

**A λ bakteriofág másodlagos *attachment* helyekre való integrációja
megváltoztatott specifitású *int* mutánsok esetén**

Doktori értekezés

Készítette: Szameczné Rutkai Edit

Témavezető: Dr. Dorgai László

2006

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány
Biotechnológiai Intézete, Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
1.1 Bevezetés	5
1.2 Az <i>Escherichia coli</i> és a λ bakteriofág helyspecifikus rekombinációs rendszere	6
1.3 A rekombinációban résztvevő fehérjék	7
1.4 Az <i>attachment</i> régiók	9
1.5 A rekombinációban résztvevő fehérjék kötőhelyei	9
1.6 A rekombináció folyamata	11
1.7 A másodlagos <i>attachment</i> helyek	13
1.8 A HK022 fág	14
1.9 Evolúciós hipotézis	17
2. CÉLKITŰZÉS	22
3. EREDMÉNYEK	23
3.1 A másodlagos helyeknél történő integráció frekvenciája	23
3.2 Az integrációban hatékony másodlagos helyek kimutatása	25
3.3 A detektált másodlagos helyek azonosítása	28
3.4 A másodlagos <i>att</i> helyek szekvenciáinak analízise	34
3.5 Az overlap régió szekvenciájának szerepe a másodlagos helyek használatában	37
3.6 Az overlap régiók szekvenciájának irányított szegregációja	40
3.7 A specifitásváltozás modellje	42
3.8 A másodlagos helyek <i>core</i> típusú Int-kötő helyeinek rekombinációs hatékonysága	44

3.9 Egy <i>attR</i> transzdukáló fág struktúrájának és funkcionalitásának vizsgálata	47
4. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS MEGBESZÉLÉS	50
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	57
5.1 Mikrobiális technikák	57
5.1.1 Mikroorganizmusok tenyésztése:	57
5.1.2 Bakteriofágok szaporítása:	58
5.1.3 A felszaporított fágok titrálása:	58
5.1.4 Az <i>in vivo</i> integráció mérése, a lizogének szelektálása:	59
5.1.5 A rekombináció mérése plazmid szubsztrátokon	60
5.1.5.1 A kivágódás hatékonyságának mérése:	60
5.1.5.2 Az integráció hatékonyságának mérése:	61
5.2 DNS technikák	61
5.2.1 <i>E. coli</i> genomiális DNS tisztítás:	61
5.2.2 Amplifikáció PCR-rel:	62
5.2.3 A másodlagos helyek azonosítása:	62
5.2.4 Az integrációs frekvencia mérése kiválasztott másodlagos helyeken:	63
5.2.5 Az overlap régió szegregációjának ellenőrzése:	63
5.2.6 Southern hibridizáció	63
5.2.6.1 A próba készítése:	63
5.2.6.2 Filterkészítés és hibridizálás:	64
5.2.7 A rekombinációs mérésekben használt plazmidszubsztrátok előállítása	64
5.2.7.1 A kivágódási szubsztrátok előállítása:	64
5.2.7.2 Az integratív szubsztrátok előállítása:	65
5.2.8 Gélelektroforézis:	65
5.2.9 Fragmentizolálás:	65
5.2.10 Plazmidok izolálása:	65
5.2.11 Az <i>E. coli</i> sejtek transzformálása:	66

5.2.12 Szekvenálás:	66
5.2.13 Enzimek és reagensek:	66
6. IRODALOMJEGYZÉK	67
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	74
8. ÖSSZEFOGLALÁS	75
9. SUMMARY	78

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1 Bevezetés

Az evolúció során a különböző fajok közül azok bizonyulnak versenyképesebbnek a természetes szelekció nyomása alatt, amelyeknek genetikai anyaga a nagyfokú stabilitás mellett változásra is képes. Ez a változékonyság az alapja az alkalmazkodóképességüknek. A genetikai változatosságot biztosító folyamatok között az egyik legfontosabb a rekombináció. Ennek során szabályozottan, enzimkatalizált reakcióban, a genetikai anyag kicserélődése zajlik le két kromoszóma között vagy kromoszómán belül. A homológ rekombináció bármely két DNS szakasz között lejátszódhat, amelyek megfelelően hosszú szakaszon, kellő fokú hasonlóságot mutatnak. Legismertebb funkciója a meiózis során a homológ kromoszómák közötti átrendeződés katalizálása. Ezzel ellentétben a helyspecifikus rekombináció csak meghatározott szekvenciával rendelkező szakaszok rekombinálására képes. Az evolúció során számos független funkció ellátására alakult ki. A legrégebben tanulmányozottak a bakteriofágok által használt helyspecifikus rekombinációs folyamatok, ezek közül is az *Escherichia coli* és a λ bakteriofág rendszere, amely biztosítja a fág integrációját a gazda genomjába, hogy az ott stabilan fennmaradjon, amíg a fiziológiás körülmények nem kedveznek a kivágódásnak, amely a víruspartikulumok szaporodásához és a baktérium líziséhez vezet.

A komplex *E. coli*/ λ rendszerénél egyszerűbb felépítésű a P1 fág Cre/*lox* rendszere (Sternberg és Hamilton, 1981), amely biztosítja a sejtbe bejutott lineáris fág cirkularizációját, és a replikáció során kialakuló P1 dimerek monomerekké való konvertálását (Sternberg és mtsai, 1981). Számos további bakteriofág helyspecifikus rekombinációs rendszerét is ismerjük, csak példaként kiragadva néhányat: a HK022 coli-fág *att*/*Int* rendszere (Dhillon és mtsai, 1981), a *Haemophilus influenzae* HP1 fág integráza

(Hickman és mtsai, 1997), vagy a *mu* és P1 fágok által a felületi antigének megváltoztatására használt rendszerek. Természetesen nemcsak a bakteriofágok rendelkeznek helyspecifikus rekombinációs rendszerekkel. Szintén a felületi antigének megváltoztatására alakult ki egyes *Salmonella* fajok *hin*-rendszere (Silverman és Simon, 1983), de jól tanulmányozott például a *Saccharomyces cerevisiae* F1p rekombináza is (Hartley és Donelson, 1980).

1.2 Az *Escherichia coli* és a λ bakteriofág helyspecifikus rekombinációs rendszere

Munkám során a helyspecifikus rendszerek specifikitásváltozását vizsgáltam, ehhez modellként az *Escherichia coli*/ λ bakteriofág rendszerét használtam, ezért a következő oldalakon ezt mutatom be részletesebben. Az irodalomjegyzék hosszának korlátok között tartása érdekében sok helyen nem hivatkozom az eredeti publikációkra, ezekben az esetekben az R. W. Hendrix, J. W. Roberts, F. W. Stahl és R.A. Weisberg által szerkesztett Lambda II könyv szolgál összefoglaló hivatkozásként.

Ma az egyik legjobban ismert vírus - baktérium rendszer az *Escherichia coli* és vírusa, a λ bakteriofág. A λ más temperált bakteriofágokhoz hasonlóan kétféle stratégiát követhet miután bejutott a gazdaszervezetbe. A lítikus út során a fág lízissel elpusztítja a baktériumsejtet, miközben annak erőforrásait kihasználva megközelítőleg száz új vírusrészecske képződik. A másik lehetőség a lizogén út, ekkor a fág DNS beépül a gazda kromoszómájába. A lízis-lizogénia döntés a fágfertőzés után gyorsan megtörténik. Ha a *cI* represszor elég magas szintje kialakul, a fág génjei közül csak a lizogén állapot kialakulásáért felelősek nyilvánulnak meg, a többi represszálódik és az integráció lejártszódik.

A beépülés (inzerció) a helyspecifikus rekombináció révén valósul meg, melynek apparátusa egy-egy egyedi szekvenciát felismerve a baktérium kromoszómán és a fág DNS-en, egy reciprok rekombinációval fúzionálja a két genomot. A beépült fág genomot hívjuk profágnak. Ritkán előfordul, hogy a lizogén döntést nem követi integráció, ilyenkor a represszió miatt a fág kromoszóma nem képes replikációra, ezért a gazda osztódása során kihígul és eliminálódik a populációból. A helyspecifikus rendszer apparátusa az ellentétes folyamatot is lehetővé teszi. A profág gazdakromoszómából való kivágódása is ritka esemény a normális bakteriális növekedés alatt, de ha a represszor valami okból inaktiválódik vagy szintje lecsökken a kivágódás gyorsan megtörténik. Ha a represszor inaktivációja csak átmeneti, rövid ideig tart, akkor a profág kivágódását nem követi lítikus növekedés. A kivágódott fág DNS ilyenkor a sejtosztódás során a fentihez hasonlóan elvész.

1.3 A rekombinációban résztvevő fehérjék

A rekombinációhoz egyaránt szükségesek fág és baktérium által kódolt fehérjék. Az Int (Integráz) és a Xis (*excisionase*) fehérje fág eredetű, míg az IHF (*Integration Host Factor*) és a Fis fehérje (*Factor of inversion-stimulation*) a baktérium kromoszómán kódolt.

Az Int a katalitikus aktivitással rendelkező fehérje. Egyetlen polipeptid lánc alkotja, ennek molekulásúlya 40.3 kD. Más DNS-kötő fehérjékhez hasonlóan az aminoterminális része különösen bázikus. Katalizálja a DNS szál hasítását, a szálkicserélődést és a kicserélődött szálak újraligálását (Azaro és Landy, 2002).

Az IHF egy 20 kD molekulásúlyú heterodimer protein, a *himA* és a *hip* gének terméke. A HU-fehérjecsald tagja, melyek jellemzően két domaint tartalmaznak, egy

helix-turn-helix-et, amely a dimer kialakításáért felelős fehérje-fehérje kölcsönhatásban vesz részt, és egy kari részt, amely két parallel β -lemezből áll. Más HU-fehérjékkel szemben az IHF-nek erős szekvencia-preferenciája van (Craig és Nash, 1984). Funkciója a DNS meghajlítása a specifikus szekvenciamotívumhoz kötődést követően (Rice és mtsai, 1996), szerepe a fág kromoszóma beépülése és kivágódása során is jelentős.

A Xis egy 8.6 kD molekulásúlyú monomer fehérje, kódoló régiója az *int*-tel átfedő. Aktív szerepe a kivágódásnál van, az integrációt gátolja. A Xis a leginkább vizsgált tagja az RDF (*recombination directionality factor*) családnak, amely fehérjék az integrázok által katalizált rekombinációs reakciók szabályzásában játszanak fontos szerepet (Lewis és mtsai, 2001). A Xis teszi lehetővé a funkcionális kivágódási intaszóma felépülését azáltal, hogy meghajlítja a DNS-t és így stabilizálja a komplexet, melyben az *attL-t* és *attR-t* Int fehérjék kötik össze. Ezzel egyidejűleg meggátolja a vírus re-integrációt azáltal, hogy az *attP-t* egy katalitikusan inaktív struktúrává konvertálja (Bushman és mtsai, 1984, Franz és mtsai, 1995, Moiso de Vargas és mtsai, 1991).

A Fis egy 68 aminosavat tartalmazó protomerből képződő homodimer fehérje, amely számos funkcióval rendelkezik az *E. coli* sejtekben. A helyspecifikus rekombinációs rendszerben betöltött szerepén kívül például a DNS replikáció kofaktora (Filutowitz és mtsai, 1992) és transzkripció aktivátor (Nilsson és mtsai, 1990). Eredetileg a kivágódási reakciókban tulajdonítottak neki fontos szerepet, de mára már bizonyított, hogy az integrációban is fontos. *In vivo* kísérletekből lehetett következtetni az integráció folyamatában betöltött szerepére (Ball és mtsai, 1991). Később *in vitro* kísérletekben is megmutatták, hogy funkciója elengedhetetlen a hatékony integrációhoz, azonban csak szuboptimális körülmények között, például alacsony Int koncentráció mellett (Esposito és mtsai, 2003). Nem csak az integrációban, de a kivágódásnál is eltérés van az *in vivo* és *in vitro* kísérletekben kapott eredmények között. *In vivo* kísérletekben azt tapasztalták, hogy

elengedhetetlen a hatékony kivágódáshoz, míg *in vitro* kísérletekben csak limitált Xis koncentráció mellett volt az (Thompson és mtsai, 1987 és Ball és mtsai, 1991).

1.4 Az *attachment* régiók

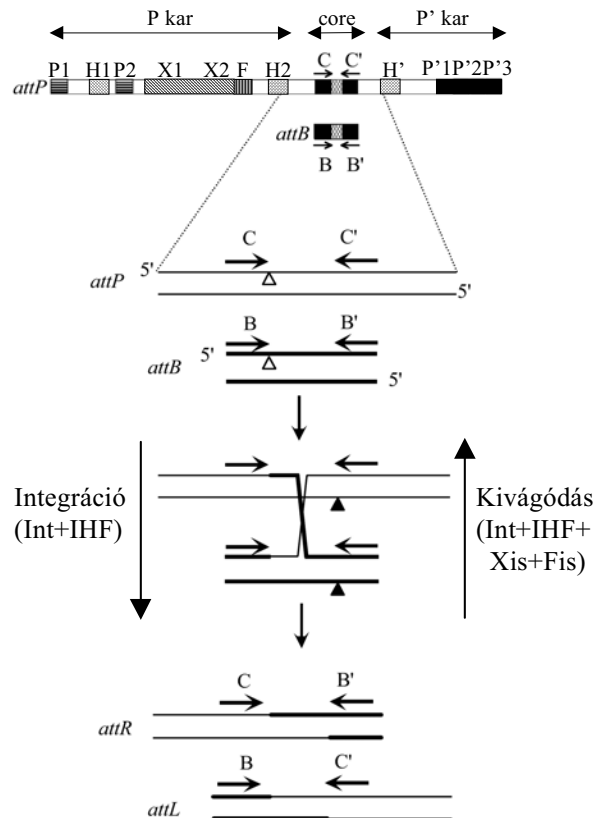
Azokat a szekvenciákat, melyeket a λ Integráz felismer és amelyeknél megtörténik a rekombináció, nevezzük *attachment* (*att*) helyeknek. Az *E. coli*- λ rendszerben 4 elsődleges *att* helyet különböztetünk meg. A fág DNS-en található *attP*-t, a baktériumkromoszóma *attB* régióját és az inzerciót követően kialakuló *attL* (*left*) és *attR* (*right*) helyeket, amelyek a profágot balról illetve jobbról határolják. Minden *att* régió 3 részre tagolódik: egy központi (*core*) hely, amelyen belül a rekombináció bekövetkezik és két kari rész, melyek a *core* régióhoz közvetlenül csatlakoznak. A *core* hely mind a 4 elsődleges *att* hely esetén hasonló, jelentős eltérések a kari részeknél figyelhetők meg.

1.5 A rekombinációban résztvevő fehérjék kötőhelyei

Az Int bifunkcionális fehérje, az *attP*-ben kétfajta szekvenciát ismer fel. A *core* típusú felismerőhely a *core* szekvencián belül az *overlap* régió két oldalán, nem tökéletes *invert repeat*-ként, helyezkedik el, konszenzus szekvenciája CAACTT. A kari típusú kötőhelyből a bal oldali kar (P) kettőt, a jobb oldali kar (P') pedig hármat tartalmaz. Konszenzus szekvenciája: ^A/CAGTCACTAT (Ross és Landy, 1983). Az *attP*-ben 3 IHF kötőhelyet találunk, kettőt a P karon (H1 és H2), és egyet a P' karon (H') A H1 közel helyezkedik el az Int P kari kötőhelyeihez, ami a két fehérje kölcsönhatását jelezheti. Xis és Fis kötőhelyeket csak a P karon találunk (X1, X2, F). Az *attB* lényegesen egyszerűbb,

mint az *attP*, hiányoznak a járulékos fehérjék kötőhelyei és nincsenek kari Int felismerőhelyei sem.

A rekombinálandó *att* régiókat, és a bemutatott fehérjék kötőhelyeinek elhelyezkedését az 1. ábra mutatja be.



1. ábra A helyspecifikus rekombináció folyamata sematikusan, és a folyamatban részt vevő fehérjék kötőhelyeinek elhelyezkedése. P1, P2, P'1, P'2 és P'3-mal jelöltük az *attP*-ben található kari Int kötőhelyeket, H1, H2 és H' az IHF, X1, X2 az Xis míg F jelöli a Fis fehérje kötőhelyeket. A C, C' és B, B'-vel jelölt nyilak felelnek meg az *attP*-ben és *attB*-ben található *core* típusú Int kötőhelyeknek. A C-t C'-től illetve a B-t B'-től elválasztó 7 bp-os részt nevezzük *overlap* régióknak. Az első szálhasítás és csere az *overlap* régió bal oldalán történik, a két felső szál között (üres háromszöggel jelölve), így létrejön a Holliday struktúra. A két alsó szál az *overlap* régió jobb oldalán hasítódik (sötét háromszögek), ezzel a Holliday-struktúra megoldódik, kialakítva a rekombináns *attR* és *attL* helyeket.

1.6 A rekombináció folyamata

A rekombináció a *core* szekvencián belül játszódik le. Az Int típusú rekombinázorok a topoizomeráz I-hez hasonlóan protomerenként a DNS egy szálát hasítják, ami azt jelenti, hogy egy teljes rekombinációs esemény legalább négy Int molekulát igényel, kettőt-kettőt mindkét rekombinálódó partnert tekintve (Landy, 1989 és Yayaram, 1994). Az inzerció első lépésében kialakul egy komplex, az intaszóma, amely *attP*-t valamint Int és IHF molekulákat tartalmaz. Ezt követően az intaszóma kapcsolódik az *attB*-hez és az így kialakult szinapszis biztosítja a partnerek megfelelő konformációját a helyspecifikus rekombinációhoz. A rekombináció-kompetens struktúra kialakulása után mindkét partner DNS molekulának a konvencionális felírás szerinti felső szála hasítódik a $-3/-2$ nukleotidok között (az *overlap* régió 3. nukleotidját nevezzük 0 pozíciónak, a többi nukleotid számozása ennek megfelelően történik), a szálak kicserélődnek, majd kovalensen kötődnek a partner DNS-hez. Ezeket a folyamatokat az Integráz katalizálja. A hasítás sajátossága, hogy az enzim kovalensen kötődik a DNS 3' végéhez, a tirozil-3'-nukleotid-foszfát intermedier a hasításnál felszabadult energiát megőrzi, és ezt az energiát használja fel a szálak újraegyesítését eredményező ligálási reakció, tehát a teljes reakció külső energiát (ATP) nem igényel. A folyamat eredményeként létrejön a Holliday-struktúra. Ezt követően a $+4/+5$ nukleotidok között, az alsó szálakon is lejátszódik a szálak hasítása és újraegyesülése, ami az első szálcsere során képződött Holliday-struktúra megoldását jelenti és rekombináns terméket eredményez. A két töréspont ($-3/-2$ és $+4/+5$) közötti *overlap* régióval szemben a hatékonyság szempontjából alapvető követelmény, hogy maximálisan homológok legyenek a két partnert tekintve, ám konkrét nukleotidszekvenciájuk indifferens (Weisberg és mtsai, 1983). Ugyanezt a követelményt bizonyították a P1, P2 fágok, de a *Saccharomyces cerevisiae* helyspecifikus rekombinációs rendszereiben is

(Hoess és mtsai, 1986, Six, 1963 és 1966, Senecoff és Cox, 1986, Andrews és mtsai, 1986). Az azonosság fontos, ám nem elengedhetetlen, hiszen különböző *overlap*-pel rendelkező un. heterológ helyek között is mérhető csökkent szintű rekombináció (Bauer és mtsai, 1989).

Mint már említettük, a szinaptikus komplexben a DNS két szálához négy Int fehérje kapcsolódik, attól függően, hogy ezek a fehérjék hogyan vesznek részt a hasításban, beszélhetünk un. *cis* és *trans* hasításról. A *trans* hasítás során a DNS hasítását egy összetett aktív hely végzi, amelyben a két fehérjemonomer különbözőképpen vesz részt. Az egyik monomer szolgáltatja azokat az aminosavakat, amelyek aktiválják a hasítandó kötést, míg a másik a nukleofil támadásban résztvevő tirozint. Elvileg háromféle *trans* hasítást különböztethetünk meg: a horizontális hasítás esetén a nukleofil donor a *core* régió túloldalán helyezkedik el a hasítás helyéhez képest, de ugyanazon a DNS-szálon, míg a vertikális és diagonális hasítás esetén a donor és a hasítás helye különböző DNS szálakon helyezkedik el (a *core*-hoz képest azonos illetve ellentétes oldalon). Ez utóbbi kettő hasítás esetén feltétel, hogy a szinaptikus komplex még a hasítás bekövetkezése előtt létrejöjjön. A *trans* hasításnak megfelelően működnek a *Saccharomyces cerevisiae* F1p rekombináza, a *Zygosaccharomyces rouxii* R rekombináza, a *P1* fág Cre rekombináza és a *Mu* fág transzpozáza (Chen és mtsai, 1992, Dixon és mtsai, 1995, Shaikh és mtsai, 1997, Savilahti és mtsai, 1996). A *cis* hasítás esetén egyetlen monomer szolgáltatja a két funkciót egyazon hasítási hely esetén. A XerC/XerD rekombináza és a λ fág Int rekombináza a *cis* hasításnak megfelelően működik (Arciszewska és mtsai, 1995, Nunes-Düby és mtsai, 1994).

1.7 A másodlagos attachment helyek

Az elsődleges *attB*-n kívül mind a baktérium mind a fág tartalmaz ún. másodlagos *att*-helyeket, de lambda vektorba integrálódott idegen DNS-en is leírták már a jelenlétüket (Parkinson, 1971 és Struhl, 1981). A beépülés hatékonysága ezeken a helyeken nagyságrendekkel kisebb, mint az *attB*-nél. Sosem tapasztaltak másodlagos helyre történő integrációt, ha az elsődleges *attB* is megtalálható volt a genomon, tehát az ilyen helyek vizsgálatához az elsődleges *attB* eltávolítása szükséges (Shimada és mtsai, 1972). A másodlagos helyek felépítése megfelel az *attB* felépítésének, szekvenciájuk több-kevesebb hasonlóságot mutat az elsődleges *attB* szekvenciájához (Shimada és mtsai, 1975).

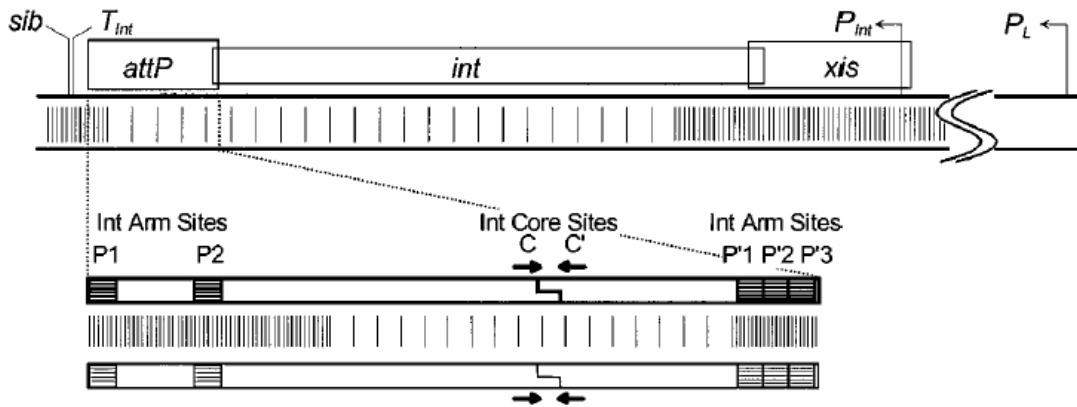
A másodlagos helyek funkcionálisan igen eltérőek, mind az *attP*-vel való rekombinációjukban, mind a profág kivágódásának hatékonyságában. Ha a lambda egy másodlagos helyre integrálódik, akkor hibrid helyek jönnek létre, amelyek felépítése megegyezik az *attL* és *attR* felépítésével. Mivel azonosításuk/izolálásuk módszere különböző volt, az ismert másodlagos helyek erősen eltérnek egymástól. Bizonyos másodlagos helyeknél a *core* Int-kötő szekvencia mutatott homológiát az elsődleges helyével, míg másoknál az *overlap* régió. A másodlagos helyek azonosítása során használt módszer érzékenysége igen magas, így még a nagyon gyengén használt helyek is izolálhatóak voltak. Ennek megfelelően az integrációs frekvencia is igen nagy eltéréseket mutatott, a legjobb és a legrosszabb helyeket tekintve a különbség 6 nagyságrend.

Az integráció folyamata a másodlagos helyeken megegyezik az elsődleges helyeknél leírtakkal, azaz Int fehérjét igényel, a szálcsere itt is az *att* helyeken belül játszódik le, és a kivágódás igényli az Int-et illetve az Xis-t is (Shimada és mtsai, 1972). A másodlagos helyekkel kapcsolatban vizsgálták azt is, hogy a rekombináció során a szálcserek mely nukleotidok között történnek meg. A kísérletes eredmények szerint az

elsődleges helyre való integrációval azonos módon hasítódnak a szálak a beépülés során. A másodlagos helyekről való kivágódást vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy hasonlóan az elsődleges helyre integrálódott profághoz, a kivágódás ugyanazokon a pontokon történik, ahol az integráció. Így a kivágódással visszaáll a másodlagos hely eredeti szekvenciája (Bidwell and Landy, 1979). Amennyiben a másodlagos hely *overlap*-jének szekvenciája eltér az *attP overlap*-tól, akkor a kivágódást követően előállhatnak olyan *attP* helyek, melyek *overlap*-je a másodlagos helynek megfelelő. Ezeket a mutánsokat nevezzük *saf* (*site affinity*) mutánsoknak. Ezen mutánsok megléte alátámasztja azt a feltételezést, hogy a kivágódás, akár csak az integráció a -3/-2 és a +4/+5 nukleotidok között történik. A *saf* mutánsokkal végzett kísérletekben a vad típusét megközelítő integrációs frekvenciákat kaptak (Weisberg és mtsai, 1983), ami egy újabb, független bizonyítéka annak, hogy fontosabb a két rekombinálódó partner *overlap*-jének azonossága, mint az, hogy ez az *overlap* mennyire tér el a vad típusétól.

1.8 A HK022 fág

A HK022 fág, a λ -hoz hasonlóan a baktériumsejtbe jutás után képes a lizogén utat követni. A két fág helyspecifikus rekombinációs rendszere rendkívül hasonló (Dhillon és mtsai, 1981), amint azt a 2. ábra is mutatja.



2. ábra A λ és HK022 helyspecifikus rekombinációs régiók sematikus összehasonlítása. A gének és a helyek nevei az ábra felső részén láthatók. A közvetlenül ez alatt látható két horizontális vonal a két fág 1.8 kb nagyságú kromoszómaszegmentjét képviseli. A közöttük látható függőleges vonalkázás sűrűsége nagyjából arányos a szekvencia hasonlósággal: a sűrű vonalkázás 95%-nál nagyobb, a ritka pedig 75% körüli azonosságot mutat. A két téglalap a két *attP* régiót mutatja kinagyítva (közel 250 bp, fölül a λ , alul pedig a HK022). A függőleges vonalkázás sűrűsége ismét a hasonlóság fokát mutatja. A téglalapon belüli tört vonal a szálhasítás helyeire mutat, melyeket 7 bp választ el egymástól (az ábra Weisberg és mtsai 1999-es publikációjából származik).

A HK022 és a λ Int az aminosavakat tekintve 75%-ban azonosak, beleértve természetesen a katalitikus aktivitásért felelős aminosavakat is, továbbá a különbségek nagy része konzervatív csere, ami azt jelenti, hogy a változások az aminosavak karakterét nem érintették. Ezenkívül a két Xis csak egy aminosavban tér el egymástól és funkcionálisan felcserélhetők. A mindkét rendszer által igényelt és a gazda által kódolt járulékos fehérjék pedig (IHF, Fis) azonosak és azonos szerepet is játszanak (Nunes-Düby és mtsai, 1994, Kolot és Yagil, 1994, Dorgai és mtsai, 1993, Nagaraja és Weisberg, 1990). Az *attP* és a rekombinációhoz szükséges gének szomszédosak a HK022 fág kromoszómáján is, transzkripciójuk a p_L promoterről történik, attól balra helyezkednek el, a genetikai térképen *attP-int-xis* sorrendben. A HK022 és a λ szekvenciáit a fenti régióban

összehasonlítva azt tapasztalták, hogy a szekvenciák az *xis* 5' végétől az *Int core* kötő *domain*-jét kódoló rész 5' végéig, közel azonosak. Továbbhaladva a kromoszómán a hasonlóság foka kisebb (70%), de az *attP* P karjának bal végéhez közeledve ismét növekszik. A hirtelen átmenet a nagyobb hasonlóságot mutató és az erősen eltérő szekvenciák között tipikus a lambdoid fágok esetén. Ezek a töréspontok valószínűleg a családon belüli genetikai állomány cseréjének bizonyítékai.

A nukleotid szekvenciák összehasonlítása és a génfunkciók tanulmányozása felfedte, hogy a λ és a HK022 fág regulációs apparátusa nagymértékben hasonló, így a két fág inzerciójának és excíziójának kontrollja is hasonló. A konzervált regulációs apparátus tartalmaz egy promótert és egy terminátort (p_{int} és T_{int}), ami lehetővé teszi az *Int* magas szintű expresszióját *Xis* expresszió nélkül. A λ p_{int} a C_{II} géntermék által aktiválódik, ami a lízis-lizogénia döntés központi regulátora a megtámadott sejtben. A HK022-ben is találtak egy, a C_{II} -vel homológ fehérjét, melynek funkciója is feltehetően hasonló. Szerepe itt is az *Int* termelés összehangolása a lízis-lizogénia döntéssel (Weisberg és mtsai, 1999).

A λ *Int* első, 64 aminosavból álló *domain*-je felelős a kari kötőhelyek felismeréséért, melyeknek a szekvenciája a két rendszerben erősen konzervált. Ezzel összhangban áll az a tény, hogy a két fehérjének közel azonos az N-terminális *domain*-je (Lee és mtsai, 1990, Nagaraja és Weisberg, 1990), és valóban, az *attP* kari szekvenciák a rendszerek között funkcióvesztés nélkül kicserélhetők.

A két rendszer eddigi vizsgálatának minden eredménye arra utal, hogy a két fág azonos reakcióutat követ a beépülés és a kivágódás során. Viszont a strukturális, szabályozási és reakciómechanizmusbeli hasonlóságok ellenére egyik sem katalizálja a másik fág beépülését ill. kivágódását kellő hatékonysággal (Yagil és mtsai, 1989). A *core* kötőhelyek - amelyek szekvenciája kevésbé hasonló a λ -t és a HK022-t tekintve - felelősek

ezért a specifitásbeli különbségért, a mindkét fág szekvenciáit tartalmazó kiméra *att* helyek rekombinációs specifitása a *core* kötő helyet adó szülőével egyezik meg.

1.9 Evolúciós hipotézis

A HK022 Int és a λ Int közötti hasonlóság alapján tanulmányozhatók az evolúciós változások mechanizmusai a fehérje-nukleinsav kölcsönhatásokban. A két fehérje az evolúció során eljutott egy olyan pontig, ahol a rekombinációs helypreferenciájuk különböző és könnyen mérhető, de még nagyfokú hasonlóságot mutatnak szekvenciáikban, és alacsony szintű keresztreakció is megfigyelhető.

A kérdés az, hogy hogyan alakulhat ki egy új specifitás egy már meglévőből úgy, hogy a folyamat során a rendszer még időlegesen se váljon funkcióképtelenné. Az Int és felismerőhelye közti kölcsönös funkcionális kompatibilitás elvesztése ugyanis csökkentené a lizogénizáció hatékonyságát (vagy a kivágódását, ha az a profágban történne), és ez kétségtelenül hátrányos helyzetbe hozna egy temperált bakteriofágot. Mivel a felismerőhelynek és a proteinek kompatibilisnek kell lennie, így eleve kizárható a specifitás teljes megváltozása egyetlen mutációs lépésben. A másik lehetőség a specifitás megváltozása több lépésben, ami hipotetikusan a következőképpen történhetett. Először az *int* mutációja lehetővé teszi, hogy az Int az eredeti *att* szekvenciáktól eltérő helyek között is katalizáljon rekombinációt, anélkül, hogy az eredeti helyeken mért aktivitás jelentősen csökkenne (specifitást relaxáló mutáció). A következőkben olyan *attP* mutációk alakulnak ki, melyek csökkentik az eredeti Int által katalizált rekombináció valószínűségét az eredeti *attB* helyre. Végül további *int* mutációk meggátolják a mutáns Int-et, hogy felismerje és katalizálja az eredeti helyek rekombinációját (specifitást szűkítő mutáció). Az a

követelmény, hogy az új mutáns Int-nek és *attP*-nek találni kell egy kompatibilis *attB*-t a gazda kromoszómán, valószínűleg korlátozza a választható variációk számát.

Habár a két Int valószínűsíthető közös őse nem ismert, a divergencia alacsony foka lehetővé tette a fenti evolúciós forgatókönyv felállítását és laboratóriumi vizsgálatát. Azok az aminosavak és nukleotidok, melyek felelősek a két fehérje specifitásbeli különbségéért és felismerőhelyeik eltéréseért, megváltozott specifitású Int mutánsok genetikai szelekciójával, kiméra Int-ek létrehozásával és irányított mutagenezissel megváltoztatott *att* helyek konstruálásával és a fentiek vizsgálatával volt lehetséges (Dorgai és mtsai, 1995; Yagil és mtsai, 1995). A két protein 92 pontban tér el egymástól. A λ Int öt bizonyos aminosavának a megfelelő HK022 aminosavra való cseréje a λ specifikus fehérjét lényegében HK022 specifikusra változtatta. Ezek közül két mutáció relaxálja a specifitást: megnövekedett aktivitást mutatnak a HK022 helyen, de a kiindulási fághez hasonlóan képesek a λ helyeket is rekombinálni. Három mutáció viszont beszűkíti a specifitást: csökkentett aktivitást mutatnak a λ helyekkel szemben, de az eredeti fághez hasonlóan, nem képesek rekombinálni a HK022 helyeket. A kétféle mutációt kombinálva a λ helyen gátlódik, míg a HK022 helyen lehetővé válik a rekombináció. Valószínűleg a szűkítő mutánsok azért mutatnak alacsony aktivitást a λ helyekkel szemben, mert azokban bizonyos pozícióban olyan nukleotidok találhatóak, melyek gátolják a mutáns Int-el való hatékony kölcsönhatás kialakulását. Ezzel a feltevással összhangban, bizonyos mutációk a λ *att* helyekben részben szupresszálják a szűkítő mutánsok rekombinációs deficienciáját (Dorgai és mtsai, 1998).

A két fág *attP* és *attB* helyeinek mutagenezisével meghatározták azokat a pozíciókat a *core* kötőhelyen, amelyek megakadályozzák a nem-specifikus Int általi rekombinációt (Dorgai és mtsai, 1998). Ezek a pozíciók nem egyeznek meg a λ -t és a HK022-t tekintve. Ha megváltoztatjuk az ezekben a pozíciókban található nukleotidokat,

akkor elhárul az akadály a nem megfelelő Int által katalizált reakció elől, de a saját Int által katalizált rekombináció hatékonysága nem csökken. Az eredmények azt mutatják, hogy a λ Int specifikitása többszörös mutációval HK022 specifikitásra változtatható, és valószínűleg egy, a fentihez hasonló természetes evolúciós úttal magyarázható a közös ősből származó λ és HK022 helyspecifikus rekombinációjának specifikitás-divergenciája.

A két rekombinációs modul közti divergencia jobb megértéséhez szükséges megvizsgálni két további tulajdonságot. Először is, a szekvencia hasonlóságot tekintve éles különbség van az aminoterminális kari kötő *domain* (> 95%) és a fehérje többi része (70%) között. Ennek a töréspontnak a létrejöttét úgy magyarázhatjuk, hogy evolúciós időskálán mérve viszonylag nem túl régen rekombináció történhetett az ősi HK022 *int* és egy, a λ *int*-hez közelálló *int* között. Másodsor, az *att* helyek egyik funkcionálisan fontos része a 7 bp-os *overlap* régió 6 pontban különbözik a két fágot tekintve. Mindkét fág esetében az *overlap* szekvenciája azonos *attP*-ben és *attB*-ben. Tulajdonképpen a szekvencia-azonosság a rekombinációs specifikitás egy eleme: már 1 nukleotid különbség is a rekombinációs frekvenciát jóval az alá a szint alá csökkenti, amelyet azonos *overlap* régióval rendelkező helyek között tapasztalunk. Sem a λ , sem a HK022 Int nem katalizál rekombinációt olyan helyek között, melyek *overlap*-je 6 bp-ban különbözik, de minden egyéb szempontból kompatibilisek. Az *overlap* régiók közti divergencia magyarázható, ha feltételezzük, hogy az egyik mai fág őse beépült majd kivágódott egy olyan másodlagos *att* helyről, aminek nem megfelelő volt az *overlap* régiója. Az ilyen ciklusok habár ritkák, de eredményezhetik az *overlap* régió megváltozását. Mind a 6 pozíció megváltozása, amiben a 2 *overlap* régió különbözik, egy vagy több egymást követő ilyen ciklus eredménye is lehet. Elképzelhető az is, hogy egy ősi *attP* *overlap* régiójának a fenti módon való megváltozása indukálta a két Int és megfelelő *att* helyeik divergenciáját. Egy ilyen változás csökkentheti vagy megakadályozhatja az inzerciót az elsődleges *attB* helyre, de

ugyanakkor megteremtheti a lehetőségét az inzerciónak és az excizióknak egy új *attB* helyen olyan mértékben, ami már elegendő a fának az új helyre való adaptálódásához.

A fenti specifitás-változást eredményező mutációk még azelőtt kerültek azonosításra, hogy az Int családba tartozó fehérjék térszerkezete ismert lett volna. Azóta azonban több ilyen struktúra is publikálásra került, többek között a λ Int-é is (Kwon és mtsai, 1997, Hickman és mtsai, 1997, Subramanya és mtsai, 1997, Gou és mtsai, 1997, Yang és Mizuuchi, 1997, Aihara és mtsai, 2003). A λ Int specifitását megváltoztató mutációk elhelyezhetők a fehérje háromdimenziós képén.

A három szűkítő mutáció (S282P, G283K, R287K) a J α -helixben van, ami a C-terminálisban található katalitikus *domain* része. Az Int/*suicide*DNS ko-kristályban (Aihara és mtsai, 2003) az Arg287 a C(1)A(2)A(3)C(4)T(5)T(6) konszenzus szekvenciában a komplementer szálon a G1-gyel létesít bázis-specifikus kapcsolatot, a Gly283 pedig a 2. pozícióban, szintén a komplementer szálon a T C5 metilcsoportjával van der Waals kölcsönhatást.

A két relaxációt okozó mutáció közül az Asn99 az α D helix része, és szintén a komplementer szálon, az A5 és A6 bázisokkal létesít kapcsolatot. A Gln319 és az ezzel analóg aminosavak (pl. Arg301 a Cre-ben) nincsenek a DNS közelében, egy attól elfelé néző felszínen helyezkedik el. Ez azt jelenti, hogy az E319R mutáció nem direkt fehérje-DNS kapcsolatot változtat meg, hanem valószínűleg indirekten hat, összhangban a fenotípusból levont korábbi következtetéssel. A genetikai és strukturális adatok összhangja ellenére nem egyszerű értelmezni a fenti aminosavcserek specifitás-változásban betöltött szerepét, pl. az N99D csere olyan bázispárokkal való kölcsönhatást érint a *core* típusú Int felismerő helyben, melyek tökéletesen konzerváltak a λ és HK022 rendszerekben.

Az a szelekciós nyomás, ami az inzerciók specifitás megváltozásához vezethet, és ami a bakteriális inzerciók helyek számát sok temperált fág esetén erősen korlátozza,

jelenleg még ismeretlen. De egy lizogén baktérium felülfertőzése egy olyan fággal, melynek ugyanolyan az Int specifitása, gyakran vezet az eredeti profág elvesztéséhez. Campbell azt feltételezte, hogy azok a mutációk, amik megváltoztatják a specifitást, növelhetik a profág túlélését, legalábbis addig, amíg az újonnan kialakult specifitás kellően ritka a populációban. Feltételezhetően a letalitást eredményező integrációs események számának minimális szinten tartása az a szelekciós nyomás, ami korlátozza a preferált bakteriális integrációs helyek számát, azonban ez nem bizonyított, és például a Mu fág esetében nincs is ilyen limitáció.

2. CÉLKITŰZÉS

A dolgozat kiindulópontjaként szolgáló korábbi munka során (Dorgai és mtsai, 1998 és 1995, Yagil és mtsai, 1995) ismertté váltak a λ /HK022 fágok helyspecifikus rekombinációs rendszereiben az eltérő specifitásért felelős elemek. Azonosításra kerültek az Integrázok specifitás-különbségéért felelős aminosavak, és a *core* típusú Int-kötő szekvenciákban azok a nukleotidok, melyek a nem saját Int által katalizált rekombinációt gátolják. A vad típusú és mutáns Integrázok valamint a vad típusú és mutáns *att* szekvenciák különböző kombinációkban, *in vivo* mért rekombinációs tulajdonságai alapján valószínűsíteni lehetett egy utat, melyet követve egy létező *att/int* rendszer specifitása megváltozhat az evolúció során. Eszerint egy vagy több Int mutáció relaxálja a rekombináz specifitását, majd további mutációk beszűkítik azt, úgy, hogy az eredeti szekvenciát már nem rekombinálja hatékonyan, de egy másikat már igen. Újabb mutációk, mind az Int-ben, mind az új *core* szekvenciákban finomhangolják a rendszert.

A hipotézis megfogalmazza a specifitás változásának egy lehetséges mechanizmusát, de arra nézve nem ad választ, hogy ez a valóságban hogyan következhet be. Az ugyanis a rendszer komplexitása és a szükséges mutációk relatíve nagy száma miatt valószínűtlen, hogy a kísérletesen megvalósított $\lambda \rightarrow$ HK022 irányú specifitásváltozás reális körülmények között is hasonló módon bekövetkezzen anélkül, hogy a rendszer funkcióképessége a teljes folyamat során megmaradjon.

A relaxált specifitású Int-nek találnia kell egy vagy több olyan szekvenciát, melyet relatíve jó hatékonysággal rekombinálni képes. Az ilyen szekvenciák jó jelöltjei a gazdabaktérium kromoszómáján található másodlagos *attB* (*attB**) helyek, melyek szekvenciái több-kevesebb mértékben hasonlítanak az *attB*-re, és a vad típusú Int kis hatékonysággal ugyan, de képes rekombinálni őket. Feladatom annak vizsgálata volt, hogy a másodlagos *attB*-k szerepet játszhatnak-e a specifitás változásában, és ha igen, akkor milyen mechanizmus szerint.

3. EREDMÉNYEK

3.1 A másodlagos helyeknél történő integráció frekvenciája

Az első kísérletsorozatban arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a vad és a mutáns Integrázt hordozó fágok integrációs képessége az *Escherichia coli*-ban található másodlagos helyek összességénél azonos vagy különböző-e. A kísérlethez két gazdabaktériumot használtunk, az egyik tartalmazta a λ -*attB*-t (RW495), míg a másikban egy deléciónak köszönhetően ez hiányzott (RW1401), tehát az utóbbiban az integráció kizárólag csak a másodlagos helyeken következhet be. A kísérletben használt fágyszármazékokat az 1. táblázatban tüntettem fel. Ezek a vad típus mellett rendre

Fág	Int mutáció	fenotípus
Y1		vad típus
Y1206	N99D	relaxált specifitást okozó mutáció
Y1213	E319R	relaxált specifitást okozó mutáció
Y1221	N99D-E319R	relaxált specifitást okozó mutációk
Y1225	S282P-G283K-R287K	specifitás-szűkítő mutációk
Y1228	N99D-S282P-G283K-R287K-E319R	specifitás változást okozó mutációk

1. táblázat: *A vizsgált bakteriofágok és mutációik* (Dorgai és mtsai, 1995).

hordozták mindkét relaxált specifitást eredményező mutációt külön-külön és együttesen, a specifitás-szűkítő mutációkat együttesen, továbbá a kétféle mutációtípus kombinációját, melyek együtt a specifitásváltozást eredményezték. A kísérletben mindkét gazdát fertőztük a kérdéses fággal, majd a kísérlettől függő alkalmas hígításokban $\sim 10^9$ W248 *killer* fág jelenlétében illetve hiányában táptalajra szélesztettük a kultúrát és számoltuk a túlélő telepeket. A W248 fág a c_I regulátor gén mutációja miatt *clear* fenotípusú, ezért a nem lizogén baktériumokat elpusztítja. A lizogénekben viszont a profág termeli a funkcionális

c_1 represszort, ami gátolja a W248 szaporodását, így ezek túlélnek a *killerrel* történt felülfertőzést. Az ebben a kísérletben kapott telepeket még egyszer teszteltük a profág jelenlétére 32 és 37 °C-on történő párhuzamosan inkubálással (az Y fágok a c_1 represszor ts_{857} hőérzékeny változatát tartalmazzák). A külön ellenőrzésre azért volt szükség, mert a W248 fertőzést túlélő telepek fágrezisztens kolóniák is lehetnek. Ez különösen fontos volt azokban a kísérletekben, ahol nagyon alacsony integrációs frekvenciákat mértünk, és ezekben az esetekben a mért integrációs frekvenciát ezzel az adattal korrigáltuk. Az eredményt a 2. táblázatban összegzem.

gazda/fág	Y1	Y1206	Y1213	Y1221	Y1225	Y1228
<i>attB</i> ⁺	63 ± 13	47 ± 7	52 ± 5	48 ± 6	0.03 ± 0.01	1.8 ± 0.3
$\Delta attB$	1.1 ± 0.3	0.6 ± 0.2	1.7 ± 0.5	0.5 ± 0.1	<0.04	2.2 ± 0.2
$\Delta attB/attB$ ⁺	0.017 ± 0.009	0.013 ± 0.007	0.033 ± 0.013	0.01 ± 0.003	-	1.2 ± 0.4

2. táblázat: *Vad típusú és mutáns Int-ek által katalizált integráció frekvenciája másodlagos attB helyeknél.* A táblázat adatai három-öt független kísérlet átlagai (± szórás), a fágfertőzést túlélő populációban a lizogének százalékos arányát adják meg.

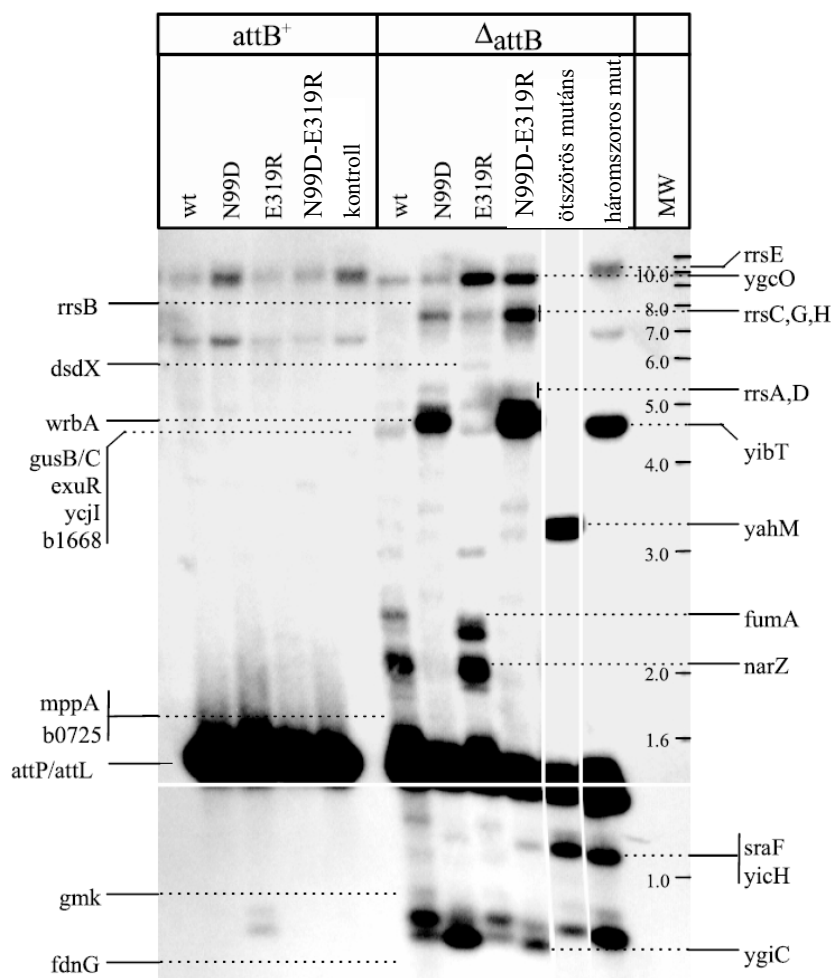
Azt találtuk, hogy mindhárom relaxált specifitású Int mutáns a vadhoz közel azonos gyakorisággal használja a $\lambda attB$ -t, és az összes másodlagos hely használatának gyakorisága sem különbözik lényegesen, az eltérések egy kétszeres faktoron belül maradnak. Az *intS282P-G283K-R287K* mutációkat hordozó fág mindkét gazdát nagyon gyengén lizogenizálta, ezen belül a $\Delta attB$ gazda esetében az integráció gyakorisága a kísérleti körülmények által megszabott detektálhatósági határ alatt maradt. Az utóbbi némileg meglepő eredmény volt, hiszen ismert, hogy ez az Int néhány mutáns *att* kombinációt viszonylag magas, 10-40 %-os hatékonysággal rekombinál (Dorgai és mtsai, 1998). Az eredmény arra utal, hogy a háromszoros mutáns Int által rekombinálható

szekvenciák csak egy nagyon szűk tartományt képviselhetnek, és az ezekhez hasonló helyek alulreprezentáltak a gazda genomjában. Az öt mutációt együttesen tartalmazó Int rekombinációs tulajdonsága markánsan különbözött mind a vad, mind pedig a vizsgált többi mutáns Integrázétól: a korábban azonosított fenotípusának megfelelően nem használta hatékonyan a λ *attB*-t, de mindközül a leghatékonyabban katalizált integrációt a másodlagos helyeknél.

A másodlagos helyeken mért integrációs frekvencia, bár informatív a mutáns Int-ek fenotípusát illetően, csak egy átfogó képet ad a fenti helyek használatáról, hiszen az *Escherichia coli* genomjában található összes ilyen másodlagos hely átlagos használatát méri. Arra a kérdésre, hogy a használt helyek spektruma a mutáns Int-ek esetén változik-e a vad típushoz képest, nem ad választ. Ennek a kérdésnek az eldöntésére terveztük a következő kísérletet.

3.2 Az integrációban hatékony másodlagos helyek kimutatása

A kísérlethez egy megközelítőleg 3000 független tagból álló lizogénpopulációt izoláltunk, melyek az adott vizsgált fág/ $\Delta attB$ gazda kombinációból származtak. Összehasonlítás céljára a vad típusú gazdából képzett hasonló méretű lizogén populációkat is izoláltunk, illetve kontrollként egy nem lizogén baktérium szolgált. A fentiek alól egyetlen kivétel volt, az *intS282P-G283K-R287K* általi gyenge lizogenizáció miatt ebben az esetben csak egy 12 tagú populáció állt rendelkezésre. A fenti populációkból genomiális DNS-t tisztítottunk, restrikciós enzimekkel (HindIII, BamHI, EcoRI és EcoRV) emésztettük, majd Southern hibridizációval, *att* próbákat használva (*attP*, *attL*, *attR*) vizsgáltuk a kimutatható másodlagos helyeket. A leginformatívabb kísérletnek az EcoRV emésztés, és az *attL* próba használata bizonyult (3. ábra).



3. ábra: A leghatékonyabban használt másodlagos helyek kimutatása Southern hibridizációval. Az egyes kísérletekben azonos mennyiségű DNS-t emésztettünk EcoRV enzimmel, és szeparáltunk 1% agaróz gélen. A próba egy ³²P-vel jelölt attL fragment volt (−9 - +239 nukleotidok). A kontroll oszlop fág által nem fertőzött, azaz nem lizogén sejtek genomiális DNS-ét tartalmazza. A későbbi munka során azonosított másodlagos helyeket az adott hely nevével jelöltük. Az 1.6 kb. méret alatt közvetlenül látható rendkívül erős fragment, amely minden kísérleti oszlopban megtalálható, az attL-nek illetve az attP-nek felel meg. Az attL a λ attB-nél történő integráció eredménye, míg az attP a többszörös, tandem lizogének esetében fordulhat elő. Annak érdekében, hogy kompenzáljuk a fragmentek közötti intenzitás-különbséget, az ábra alsó és felső részét különböző expozíciós idővel készült autoradiogramokból állítottuk össze.

Másodlagos helyre integrálódott egyedi lizogének korábbi genetikai analízise felfedte, hogy a vad típusú λ fág relatíve kis számú másodlagos helyet használ hatékonyan (Shimada és mtsai, 1972). Ezért azt vártuk, hogy a kísérletünkben viszonylag kevés, de méretük alapján elkülöníthető fragmentet kapunk majd, és az egyes fragmentek intenzitása arányos lesz a rekombinációs hatékonyságukkal. Az eredmény igazolta ezt a feltételezést, mindegyik tesztelt fág esetében egy diszkrét mintázatot kaptunk, bennük néhány intenzíven hibridizáló fragmenttel.

A mutánsok közül az *intE319R* a vad típuséhoz nagyon hasonló, de nem teljesen azonos mintázatot mutatott. Az eltérések elsősorban a kis intenzitással hibridizáló fragmentekre voltak jellemzőek, illetve az erősebben hibridizáló fragmentek intenzitáskülönbségében mutatkoztak meg. Az előbbi eset valószínűleg statisztikai fluktuáció következménye, az utóbbinál azonban azt sem zárhatjuk ki, hogy néhány másodlagos hely használatának gyakoriságát befolyásolja a mutáció. Ezzel együtt is arra a következtetésre juthatunk, hogy az *E319R* mutáció nem változtatja meg lényegesen a vad típusú Int által használt másodlagos helyek spektrumát.

Az *intN99D* esetében észlelt mintázat erősen különbözött a vad típusétól, és ez a mintázat nagyon hasonló volt az *intN99D-E319R* által képzett lizogének vizsgálatában kapotthoz. Az észlelés összhangban van azzal a korábbi következtetéssel, hogy a 99-es pozícióban található aszparagin, illetve aszparaginsav bázis-specifikus kontaktust létesít a *core*-felismerőhellyel, míg ez a 319-es pozíció esetében a fenotípus alapján és strukturális okok miatt kizárható (Dorgai és mtsai, 1995, Yagil és mtsai, 1995, Kwon és mtsai, 1997, Aihara és mtsai, 2003). Ezért nem meglepő, hogy a kettős mutáns esetében az *intN99D* fenotípusa érvényesül.

Az *intS282P-G283K-R287K* restriktív mutáns esetén a kísérlethez csak kevés számú lizogén kolónia állt rendelkezésünkre. A kapott fragmentek eloszlása részben

átfedést mutatott, részben pedig különbözött az összes többi mutáns esetében kapottól. Ez arra utal, hogy ez az *Int* a többitől eltérő helye(ke)t is használ, bár gyenge hatásfokkal. A kis mintaszám miatt azonban további következtetéseket nem vonhatunk le.

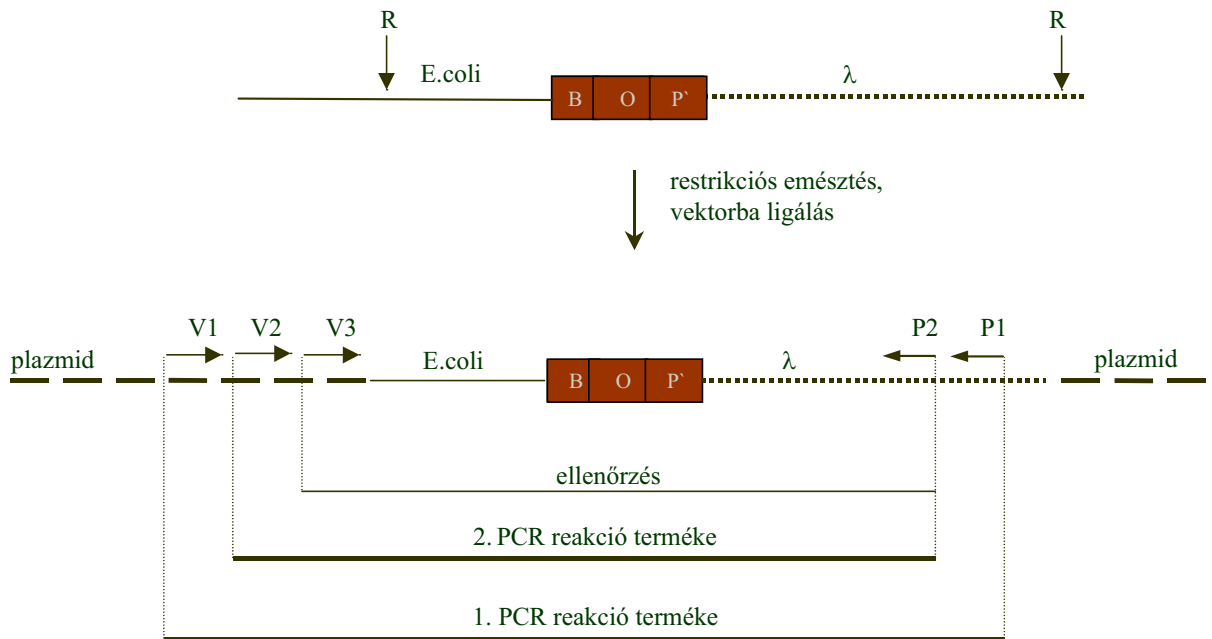
Az *intN99D-S282P-G283K-R287K-E319R* mutáns esetében kapott fragmentmintázat nem egyszerűen a kétszeres és háromszoros mutánsok által kapott mintázatok összege: egy új és az intenzitás alapján nagyon hatékonyan látszó integrációs célszekvenciát is detektáltunk (*yahM*), illetve néhány, a "szülők" esetében intenzív fragment hiányzik a mintázatból (pl. *wrbA*, *ygcO*, *ygiC*, *yibT*).

A relaxált mutánsok közül egy sem integrálódott a HK022 fág elsődleges *attB* helyére detektálható hatékonysággal, bár tudjuk, hogy ezen fágok Integrázai képesek a HK022 *att* helyek közötti rekombináció katalizálására. Az elsődleges HK022 *attB* helyre való integrációt egy 6.5 kb méretű fragment jelenléte mutatná, de ezt az autoradiogramon nem látjuk.

3.3 A detektált másodlagos helyek azonosítása

A kísérletet sematikusan a 4. ábrán mutatom be. A leggyakrabban használt másodlagos helyek azonosítására az egyedi lizogénekből genomiális DNS-t tisztítottunk, ezeket restriktív enzimekkel emésztettük, majd egy hasonlóan, vagy kompatibilis véget eredményező enzimmel emésztett plazmidhoz ligáltuk. A ligált DNS populációt közvetlenül használtuk templátnak PCR reakciókban, ahol fág és plazmid-specifikus primerekkel megkíséreltük amplifikálni a profág-gazda kapcsolódást tartalmazó fragmentet. Az amplifikált termék specifikusságát egy *nested* primerpárral végzett második reakcióban ellenőriztük, majd izoláltuk a gélből, és meghatároztuk a kapcsolódási régió szekvenciáját.

A különböző lizogénekből összesen 19 eltérő szekvenciát kaptunk. Mindegyik esetben a fág-DNS az *overlap* régión keresztül kapcsolódott a gazda genomjához, ahogyan az elvárható egy Int által katalizált, az *attP* és egy másodlagos hely közötti rekombinációnál.



4. ábra: A detektált másodlagos helyek azonosításának módszere. A genom emésztéséhez használt restriktions enzim felismerőhelyét R-rel jelöltük, az amplifikáláshoz használt vektorspecifikus primerek: V1, V2 és V3, fág-specifikus primerek: P1 és P2.

A szekvenciákat az *E. coli* genomszekvenciával összehasonlítva azonosítható volt az adott másodlagos hely és annak szekvenciakörnyezete. Az azonosított másodlagos helyeket arról a génről vagy *open reading frame*-ről neveztük el, amelyben találhatóak, illetve amelyhez a legközelebb esnek (5. ábra, lásd a 28. oldalon). A másodlagos helyek kromoszómális lokalizációját illetően nyilvánvaló szabályosságot nem lehetett megfigyelni, csoportokat nem alkotnak és többé kevésbé elszórtan helyezkednek el.

A szekvencia ismeretében mindegyik azonosított másodlagos helynél kiszámítottuk az *attL*-t tartalmazó EcoRV restrikciós fragment várható méretét, és összevetettük a lizogén populációk Southern hibridizációs vizsgálatánál kapott fragmentekkel. Elmondható, hogy az autoradiogramon látható fragmentek nagy részét, de nem mindegyiket sikerült azonosítanunk. Ez a megállapítás fordítva is igaz, három olyan helyet is azonosítottunk, ami az autoradiogramon nem látható (*mppA*, *b0725* és *fdnG*).

Az egyes másodlagos helyek integrációs hatékonyságára a hibridizációs intenzitás már durva megközelítésben utalt. Annak érdekében, hogy erről egy félkvantitatív képet kapjunk további két kísérletet terveztünk. Az elsőben egy viszonylag nagy számú (összesen 459), az egyes mutáns Int-ek által képzett egyedi lizogén kollekciónak vizsgáltuk meg egyenként, hogy esetükben melyik másodlagos helyen történt meg az integráció. A méréshez a vizsgált helyek mindegyikére specifikus primerpárt terveztünk, ezek egyike minden esetben az *attP* egyik karjához hibridizált, míg a másik a vizsgált másodlagos hely közelében a gazda kromoszómájához. Az adott helyen történt integrációt a várt méretű PCR termék megjelenése mutatta. Azokat a lizogéneket, melyek az első primerpárral nem adtak pozitív eredményt, tovább vizsgáltuk a következő primerpárral, mindaddig, amíg az összes oligonukleotid-párt meg nem vizsgáltuk. Az eredményt a 3. táblázatban foglaltuk össze.

	kar	B	overlap	B'	kar	min
int⁺ és intE319R:						
<i>λ attP</i>	-CGTT	CAGCTTT	TTTATAC-	TAAGTTG	GCAT-	-
<i>λ attB</i>	-AAGC	CTGCTTT	TTTATAC-	TAACTTG	AGCG-	17
<i>rrsX</i>	-AAGT	ACGCTTC	TTTAAGG-	TAAGGAG	GTGA-	7 hely
<i>ygcO</i>	-TATC	CTTATTA	TTTATCC-	AAAGCGG	TAGG-	62
<i>ygiC</i>	-CTGC	CCGCTTA	TTTTGCG-	GAAGATG	ATCA-	69
<i>narZ</i>	-ACGC	CCACTTC	TTTAC-C-	GAAGTAC	GCTAC	33
<i>fumA</i>	-GTAT	TCACTTC	TTTATACA	TATCCAG	CGGC-	36
<i>dsdX</i>	-TGAC	CCAGAAA	TTTAAGGA	AAAGTGG	GCCA-	53
<i>exuR</i>	-AGAT	CATGTTA	TTTAACG-	AAACCAG	CGAC-	70
<i>gusB/C</i>	-ATGG	CCACTAT	TTTTTCTC-	ATAGTTG	CACC-	36
<i>ycjI</i>	-TGTA	TCACTTT	TTTGCCG-	GAAGTTG	TTTG-	30
<i>gmk</i>	TGCTC	ACACTT-	TTTGCGC-	AAAGTTG	TTGC-	82
<i>b0725</i>	-TAAG	CATCTTT	TTTATGC-	TTACTTC	GCCG-	16
<i>b1668</i>	-CGCA	CGGGTAT	TTTACCC-	GAAGCCG	ATTT-	38
<i>yicH</i>	-AGAC	CATGAAA	TTTATTGG	GAAGCTG	CTTC-	83

intN99D és intN99D-E319R:

<i>λ attP</i>	CGTT	CAGCTTT	TTTATAC-	TAAGTTG	GCAT	-
<i>λ attB</i>	AAGC	CTGCTTT	TTTATAC-	TAACTTG	AGCG	17
<i>ygiC</i>	CTGC	CCGCTTA	TTTTGCG-	GAAGATG	ATCA	69
<i>wrbA</i>	GCTA	CCACTTA	TTTAAAGA	TAAGACG	TCCT	23
<i>ygcO</i>	TATC	CTTATTA	TTTATCC-	AAAGCGG	TAGG	62
<i>rrsX</i>	AAGT	ACGCTTC	TTTAAGG-	TAAGGAG	GTGA	7 hely
<i>ycjI</i>	TGTA	TCACTTT	TTTGCCG-	GAAGTTG	TTTG	30
<i>fumA</i>	GTAT	TCACTTC	TTTATACA	TATCCAG	CGG-	36
<i>mppA</i>	TTTG	TCACTTT	TTTGATG-	GAAGTTG	TTTG	30

ints282P-G283K-R287K:

<i>λ attP</i>	CGTT	CAGCTTT	TTTATAC	TAAGTTG	GCAT	-
<i>yibT</i>	GGAG	GAAGTTT	TTTCAGA	TACTCCC	GGAA	81
<i>rrsX</i>	AAGT	ACGCTTC	TTTAAGG	TAAGGAG	GTGA	7 hely
<i>sraF</i>	CGTA	TTCCTTT	TTTGTTG	TAAGTGA	GACC	70

intN99D-S282P-G283K-R287K-E319R:

<i>λ attP</i>	CGTT	CAGCTTT	TTTATAC	TAAGTTG	GCAT	-
HK022 <i>attP</i>	TGTC	ATCCTTT	AGGTGAA	TAAGTTG	TATA	-
HK022 <i>attB</i>	CGGT	GCACTTT	AGGTGAA	AAAGGTT	GAGT	23
<i>yahM</i>	CGTG	GTCCTTA	TTTCCGA	TAAGTTT	ACTT	7
<i>sraF</i>	CGTA	TTCCTTT	TTTGTTG	TAAGTGA	GACC	70
<i>rrsX</i>	AAGT	ACGCTTC	TTTAAGG	TAAGGAG	GTGA	7 hely
<i>fdnG</i>	ACTG	ACCTTTC	TTCGCAA	TAAGCAC	GCCA	33

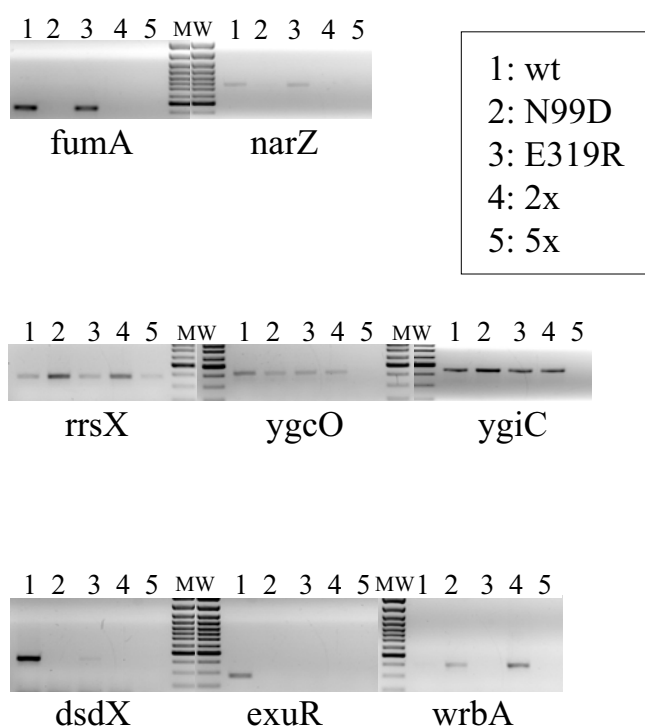
5. ábra: Az azonosított másodlagos helyek szekvenciája és kromoszómális elhelyezkedése.

A másodlagos helyeket a hibridizálás, az egyedi lizogének vizsgálata illetve a populációkon végzett specifikus PCR eredményei alapján csoportosítottuk. Összehasonlítás céljából feltüntettük az adott Int által bizonyítottan használt vad típusú *att* szekvenciákat is. A jobb áttekinthetőség miatt a szekvenciákat a B és B' *core* felismerőhelyek, a közöttük lévő *overlap* régió, illetve az ezeket balról és jobbról határoló 4-4 nukleotid szerint tagoltuk, és a csoportokon belüli legjobb illeszkedés alapján írtuk egymás alá. Tőlük jobbra a hely kromoszómális helyzetét adtuk meg. A csoportokon belül az erősen konzervált nukleotidokat árnyékolással jelöltük.

Int/attB*	rrsX	ygcO	narZ	ygiC	wrbA	fumA	dsdX	gusB	yahM	sraF	Σ 9
vad típus (66)	24%	14%	11%	3%	0%	1%	1%	1%	0%	0%	5%
E319R (78)	1%	20%	5%	21%	0%	7%	6%	10%	0%	1%	5%
N99D (102)	9%	3%	0%	49%	21%	0%	0%	0%	0%	1%	1%
N99D-E319R (69)	3%	10%	0%	54%	9%	1%	0%	0%	0%	4%	3%
5x mutáns (144)	21%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	nt.	38%	31%	0%

3. táblázat: *Az egyes másodlagos helyek használatának gyakorisága.* A vizsgált telepszámot az adott Int alatt adjuk meg zárójelben, az adatok ennek százalékában tüntetik fel a jelölt helyen történt integrációt. A 9 legkevésbé hatékony hely adatait összesítve adjuk meg a Σ 9 oszlopban. A 459 megvizsgált lizogénből 373 esetben (81%) tudtuk azonosítani az integráció helyét.

A másik kísérletben, melyet a másodlagos helyeknél történő integráció hatékonyságának vizsgálatára terveztünk, genomiális DNS-t tisztítottunk a Southern hibridizációs kísérlethez hasonló méretű lizogén populációkból (a gazda $\Delta attB$ volt). Ezt használtuk templátként nyolc, az előző kísérletek szerint a vad és/vagy a relaxált Int-ek által viszonylag magas hatékonysággal használt helynél történő integráció specifikus kimutatására illetve relatív hatékonyságuk megállapítására. A primerpárok azonosak voltak az egyedi lizogének vizsgálatában alkalmazottakkal. Előkísérletekben megállapítottuk azt a templátmennyiséget, melyek alkalmazása éppen detektálható termékmennyiség megjelenéséhez vezetett, azért, hogy biztosak legyünk abban, hogy a reakciók terméklimitáltak. A kísérlet eredményét a 6. ábrán mutatjuk be.



6. ábra: Kiválasztott másodlagos helyek használatának PCR analízise. Az *rrsX*, *ygcO*, *wrbA* és *narZ*-specifikus reakciók 10^4 , míg a *fumA*, *ygiC*, *dsdX* és *exuR*-specifikus reakciók 10^5 genom-ekvivalensnyi templátot tartalmaztak.

A három kísérlet eredményét összevetve megállapíthatjuk, hogy azok jó összhangban vannak egymással, de néhány esetben nem mind a három eredménye erősíti meg egymást. A következtetés levonásánál természetesen óvatosnak kell lennünk, mindhárom megközelítésnek vannak előnyei és hátrányai is. Az egyedi lizogének vizsgálata abszolút eredményt ad, de a technikai limitáció miatt csak viszonylag kis számú eset vizsgálható, ezért jelentős statisztikai fluktuációval kell számolnunk. Ez a nagy populációk PCR vizsgálatánál már nem probléma, de könnyen beláthatóan alulreprezentáltak benne azok a lizogének, melyekben a fág integrációja növekedési hátránnyal jár. Ez igaz a hibridizációs kísérletre is, azzal a további megszorítással, hogy egy adott molekulaméretű hibridizáló fragment könnyen együtt futhat egy hasonló méretű

szintén jelet adó, de nem azonosított másik fragmenttel. A fentieket is figyelembe véve összegzésképpen a következőket állapíthatjuk meg:

A vizsgált helyek közül a *rrsX*-et és az *ygcO*-t közel azonos hatékonysággal használja a vad és a három relaxált fenotípusú mutáns Int. A *fumA*, *narZ*, *dsdX* és *exuR* helyeket a vad Int és az *intE319R* lényegesen jobban használja, mint az *intN99D* és az *intN99D-E319R*. Ezzel ellentétben a *wrbA*-t és az *ygiC*-t az *intN99D* és az *intN99D-E319R* nagyobb hatékonysággal használja, mint a vad Int és az *intE319R*. Végül, mindhárom megközelítés eredménye szerint az ötszörös mutáns a vizsgált helyek közül csak az *rrsX*-et rekombinálja kimutatható hatékonysággal.

3.4 A másodlagos *att* helyek szekvenciáinak analízise

A szekvencia-variabilitás vizsgálatához négy csoportra osztottuk az azonosított másodlagos helyeket: a vad típus és az *intE319R* által, az *intN99D* és az *intN99D-E319R* mutánsok által, a restriktív mutáns által, és a megváltozott specificitással rendelkező ötszörös mutáns által használt helyekre. A csoportok között, a mért és detektált rekombinációs frekvenciák alapján van átfedés, azaz egy hely több csoportban is szerepelhet. Az egyes csoportok tagjait a ClustalW program (Thompson és mtsai, 1994) segítségével illesztettük egymáshoz. Az illesztéshez az alapértelmezett paramétereket két ponton módosítottuk: kismértékű (-1) pontlevonás járt egy nukleotidnyi *gap* nyitásáért, míg a *gap* növelésére jóval nagyobb (-40/nukleotid) értéket használtunk. A fenti paraméterek kiválasztásánál figyelembe vettük azt a tapasztalatot, hogy az Int által katalizált reakció lejátszódik a 7 bp-os *overlap* régiójú *attP* és egy 6-8 bp-os *overlap* régiójú mutáns, vagy másodlagos *attB* hely között, de 6 bp-nál rövidebb, illetve 8 bp-nál hosszabb *overlap* régiójú helyek közötti rekombinációról még senki sem számolt be (deMassy és mtsai, 1984, Ross és mtsai, 1982, Shulman és mtsai, 1976). A beállított

paraméterekkel a program úgy illesztette egymáshoz a másodlagos helyek szekvenciáit, hogy azok tagolhatósága megfelelt egy *attB*-től elvárhatónak, azaz a bal és jobb oldali *core* típusú Int-felismerőhelyek, és az őket elválasztó *overlap* régiók egymáshoz illeszkedtek, összhangban az adott helynél történt integráció kísérletes és számított eredményeivel. Az elsődleges eredmény szerint egyik szekvenciánál sem volt szükség egynél több és 1 bp-nál nagyobb *gap* bevezetésére, ezt azonban két esetben felülbíráltuk: a *narZ* és a *gmk* helyek esetében egy további *gap*-et illesztettünk be, aminek eredményeképpen az előbbinél az *overlap*, az utóbbinál a baloldali *core* hely szekvenciahasonlósága jobb lett a program által eredményezetttnél. A kapott eredményt az 5. ábrán már korábban feltüntettük.

Az *overlap*-et határoló régiók konszenzus szekvenciáját a jobb összehasonlíthatóság érdekében, csoportonkénti bontásban a 4. táblázatban tüntettük fel. Az *attP* és *attB* esetén ezek a szegmensek tartalmazzák az Int *core* kötőhelyeit, egy *inverted repeat* formájában (1. ábra), és úgy tűnik ez igaz a másodlagos helyekre is, bár konzerváltságuk kisebb. A 4. táblázatban ez jól látszik, mivel a jobb oldali szekvenciák itt komplementer szekvenciaként jelennek meg.

Int	<i>core</i> hely	<i>core</i> hely pozíció										<i>overlap</i> pozíció							
		-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
λ és E319R	bal	r	R	R	Y	C	c	R	C	T	T	H	T	T	T	A	N	N	c
	jobb	N	R	R	N	C	R	R	C	T	T	H							
N99D és N99D-E319R	bal	N	r	t	Y	c	C	R	C	T	T	H	T	T	T	A	N	N	g
	jobb	N	N	r	r	C	a	R	C	T	T	H							
N99D-S282P-G283K- R287K-E319R	bal	c	G	T	N	R	Y	N	C	T	T	t	T	T	T	N	N	N	N
	jobb	r	N	N	C	N	r	r	C	T	T	A							

4. táblázat: Az 5. ábrán bemutatott másodlagos helyek konszenzus szekvenciái, csoportonkénti bontásban. Az erősebb konzerváltságot nagy, a gyengébbet kis betűvel jelöltük. R = purin, Y = pirimidin, H = A,C,T. A szekvencia-pozíciókat nem a hagyományos számozás szerint jelöltük!

A legkisebb variabilitás minden csoportban a 4. az 5. és a 6. pozícióban figyelhető meg, amely az esetek döntő többségében 5'-CTT. Ez a szekvenciamotívum jellemző a HK022 és a λ *attP* illetve *attB core* helyeire is. A *core* Int-kötő hely 1-3 pozícióinak konzerváltsága ennél lényegesen gyengébb, és ezekben a pozíciókban már jelentkezik eltérés a csoportok között is. Az *int*⁺ és *intE319R* csoportban az 1. pozícióban gyakran találhatunk C-t, ami a bal oldali *core* helyben a 2. pozícióra is jellemző. A 3. pozícióban a purinok erős túlsúlya figyelhető meg. Ettől a képtől nem különbözik lényegesen az *intN99D* és *intN99D-E319R* csoportban látott konzerváltság. Az egyetlen említésre érdemes különbség a bal oldali *core*-ban az 1C kisebb és a 2C nagyobb gyakorisága. A fentiek alapján felállítható egy 5' CcRCTT-TTTA----AAGY-G konszenzus szekvencia. A másodlagos helyek hasonlósága ehhez a motívumhoz azonban nem korrelál az adott hely használatának frekvenciájával. Nem találtunk olyan nyilvánvaló szekvencia elemet, amely felelős lehetne a helyek használatában mutatkozó különbségekért. A *narZ*, *fumA*, *dsdX* és *exuR* helyeket az *int*⁺ és *intE319R* fágok egyértelműen hatékonyabban használták, mint az *intN99D* és az *intN99D-E319R* fágok. Az előbbi hely esetében az *overlap* 1 nukleotiddal rövidebb, az utóbbi három esetében viszont a *core* 4-6 nukleotidjai kevésbé konzerváltak. Fel kell tételeznünk, hogy a vad és az E319R mutáns Int jobban tolerálja a szuboptimális szekvenciákat, mint az utóbbi két mutáns Int.

Egyedül a megváltozott specifitással rendelkező ötszörös mutáns Int esetén vonhatunk le következtetéseket a helyek használatára vonatkozóan. Ez a fág a vad típusnál és a relaxált mutánsoknál is kevésbé igényli a *core* 1-3. pozícióiban a nukleotid azonosságot. Úgy tűnik, hogy az olyan helyeket részesíti előnyben, ahol a -3 pozícióban G, a -2 pozícióban pedig T van a bal *core* hely esetén, míg a jobboldali *core*-nál a -1 pozícióban lévő C-t preferálja. Feltűnő, hogy ezen preferenciák egy része már az *intS282P-G283K-R287K* esetében is megjelenik.

Végül mindegyik vizsgált hely esetében megfigyelhető, hogy a *core*-t és az *overlap*-et elválasztó nukleotid (7. pozíció) soha sem G. Erről a pozícióról eddig az volt az általánosan elfogadott nézet, hogy bármilyen nukleotid megfelelő. Az eredmény arra utal, hogy a G nukleotid ebben a pozícióban eddig még ismeretlen ok miatt negatívan befolyásolja a rekombinációt.

3.5 Az *overlap* régió szekvenciájának szerepe a másodlagos helyek használatában

Az előző fejezetben tárgyalt szekvencia-analízis legfeltűnőbb eredménye az *overlap* régiók első három/négy (8/10 eset) nukleotidjának erős konzerváltsága. Ez alól csak az *fdnG* hely kivétel (egyetlen integrációs eseményt detektáltunk itt!), ahol csak az első két nukleotid azonos a vad típusú *overlap* szekvenciával. Korábbi vizsgálatok általánosan elfogadott következtetése az, hogy az *attP* és *attB* *overlap*-ek szekvenciája nem befolyásolja a rekombinációt, az abszolút szekvencia bármi lehet, feltéve, hogy a két rekombinálandó partnert tekintve azonos (deMassy és mtsai, 1984, Weisberg és mtsai, 1983). Ez a szekvencia-azonosság iránti igény magyarázhatja az általunk izolált másodlagos helyek mindegyikében megfigyelt, az *attP* *overlap* bal oldalával való szekvencia-azonosságot, ugyanakkor ellentmond az *overlap* jobb oldalán megfigyelt szekvencia-heterogenitásnak. Feltételezhető, hogy eddigi ismereteink ellenére az *overlap* abszolút szekvenciája mégiscsak befolyásolja a rekombináció hatékonyságát. Ennek ellenőrzésére terveztük az alábbi kísérletsorozatot, az ebben használt három izogenikus λ fág csak az *attP* *core* régióban különbözött egymástól, az egyik λ , a másik HK022 *overlap*-pel rendelkezett, míg a harmadikban a *core* Int kötő helyek és az *overlap* hiányzott (rendre W316, W314 és W307). Első lépésben vizsgáltuk a fenti fágok integrációs képességét vad és $\Delta[attB\text{-}HK022]$ gazdáknak (5. táblázat).

A HK022 *overlap*-pel rendelkező fág gyengén integrálódott a vad típusú gazdában, ami várható is volt, hiszen a HK022 *overlap* 6 nukleotidban különbözik a λ -étől (TTTATAC a λ estében, és AGGTGAA a HK022-nál). Viszont az integrációs események döntő része a HK022 *attB*-nél történt, amit az bizonyított, hogy a $\Delta[attB\text{-HK022}]$ gazdában az integrációs hatékonyság további egy nagyságrenddel csökkent. Ezt közvetlenül is megerősítettük, a specifikus PCR primerek 10 esetből nyolcban detektálták a HK022 *attB*-nél történő integrációt. Tehát az *overlap* teljes szekvencia-azonossága döntő mértékben meghatározza az integráció helyét.

fág <i>overlap</i>	gazda <i>attB</i> hely	
	vad típus	$\Delta[attB\text{-HK022}]$
λ	86	85
HK022	1.3	0.15
nincs	0.06	NT

5. táblázat: Az integráció frekvenciája a λ illetve HK022 *overlap* régióval rendelkező fágok esetén, a fágfertőzést túlélő populáció százalékában. NT: nem vizsgált.

Kérdés, hogy a HK022 *attB* hiányában a fág által használt másodlagos helyek *overlap* régióiban a korábban észlelthez hasonló-e a HK022 *overlap*-hez való szekvencia-azonossága. Az előzőekben már ismertetthez hasonlóan azonosítottunk és szekvenáltunk három másodlagos helyet, amelyet a fág a HK022 *attB* hiányában használt. Továbbá megvizsgáltunk három olyan másodlagos helyet is, amelyet egy λ -HK022 hibrid fág, a λ 321h használ. Ez a fág HK022 *attP*-vel rendelkezik, de az Int első 321 aminosava a λ -ból, míg a maradék a HK022-ből származik. Ez utóbbi fágot az esetleges Int és/vagy *attP* specifitás kizárása miatt használtuk. Az eredmény a 6. táblázatban látható.

<i>att</i> hely	bal <i>core</i> hely	<i>overlap</i>	jobb <i>core</i> hely
A. Elsődleges HK022 <i>att</i> helyek:			
<i>attP</i>	ATCCTTT	AGGTGAA	TAAGTTG
<i>attB</i>	GCACTTT	AGGTGAA	AAAGGTT
B. A W314 által használt másodlagos helyek:			
<i>ytfK</i>	CCACTTC	AGGTG _{gc}	GAAGTAC
<i>yhiV</i>	AGGCTTA	AGG _g GA _c	TTTCATG
<i>pqqL</i>	CAGGTTC	AGG _{gtt} A	TTAGTCC
C. A λ int- λ 321h által használt másodlagos helyek:			
<i>yihL</i>	CAACTTC	AGG _{att} A	ATATATG
<i>relE</i>	GGGTTAT	AG _{ac} GA _g	AAAGTTG
<i>frvR</i>	CCAGTTG	AGGTGAA	TAACGAA

6. táblázat: A HK022 *overlap*-pel rendelkező fágok által használt másodlagos helyek szekvenciái. Az *overlap* azonosságot vastagon szedett nyomtatott nagy, az eltéréseket kis betűkkel jelöltük.

A hat azonosított hely közül egynek teljes mértékben megegyezett az *overlap* szekvenciája a HK022-ével, a maradék öt esetben viszont a korábban tapasztalthoz hasonló képet figyeltünk meg: az *overlap* régió bal oldalán 2-5 nukleotidnyi azonosság, míg a jobb oldalán változó mértékű variabilitás volt a jellemző. A kísérleti adatokból arra a következtetésre kell jutnunk, hogy a másodlagos helyekben az *overlap* régió bal oldalának konzerváltsága a rekombináció által megkívánt szekvenciaegyezés miatt van, és nem az Int preferenciájának következménye. Ugyanakkor azt is fel kell tételeznünk, hogy az *overlap* jobb oldalán ez az azonosság-igény jelentősen gyengébb, ami az Int által katalizált rekombináció ismert reakciómechanizmusával nem magyarázható.

3.6 Az overlap régiók szekvenciájának irányított szegregációja

Ezen a ponton csábító volt a gondolat, hogy egy másodlagos helyen integrálódott *int* mutáns profág-ból viszonylag könnyen egy megváltozott integrációs specifitással rendelkező fágot izoláljunk. Az Int által katalizált *attP* x *attB* rekombináció ugyanis két olyan *att* helyet eredményez, amelyek mindegyike örököl egy-egy szálat mindkét szülői *overlap*-tól (lásd 1. ábra). Az *attL* rekombináns örököli az *attP* felső és az *attB* alsó szálait, míg az *attR* az *attP* alsó és az *attB* felső szálait kapja. Amennyiben a rekombináció az *attP* és egy olyan másodlagos hely között történik, amelynek *overlap*-je különbözik a vad szekvenciától, két heteroduplex rekombináns jön létre, és mindkettő tartalmazni fog *mismatch*-eket. Ha a *mismatch* korrekciónak nincs szál-preferenciája, akkor az *attL* és *attR*-nek ugyanannyi esélye van a fág és a bakteriális *overlap* szekvenciájának öröklésére, végeredményben 25% a valószínűsége annak, hogy mindkettő egy irányba korrigálódik, és a másodlagos hely *overlap* szekvenciáját fogja hordozni.

A fenti logikára alapozva indukáltuk a másodlagos helyen integrálódott profágot, és a kapott fágpopulációban kerestünk olyan fágokat, melyek a $\Delta attB$ gazdában az eredetileg mértnél lényegesen nagyobb hatékonysággal integrálódnak. Meglepetésünkre nagyszámú egyedi eset vizsgálata után sem találtunk ilyet, pedig elvileg 1:3 arányban kapnunk kellett volna. Ezért fel kellett tételeznünk, hogy a másodlagos helyeken történő integráció mechanizmusa nem minden tekintetben azonos a vad típusú *att* helyek közötti reakciómechanizmussal, de legalábbis a heteroduplex *overlap* régiók szálpreferenciák nélküli szegregációjára vonatkozó egyszerű elképzelést el kell vetnünk. Egy másodlagos helynél (*safG*) történő integráció során megfigyelték, hogy az *attL* a fág, az *attR* pedig a bakteriális szekvenciát örökölte preferenciálisan (Weisberg és mtsai, 1983). A 17 másodlagos hely esetén az azonosításuk során már meghatároztuk az *attR* szekvenciákat,

de akkor az *overlap* szegregációja szempontjából még nem fordítottunk figyelmet rájuk. Most a fentiek fényében ismét megvizsgáltuk őket: közülük 15 esetben az *attR* a másodlagos *attB overlap* szekvenciáját hordozta, míg kettő a λ -ét. A két kivétel a *b0725* és az *ygcO* volt, mindkettő csak egy-egy *mismatch*-et tartalmaz a 6. pozícióban.

Ezek után megvizsgáltunk 197 független lizogén kolóniát, melyeknél az inzerció három gyakran használt másodlagos helynél következett be, és ezen másodlagos helyek mindegyikének *overlap* régiója több nukleotidban is különbözik a λ *overlap*-tól, szekvenciáik a következők voltak: TTTATAC (λ), TTTTGCG (*ygiC*), TTTAAAGA (*wrbA*) és TTTCCGA (*yahM*). A kapott eredményt a 7. táblázat tartalmazza.

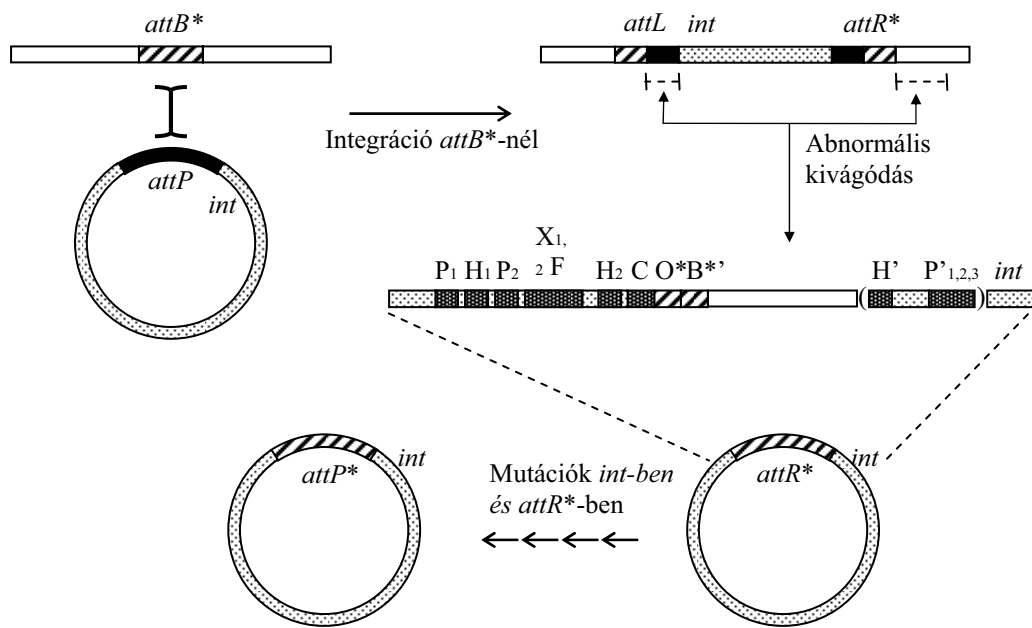
hely	<i>attL overlap</i>		<i>attR overlap</i>	
	λ	<i>E. coli</i>	λ	<i>E. coli</i>
<i>ygiC</i>	110	0	0	110
<i>wrbA</i>	33	0	0	33
<i>yahM</i>	54	0	0	54
Total	197	0	0	197

7. táblázat: Az *overlap* régió irányított szegregációja három másodlagos hely esetében.

A vizsgált 197 esetben, kivétel nélkül, az *attL*-ben a λ , míg az *attR*-ben a másodlagos hely *overlap* szekvenciát detektáltuk. Tehát, ha az integrációban résztvevő két *overlap* régió jobb oldali szegmense több nukleotidban is különbözik, akkor a folyamat az irányított szegregáció szabálya szerint történik.

3.7 A specifitászváltózás modellje

Ezen a ponton már megkísérélhető a válaszadás a célkitűzésben feltett kérdésre, nevezetesen arra, hogy a másodlagos helyek szerepet játszhatnak-e egy létező helyspecifikus rekombinációs rendszer specifitászának megváltózásában, egy új specifitász kialakulásában. Összegezve eddigi tudásunkat: mutációk az Int-ben (pl. N99D, N99D-E319R) a vad típusú fág nál nagyobb hatékonysággal katalizálnak integrációt egyes másodlagos helyeknél (pl. *wrbA*, *ygiC*). A másodlagos helyek struktúrájukat tekintve hasonlítanak az *attB*-re, és már bizonyos, bár alacsony szintű funkcionalitással is rendelkeznek. Az integrációt követően az *attP* és az *attB** eltérő *overlap* szekvenciái aszimmetrikusan szegregálnak, lényeges szekvenciakülönbség esetén az *attR* a másodlagos hely *overlap* szekvenciáját fogja tartalmazni. Ilyen kiindulási feltételek mellett kell egy lehetséges utat találni, ami a specifitász megváltózását eredményezheti. Ennek egy lényeges eleme az *attP* és az *attB* *overlap*-jeinek azonossága. Egy másodlagos helyen integrálódott fág akkor fogja kivágódás után a másodlagos *overlap*-et hordozni, ha a kivágódás nem a helyspecifikus rekombináció mechanizmusa szerint, hanem egy illegitim rekombinációs lépés eredményeként egy *attR* transzdukáló fág formájában történik meg. Ez ugyan a helyspecifikus rekombináció hatékonyságához képest ritka esemény, de ilyen fágok képződése már régen ismert (Weisberg, 1996), ezért ezt a lehetőséget bizonyítás nélkül is adottnak vehetjük. Az egyetlen extra követelmény az illegitim rekombináció során az, hogy a nem szokványos kivágódás után a fág ne veszítsen "túl sokat" a genomjából. Mindenképpen követelmény, hogy az Int teljes kódoló szekvenciája épen maradjon, és előnyös, ha a P' kar funkcionális elemei (P'_{1,2,3}) is megmaradnak.



7. ábra: A specifikitásváltozás lehetséges modellje, sematikusán. Bővebb magyarázat a szövegben. Az *attP** és az *int* az új helyhez adaptálódott funkcionális *attP* szekvencia és a megváltozott specifikitású integrázt kódoló gén. P₁, P₂, P'₁, P'₂ és P'₃-mal jelöltük az *attP*-ben található kari Int kötőhelyeket, H₁, H₂ és H' az IHF, X₁, X₂ az Xis míg F jelöli a Fis fehérje kötőhelyeket.

Egy ilyen *attR* transzdukáló fág *attP* helyett *attR**-t tartalmaz majd, ennek struktúrája a vad típussal, azaz P_{kar}-C-O-C'--H---(P'_{1,2,3})-*int*-el szemben C-O*-B*'--[bakteriális inzerció]-(P'_{1,2,3})-*int* lesz. A másodlagos *overlap* jelenléte bizonyosan növeli az adott helynél történő újbóli integráció hatékonyságát. Ugyanakkor a C'→B*' *core* típusú Int felismerőhely csere valószínűleg nem optimális a rekombináció szempontjából, ezért ez hatékonyságcsökkentő lehet. Ugyanilyen irányba hat a kromozómális inzerció is, aminek mérete a fágfejbe történő pakolódás által megszabott korláton belül bármekkora lehet, de szinte bizonyos, hogy megváltoztatja a *core*-P'_{1,2,3} helyek közötti optimális távolságot, így várhatóan negatívan hat a helyspecifikus rekombináció hatékonyságára. Ugyanakkor kellő méret esetén lehetővé teszi a fág integrálódását homológ rekombináció révén, ami egy ilyen transzdukáló fág lizogénizációs képességét biztosíthatja még igen alacsony helyspecifikus rekombinációs hatékonyság esetén is, biztosítva ezzel a kellő időt arra, hogy

a hatékonyságnövelő strukturális és *int* mutációk felhalmozódhassanak. Lényeges, hogy az *attR* döntő mértékben megőrzi az *attP* strukturális komplexitását, ami biztosíték arra nézve, hogy néhány mutáció bekövetkezte után a funkció gyorsan helyreállhasson. A folyamatot a 7. ábrán foglaljuk össze szemléletesen.

3.8 A másodlagos helyek *core* típusú Int-kötő helyeinek rekombinációs hatékonysága

Az előző fejezetben ismertetett modellben néhány olyan feltételezés is szerepel, ami kísérletesen ellenőrizhető. Az egyik ilyen feltételezés az, hogy egy adott másodlagos hely *core* típusú Int-kötő szekvenciái a vad és/vagy mutáns Int(-ek) által katalizált reakcióban kellő hatékonyságúak a funkció szempontjából. Az eddig végzett kísérleteink erre nem adtak választ, egy-egy másodlagos hely hatékonyságára csak relatív adatokat kaptunk, ami a teljes *E. coli* genom háttérében a többi ilyen helyhez viszonyított közelítő értéknek tekinthető csupán. A kérdés vizsgálatára mesterséges plazmidszubsztrátokat hoztunk létre, melyek segítségével kvantitatíve mérhető volt az integratív és a kivágódási reakciók hatékonysága. A kivágódási szubsztrát egy másodlagos helyen integrálódott profágot modellezett, az *attL* és *attR* helyekben a bakteriális Int-kötő szekvenciák a vizsgált másodlagos helyből származtak (B* illetve B'*). Az integratív szubsztrát a fág integrálódását modellezte az adott másodlagos helynél, azaz vad típusú *attP*-t és másodlagos *attB*-t tartalmazott. A fenti szubsztrátokat két változatban is elkészítettük, ezekben a rekombinálódó *att*-ok azonos vagy különböző *overlap*-eket tartalmaztak. Tudjuk, hogy az *overlap* azonosság biztosan növeli a rekombináció hatékonyságát, és ezek a szubsztrátok ennek a hatásnak a kvantitatív mérését szolgálták. A másodlagos helyek közül kettőt választottunk ki a vizsgálathoz (*yahM* és *sraF*), ezeket a λ Int nem használta, de a megváltozott specifitású öt mutációt tartalmazó Int relatíve hatékonyan rekombinálta.

A kísérletben mértük az eddigiekben is használt vad és mutáns Int-ek által katalizált reakciók hatékonyságát, az eredményt a 8. táblázatban foglaltuk össze.

A különböző *overlap* régiókkal rendelkező *attachment* helyeket tartalmazó plazmidok nem bizonyultak hatékony szubsztrátnak sem az integratív, sem a kivágódási reakcióban, egyik másodlagos hely és egyik vizsgált Int esetén sem. A rekombinációs frekvenciák, egy kivételtől eltekintve a mérési határ alatt maradtak. Az egyetlen kivétel a megváltozott specifitású Int által az *yahM* helynél katalizált integráció volt. A korábbi kísérleteink tanúsága szerint ez egyike volt a mutáns fág által leggyakrabban használt másodlagos helyeknek, a mérés tanúsága szerint itt az integráció az eltérő *overlap*-ek ellenére is mérhetően hatékony.

Az azonos *overlap* régiójú plazmidok sokkal jobb szubsztrátnak bizonyultak. Mint már említettük az *sraF* helyet a vad típusú fág nem használta, most az *overlap* azonossága egy nem túl nagy, de detektálható szintre növelte a hatékonyságot. Az 1% körüli érték azt jelenti, hogy a vad típusú λ Int továbbra sem részesíti előnyben a *sraF* helyet, még így sem, hogy megvalósult az *overlap* régiók tökéletes egyezése. Ez a kép méginkább jellemző az *yahM* helyre, detektálható rekombinációt csak egyetlen kivágódási szubsztrát esetén mértünk. Az azonos *overlap*-pel rendelkező kivágódási szubsztrátokat két változatban készítettük el, egyik a λ , a másik a másodlagos hely szekvenciáját tartalmazta. A *sraF* szubsztrátok esetén ez az eltérés nem okozott szignifikáns különbséget. A két *yahM* szubsztrát közül azonban a másodlagos *overlap*-et tartalmazó kevésbé hatékonyan rekombinálódott, az eltérés a λ , valamint az N99D és E319R Int-ek által katalizált esetben szignifikáns. A két egyszeres mutációról, N99D és E319R, már megmutattuk korábban, hogy növelik a nem specifikus *att* helyek közötti rekombinációt. Most azt találtuk, hogy az E319R egyedül is, de az N99D mutációval együtt különösen, szignifikánsan megnövelte a

rekombinációt mindkét hely esetén. Az N99D mutációnak önmagában nem volt ilyen hatása.

Szubsztrát	Integráz					
	wt λ	N99D	E319R	N99D-E319R	S282P,G283K R287K.	N99D,E319R S282P,G283K R287K.
<i>Azonos overlap-ú szubsztrátok</i>						
wt λ	aagc CTGCTTT	TTTATAC	TAAGTTG	agcg		
L/R (λ/λ)	28 \pm 13	34 \pm 13	40 \pm 11	48 \pm 10	\leq 0.18	3.2 \pm 2.3
P/B (λ/λ)	47 \pm 9	23 \pm 9	35 \pm 10	7.8 \pm 2.4	\leq 0.53	1.6 \pm 1.1
yahM	cgtg GTCCTTA	TTTCCGA	TAAGTTT	actt		
L/R (λ/λ)	0.33 \pm 0.27	0.92 \pm 0.6	3.6 \pm 0.6	9.5 \pm 1.2	\leq 0.20	4.6 \pm 2
L/R (s/s)	\leq 0.28	\leq 0.45	0.72 \pm 0.5	6.6 \pm 0.6	\leq 0.17	2.6 \pm 0.4
P/B (λ/λ)	\leq 0.42	\leq 0.72	0.73 \pm 0.3	2.9 \pm 1.4	\leq 0.58	12 \pm 4.3
sraF	cgta TTCCTTT	TTTGTTG	TAAGTGA	gacc		
L/R (λ/λ)	0.88 \pm 0.25	1.5 \pm 0.5	8.7 \pm 2.6	13 \pm 1.7	\leq 0.16	7.9 \pm 1.5
L/R (s/s)	1.04 \pm 0.12	2.3 \pm 0.6	3.9 \pm 1.4	10 \pm 1.1	\leq 0.25	6.3 \pm 0.8
P/B (λ/λ)	0.76 \pm 0.36	1.1 \pm 0.2	8.5 \pm 2.9	25 \pm 3.5	\leq 0.42	37 \pm 13
wt HK022	cggt GCACTTT	AGGTGAA	TAAGTTG	gagt		
L/R (HK/HK)	0.2 \pm 0.1	0.55 \pm 0.46	3.3 \pm 0.3	10 \pm 5	5.6 \pm 1.3	32 \pm 5
<i>Különböző overlap-ú szubsztrátok</i>						
yahM						
L/R (s/ λ)	\leq 0.22	\leq 0.15	\leq 0.23	\leq 0.09	\leq 0.08	\leq 0.30
L/R (λ /s)	\leq 0.09	\leq 0.09	\leq 0.11	\leq 0.06	\leq 0.05	\leq 0.12
P/B (λ /s)	\leq 0.30	\leq 0.33	\leq 0.49	\leq 0.31	\leq 0.41	1.50 \pm 0.80
sraF						
L/R (s/ λ)	\leq 0.39	\leq 0.41	\leq 0.38	\leq 0.54	\leq 0.60	\leq 0.56
L/R (λ /s)	\leq 0.43	\leq 0.26	\leq 0.12	\leq 0.31	\leq 0.39	\leq 0.15
P/B (λ /s)	\leq 0.07	\leq 0.04	\leq 0.11	\leq 0.14	\leq 0.22	\leq 0.16

8. táblázat: Másodlagos helyek core típusú Int-kötő helyeit tartalmazó szubsztrátok rekombinációs tulajdonságai. Az adatok 3-5 független kísérlet átlagai (\pm szórás). L/R = kivágódási szubsztrát, P/B = integratív szubsztrát. A szubsztrátok után zárójelben az overlap régió eredetét tüntettük fel, s = másodlagos hely, λ = vad típus. A helyek nevei után megadtuk az adott *attB* szekvenciáját is.

Az S282P-G283K-R287K mutációkat tartalmazó fág esetén a korábbi kísérletekben tapasztaltaknak megfelelően nagyon alacsony rekombinációs frekvenciákat kaptunk mindkét helynél, még azonos *overlap* régiók esetén is.

A fenti mutációkat együttesen tartalmazó Int jelentős mértékű rekombinációt katalizált mindkét szubsztrát esetében, különösen az integratív reakcióban volt jelentős a hatékonyság növekedése.

Összegezve megállapíthatjuk, hogy a vizsgált két másodlagos hely *core* Int-kötő szekvenciáit tartalmazó plazmidok alkalmas szubsztrátok mind az integratív, mind pedig a kivágódási reakciókban. Magas rekombinációs szintet mértünk már az egy vagy két mutációt tartalmazó Int-ek esetében is, és egy megváltozott specifitású Int is hatékonyan rekombinálta őket.

A kísérletsorozat érdekes mellékterméke egy nem várt megfigyelés: néhány szubsztrát/Int kombinációban a kivágódási és az integratív rekombinációs hatások szignifikánsan eltértek egymástól. Például az ötszörösen mutáns Int által katalizált kivágódás hatása jelentősen kisebb volt az integrálódásénál, mindkét másodlagos hely esetében. Az eltérés bizonyosan nem az Int tulajdonsága miatt van, hiszen ugyanez az Int egy másik szubsztrát esetében (HK022) magas szinten katalizálja a kivágódási reakciót. A fentivel ellentétes aszimmetria figyelhető meg a vad típusú szubsztrátok *intN99D-E319R* által katalizált reakcióiban. Ez a jelenség is szubsztrátfüggő, hiszen lényegesen kisebb a két másodlagos helyet tartalmazó szubsztrátok esetében.

3.9 Egy *attR* transzdukáló fág struktúrájának és funkcionalitásának vizsgálata

A specifitásváltozás modellje feltételezi egy *attR* transzdukáló fág képződését, melyben épek a helyspecifikus rekombinációs funkciók. Dr. Weisberg más célra korábban

izolált egy fágot (Y976), ami a genetikai analízis szerint megfelelt a modell által támasztott követelményeknek. A fág a λ *attB*-nél integrálódott profág abnormális kivágódása során keletkezett, transzdukálja a *bioAB* markereket, ezért feltehetően az *attP* helyett az *attR* régiót hordozza. A modellben ez megfelel egy olyan *attR* transzdukáló fágnek, melyben az Int és a *core* helyek egymáshoz való adaptációja már megtörtént. Feladatom a fág struktúrájának és rekombinációs funkciói épségének igazolása, és rekombinációs tulajdonságainak mérése volt.

A struktúra bizonyítása végett egy Pkar/Int-specifikus primerpárral amplifikáltuk a bakteriális inzerciót és az azt közvetlenül határoló fág részeket tartalmazó régiót, majd meghatároztuk a szekvenciáját. A szekvencia szabályos *attR* struktúrát mutatott, az *overlap* régiót 3106 bp bakteriális kromoszómából származó inzerció követte (*AE000180*, *Escherichia coli* K12 MG1655 section 70 of 400 of the complete genome, 1489-4593 pozíciók), amely a fág genomban folytatódott, az *attP* hagyományos számozása szerint a 42. pozíciótól. Az inzerció és a deléciónál az *attR*-ből hiányzik a H' IHF kötő hely, de jelen van mind a három P' kari Int-kötő hely, de ezek természetesen jelentős mértékben távolabb kerültek a *core* régiótól.

A rekombinációs funkciók épségének bizonyítására vad típusú *att*-okat tartalmazó plazmid szubsztrátokat használva mértük, hogy a fágfertőzés után *trans* helyzetből biztosítva milyen határfokkal katalizálják a két reakciót. Az 9. táblázatban bemutatott adatok szerint mindkét funkció ép, a relatíve alacsonyabb hatásfokú integratív reakció valószínűleg az *intM*RNS-nek a megváltozott struktúra miatt bekövetkező csökkent stabilitásával magyarázható.

Ezek után a kérdés az volt, hogy a struktúra és szekvenciaváltozás hogyan befolyásolja a fág lizogenizációs képességét.

a funkciók forrása	kivágódás	integráció
λ , vad típus	28 ± 13	47 ± 9
Y976	44 ± 7	12 ± 7

9. táblázat: Az *attR* transzdukáló fág rekombinációs funkcióinak mérése. Az adatok három független kísérlet átlagai.

A kromoszómába történő beépülés ennek a fágnak az esetében történhet homológ és helyspecifikus rekombinációval is, ezért a kísérletet két gazdával végeztük, az egyikben a RecA funkció ép volt, a másikban hiányzott. Mértük a fágfertőzést túlélő populációban a stabil lizogének gyakoriságát, illetve a kísérlet háttérét (W248 spontán rezisztens gyakoriság). A fág közel 1%-os gyakorisággal eredményezett stabil lizogéneket RecA⁺ gazdában. A RecA funkció hiányában a lizogenizációs gyakoriság közel két nagyságrenddel csökkent, de még mindig közel 25-ször magasabb volt a háttérnél. Ez az igen alacsony integrációs gyakoriság azonban továbbra is biztosan Int-katalizált, mert az izogénikus *int⁻* fág a háttérrel azonos W248-rezisztens gyakoriságot adott (10. táblázat).

fág	RW4206 (RecA ⁺)	RW4209 (RecA ⁻)	háttér
Y976 (Int ⁺)	$1,3 \times 10^{-2}$	$1,14 \times 10^{-4}$	$4,39 \times 10^{-6}$
Y936 (Int ⁻)	NT	$1,40 \times 10^{-5}$	$2,61 \times 10^{-5}$

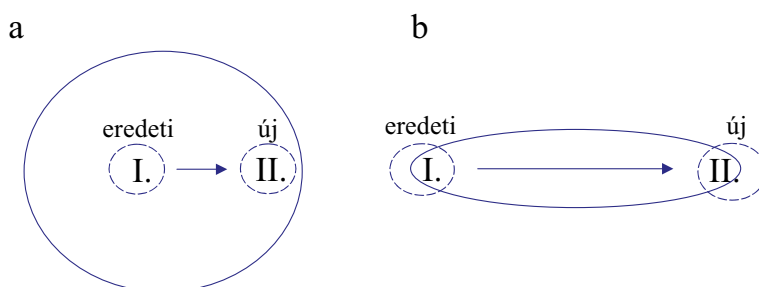
10. táblázat: Az *attR* transzdukáló fág integrációs képességének mérése. Az adatok három független kísérlet átlagai (\pm szórás). NT: nem vizsgált.

4. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS MEGBESZÉLÉS

Feladatomban annak vizsgálata volt, hogy az *Escherichia coli* genomjában található másodlagos *attB* helyek játszhatnak-e, és ha igen, milyen szerepet egy helyspecifikus rekombinációs rendszer specifikálásának megváltozásában. Az ilyen helyek azonosítása és/vagy vizsgálata korábban elsősorban a specifikus transzdukciónak és az ehhez kapcsolódó genetikai analízis kapcsán került leírásra, a rekombinációs hatékonyság szempontjából eddig nem, vagy csak kivételes esetben (pl. *saf* mutációk, deMassy és mtsai, 1984, Weisberg és mtsai, 1983) vizsgálták őket. A dolgozatban bemutatott munka az első ilyen szisztematikus vizsgálat, aminek során 19 új másodlagos *attB*-t azonosítottunk. Érdekes módon ezek közül eddig egyik sem került leírásra, valószínűleg éppen azért, mert nem az integráció hatékonysága volt az elsődleges szempont a korábban azonosított ilyen helyek szelekciója során.

Az integrázok specifikitás-változásának első lépéseként feltételezték (Dorgai és mtsai, 1998, Dorgai és mtsai, 1995, Yagil és mtsai, 1995), hogy az Int specifikitása egy vagy több mutáció következtében relaxálódik, azaz továbbra is hatékonyan rekombinálja a specifikus *att*-okat, de ezen felül megnövekedett hatékonysággal rekombinál a vad típusú Int számára nem, vagy csak kevésbé elfogadható szekvenciákat, köztük a majdani új specifikitásra jellemző helyet is. Ezzel kapcsolatban kérdésként merül fel, hogy a relaxáció általános, vagy irányított-e, ahogyan azt a 8. ábra mutatja szematikusan. Előbbi esetben azt várnánk, hogy egy relaxált fenotípusú Int nagyobb hatékonysággal integrálódik másodlagos helyeknél, hiszen továbbra is használja a vad rekombináz által elfogadható *attB**-ket, és ezeken felül eddig nem használt helyeknél is katalizálni fogja az integrációt. A 2. táblázat és a további méréseink adatainak tanúsága szerint nem ez a helyzet, sem az N99D sem pedig az E319R mutáció nem eredményez detektálható, szignifikáns

növekedést az összes másodlagos hely használatában. A mutáns és a λ Int által használt, azonosított másodlagos helyek halmazainak összevetése is ellentmond az általános relaxációnak, ugyanis vannak olyan helyek, melyeket a λ Int igen, de relaxált Int-ek nem használnak, és ez fordítva is igaz. Tehát arra a következtetésre kell jutnunk, hogy a relaxációnak irányultsága van, valószínűleg úgy, ahogy azt a 8. ábra b esete mutatja.



8. ábra: A specifikitásváltozás kétféle módja: (a) általános, (b) irányított relaxáció.

A relaxációra esetleg magyarázatot adhatott volna a vad és mutáns Int-ek által használt másodlagos *attB*-k Int kötő helyeinek szekvenciakülönbsége, de ilyen különbséget nem sikerült azonosítanunk. A λ Int-*core*DNS kristály analízise (Aihara és mtsai, 2003) egyértelműen azt mutatja, hogy az N99 bázis-specifikus kontaktust létesít a *core* hely 4. pozíciójában található T:A bázispár adenin-jével (CAACTT a λ konszenzus szekvenciában). Kézenfekvő lenne feltételezni, hogy az aszparagin \rightarrow aszparaginsav csere magyarázza az N99D mutáció fenotípusát. Ugyanakkor sem a mutáns által előnyben részesített másodlagos helyekben, sem pedig az eredetileg a mutáns szelektálására használt HK022 *att* helyekben ez a bázispár nem különbözik a λ szekvenciától. Éppen ellenkezőleg, az egyik legerősebb konzerváltságot mutatja, a 19 másodlagos *attB* 38 *core* helyéből csak 4 esetben nem T:A, és ezeket a helyeket nem preferálja az *int*N99D! A 319-es pozíció pedig a struktúra tanúsága szerint nem a DNS kötő felszínen helyezkedik el. Ezért fel kell

tételeznünk, hogy a két mutáció nem a direkt szekvenciafelismerésen keresztül fejt ki hatását, hanem a rekombináció egyéb lépéseit (pl. fehérje-fehérje kölcsönhatás, molekuláris átrendeződések a reakció során) befolyásolják úgy, hogy egyes szekvenciák alkalmasak, mások kevésbé elfogadhatóak lesznek az Int számára, de az ezt befolyásoló tényezők azonosításához a kísérleteink eredményei nem nyújtanak elégséges alapot.

Az *att* helyek közötti rekombináció specifitását - a *core* Int-kötő helyek elsődlegességét nem kétségbe vonva – egy másik szekvencia elem, az *overlap* régió is meghatározza, a két rekombinálódó hely közötti szekvencia-azonosság követelmény a hatékony, produktív rekombináció szempontjából. Az azonosított másodlagos *attB*-k szekvenciáiban a legjobban konzervált szekvencia-elem az *overlap* régió bal oldalának azonossága a λ *attB overlap* szekvenciájával, illetve egy másik kísérletben az ott alkalmazott HK022 *overlap* bal oldalának szekvenciájával. Ez arra utal, hogy egy adott Int által, a *core* Int-kötő helyek alkalmassága miatt elvileg használható másodlagos helyek közül a produktívan rekombinálhatók kiválasztásában az *overlap* első három/négy nukleotidjának meghatározó szerepe van. A reakciómechanizmus ismeretében ez a tény nem is meglepő, a Holliday struktúra kialakulásához vezető első száltranszfer során ez követelmény. Sokkal meglepőbb volt a konzerváltság hiánya az *overlap* jobb oldalán, ugyanis a második száltranszfer során a szekvencia-azonosság iránti követelmény ugyanaz kell legyen. Ugyancsak nem várt eredmény volt az eltérő szekvenciájú *overlap*-ek aszimmetrikus szegregációja a másodlagos helyeknél történő integráció során. Sem ez, sem pedig a fenti konzerváltság-hiány nem magyarázható az Int által katalizált reakció ismert mechanizmusával. A kísérleti eredmények elvileg magyarázhatók lennének annak feltételezésével, hogy a második száltranszfer során az Int nem a kanonikus +4/+5 nukleotidok között hasítja a két alsó szálát, hanem a 0/+1 pozíciók között. A hasítást végző 342-tirozin a struktúrában rendelkezik bizonyos flexibilitással, sőt az Flp és a Cre

rekombinációk esetében az analóg aminosavak ún. *trans* helyzetben hasítanak (Aihara és mtsai, 2003, Kwon és mtsai, 1997, Shaikh és mtsai, 1997, Chen és mtsai, 1992). A λ Int esetében azonban a kísérleti adatok a *trans* hasítás lehetőségét kizárni látszanak (Nunes-Düby és mtsai, 1994). Továbbá a hasítandó kötés aktiválásához szükséges további aminosavak nem flexibilis pozíciója a struktúrában nem kompatibilis egy 0/+1 hasítással. A korábbi kísérleti eredmények is azt mutatják, hogy az *overlap* hosszában egy ± 1 nukleotidnyi eltérés hatékonyságcsökkenés árán ugyan, de tolerálható az Int számára, nagyobb eltérés azonban nem. A fentieket figyelembe véve arra a következtetésre kell jussunk, hogy ha az *attB** *overlap* régió jobb oldala jelentősen eltér az *attP* szekvenciájától, az első száltranszfert követően a Holliday struktúra megoldását nem az Int által katalizált második száltranszfer végzi el. Feltételezésünk szerint az első száltranszfert követően, néhány sikertelen próbálkozás után az intaszóma szétesik, és a hátramaradó Holliday struktúra más mechanizmus szerint oldódik meg, pl. a homológ rekombinációs apparátus vagy a replikáció által. Ez a mechanizmus kielégítően magyarázhatja a kísérleti adatainkat.

A fenti feltételezett mechanizmus fényében szeretnénk értelmezni azt a megfigyelésünket, hogy az *yahM* kivágódási szubsztrátok hatékonysága között szignifikáns különbséget mértünk attól függően, hogy a két azonos *overlap* fág vagy másodlagos *attB* eredetű volt. Ez ellentmondani látszik annak a korábban sokak által megállapított, és a jelen munka során is megerősített ténynek, hogy az *overlap* azonossága, és nem a szekvenciája a fontos. Ugyanakkor Azaro és Landy *in vitro* kísérletekben kimutatta, hogy az *overlap* jobb oldalának purin/pirimidin összetétele befolyásolja az első száltranszfer során keletkező Holliday struktúra megoldásának irányát, adott esetben preferált lehet a szülői, nem rekombináns *att*-okat eredményező irány (Azaro és Landy, 1997). Az *yahM* specifikus szekvenciát a fenti szerzők nem tesztelték, de elképzelhető,

hogy itt is ilyen jelenséggel állunk szemben: a másodlagos helynél történő integráció első lépéseként kialakul a Holliday struktúra, de a fenti preferencia ezt aszimmetrikus arányban alakítja vissza szülői *att*-okká, tehát kisebb valószínűséggel kerül sor arra, hogy az intaszóma szétesése után a homológ rekombinációs rendszer rekombinánst generáljon belőle. A magyarázat természetesen spekulatív, de illik a képbe.

A dolgozatban bemutatott munka során azonosítottunk másodlagos *attB* helyeket, vizsgáltuk ezek hatékonyságát vad típusú és mutáns Int-ek által katalizált integrációban, meghatároztuk az integrációt követően az *overlap* régiók szekvenciáinak megoszlását az *attL* és *attR* helyek között. A fenti kísérletek eredményeire alapozva került kidolgozásra a specifitás változásának egy lehetséges módja, a *chromosome jumping modell*. Ez összhangban áll az összes kísérleti adattal, és előnye az is, hogy néhány feltételezett eleme kísérletesen ellenőrizhető. Ezek közül a munka során kettőt vizsgáltunk meg. Az egyik feltételezés az, hogy a másodlagos helyek Int-kötő szekvenciái kellően hatékonyak lesznek a helyspecifikus rekombináció során. A két vizsgált *attB** *core* típusú Int-kötő szekvenciáit is tartalmazó szubsztrátok vad és mutáns Int-ek által katalizált reakciókban mutatott rekombinációs tulajdonságai (7. táblázat) azt igazolják, hogy az Int csupán egy illetve két mutáció hatására jelentős mértékben képes egy új helyhez adaptálódni. Mind az integrációs, mind pedig a kivágódási reakciók során olyan hatékony rekombinációt mértünk, ami valószínűleg biztosíthatja a fág lizogenizációs képességét, és az időt arra, hogy további mutációk finomhangolják a rendszert. Hangsúlyozni szeretnénk, hogy az ebben a kísérletben használt helyek nem azonosak az Int mutánsok szelektálására használt HK022 *att* helyekkel, éppen függetlenségük támogatja a fenti következtetést. Természetesen véletlenül sem akarjuk azt állítani, hogy a vizsgált fehérjemutációk és másodlagos helyek valaha is szerepet játszottak egy konkrét specifitásváltozásban, de az adatsor meggyőzően bizonyítja a folyamat lehetséges voltát.

Egy másik feltételezése a modellnek, hogy az *attR* transzdukáló fág képes helyspecifikus rekombinációval integrálódni az adott másodlagos helynél. Munkám során vizsgáltuk egy ilyen fág tulajdonságait, bizonyítottuk, hogy struktúrája megfelel a modell által előrejelzettnek, integrációs és kivágódási funkciói épek. A fág maga képes homológ és helyspecifikus rekombinációval is beépülni a gazda genomjába, a konkrét esetben a homológ rekombináció közel 1%-os, a helyspecifikus rekombináció ennél két nagyságrenddel kisebb hatékonysággal működik. Az utóbbi alacsony érték valószínűleg az *attR attP*-hez viszonyított strukturális eltérésének (egy közel 3 kb inzerció a *core* és P' kari Int-kötő helyek között), és a H' IHF kötőhely hiányának tulajdonítható. Az *attR* transzdukáló fágok az inzerció méretét és a P' karból hiányzó fág részt tekintve igen sokfélék lehetnek, az általunk vizsgált konkrét eset talán szerencsésnek minősíthető, hiszen megmaradtak a P' kari Int-kötő helyek. Az ilyen körülmények között mért integrációs érték mutatja, hogy milyen alacsony szintről kell mutációk (pl. deléció) révén visszanyernie a fagnak a hatékony integrációs képességet. Mindaddig, amíg ez be nem következik, a homológ rekombináció biztosíthatja a fennmaradáshoz szükséges integrációs képességet.

A munka során két olyan megfigyelést is tettünk, ami nem kapcsolódik közvetlenül a vizsgálat fő irányához, de rávilágít a lambdoid Int által katalizált helyspecifikus rekombináció eddig nem ismert részleteire. Ezek egyike egy szekvencia-igény. Az eddig általánosan elfogadott nézet szerint az *overlap*-et és a *core* típusú Int kötőhelyeket elválasztó nukleotid bármi lehet (konszenzus: CAACTT N TTTATAC N AAGTTG). A nagyszámú másodlagos és az ismert elsődleges *att* helyek szekvencia-összehasonlítása során figyeltünk fel arra, hogy ez soha nem G. Az ok mai tudásunk szerint ismeretlen, vélelmezhetően a G jelenléte negatívan befolyásolja a reakció valamelyik lépését. A hatás nem lehet túl erős, hiszen a kiterjedt, mesterséges szekvenciákkal is operáló *in vitro*

vizsgálatok során már várhatóan korábban észlelték volna. Esetleg az is feltételezhető, hogy az *in vitro* vizsgálatokhoz optimalizált reakciókörülmények között a hatás nem is jelentkezik. Valószínű, hogy a jelenségre azért csak most derült fény, mert a másodlagos helyeket is érintő rekombináció szuboptimális, ilyen körülmények között egy egyébként gyenge hatás jobban észlelhető.

A másik nem várt megfigyelés a bizonyos szubsztrát/Int kombinációkban észlelhető szignifikáns különbség az integratív és kivágódási reakciók hatékonyságában (pl. a vad típusú *att*-ok *intN99D-E319R* által, illetve a λ /*sraF att*-ok *intN99D-S282P-G283K-R287K-E319R* által katalizált reakciói). A jelenség szubsztrátfüggő, hiszen mindkét Int esetében ismertek olyan *att* kombinációk, melyeket a vad típusú reakció szintjéhez közeli hatékonysággal rekombinálnak. Az integratív és a kivágódási reakciók több szempontból is különböznek egymástól, pl. mások a járulékos fehérjék iránti igények, eltér a kari Int-kötő helyek használata, más a reaktív intaszómák struktúrája. A fenti mérési eredmények alapján azt is fel kell tételeznünk, hogy a kétféle rekombináció során az Int/*core* kötőhely kölcsönhatás nem azonos, az Int bizonyos információtartalmat az egyik reakció során használ, a másikban nem.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1 Mikrobiális technikák

5.1.1 Mikroorganizmusok tenyésztése:

Az *Escherichia coli* törzsek tenyésztéséhez LB tápoldatot (1% tripton, 0.5 % élesztőkivonat, 0.5 % NaCl, pH 7.2) vagy 1.3 % agart tartalmazó táptalajt használtunk. A fágadszorpciót elősegítendő a szaporításhoz LBMM tápoldatot használtunk, amely a fentiekén felül 0.2 % maltózt és 10 mM MgSO₄-ot is tartalmazott. A tenyészeteket a kísérletnek megfelelően, 32 vagy 37 °C-on inkubáltuk egy éjszakán át. A használt baktériumtörzseket a 11. táblázat tartalmazza.

baktériumtörzs	releváns genotípus	Hivatkozás
RW495	$\lambda attB^+ - supE44$	Enquist és Weisberg, 1977
RW1401	$\Delta SA269[galT-attB\lambda-bioB]supE44$	Weisberg és mtsai, 1983
RW4206	RecA ⁺	R.A.Weisberg törzsgyűjteményéből
RW4209	RecA ⁻ $\Delta 306[srl-recA]$	R.A.Weisberg törzsgyűjteményéből
EY1546	LE392 $\Delta[attB-HK022]::neo$	jelen munka
TAP114	W3110 $\Delta M15[lacZ] lacI^q$	King és Weisberg, 2003
fág		
W248	$\lambda h\phi 80 \Delta 248[attP-int] cI248$	Shimada és mtsai, 1972
W307	$\lambda \Delta 307[attP]$	Nagaraja és mtsai, 1990
W314	$\lambda attP$ with overlap of HK022	jelen munka
W316	$\lambda attP^+$	jelen munka
Y λ 321h	λ -HK022 hybrid with chimeric Int and attP of HK022	Dorgai és mtsai, 1995
Y936	$\lambda int^+ attR$ (bio936)	R.A.Weisberg törzsgyűjteményéből
Y976	$\lambda int-am29 attR$ (bio936)	R.A.Weisberg törzsgyűjteményéből

11. táblázat: A használt baktériumtörzsek és bakteriofágok

5.1.2 Bakteriofágok szaporítása:

A munkához használt bakteriofágokat részben az 1. részben pedig a 11. táblázatban sorolom fel. Szaporításuk vagy folyadékban, vagy szilárd táptalaj felszínén történt. A folyadékban történő szaporításhoz egy baktériumpázsiton kapott egyedi plakkot és 50-100 µl 10 mM MgSO₄-ban szuszpendált gazdabaktériumot (általában RW495) 5 ml, 62 µl NOZU adalékkal (0.3 % glükóz, 7.5×10^{-2} mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 4×10^{-3} mM FeCl₃ vagy FeSO₄) kiegészített LB tápoldatba oltottuk. A tenyészetet 37 °C-on rázattuk (220 rpm) addig, míg a lízis jelei nyilvánvalóvá nem váltak. Ekkor a kultúrához 100 µl kloroformot adtunk (dezintegrálja a lízisben lévő, de még nem teljesen lizált baktériumsejteket), ezzel további 10 percig rázattuk. Ezután centrifugáltuk (10 perc, 3000 rpm), a felülúszót steril kémcsőbe szívtuk át, és +4 °C-on tároltuk.

A szilárd felszínen történő szaporításhoz 1.3 %-os LB táptalajra 2.5 ml 55 °C-os fedő agarban (0.6% agart tartalmazó LB tápoldat) szuszpendált 100 µl megfelelő hígítású fágot és 50 µl gazdabaktériumot szélesztettünk. Minden esetben előkísérletekben határoztuk meg az éppen konfluens lízist eredményező megfelelő hígítást. A lemezeket 37 °C-on, egy éjszakán át inkubáltuk. Ezután a lemezre 3 ml TMG fág-hígító puffert (10 mM Tris, 10 mM MgSO₄, 0.01 % zselatin, pH 7.4) mértünk. A fedő agar fellazítása után a szuszpenziót átöntöttük kémcsőbe, 100 µl kloroformot adtunk hozzá és egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk, hogy a fágok kidiffundáljanak a fedőagarból. Ezt követően centrifugáltuk, a felülúszót steril kémcsőbe átszívtuk és +4 °C-on tároltuk.

5.1.3 A felszaporított fágok titrálása:

A fáguszuszpenzióból TMG fág-hígító pufferrel 10^{-7} koncentrációig terjedő hígítási sorozatot készítettünk. 2.5 ml 55 °C-os fedőagarban szuszpendált 50 µl RW495 *E. coli*-hoz

100 µl megfelelő hígítású fágot adtunk és 1.3 %-os LB táptalajra öntöttük. A lemezeket 37 °C-on inkubáltuk egy éjszakán át, majd a baktériumpázsiton kapott plakkokat legalább három párhuzamos lemezen megszámláltuk, és ez alapján határoztuk meg a fág titerét.

5.1.4 Az *in vivo* integráció mérése, a lizogének szelektálása:

Egy éjszakán át szaporított baktériumkultúrával 1:100 arányban oltottunk be friss LBMM tápoldatot, amit 37 °C-on inkubáltunk, amíg az OD₆₀₀ érték elérte az 1-et. A kultúrát centrifugáltuk és 10 mM MgSO₄ oldatban szuszpendáltuk. Ismét mértük a denzitást, és szükség esetén OD₆₀₀ = 1-re állítottuk be. A kultúrát további 1 órán át inkubáltuk 32 °C-on, majd jégen lehűtöttük. 100 µl jégbe hűtött baktériumhoz 10-szeres multiplicitásban adtuk a kérdéses fágot, 10 perc adszorpció után 1 ml-re kiegészítettük 32 °C-on előmelegített LBMM tápoldattal és további egy órát inkubáltuk 32 °C-on. Ezután a megfelelő hígítások 100 µl-ét 10⁹ W248 "killer" fág jelenlétében táptalajra szélesztettük, a lizogének szelektálására. A fágfertőzést túlélő összes sejt számát hasonló módon, de W248 fág hiányában határoztuk meg. A lemezeket 32 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk, és számláltuk a telepeket. Az integráció frekvenciáját a lizogének és az összes túlélő sejt aránya adta meg.

Az egyedi lizogéneket „killer” fágot tartalmazó lemezeiről izoláltuk, és tisztítás után párhuzamosan 32 és 37 °C-on történő inkubálás során győződünk meg arról, hogy valóban lizogén és nem fágrezisztens baktériumról van-e szó. A nagyszámú független lizogént tartalmazó populációhoz a megfelelő hígításban lemezelt kultúrát egy vagy több lemezeiről szuszpendáltuk fel néhány milliliter tápoldatban.

5.1.5 A rekombináció mérése plazmid szubsztrátokon

5.1.5.1 A kivágódás hatékonyságának mérése:

Az *attR* és *attL* régiókat tartalmazó DNS szegmenst tartalmazó plazmidok az (1) hivatkozásban leírttal azonos általános szerkezetűek voltak, csak a vizsgált *core* Int-kötő helyekben különböztek. Működési elve röviden a következő: Az *rrnBT₁T₂* terminátorokkal elválasztott két *att* hely a p_{tac} promóter és a *lacZ* gén között helyezkedett el, a plazmid által biztosított fenotípus Lac⁻. A kivágódási reakció ezt a szegmentet eltávolítja, hátrahagyva az *attB*-t *in frame* a *lacZ* kódoló régióval, a keletkező plazmid fenotípusa Lac⁺.

Az adott plazmidot tartalmazó baktériumot *overnight* növesztettük, reggel 1:100 arányban hígítottunk friss LBMM tápoldatban, majd 37 °C-on szaporítottuk, amíg az OD₆₀₀ érték elérte az 1-et. A kultúrát centrifugáltuk és 10 mM MgSO₄ oldatban szuszpendáltuk. Ismét mértük az OD₆₀₀ értéket és hígítással 1-re állítottuk be. A kultúrát további 1 órán át inkubáltuk 32 °C -on, majd jégen lehűtöttük. 100 µl jégbe hűtött baktériumhoz 10-szeres multiplicitásban adtuk a kérdéses fágot, 10 perc adszorpció után 1 ml-re kiegészítettük LBMM tápoldattal és további 30 percig inkubáltuk 32 °C-on. Ezután a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, és plazmidot tisztítottunk belőlük.

A plazmidokat TAP114 ($\Delta lacZ$, *lacI^q*) elektrokompetens sejtekbe transzformáltuk, ampicillint és X-galt tartalmazó LB táptalajra szélesztettük, és másnap számoltuk a kék és a fehér telepeket. A kék telepek olyan plazmidot tartalmaztak, amelyeknél megtörtént a kivágódás, ezért termelődhet a β -galaktozidáz, ami színreakciót eredményez, míg a fehér telepek a rekombináció hiányát jelzik. A kivágódás frekvenciáját a kék telepek és az összes telep számának aránya adja. A konstitutív *lac* represszorra azért van szükség, mert hiányában a kivágódás után előálló *attB* plazmid toxikus a sejtre.

5.1.5.2 Az integráció hatékonyságának mérése:

Az integratív szubsztrátok tartalmazták a vizsgált *attB** helyet *in frame* a *lacZ* kódoló régióval (a kivágódási reakció termékével azonos struktúra), és a p_{tac} -tól *upstream* egy EcoRI fragment formában beillesztett *attP*-t. Ez utóbbi orientációja olyan, hogy a rekombináció eredményeként az *attP* és az *attB* közötti szegmens a p_{tac} promóterrel együtt deletálódik, így $Lac^+ \rightarrow Lac^-$ fenotípus változás következik be.

Az integráció mérésének technikai része azonos volt a kivágódás mérésénél márt leírttal, azzal az egyetlen módosítással, hogy fágfertőzés után 45 percig inkubáltuk a kultúrát. Transzformálás után az integrációt a fehér kolóniák megjelenése jelzi, a frekvenciát a fehér/össz telepszám arány adja meg.

5.2 DNS technikák

5.2.1 *E. coli* genomiális DNS tisztítás:

A DNS kinyeréséhez a baktériumokat egy éjszakán át 32 °C-on 1.5 ml rázatott LB tápoldatban növesztettük, centrifugáltuk (0.5 perc, 12000 rpm) és a felülúszó leöntése után az üledéket rövid vortexeléssel fellazítottuk. A sejteket felfuszpendáltuk 200 μ l 50 mM Tris/HCl, pH 6.8, 50 mM EDTA oldatban. Hozzáadtunk 20 μ l 10% SDS-t és 2 μ l 10 mg/ml proteáz K-t, és 50 °C-on inkubáltuk, amíg a szuszpenzió ki nem tisztult. A lizátum viszkozitását intenzív pipettázással csökkentettük, majd fenol-kloroform extrakciónak vetettük alá. Ezt mindaddig ismételtük, míg centrifugálás után tiszta határfelületet nem kaptunk. Az utolsó lépés felülúszóját kétszer extraháltuk kloroformmal, majd a DNS-t kicsaptuk (1/20 térfogat 5 M K-acetát, 2.5 térfogat 96% etanol). Centrifugálás után (15 perc, 12000 rpm) az üledéket 70% etanollal mostuk egy órán át. Újabb centrifugálás után az üledéket vákuumszáritóban száritottuk ~3 percig. A száraz, tiszta DNS-t feloldottuk 100

μ l 10mM Tris-HCl, pH 6.8, 10 mM NaCl, 0.5 mM EDTA oldatban, és felhasználásig fagyasztva tároltuk.

5.2.2 Amplifikáció PCR-rel:

A reakciókhoz PTC 200 Thermal Cycler-t (MJ Research) használtunk. Az oligonukleotidok a BioServe Biotechnologies (Laurel, MD, USA), illetve a Biocenter Kft. (Szeged) termékei. Egy tipikus PCR amplifikáció 30 ciklust tartalmazott, 30 másodperces lépésekkel: 95 °C-os denaturáció, 55 °C-os *annealing* és 72 °C-os szintézis. Hosszabb termékek amplifikációjához 60 másodperces szintézisidőt használtunk. Az amplifikációt 50 μ l térfogatban, 50-100 pmol primerrel végeztük. Egyebekben követtük a gyártóknak (Perkin Elmer vagy Zenonbio Kft.) a Taq DNS polimeráz enzim használatára vonatkozó ajánlásait.

5.2.3 A másodlagos helyek azonosítása:

Az egyedi lizogénekből tisztított genomiális DNS-t restrikciós enzimmel emésztettük, majd hasonlóan emésztett pBC SK plazmidhoz (Stratagene) ligáltuk. A ligálási reakcióból 1 μ l-t használtunk templátként PCR-ben, melyben vektor- és fág-specifikus primerek segítségével amplifikáltuk vagy az *attL*-t vagy az *attR*-t tartalmazó DNS szakaszt. A termék specifikitását egy második amplifikálással ellenőriztük, melyben nested vektor- és fág-specifikus primereket használtunk.

A sikeres amplifikálás érdekében többféle restrikciós enzimmel próbálkoztunk, pl. EcoRI, EcoRV, BamHI, HpaII és HaeIII, illetve különböző összetételű ligálási elegyeket használtunk (adott mennyiségű vektor DNS-hez különböző mennyiségű emésztett genomi DNS-t adtunk). Az első PCR-hez különböző hígításokban adtuk a ligálási elegyet,

töményen illetve 10x-100x hígítva. A *nested/semi-nested* PCR terméket agaróz gélből izoláltuk, és meghatároztuk a szekvenciáját.

5.2.4 Az integrációs frekvencia mérése kiválasztott másodlagos helyeken:

Az izolált egyedi lizogéneket illetve a lizogén populációkat PCR-rel teszteltük arra nézve, hogy az integráció melyik általunk már azonosított másodlagos helyen történt. Primerjeink az *attP* P vagy P' karjához hibridizáltak, illetve ennek megfelelően a kialakult másodlagos *attR* vagy *attL* körüli genomiális DNS-hez. Az *overnight* felnövesztett kultúrát 1% Triton X-100-zal 95 °C-on 1 percig kezeltük, majd az így feltárt sejtszuszpenzió 1 µl-ét használtuk templátként. Az adott helyre való integrációt a megfelelő méretű fragment jelenléte bizonyította.

5.2.5 Az overlap régió szegregációjának ellenőrzése:

Templátként az egyedi lizogénekből tisztított genomiális DNS 1 µl-ét használtuk PCR-ben. Mindhárom tesztelt másodlagos hely esetén (*ygiC*, *wrbA*, *yahM*) primereket terveztünk az *attL*-hez és *attR*-hez is, amelyek vagy a vad típusú vagy a másodlagos hely *overlap* régiójához hibridizáltak. Ha az egyik primerpár adott terméket, míg a másik nem, akkor következtethettünk az *overlap* régió szekvenciájára.

5.2.6 Southern hibridizáció

5.2.6.1 A próba készítése:

Az *attP*, *attL* és *attR* próbákat PCR ampifikálással készítettük, templátként az *attP*-hez fág DNS-t, a profág *att* helyekhez pedig egy, a kivágódási reakció teszteléséhez készült plazmidot (pLD166) használtunk. A specifikus primerpárok azonosak voltak a szubsztrátok készítése során használtakkal (lásd ott). A radioaktív jelölés $\alpha^{32}\text{PdCTP}$ -vel

történt (NEN, 111TBq/mmol), egy reakció közel 1.8 MBq aktivitású jelölt dCTP-t tartalmazott. A PCR reakcióelegyben a nem jelölt dCTP koncentrációját a szokásos érték (250 μ M) 1/10-ére csökkentettük. A jelölt terméket további tisztítás nélkül használtuk a hibridizáláshoz.

5.2.6.2 Filterkészítés és hibridizálás:

Az eljárást a Molecular Cloning 9.31.-62. fejezete alapján végeztük. Egy éjszakán át tartó kétoldalú kapilláris transzfert alkalmaztunk. A filterek hibridizálásának és mosásának körülményei egyébként megegyeztek a fenti hivatkozás ajánlásaival. A hibridizált filtereket - 70 °C-on exponáltuk.

5.2.7 A rekombinációs mérésekben használt plazmidszubsztrátok előállítása

5.2.7.1 A kivágódási szubsztrátok előállítása:

Kiindulási plazmidként a pLD177 jelű plazmidot használtuk (Dorgai és mtsai, 1998), amely tartalmazta a λ fág beépülésével kialakult *attL* és *attR* helyek szekvenciáit.

A különböző másodlagos *att* helyeknek megfelelő nukleotidokat oligonukleotid-irányított mutagenézissel hoztuk létre a plazmid *att* helyeiben. A megfelelő mutációkat tartalmazó *attL* és *attR* oligonukleotidokkal PCR reakcióban amplifikáltuk a helyeket tartalmazó DNS-szakaszt, a PCR terméket a későbbiekben emésztettük, majd alkalmasan emésztett plazmidhoz ligáltuk, egy BamHI helyen keresztül.

Az inzertet megfelelő orientációban tartalmazó transzformánsokat PCR-rel teszteltük, majd szekvenciájukat meghatároztuk.

5.2.7.2 Az integratív szubsztrátok előállítása:

A kivágódási szubsztrátokkal végzett kísérletek eredményeként előálltak a másodlagos *attB** helyet tartalmazó plazmidok. Alkalmas oligonukleotidokkal amplifikáltuk az *attP* helyet tartalmazó DNS szakaszt, emésztettük EcoRI-gyel, majd a másodlagos *attB** helyet tartalmazó plazmidba inzertáltuk a p_{tac} promótortól *upstream* elhelyezkedő egyedi EcoRI helyre. PCR-rel teszteltünk az inzert jelenlétére és megfelelő orientációjára, majd a szekvenciáját meghatároztuk.

5.2.8 Gélelektroforézis:

Restrikciós fragmentek és PCR termékek analizésére 0.7-4%-os agaróz (Invitrogén, FMC NuSieve 3:1) géleket használtunk, a detektálandó fragmentek méretétől függően. Az elektroforézishez TAE puffert használtunk (0.04 M Tris-acetát, pH 8.5, 1 mM EDTA). A futtatáshoz 10 V/cm feszültséget alkalmaztunk. A DNS-t 0.5 µg/ml közvetlenül a gélhez adott etídium-bromiddal vizualizáltuk.

5.2.9 Fragmentizolálás:

Az agaróz gélből a megfelelő méretű restrikciós fragmenteket vagy PCR terméket tartalmazó géldarabot kivágtuk, fagyasztottuk, összetörtük és Millipore Ultrafree-MC betétes centrifugacsövön keresztül centrifugáltuk (15 perc, 12000 rpm). A szűrletből a DNS-t alkohollal kicsaptuk, mostuk, szárítottuk és desztillált vízben oldottuk.

5.2.10 Plazmidok izolálása:

Plazmid izoláláshoz *E. coli* sejtekből kereskedelmi forgalomban kapható *kit*-eket (Qiagen, Viogen, V-gene) használtuk, követve a gyártó ajánlását.

5.2.11 Az *E. coli* sejtek transzformálása:

Elektrokompetens sejt készítésekor és a sejtek elektroporálásakor (Sambrook és mtsai, 1989) szerint jártunk el.

5.2.12 Szekvenálás:

A DNS szekvenciák meghatározásához az MTA SZBK szekvenáló szolgáltatását vettük igénybe.

5.2.13 Enzimek és reagensek:

A felhasznált restrikciós endonukleázok, T4 DNS ligáz, RNáz, proteáz K, Taq DNS polimeráz, valamint az alkalmazott vegyszerek és reagensek kereskedelmi forrásból kerültek beszerzésre (New England BioLabs, Fermentas, Promega, Zenon Kft.), és a gyártók által ajánlott vagy az alkalmazott módszer által megkívánt körülmények között használtuk azokat.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- Aihara H, Kwon HJ, Nunes-Düby SE, Landy A, Ellenberger T. 2003. A conformational switch controls the DNA cleavage activity of lambda integrase. *Mol Cell* 12, 187-198
- Arciszewska LK, Sherratt DJ. 1995. Xer site-specific recombination in vitro. *EMBO J* 14, 2112-2120
- Azaro MA, Landy A. 1997. The isomeric preference of Holliday junction influences resolution bias by lambda integrase. *EMBO J* 16, 3744-3755
- Azaro MA, Landy A. 2002. λ integrase and the λ Int family, p118-148. In Craig NL, Craigie R, Gellert M, Lambowitz AM (eds), *Mobile DNA II*. ASM Press, Washington DC.
- Ball CA, Johnson RC. 1991. Efficient excision of phage λ from the *Escherichia coli* chromosome requires the Fis protein. *J Bacteriol* 173, 4032-4038
- Ball CA, Johnson RC. 1991. Multiple effects of Fis on integration and the control of lysogeny in phage λ . *J Bacteriol* 173, 4027-4031
- Bauer CE, Gardner JF, Gumpert RI, Weisberg RA. 1989. The effect of attachment site mutations on strand exchange in bacteriophage λ site-specific recombination. *Genetics* 122, 727-735
- Bidwell K, Landy A. 1979. Structural features of λ site-specific recombination at a secondary att in galT. *Cell* 16: 397

- Bushman W, Yin S, Thio LL, Landy A. 1984. Determinants of directionality in lambda site-specific recombination. *Cell* 39, 699-706
- Chen JW, Lee J, Jayaram M. 1992. DNA cleavage in trans by the active site tyrosine during Flp recombination: switching protein partners before exchanging strands. *Cell* 69, 647-658
- Cheng Q, Swalla BM, Beck M, Alcaraz RJr, Gumport RI, Gardner JF. 2000. Specificity determinants for bacteriophage Hong Kong 022 integrase: analysis of mutants with relaxed core-binding specificities. *Mol Microbiol* 36, 424-436
- Craig NL, Nash HA. 1984. E.coli integration host factor binds to specific sites in DNA. *Cell* 39, 707-716
- deMassy B, Studier FW, Dorgai L, Appelbaum E, Weisberg RA. 1984. Enzymes and sites of genetic recombination: Studies with gene-3 endonuclease of phage T7 and with site-affinity mutants of phage lambda. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 49, 715-725
- Dixon JE, Shaikh AC, Sadowski PD. 1995. The Flp recombinase cleaves Holliday junctions in trans. *Molec Microbiol* 18, 449-458
- Dhillon TS. 1981. Temperate coliphage HK022: virions, DNA, one-step growth, attachment site, and the prophage genetic map. *J Gen Virol* 55, 487-492
- Dorgai L, Oberto J, Weisberg RA. 1993. Xis and Fis proteins prevent site-specific DNA inversion in lysogens of phage HK022. *J Bacteriol* 175, 693-700

- Dorgai L, Yagil E, Weisberg RA. 1995. Identifying determinants of recombination specificity: construction and characterization of mutant bacteriophage integrases. *J Mol Biol* 252, 178-188
- Dorgai L, Sloan S, Weisberg RA. 1998. Recognition of core binding sites by bacteriophage integrases. *J Mol Biol* 277, 1059-1070
- Enquist LW, Weisberg RA. 1977. A genetic analysis of the att-int-xis region of coliphage lambda. *J Mol Biol* 111, 97-120
- Esposito D, Gerard GF. 2003. The *Escherichia coli* Fis protein stimulates bacteriophage lambda integrative recombination *in vitro*. *J Bacteriol* 185, 3076-3080
- Filutowitz M, Ross W, Wild J, Gourse RL. 1992. Involvement of Fis protein in replication of the *Escherichia coli* chromosome. *J Bacteriol* 174, 398-407
- Franz B, Landy A. 1995. The Holliday junction intermediates of lambda integrative and excisive recombination respond differently to the bending proteins integration host factor and excisionase. *EMBO J* 14, 397-406
- Guo F, Gopaul DN, Van Duyne GD. 1997. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* 389, 40-46
- Hartley JL, Donelson JE. 1980. Nucleotide sequence of the yeast plasmid. *Nature*, 286, 860-864
- Hickman AB, Waninger S, Scocca JJ, Dyda F. 1997. Molecular organization in site-specific recombination the catalytic domain of bacteriophage HP1 integrase at 2.7 Å resolution. *Cell*, 89, 227-237

- Hoess RH, Wiezbicki A, Abremski K. 1986. The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination. *Nucleic Acid Res* 14, 2287-2300
- Jayaram M. 1994. Phosphoryl transfer in Flp recombination: a template for strand transfer mechanisms. *Trends Biochem Sci* 19, 78-82
- King RA, Weisberg RA. 2003. Suppression of factor-dependent transcription termination by antiterminator RNA. *J Bacteriol* 185, 7085-7091
- Kolot M, Yagil E. 1994. Position and direction of strand exchange in bacteriophage HK022 integration. *Mol Gen Genet* 245, 623-627
- Kwon HJ, Tirumalai R, Landy A, Ellenberger T. 1997. Flexibility in DNA recombination: structure of the lambda integrase catalytic core. *Science* 276, 126-131
- Landy A. 1989. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 58, 913-949
- Lee EC, Gumport RI, Gardner JF. 1990. Genetic analysis of bacteriophage lambda integrase interactions with arm-type attachment site sequences. *J Bacteriol* 172, 1529-1538
- Lewis JA, Hatfull GF. 2001. Control of directionality in integrase-mediated recombination: examination of recombination directionality factors (RDFs) including Xis and Cox proteins. *Nucl Acid Res* 29, 2205-2216
- Moisoto de Vargas L, Landy A. 1991. A switch in the formation of alternative DNA loops modulates lambda site-specific recombination. *PNAS* 88, 588-592

- Nagaraja R, Weisberg RA. 1990. Specificity determinants in the attachment sites of bacteriophages HK022 and lambda. *J Bacteriol* 172, 6540-6550
- Nilsson L, Vanet E, Vijgenboom E, Bosch L. 1990. The role of Fis in trans activation of stable RNA operons of E. coli. *EMBO J* 9, 727-734
- Nunes-Düby SE, Tirumalai RS, Dorgai L, Yagil E, Weisberg RA, Landy A. 1994. Lambda integrase cleaves DNA in cis. *EMBO J* 13, 4421-4430
- Nunes-Düby SE, Kwon HJ, Tirumalai RS, Ellenberger T, Landy A. 1998. Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucl Acids Res* 26, 391-406
- Parkinson JS, Davis RW. 1971. A physical map of the left arm of the lambda chromosome. *J Mol Biol* 56, 425-428
- Ross W, Landy A. 1982. Bacteriophage lambda int protein recognizes two classes of sequence in the phage att site: characterization of arm-type sites. *Proc Natl Acad Sci* 79, 7724-7728
- Ross W, Shulman M, Landy A. 1982. Biochemical analysis of att-defective mutants of the phage lambda site-specific recombination system. *J Mol Biol* 156, 505-522
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T eds. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual
Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Savilahti H, Mizuuchi K. 1996. Mu transpositional recombination: donor DNA cleavage and strand transfer in trans by the Mu transposase. *Cell* 85, 271-280

- Senecoff JF, Cox MM. 1986. Directionality in FLP protein-promoted site-specific recombination is mediated by DNA-DNA pairing. *J Biol Chem* 261, 7380-7386
- Shaikh AC, Sadowski PD. 1997. The Cre recombinase cleaves the lox site in trans. *J Biol Chem* 272, 5695-5702
- Shimada K, Weisberg RA, Gottesman ME. 1972. Prophage lambda at unusual chromosomal locations I. Location of the secondary attachment sites and the properties of the lysogens *J. Mol. Biol.* 63, 483-503
- Shulman MJ, Mizuuchi K, Gottesman MM. 1976. New att mutants of phage lambda. *Virology* 72, 13-22
- Silverman M, Simon M. 1983. Mobile genetic elements. J. A. Shapire ed. Academic Press
- Six E. 1963. Affinity of P2 rdl for prophage sites on the chromosome of *Escherichia coli* strain C. *Virology* 10, 375-387
- Six E. 1966. Specificity of P2 for prophage site I on the chromosome of *Escherichia coli* strain C. *Virology* 29, 106-125
- Sternberg N, Hamilton D, Austin S, Yarmolinsky M, Hoess R. 1981. Site-specific recombination and its role in the life cycle of P1. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 45 297-309
- Sternberg N, Hamilton D. 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 150, 467-486
- Struhl K. 1981. Deletion, recombination and gene expression involving the bacteriophage lambda attachment site. *J Mol Biol* 152, 517-533

- Thompson JF, de Vargas LM, Koch C, Kahmann R, Landy A. 1987. Cellular factors couple recombination with growth phase: characterization of a new component in the λ site-specific recombination pathway. *Cell* 50, 901-908
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680
- Weisberg RA, Enquist LW, Foeller C, Landy A. 1983. Role for homology in site-specific recombination. The isolation and characterization of a site affinity mutant of coliphage lambda. *J Mol Biol* 170, 319-342
- Weisberg RA. 1996. Specialized transduction. pp2442-2448 In Neidhardt, FC (ed): *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium*. ASM Press, Washington, DC
- Weisberg RA, Gottesman ME, Hendrix RW, Little JW. 1999. Family values in the age of genomics: comparative analyses of temperate bacteriophage HK022. *Annu Rev Genet* 33, 565-602
- Yagil E, Dolev S, Oberto J, Kislev N, Ramaiah N, Weisberg RA. 1989. Determinants of site-specific recombination in the lambdoid coliphage HK022. An evolutionary change in specificity. *J Mol Biol* 207, 695-717
- Yagil E, Dorgai L, Weisberg RA. 1995. Identifying determinants of recombination specificity: construction and characterization of chimeric bacteriophage integrases. *J Mol Biol* 252, 163-177

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani

- témavezetőmnek, Dr. Dorgai Lászlónak, hogy hasznos tanácsaival irányította kutatásaimat és elősegítette szakmai fejlődésemet, karrierem építését,
- munkatársamnak, György Andreának, aki eredményes munkájával segítette doktori dolgozatom elkészítését,
- Bálint Arankának és Vörös Andreának, akiknek a mindennapi segítségére és értékes munkájára mindig számíthattam,
- Dr. Kiss Istvánnak és Urbán Gabriellának, akik hozzáértő kritikájukkal sokat segítettek dolgozatom megírásában,
- Dr. Kálmán Miklósnak, a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány Biotechnológiai Intézetének igazgatójának, hogy a kutatásaimhoz szükséges feltételeket biztosította,
- Dr. Robert Weisbergnek akitől sokat tanulhattam és aki nagyban hozzájárult dolgozatom elkészültéhez.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során a lambdoid temperált fágok helyspecifikus rekombinációs rendszerei specifikitásváltozásának lehetőségét vizsgáltam. A legrégebben tanulmányozott és az egyik legjobban ismert helyspecifikus rendszer az *Escherichia coli* és a λ bakteriofág rendszere, melynek apparátusa egy-egy egyedi szekvenciát felismerve a baktérium kromozómán és a fág DNS-en, egy reciprok rekombinációval fúzionálja a két genomot.

A rekombináció kulcsenzime a fág által kódolt Integráz (Int). Azokat a szekvenciákat, melyeket az Int felismer és amelyek között megtörténik a rekombináció, nevezzük *attachment (att)* helyeknek. Az elsődleges *att* helyeken kívül mind a baktérium, mind a fág tartalmaz ún. másodlagos *att* helyeket is. A rekombináció hatékonysága ezen helyek között nagyságrendekkel kisebb, mint az elsődleges *att* helyek esetén.

A HK022 fág, a λ -hoz hasonlóan a baktériumsejtbe jutás után képes a lizogén utat követni. A két helyspecifikus rekombinációs rendszer minden eddigi vizsgálata arra utal, hogy a két fág azonos reakcióutat követ a beépülés és a kivágódás során. Viszont a strukturális, szabályozási és reakciómechanizmusbeli hasonlóságok ellenére egyik Int sem katalizálja a másik fág beépülését ill. kivágódását kellő hatékonysággal.

A HK022 Int és a λ Int közötti hasonlóságok és eltérések alapján tanulmányozhatók az evolúciós változások mechanizmusai a fehérje-nukleinsav kölcsönhatásokban. A dolgozatban bemutatott munka kiindulópontjaként szolgáló korábbi vizsgálatok során ismertté váltak a két fág helyspecifikus rekombinációs rendszerében az eltérő specifikitáért felelős elemek. A vad típusú és mutáns Integrázok valamint a vad típusú és mutáns *att* szekvenciák különböző kombinációkban, *in vivo* mért rekombinációs tulajdonságai alapján valószínűsíthető lehetett egy utat, melyet követve egy létező *att/int* rendszer specifikitása megváltozhat az evolúció során. Eszerint egy vagy több Int mutáció relaxálja a rekombináz specifikitását, majd további mutációk beszűkítik azt, úgy, hogy az

eredeti szekvenciát már nem rekombinálja hatékonyan, de egy másikat már igen. Végül újabb mutációk, mind az Int-ben, mind az új Int-kötő szekvenciákban finomhangolják a rendszert.

Feladatom annak vizsgálata volt, hogy a másodlagos *att* helyek szerepet játszhatnak-e egy helyspecifikus rekombinációs rendszer specifitásának változásában, és ha igen, akkor milyen mechanizmus szerint.

Mértük a vad és a mutáns Integrázt hordozó fágok integrációs képességét az *Escherichia coli*-ban található másodlagos helyek összességénél, és meghatároztuk az elsődleges és másodlagos *attB* helyeknél történő integrációk hatékonyságának arányát.

Southern hibridizációs kísérletben kimutattuk a vad és mutáns Int-et hordozó fágok által viszonylag gyakran használt másodlagos helyeket, majd egyoldalú PCR technikával nagyszámú egyedi lizogén törzsből amplifikáltuk a másodlagos helyekre integrálódott profág *att* régióit. A PCR termékek szekvenciájának meghatározásával összesen 19, eddig nem leírt másodlagos *attachment* helyet azonosítottunk.

A profág *att* hely(ek) - nagy egyedszámú (~3000) lizogén populációkból tisztított genomiális DNS templátról történő - amplifikálásával becsültük meg az egyes másodlagos helyek használatának relatív gyakoriságát. A leggyakrabban használt másodlagos helyek rekombinációs hatékonyságát 459 egyedi lizogén hasonló vizsgálatával mértük.

A másodlagos helyek szekvencia-analízisének legfeltűnőbb eredménye az overlap régió első három nukleotidjának erős konzerváltsága volt. Az eddig elfogadott nézet szerint, az overlap régiók konkrét szekvenciája indifferens, de a rekombinálódó partnereket tekintve azonosnak kell lennie. A kísérleteink tanúsága szerint viszont ez az azonosság a másodlagos helyeknél történő integráció során csak az overlap bal oldali három nukleotidja esetében feltétel.

197 egyedi integrációs esemény vizsgálatával bebizonyítottuk, hogy ha az integrációban résztvevő két *overlap* régió jobb oldali szegmense több nukleotidban is különbözik, akkor a szülői *overlap* szekvenciák irányítottan szegregálódnak a rekombináció termékei között, azaz az *attL* régió *overlap*-je az *attP*-től, míg az *attR* régió *overlap*-je mindig az *attB*-től örökli a szekvenciáját. Erre magyarázat lehet, hogy az *overlap* régiók jobb oldalának szekvencia-különbsége miatt a régió jobb oldalán bekövetkező második szálcsere gátlódik, ezért az első szálcsere után keletkező Holliday struktúra nem egy Int által katalizált reakcióban, hanem más mechanizmus szerint oldódik meg, pl. a baktérium homológ rekombinációs rendszere vagy replikáció révén.

A fenti kísérleti eredményekre alapozva dolgoztuk ki a specifitásváltozás *chromosome jumping* modelljét. A modelltől néhány kísérletesen is ellenőrizhető predikció következik, melyek közül kettőt is teszteltük: az egyik kísérletben másodlagos *att* szekvenciákat (is) tartalmazó mesterséges plazmid szubsztrátok használatával mértük a rekombinációs hatékonyságokat, míg egy másikban a modell által feltételezett *attR* transzdukáló fág integrációs képességét vizsgálatuk. A kapott eredmények összhangban vannak a modellben megfogalmazott mechanizmussal és valószínűsítik érvényességét.

Célunknak megfelelően sikerült megvizsgálunk a másodlagos helyeknek a specifitás-változásban betöltött lehetséges szerepét. Felállítottunk egy modellt, amelynek több elemét kísérletesen is bizonyítottuk. Természetesen nem állítjuk, hogy a vizsgált fehérjemutációk és másodlagos helyek valaha is szerepet játszottak egy konkrét specifitásváltozásban, de eredményeink meggyőzően bizonyítják a folyamat lehetséges voltát.

9. SUMMARY

(ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÁS)

During the project described in the theses, I examined the possibility of the change of the specificity in the site-specific recombinational systems of the lambdoid temperate bacteriophages. One of the most studied site-specific recombinational system is that of the *Escherichia coli* and the phage λ , that following recognition of the unique sequences on the bacterial chromosome and phage DNA fuses the two genomes by a reciprocal recombination.

This fusion is catalyzed by Integrase (Int), a phage encoded site-specific recombinase. The sequences where the recombination takes place and are identified by the Int are called *attachment (att)* sites. Beyond the primary *att* sites both the bacterial chromosome and the phage contain so-called secondary *att* sites. The recombinational efficiency of these sites is lower by several orders of magnitude than that of the primary *att* sites.

The phage HK022, similarly to the phage λ , can follow the lysogenic way after infecting the bacterial cell. Former studies comparing the site-specific recombinational systems of two phages revealed that the mechanism of both the integration and the excision is very similar. In spite of the structural and regulational analogy, none of the two Integrases can catalyze efficiently the integration or excision of the other phage.

Studying the differences and similarities of the HK022 Int and the λ Int, the mechanisms of the evolutionary changes in the protein-DNA interactions can be understood. During former studies leading to my project, the elements responsible for the different specificity in the two site-specific recombinational systems of these phages was identified. Based on the *in vivo* recombinational efficiency of different combinations

of the wild type or mutant Integrases and the wild type or mutant *att* sites we hypothesized a pathway that describes a possible way how the specificity of an existing *att/int* system can change during the evolution: one or more Int mutations relax the specificity of the recombinase and further mutations restrict it, resulting in that the original sequences will not be recombined efficiently but a new one will be. Finally, new mutations in the Int and in the new Int-binding sites will refine the system.

My specific aims were to investigate if the secondary *att* sites could play a role in the change of the specificity of a recombinational system and to determine the mechanism of this possible pathway.

The efficiency of the integration into the *Escherichia coli* chromosome using all of the secondary *att* sites *en masse* was measured using λ phages carrying the wild type or mutant Integrases, and the ratio of the integrational efficiencies at primary and secondary *attB* sites was determined.

In Southern hybridization assay, the secondary sites used most frequently by phages carrying the wild type and mutant Int was detected. The *att* regions of prophages integrated into secondary sites were amplified in one-sided PCR using the population of thousands of single lysogen strains as a template. By determining the sequence of these PCR products, 19 new secondary *attachment* sites were identified.

The relative frequency of the utilization of these secondary sites was estimated by the amplification of the prophage *att* sites using genomic DNA isolated from large lysogen populations (~3000 individual colonies) as a template. The recombinational efficiency at the most frequently used secondary sites was measured similarly, using 459 individual lysogen.

The most outstanding result of analysis of the secondary *att* sites is the strong conservation of the first three nucleotides of the *overlap* region. Previous data showed that

the sequences of the *overlap* regions in the recombining *att* sites should be identical, but the sequence itself is indifferent. Our experimental data proves that this identity is important only for the first three nucleotides of the *overlap* regions in the case of integrational events at the secondary sites.

By examining 197 independent insertions we demonstrated that unidirectional segregation is the rule when the right sides of the two *overlap* regions are multiply mismatched, that is that all of the *attL* overlap regions had the sequence of the λ and all of the *attR* overlap regions had the sequence of the secondary sites. This observation can be explained by the inhibition of the second strand swap because of the differences in the sequences of the right side of the *overlap* regions, so the Holliday structure created by the first strand exchange will be resolved not by the Int but some other mechanism for example by the bacterial homologous recombination or replication.

The results presented in this work led us to set up a model called chromosomal jumping. We have examined two predictions deduced from our model. In the first experiment, the recombinational efficiencies were measured by artificial plasmid substrates containing secondary *att* sites. In the second, the integrational ability of an *attR* transducing phage was tested. The results from these experiments are compatible with the mechanism described in the model and confirm the availability of it.

The possible role of the secondary *att* sites in the change of specificity of the site-specific recombinational system was investigated according to our initial aims. A model was set up and some elements of it were proved by experimental data. Of course, we cannot say that the examined mutations of the Int protein and the secondary sites were playing role in the change of specificity, but our results confirm its possibility.