1152	208	1360	15,3
			7	1037	189	1226	15,4
			Σ	4620	750	5370	14
Szelektálás előtt (50 µg/ml Km mellett éjszakán át növesztett kultúra)							
pLacI-ApR _{wt}	AK933	AK900	1	64	8	72	11
			2	104	17	121	14
			3	90	9	99	9
			4	114	8	122	6,6
			5	85	8	93	8,6
			6	98	10	108	9,2
			7	1327	115	1442	7,9
			8	1200	96	1296	7,4
			9	1356	154	1510	10,2
			10	1314	112	1426	7,85
			Σ	5752	537	6289	8,5

Szelektálás után (3-4 órán át 100 µg/ml Ap mellett növesztett kultúra)							
pLacI-ApR _{wt}	AK933	AK900	***1	390	0	390	0
			***2	53	0	53	0
			***3	101	1	102	0,98
			***4	238	0	238	0
			***5	769	2	771	0,25
			Σ	1151	3	1154	0,19
Szelektálás előtt (50 µg/ml Km mellett éjszakán át növesztett kultúra)							
pLacI-ApR _{wt}	AK936	AK900	****1	138	43	181	23,7
			***2	1005	263	1268	20,7
			***3	1421	463	1884	24,5
			Σ	2564	769	3333	23,1
Szelektálás után (3-4 órán át 100 µg/ml Ap mellett növesztett kultúra)							
pLacI-ApR _{wt}	AK936	AK900	***1	1056	12	1068	1,12
			***2	314	1	315	0,32
			***3	689	6	695	0,86
			***4	498	1	499	0,20
			***5	308	1	309	0,32
			Σ	2865	21	2886	0,73

jelölés nélkül: transzformálást követően Km+X-gal lemezre szélesztett kultúra

* kompetens sejt 10^{-3} hígításából szélesztett kultúra ** kompetens sejt 10^{-4} hígításából szélesztett kultúra

*** kompetens sejt 10^{-6} hígításából szélesztett kultúra **** kompetens sejt 10^{-7} hígításából szélesztett kultúra

XIII.4. Kék-fehér telepszín aránya a plazmidkönyvtár szelektálása előtt és után, *ER1821 ΔlacI* CAT_{HOB0} gazdában; Függelék 4. táblázat

9. Függelék 4. táblázat

7. Függelék 4. táblázat

templát	random szekvenciát hordozó primer	2. primer	lemezek	fehér telepek száma	kék telepek száma	össz telepszám	kék telepek aránya össz telepszámhoz viszonyítva (%)
Szelektálás előtt (50 µg/ml Km mellett éjszakán át növesztett kultúra)							
pLacI-ApR _{NE}	AK933	AK849	1	161	23	184	12,5
			2	202	28	230	12,2
			3	166	30	196	15,3
			4	109	14	123	11,4
			**5	148	14	162	8,6
			**6	316	46	362	12,7
			**7	399	58	457	12,7
			*8	638	96	734	13,1
Σ	2139	309	2448	12,6			
Szelektálás előtt (50 µg/ml Km mellett éjszakán át növesztett kultúra)							
pLacI-ApR _{wt}	AK933	AK900	1	67	6	73	8,22
			2	58	8	66	12,12
			3	85	7	92	7,78
			4	78	12	90	13,3
			5	117	16	133	12,03
			Σ	405	49	454	10,8
Szelektálás után (3-4 órán át 100 µg/ml Ap mellett növesztett kultúra)							
pLacI-ApR _{wt}	AK933	AK900	*1	329	11	340	3,23
			*2	565	9	574	1,56
			*3	2748	37	2785	1,32
			*4	728	11	739	1,48
			*5	1169	11	1180	0,93
			Σ	5539	79	5618	1,4

Szelektálás előtt (50 µg/ml Km mellett éjszakán át növesztett kultúra)							
pLacI-ApR _{wt}	AK936	AK900	*1	132	53	185	28,7
			*2	1035	449	1484	30,2
			*3	1012	411	1423	28,8
			Σ	2179	913	3092	29,5
Szelektálás után (3-4 órán át 100 µg/ml Ap mellett növesztett kultúra)							
pLacI-ApR _{wt}	AK936	AK900	*1	1422	7	1429	0,49
			*2	421	2	423	0,47
			*3	566	3	569	0,53
			*4	1157	6	1163	0,52
			*5	703	4	707	0,57
			Σ	4269	22	4291	0,51

jelölés nélkül: transzformálást követően Km+X-gal lemeze szelészett kultúra

* kompetens sejt 10^{-6} hígításából szelészett kultúra, ** kompetens sejt 10^{-7} hígításából szelészett kultúra

XIII.5. A transzformáns telepek száma kloramfenikol tartalmú lemezen *ER1821 ΔlacI CAT_{HOB0}* gazdában; Függelék 5. táblázat

10. Függelék 5. táblázat

templát	random szekvenciát hordozó primer	2. primer	lemezek	telepek száma Km+X-gal lemezen		telepek száma Km+Cm lemezen		álpozitív klónok száma (%)	
			hígítás*	10^{-6}	10^{-4} ($10^{-6} \cdot 100$)	10^{-6}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-4}
pLacI-ApR _{wt}	AK936	AK900	1	1429	-	2	383		
			2	423	-	-	230		
			3	569	-	-	322		
			4	1163	-	-	35		
			5	707	-	-	72		
			Σ	4291	-	2	1042		
			átlag	858,2	85820	2	208,4	0,23	0,24

*kompetens sejtől hígított kultúra

XIII.6. pLacI-ApR könyvtárak elemzése Illumina szekvenálással; Függelék 6. táblázat

11. Függelék 6. táblázat

templát	pLacI-ApR _{NE}		pLacI-ApR _{wt}	pLacI-ApR _{wt}
primerek	AK848 + AK849		AK933 + AK900	AK936 + AK900
könyvtár	pLacI-ApR _{NE} -N18		pLacI-ApR _N -N18(¹ / ₁₀)C	pLacI-ApR _{wt} -N18
Szelekció nélkül (<i>ER1821 ΔlacI</i> gazdában létrehozott könyvtár)				
szelekció ampicillinnel	-		-	-
össz olvasatszám (db)	47501		35506	28123
18 bp inszerthossz gyakorisága (db)	29633		26885	25021
18 bp hosszú, egyedi szekvenciák száma (db)	6927		5211	9614
A szekvenciák Shannon egyenletlenség indexe	0,96		0,95	0,83
Szelekció után (<i>ER1821 ΔlacI</i> gazdában létrehozott könyvtár)				
szelekció ampicillinnel	75 µg/ml		100 µg/ml	100 µg/ml
szelekció hossza	16 óra	5 óra	5 óra	3 óra
össz olvasatszám (db)	49283	43846	53787	16550
18 bp inszerthossz gyakorisága (db)	28758	26925	41122	14821
18 bp hosszú, egyedi szekvenciák száma (db)	236	6619	5943	7185

A szekvenciák Shannon egyenletlenség indexe	0,36	0,93	0,95	0,97
Szelekció után (ER1821 ΔlacI CAT_{HOB} gazdában létrehozott könyvtár)				
szelekció ampicillinnel	-	100 µg/ml	100 µg/ml	
szelekció hossza	-	5 óra	3 óra	
össz olvasatszám (db)	-	50727	17116	
18 bp inszerthossz gyakorisága (db)	-	39990	15287	
18 bp hosszú, egyedi szekvenciák száma (db)	-	7456	4017	
A szekvenciák Shannon egyenletlenség indexe	-	0,96	0,94	

Shannon-egyenletesség index: az index 0, ha a minta teljesen "egyenlőtlen", azaz csak egyféle szekvencia van jelen és 1, ha a teljes az egyenletesség, minden szekvencia ugyanannyiszor fordul elő.

XIII.7.: Egytényezős varianciaanalízis (ANOVA), Post Hoc teszttel (Bonferroni korigált);
Függelékek 7. táblázat

12. Függelékek 7. táblázat

ANOVA csoport:4*, darabszám:3	6. ábra		Post Hoc teszt (Bonferroni korigált; $\alpha=0,05$)		
p-érték	*oszlop	minta	oszlopok	p-érték	szignifikáns
*1,2,3,4 p=6,05E-05	1	plazmid nélkül	1x2	0,003	igen
	2	pLacI _P -(P-6ZA) (ara)	1x3	0,003	igen
	3	pLacI _P -(P-6ZA) + pB6ZA (glü)	1x4	0,004	igen
	4	pLacI _P -(P-6ZA) + pB6ZA (ara)	1x5	0,003	igen
*1,5,6,7 p=9,38E-05	5	pLacI _N -(N-6ZA) (ara)	1x6	0,003	igen
	6	pLacI _N -(N-6ZA) + pB6ZA (glü)	1x7	0,240	nem
	7	pLacI _N -(N-6ZA) + pB6ZA (ara)	1x8	0,003	igen
*1,8,9,10 p=3,68E-05	8	pLacI _{PN} -(P-6ZA) (ara)	1x9	0,002	igen
	9	pLacI _{PN} -(P-6ZA) + pB6ZA (glü)	1x10	0,003	igen
	10	pLacI _{PN} -(P-6ZA) + pB6ZA (ara)	1x11	0,003	igen
*1,11,12,13 p=4,34E-05	11	pLacI _{PN} -(N-6ZA) (ara)	1x12	0,003	igen
	12	pLacI _{PN} -(N-6ZA) + pB6ZA (glü)	1x13	0,776	nem
	13	pLacI _{PN} -(N-6ZA) + pB6ZA (ara)	14x15	0,0002	igen
*14,15,16,17 p=3,88E-07	14	plazmid nélkül	14x16	0,0002	igen
	15	pLacI _E -(E-6ZA) (ara)	14x17	0,0003	igen
	16	pLacI _E -(E-6ZA) + pB6ZA (glü)	14x18	0,002	igen
	17	pLacI _E -(E-6ZA) + pB6ZA (ara)	14x19	0,004	igen
*14,18,19,20 p=0,00581	18	pLacI _{PE} -(E-6ZA) (ara)	14x20	0,066	nem
	19	pLacI _{PE} -(E-6ZA) + pB6ZA (glü)	14x21	0,0003	igen
	20	pLacI _{PE} -(E-6ZA) + pB6ZA (ara)	14x22	0,0003	igen
*14,21,22,23 p=2,72E-05	21	pLacI _{NE} -(N-6ZA) (ara)	14x23	0,540	nem
	22	pLacI _{NE} -(N-6ZA) + pB6ZA (glü)	14x24	0,0002	igen
	23	pLacI _{NE} -(N-6ZA) + pB6ZA (ara)	14x25	0,001	igen
*14,24,25,26 p=5,04E-06	24	pLacI _{NE} -(E-6ZA) (ara)	14x26	0,0003	igen
	25	pLacI _{NE} -(E-6ZA) + pB6ZA (glü)	27x28	0,001	igen
	26	pLacI _{NE} -(E-6ZA) + pB6ZA (ara)	27x29	0,001	igen

*27,28,29,30 p=8,02E-06	27	plazmid nélkül	27x30	0,002	igen
	28	pLacI _{PNE} -(P-6ZA) (ara)	27x31	0,001	igen
	29	pLacI _{PNE} -(P-6ZA) + pB6ZA (glü)	27x32	0,001	igen
	30	pLacI _{PNE} -(P-6ZA) + pB6ZA (ara)	27x33	0,438	nem
*27,31,32,33 p=2,34E-05	31	pLacI _{PNE} -(N-6ZA) (ara)	27x34	0,459	nem
	32	pLacI _{PNE} -(N-6ZA) + pB6ZA (glü)	27x35	0,771	nem
	33	pLacI _{PNE} -(N-6ZA) + pB6ZA (ara)	27x36	0,815	nem
*27,34,35,36 p=0,89258	34	pLacI _{PNE} -(E-6ZA) (ara)	27x37	0,001	igen
	35	pLacI _{PNE} -(E-6ZA) + pB6ZA (glü)	27x38	0,002	igen
	36	pLacI _{PNE} -(E-6ZA) + pB6ZA (ara)	27x39	0,001	igen
	37	pLacI _{NE} -(N-6ZB-E-6ZA) (ara)	2x4	0,878	nem
27,37,38,39 p=1,73E-05	38	pLacI _{NE} -(N-6ZB-E-6ZA) + pB6ZA (glü)	5x7	0,002	igen
	39	pLacI _{NE} -(N-6ZB-E-6ZA) + pB6ZA (ara)	8x10	0,895	nem
			11x13	0,0004	igen
			15x17	0,709	nem
			18x20	0,231	nem
			21x23	0,004	igen
			24x26	0,447	nem
			28x30	0,614	nem
			31x33	0,002	igen
			34x36	0,648	nem
			37x39	0,569	nem
ANOVA csoport:7*, dbszám:6	8. ábra		Post Hoc teszt (Bonferroni korrigált, α=0,05)		
p-érték	*oszlop	minta	oszlopok	p-érték	szingifikáns
1-9 p=1,89E-62	1	plazmid nélkül	8x1	9,18E-22	igen
	2	N-6ZA2-E	8x2	2,53E-15	igen
	3	N+1(G-A)-6ZA2-E	8x3	1,07E-15	igen
	4	N+3-6ZA2-E	8x4	6,74E-17	igen
	5	N+5-6ZA2-E	8x5	1,39E-15	igen
	6	N+7-6ZA2-E	8x6	2,11E-15	igen
	7	N+10-6ZA2-E	8x7	4,32E-01	nem
	8	N+1-6ZA1-E	8x9	1,18E-01	nem
	9	N+1(G-A)-6ZA1-E			
ANOVA csoport:4*, dbszám:8-12	9. ábra		Post Hoc teszt (Bonferroni korrigált, α=0,05)		
p-érték	*oszlop	minta	csoportok	p-érték	szignifikáns
*1,2,3,4 p=3,52E-23	1	plazmid nélkül	1x2	1,24E-11	igen
	2	pLacI _{NE} (N+7-6ZA2-E) (ara)	1x3	1,77E-14	igen
	3	pLacI _{NE} (N+7-6ZA2-E) + pB6ZA (glü)	1x4	9,49E-08	igen
	4	pLacI _{NE} (N+7-6ZA2-E) + pB6ZA (ara)	1x5	1,38E-15	igen
*1,5,6,7 p=2,29E-31	5	pLacI _{NE} (N+10-6ZA2-E) (ara)	1x6	1,63E-16	igen
	6	pLacI _{NE} (N+10-6ZA2-E) + pB6ZA (glü)	1x7	2,66E-16	igen
	7	pLacI _{NE} (N+10-6ZA2-E) + pB6ZA (ara)	2x3	2,94E-07	igen
			2x4	1,39E-07	igen
			3x4	7,41E-14	igen

			5x6	7,98E-05	igen
			5x7	2,39E-01	nem
			6x7	1,78E-06	igen
ANOVA csoport:12*, dbszám:4-5	12. ábra		Post Hoc teszt (Bonferroni korrigált, $\alpha=0,05$)		
p-érték	oszlop	minta	csoportok	p-érték	szignifikáns
*1-12 p=7,46E-18	1	plazmid nélkül (ara)	1x2	0,00025	igen
	2	pLacI _{NE} ^{do3} -6ZA1 (ara)	1x3	0,01739	nem
	3	pLacI _{NE} ^{do3} -6ZA1 + pB6ZA (ara)	1x4	0,00019	igen
	4	pLacI _{NE} ^{do3} -6ZB1 (ara)	1x5	0,00066	igen
	5	pLacI _{NE} ^{do3} -6ZB1 + pB6ZB (ara)	1x6	0,00019	igen
	6	pLacI _{NE} ^{do3} -tetO1 (ara)	1x7	0,24426	nem
	7	pLacI _{NE} ^{do3} -tetO1 + pBtetR (ara)	12x8	0,00000	igen
	8	pLacI _{NE} ^{do3} -λO2,1	12x9	0,02588	nem
	9	pLacI _{NE} ^{do3} -λO2,1 + pdOM2	12x10	0,00002	igen
	10	pLacI _{NE} ^{do3} + pdCas9	12x11	0,00245	igen
	11	pLacI _{NE} ^{do3} + pdCas9-AK518	2x3	9,78E-05	igen
	12	plazmid nélkül	4x5	3,70E-03	igen
			6x7	1,72E-04	igen
			8x9	1,39E-04	igen
			10x11	2,51E-04	igen
ANOVA csoport:4*, dbszám:3	16. ábra		Post Hoc teszt (Bonferroni korrigált, $\alpha=0,05$)		
p-érték	oszlop	minta	csoportok	p-érték	szignifikáns
*1-4 p=5,21E-06	1	plazmid nélkül (ara)	1x2	0,0001	igen
	2	pLacI ³² _{XE} -6ZA1 (ara)	1x3	0,0007	igen
	3	pLacI ³² _{XE} -6ZA1 + pB6ZA (glü)	1x4	0,0005	igen
	4	pLacI ³² _{XE} -6ZA1 + pB6ZA (ara)	2x4	0,1586	nem
*5-8 p=1,14E-08	5	plazmid nélkül (ara)	2x3	0,323	nem
	6	pLacI ³² _{XE} -6ZA2 (glü)	3x4	0,105	nem
	7	pLacI ³² _{XE} -6ZA2 + pB6ZA (glü)	5x6	3,01E-05	igen
	8	pLacI ³² _{XE} -6ZA2 + pB6ZA (ara)	5x7	3,52E-05	igen
			5x8	0,009	igen
			6x7	0,278	nem
			6x8	1,50E-05	igen
			7x8	2,06E-05	igen
ANOVA csoport:7*, dbszám:6	27. ábra		POST-HOC teszt (Bonferroni korrigált, $\alpha=0,05$)		
p-érték	oszlop	minta	csoportok	p-érték	szignifikáns
*1-7 p=1,49E-17	1	plazmid nélkül	1x2	1,90E-05	igen
	2	pLacI-ApRwt	1x3	1,54E-05	igen
	3	pLacI-ApRwt+pS6ZA	1x4	1,17E-05	igen
	4	pLacI-ApRwt-6ZA1	1x5	0,0759	nem
	5	pLacI-ApRwt-6ZA1+pS6ZA	1x6	1,40E-05	igen
	6	pLacI-ApRwt-6ZA2	1x7	0,389	nem
	7	pLacI-ApRwt-6ZA2+pS6ZA	1x8	1,34E-05	igen
*1, 8-13	8	pLacI-ApRNE	1x9	1,94E-05	igen

p=6,71E-12	9	pLacI-ApRNE+pS6ZA	1x10	3,21E-05	igen
	10	pLacI-ApRNE-6ZA1	1x11	0,122	nem
	11	pLacI-ApRNE-6ZA1+pS6ZA	1x12	0,0008	igen
	12	pLacI-ApRNE-6ZA2	1x13	0,854	nem
	13	pLacI-ApRNE-6ZA2+pS6ZA	2x3	0,608	nem
			4x5	4,72E-09	igen
			6x7	2,50E-07	igen
			8x9	0,0343	nem
			10x11	6,74E-05	igen
			12x13	0,0022	igen

Az elemzést Excelben végeztem.

XIV. Ábra- és táblázatjegyzék

XIV.1. Ábrajegyzék

1. ábra: Különböző DNS-kötő fehérjék DNS-sel alkotott komplexe	10
2. ábra: Az I-Block módszer működésének sematikus ábrázolása.....	23
3. ábra: A pUA-lacI plazmid térképe	24
4. ábra: A lacI promotor és közvetlen környezetének nukleotidszekvenciája	25
5. ábra: Az I-Block mérés folyamata	27
6. ábra: I-Block mérés 6ZA kötőhelyet hordozó különböző lacI promotor variánsokkal	28
7. ábra: A lacI _N és a vad típusú lacI promotor aktivitásának összehasonlítása.....	30
8. ábra: A lacI _{NE} (N-6ZA-E) promotervariánsok hatása a β-galaktozidáz termelésre.....	32
9. ábra: pLacI _{NE} (N+7-6ZA-E) és pLacI _{NE} (N+10-6ZA-E) promotervariánsok β-galaktozidáz aktivitása 6ZA cink-ujj fehérje jelenlétében	34
10. ábra: A pLacI _{NE} vektor lacO3 szekvenciájának részleges eliminálása.....	35
11. ábra: lacI _{NE} promotervariánsok β-galaktozidáz aktivitásának tesztelése X-gal lemezen	36
12. ábra: Különböző DNS-kötő fehérjék specifikus kötődésének kimutatása I-Block módszerrel	37
13. ábra: DNS-kötő fehérjék specifikus kötődésének kimutatása X-gal tartalmú lemezen	38
14. ábra: Random szekvencia beépítése lacI promoterbe módosított iPCR technikával	40
15. ábra: A groE-lacI promotor nukleotidszekvenciája	43
16. ábra: I-Block mérés groE-lacI változatot hordozó plazmidvariánsokkal	44
17. ábra: A σ70 faktor génjét hordozó pB-rpoD plazmid	46
18. ábra: Az rpoD gén L402F genomi mutációjának létrehozása	47
19. ábra: L402F genomi mutációt hordozó rpoD hatásának ellenőrzése LacI termelésre.....	48
20. ábra: A lacI-ApR bicisztronos konstrukciót kódoló pLacI-ApR _{NE} plazmid	49
21. ábra: A pLacI-ApR _{NE} plazmidot hordozó sejt növekedése különböző ampicillin koncentráció mellett.....	50
22. ábra: pLacI-ApR _{NE} variánsok ellenőrzése X-gal tartalmú lemezen és különböző ampicillin koncentrációk mellett.....	51
23. ábra: Illumina szekvenálással ellenőrzött szekvenciákból készített szekvencia logók.....	53
24. ábra : A pLacI-ApR _{NE} plazmid által kiváltott ampicillin rezisztencia.	54
25. ábra: A pLacI-ApRwt-6ZA2 plazmidváltozat létrehozása iPCR technikával	55
26. ábra: pLacI-ApRwt variánsok tesztelése Km+X-gal tartalmú agar lemezen	56
27. ábra: I-Block mérés pLacI-ApR _{wt} és pLacI-ApR _{NE} plazmidvariánsokkal	58
28. ábra: A pLacI-ApR _N -N18(¹ / ₁₀ C) könyvtár komplexitásának ellenőrzése Illumina szekvenálással	59
29. ábra: A vad típusú pormotert hordozó, pLacI-ApR _{wt} -N18 könyvtár komplexitásának ellenőrzése Illumina szekvenálással.....	61
30. ábra: A tac promotor és cat gén klónozása pLacI _N plazmidvektorra.....	62
31. ábra: A kloramfenikol rezisztencia gén szabályozásához készített tac promotor változatok	63
32. ábra: ER1821 ΔlacI CAT _{HOB0} törzs tesztelése pLacI-ApR _{NE} plazmidvariánsokkal	64
33. ábra: A specifikus DNS-fehérje kötés szelekciója ER1821 ΔlacI CAT _{tacHOB0} törzsszel	65
34. ábra: 6ZA cink-ujj fehérje specifikus kötődésének kimutatása ER1821ΔlacI-CAT _{HOB0} törzsben.....	67
35. ábra: A specifikus kötőhely direkt szelekciójához tervezett I-Block módszer folyamatának ábrázolása	68
36. ábra: A munkafolyamat ábrázolása	72

XIV.2 Táblázatjegyzék

1. táblázat: A felhasznált DNS-kötő fehérjék csoportosítása	36
2. táblázat: A random szekvenciát hordozó oligonukleotid könyvtár beépítésének reakciókörülményei	40
3. táblázat: Az NheI és EcoRI klónozóhelyek közé beépült szekvenciák elemzése.....	41
4. táblázat: pLacI _{NE} -N18 plazmidkönyvtár szelekciója ampicillinnel LacI+ sejtekre.....	52
5. táblázat: pLacI-ApR _{NE} plazmidkönyvtár komplexitásának ellenőrzése Illumina szekvenálással.....	53
6. Függelék 1.táblázat.....	87
7. Függelék 2. táblázat.....	91
8. Függelék 3. táblázat.....	96
9. Függelék 4. táblázat.....	98
10. Függelék 5. táblázat.....	99
11. Függelék 6. táblázat.....	99
12. Függelék 7. táblázat.....	100