

SZENT ISTVÁN EGYETEM



DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**GENETIKAI ESZKÖZRENDSZER FEJLESZTÉSE A TERMOACIDOFIL
THERMOPLASMA ACIDOPHILUM MODELLSZERVEZET MOLEKULÁRIS
BIOLÓGIAI VIZSGÁLATÁHOZ**

Baka Erzsébet

GÖDÖLLŐ

2013

A doktori iskola

Megnevezése: Környezettudományi Doktori Iskola

Tudományága: Környezettudomány

Vezetője: Csákiné Dr. Michéli Erika

Tanszékvezető, egyetemi tanár

Szent István Egyetem

Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar

Környezettudományi Intézet

Talajtani és Agrokémiai Tanszék

Témavezetők: Dr. Kukolya József

Osztályvezető, tudományos főmunkatárs

Központi Környezet- és Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet

Mikrobiológiai Osztály

Dr. Kriszt Balázs

Tanszékvezető, egyetemi docens

Szent István Egyetem

Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar

Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet

Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1. KUTATÁSI ELŐZMÉNYEK	1
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	4
3. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	7
3.1 <i>THERMOPLASMA</i> MÉDIUM OPTIMALIZÁLÁSA ÉS SZILÁRD TENYÉSZTÉS	7
3.2 ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLATOK ÉS MARKER GÉNEK	9
3.3 VEKTOR KONSTRUKCIÓK.....	10
3.3.1 <i>Shuttle</i> vektorok.....	10
3.3.2 <i>Integratív</i> vektorok.....	11
3.3.3 <i>Lineáris</i> konstrukciók.....	12
3.4 ÚJ ŐSBAKTÉRIUM TRANSZFORMÁCIÓS ELJÁRÁS FELJESZTÉSE.....	13
3.5 REZISZTENS <i>T. ACIDOPHILUM</i> SEJTEK ANALÍZISE.....	14
3.5.1 <i>Novobiocin</i> rezisztens <i>T. acidophilum</i> sejtvonalak.....	14
3.5.2 <i>Rifampicin</i> rezisztens <i>T. acidophilum</i> sejtvonalak.....	16
4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	18
5. A TÉMÁBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA.....	23

1. KUTATÁSI ELŐZMÉNYEK

Az ősbaktériumok felfedezését követően azok rögtön a tudományos érdeklődés középpontjába kerültek, mivel olyan tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek a prokarióta és az eukarióta sejtekre is jellemzőek. A kezdeti vizsgálatok alapján úgy gondolták, hogy ezen mikroorganizmusok csak extrém (például kimondottan savas, sós vagy éppen forró) körülmények között képesek élni. Napjainkra ez a kép sokat változott, hiszen ma már tudjuk, hogy az ősbaktériumok a Földön mindenhol megtalálhatóak és akár a mikrobióta 20%-át is kitehetik. Felfedezésük után, a kutatók úgy vélték, hogy megtalálták a legősibb csoportot, amely magyarázatul szolgál számos nyitott evolúciós kérdésre, mivel ezek a mikroszervezetek képesek voltak olyan extrém körülményekhez adaptálódni, amelyek főként az élet keletkezésének korai időszakában voltak jellemzőek. Emellett az ősbaktériumok a biotechnológusok érdeklődését is felkeltették, ugyanis enzimeik adaptálódtak az extrém környezeti körülményekhez (pl. jóval 37 °C alatt és felett, mely tipikusan a humán fiziológia), így az ipari és klinikai alkalmazások sokrétű eszközei váltak.

Az ősbaktériumok morfológiájuk és főbb anyagcsere útvonalaik szempontjából inkább a baktériumokra hasonlítanak, viszont rendelkeznek olyan anyagcsere útvonallal, mint a metanogenezis, amely egyedülálló az egész élővilágban. A genetikai információ feldolgozása tekintetében és enzimeik felépítésében azonban lényegesen jobban hasonlítanak az eukariótákra, és az enzimek szerkezete kisebb komplexitású így a vizsgálatok egyszerűbb modelljei lehetnek. Ezen okokból az elmúlt időszakban a kutatások e mikroorganizmusok felé fordulnak.

Egy különleges ősbaktériumot, a *Thermoplasma acidophilum*-ot választottam kutatásaim tárgyául. A mikroorganizmus 40 és 60 °C közötti hőmérsékleten és pH 1 és 4 között növeszik és meglepő módon egyáltalán nem rendelkezik sejtfallal. Néhány évvel az 1970-ben történt izolálását követően azt feltételezték, hogy ez az organizmus az eukarióta sejtek őse, de ez az elmélet hibásnak bizonyult az organizmus genom projekt eredményei alapján. A 2000-ben befejezett genom projekt eredményei feltárták a *T. acidophilum* számos egyedülálló tulajdonságát. A *T. acidophilum*-nak fontos szerep jut napjainkban az eukarióta fehérjék, enzimkomplexek struktúrájának feltárásában, mivel egy egyszerűbb felépítésű de az eukarióta hasonmáshoz nagyon

hasznos modelként szolgál. A *T. acidophilum* proteaszómájának és kapcsolódó faktorok vizsgálatával nyertek értékes bepillantást az eukarióta sejtek proteolitikus folyamataiban, ezáltal is kihangsúlyozván ezen kutatások klinikai jelentőségét. A szervezet kis sejtmérete és a sejtfal teljes mértékű hiánya miatt ideális vizsgálati alanya elektron-kriotomográfián alapuló vizsgálatoknak, melyek segítségével a proteom szerveződésére világítható meg. A *T. acidophilum* genom projekt eredményei és az intenzív proteomikai kutatások ellenére a mikroba egy sor olyan tulajdonsággal bír, amely rendkívül megnehezíti a vele való munkát. A mikroba klonális munkája nem megoldott, a folyamatos és nagy erőfeszítések ellenére a mai napig nincs elérhető eszközzel a *Thermoplasma* genus tagjainak genetikai manipulálására. Habár egy genetikai eszközzel mérőldkö lehetne a fehérjék struktúra és funkció vizsgálatánál, melyek jellemzésére eddig nem volt lehetőség, mivel e szervezet fehérjéi nem minden esetben alkalmasak a heterológ expresszióra, az *Escherichia coli*-ban kifejezett fehérjék, fehérje komplexek pedig sok esetben elveszítik biológiai aktivitásukat. A szervezet azonosított fehérjéinek 29% nem ismert funkcióval rendelkezik, és további 16% teljesen ismeretlen, unikális fehérje. Egy genetikai eszközzel nagyban hozzájárulnak ezen fehérjék megfelelő mennyiségű megtermeléséhez a eredeti szervezetben további vizsgálatok céljából.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám célja az eddig hiányzó alapvető genetikai eszközrendszer fejlesztése volt a *T. acidophilum* modellszervezet számára. A genetikai eszközrendszer kialakításánál a következő elemek fejlesztését, létrehozását tűztem ki célként:

- Az organizmus rutinszerű tenyésztésének megoldása szilárd táptalajon, a klonális munka nélkülözhetetlen eleme a genetikailag homológ sejtvonalak létrehozásához.
- A vad típusú és a genetikailag manipulált sejtek elválasztása, szelekciós markerek fejlesztése, rezisztencia kialakítása olyan antibiotikumokkal szemben, melyek képesek tolerálni a szervezet extrém tenyész körülményeit.
- A genetikai elemek transzferére alkalmas vektorok és konstrukciók kialakítása, amelyek tartalmazzák a megfelelő szelekciós marker gént.
- Egy működő transzformációs rendszer fejlesztése, amellyel a nukleinsav konstrukciók hatékonyan és megismételhető módon bejuttathatók az ősbaktérium sejtekbe.

A kitűzött célok megvalósulása új utakat nyithat a *Thermoplasma* kutatásban. Az ismeretlen funkciójú fehérjék szerepének feltárására a munkámat támogató müncheni Max Planck Intézet Struktúrbiológiai Osztályán már ki is jelöltek prioritásként 6 célfehérjét a knock-out mutagenézis munkákhoz. Ezen túlmenően a kis mennyiségben jelenlevő, labilis, nagy molekulakomplexek vizsgálatánál, a szerkezet és aktivitás analízisének tervezik használni az eszközrendszert.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A klonális munka feltételeinek megteremtése: tenyésztés folyékony- szilárd táptalajon

A *T. acidophilum* tenyésztéséhez a folyékony médiumot szakirodalmi adatok alapján állítottam össze, melyet módosítottam, hogy növeljem a szervezet szaporodási sebességét. A folyékony médiumban négyszeresére növeltem a gyári élesztőkivonat és kiegészíttem az általam előállított élesztő vitaminnal. Az élesztő vitamint friss sütőélesztőből állítottam elő: 100 ml 0,5 M H₂SO₄ kénsavhoz 10 g élesztőt mértem, majd az oldatot kétszer 1 percig 40%-os teljesítményen szonikáltam, majd 3 órán keresztül 58 °C-on inkubáltam a szuszpenziót. Az inkubációs idő letelte után a sejttörmelékeltávolítottam centrifugálással (4600 rpm, 4 °C, 20 perc), majd a felülúszót sterilre szűrtem. Az élesztő vitaminból 50 ml-t adtam egy liter folyékony médiumhoz. A szervezet szilárd tenyésztéséhez egy Gelrite-bázisú szilárd médiumot állítottam elő. A szilárd médiumban a kazaminosav, gyári élesztőkivonat és Gelrite (szilárdító ágens) mennyiségét a kétszeresére növeltem és kiegészíttem azt 50 ml/L élesztő vitaminnal. A tenyésztési vizsgálatokat 58 °C-on végeztem, a szilárd táptalajon történő inkubálás esetében, az intenzív párolgást megelőzendő, jól záródó edényt használtam.

Antibiotikum érzékenységi tesztek

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokhoz az antibiotikumokat minden esetben a Sigma-Aldrich Kft. (Budapest, Magyarország) szereztem be és a törzsoldatokat minden esetben a gyártó instrukció alapján készítettem el. A *T. acidophilum* érzékenységét minden egyes antibiotikumnál a szakirodalomban általánosan használt koncentráció gradiensben teszteltem. A minimum gátló koncentrációt (MIC) 4 napos (96 óra) inkubációt követően határoztam meg.

Vektor konstrukciók kialakítása

A vektorok kialakításánál standard DNS manipulációs módszereket (Sambrook nyomán) kombináltam az overlapping-megaprimer módszer általam módosított verziójával. A genomi DNS izoláláshoz MoBio UltraClean Microbial DNA Isolation Kit-et, továbbá fenol-kloroformos, és Na-perklorátos DNS izolálási módszereket

használtam. Plazmid DNS izoláláshoz QIAprep Spin Miniprep Kit-et és QIAGEN Plasmid Mega Kit-et használtam a gyártó utasítási szerint. A PCR reakciókhoz *Taq* és *Pfu* polimerázokat alkalmaztam és minden esetben optimalizáltam a reakciót a kívánt termék méretére és a primerek anellációs hőmérsékletére. Helyspecifikus mutagenezist QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit-tel végeztem a gyártó által megadott protokoll szerint, valamint overlapping PCR mutagenezis módszert is használtam. A vektorok felhasználás előtt restrikciós analízisnek vettem alá és meghatároztam nukleotid sorrendjét is.

A *Thermoplasma acidophilum* dialízis-transzformációja

Egy Petri csészében 30 ml ultratiszta víz pH-ját 4.5-re állítottam szárazjég segítségével, majd 58 °C-ra előmelegítettem azt, kialakítva a dialízis puffert. Minden további lépést 58 °C-on végeztem. 200 µl *T. acidophilum* sejt kultúrát (OD₆₀₀: 0,8–1) óvatosan rápipettáztam egy dialízis membránra (Millipore VSWPO2500 - Millipore GmbH, Németország) mely a dialízis pufferen lebegett. A sejteket ezt követően 60 percig inkubáltam, melynek során a sejtuszuspenzió pH-ja 3,5-re emelkedett, majd 10–20 µl plazmid DNS-t (koncentráció: 0,5–2 µg/µl) mértem hozzá és újabb 60 percig inkubáltam a rendszert. Végül 1 ml antibiotikumot nem tartalmazó friss médiumba helyeztem a transzformált sejteket, melyeket 58 °C-on 12 órán keresztül regeneráltattam. Az inkubációt thermomixerben (Eppendorf) végeztem el 600 rpm-es rázatással. A transzformánsok szelekciójához 200 µl sejtuszuspenziót szélesztettem antibiotikum tartalmú szilárd médiumra és mikroaerofil, nedves környezetben inkubáltam azokat 58 °C-on a telepek megjelenéséig (12 nap). Minden transzformációnál alkalmaztam egy pozitív növekedési kontrollt, amely ugyanazt a kezelést kapta, mint a transzformációs minták, viszont a sejteket, antibiotikummentes médiumban oltottam. Továbbá használtam negatív kontrollt, amelyhez a transzformáció során nem adtam plazmidot, viszont antibiotikumos médiumban inkubáltam azt.

A genetikai kicserélődés igazolása- a transzformánsok vizsgálata

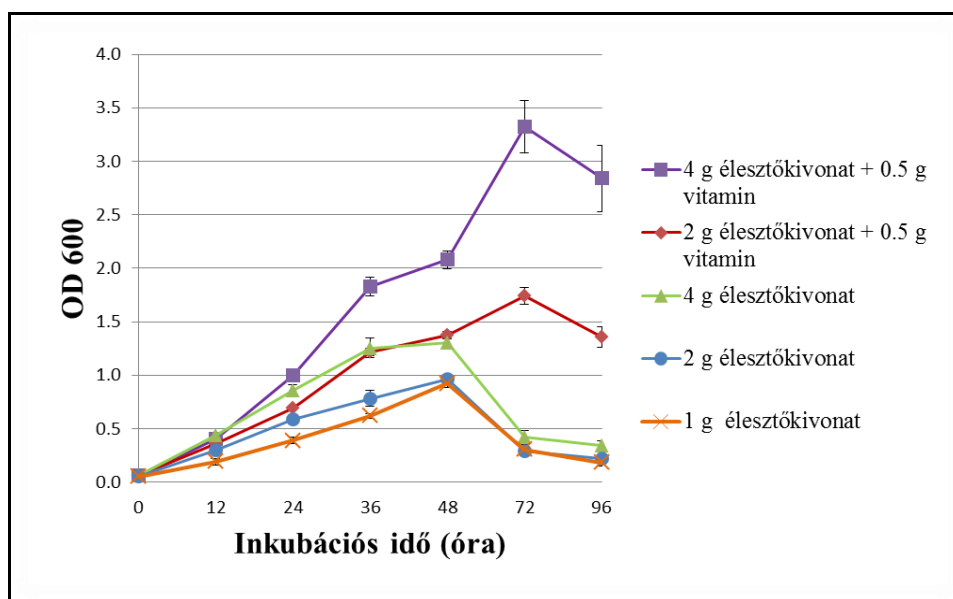
A transzformációt és szelekciót követően a transzformánsokat antibiotikum rezisztencia teszteknek vettem alá, ezzel párhuzamosan molekuláris módszerekkel is vizsgáltam őket. A plazmid fennmaradás vizsgálatánál elsőként plazmidot izoláltam a rezisztens sejt vonalakból, melyet agaróz gélelektroforézissel és nanofotométerrel

vizsgáltam, majd *E. coli* kompetens sejtekbe transzformáltam, és az így kapott plazmidokat restrikciós analízissel és nukleotidsorrend meghatározással vizsgáltam. A genomi integráció vizsgálatánál a genomi célrégióon kívül eső szakaszokra specifikus primerekkel felszaporított régiót nukleotidsorrend meghatározással vizsgáltam, valamint a rezisztencia génekre specifikus PCR reakciókkal igazoltam a kérdéses gének jelenlétét a transzformáns sejtekben.

3. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

3.1 *Thermoplasma* médium optimalizálása és szilárd tenyésztés

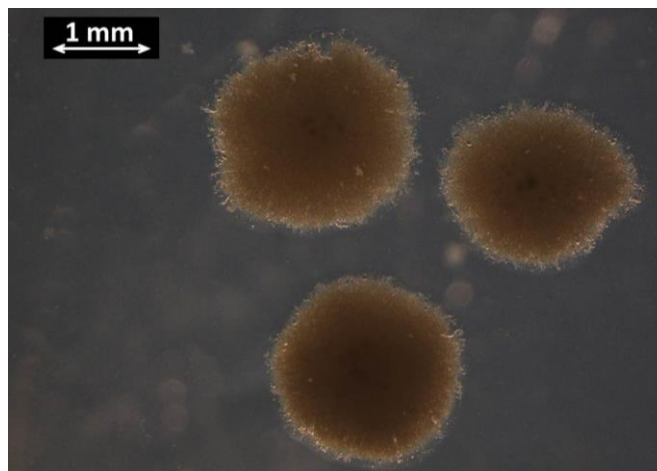
Kísérleteim során azt tapasztaltam, hogy a *T. acidophilum* pozitívan reagált a megnövelt gyári élesztőkivonat mennyiségre (1. ábra). A kétszeresre (2g) növelt élesztő mennyiség csekély mértékben, míg a négyszeres (4g) élesztőkivonat mennyiség jelentősen megnövelte a sejtek szaporodási sebességét. Szakirodalmi adatok alapján tudjuk, hogy az élesztőkivonat előállításának módja meghatározó a növekedést serkentő hatás szempontjából. Az élesztő vitamint hagyományos sütőélesztőből (*Saccharomyces cerevisiae*) állítottam elő savas hidrolízis és hősokk kombinációjával. A feltüntetett élesztő vitamin mennyiség minden esetben a szárazanyagtartalmat (DCM-Dry Cell Mass) jelenti. Az eredményeket a 1. ábra szemlélteti. A legjobb eredményt a 4 g gyári élesztőkivonat és 0,5 g élesztő vitamin kombinációjával tudtam elérni (1. ábra, lila színű görbe)



1. ÁBRA *T. ACIDOPHILUM* TÖRZS NÖVEKEDÉSE KÜLÖNBÖZŐ MENNYISÉGŰ GYÁRI ÉLESZTŐKIVONAT ÉS 0.5 G ÉLESZTŐ VITAMIN JELENLÉTÉBEN

A genetikai eszközrendszer fejlesztésének egyik kiemelkedő fontosságú alapfeltétele, a klonális munka lehetősége, ezáltal tudunk genetikailag homogén sejtvonalakat létrehozni. A rendelkezésemre álló információk alapján egy olyan szilárd táptalaj fejlesztését kezdtem el, amelyen a *T. acidophilum* sejtek telepet formálnak viszonylag

rövid idő alatt, és a szilárdító anyag nem hidrolizál a sejtek szaporodásához szükséges magas hőmérsékleten és alacsony pH-n. Az általam kiválasztott szilárdító ágensek minden esetben képesek voltak tolerálni a magas hőmérsékletet és az alacsony pH: gelrite (Sigma Aldrich Ltd), szilika (Sigma Aldrich Ltd.), phytigel (Sigma Aldrich Ltd.), noble-agar (Becton Dickinson Hungary Kft) és seakem gold agaróz (Lonza Group Ltd), viszont a *T. acidophilum* nem volt képes növekedni, telepeket formálni a seakem gold agaróz és a noble-agar alapú szilárd médiumon továbbá a phyta gél-en és szilikán történt tenyésztést követően a sejtek nem voltak képesek folyékony médiumban szaporodni. A gelrite-bázisú szilárd médiumot japán kutatók leírása alapján készítettem, amelyet a japán szerzők által közölt 30 napos inkubációs idő csökkentése érdekében módosítottam. Azért, hogy a táptalaj szilárdságát fokozzam, megnöveltem a gelrite mennyiségét 1,2%-ra és a CaCl_2 koncentrációját 10 mM-ra. Továbbá, alkalmaztam a korábbiakban fejlesztett élesztő vitamint 5% (w/v) végső koncentrációban. A szilárd gelrite-táptalajon elvégzett tenyésztéseket minden esetben zárható tenyésztő edényben (anaerob jar) végeztem annak érdekében, hogy a hőmérsékletet és a nedves környezetet fenntartsam. Így a szervezet 1-3 mm átmérőjű telepeket formált az inkubáció 12. napjára (**2. ábra**).



2. ÁBRA *T. ACIDOPHILUM* TELEPEK GELRITE-BÁZISÚ SZILÁRD MÉDIUMON AZ INKUBÁCIÓ 12. NAPJÁN

A gelrite- táptalajon kinőtt telepekből származó sejtek már képesek voltak a tenyésztést követően folyékony médiumban is szaporodni. A transzformációt követően ezt a gelrite-bázisú szilárd médiumot alkalmaztam, kiegészítve a megfelelő antibiotikummal.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (I. tézis, a 3.1. fejezetben bemutatott eredmények alapján): A módosított gelrite-bázisú szilárd médium alkalmas a *Thermoplasma acidophilum* rutinszerű tenyésztésére szilárd médiumon, így ez a médium megfelel a klonális szelekcióra, genetikailag homogén sejtvonalak létrehozására.

3.2 Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok és marker gének

Egy genetikai eszközrendszer fejlesztésénél kritikus elem, hogy hogyan választjuk el a genetikailag manipulált sejteket a vad típustól. A minimum gátló koncentrációt (Minimum Inhibitory Concentration – MIC), tekintettel *T. acidophilum* generációs tekintettel, 4 napos (96 órás) inkubációt követően határoztam meg a vizsgálatba vont 9 antibiotikumnál. Az elvégzett antibiotikum érzékenységi vizsgálatok eredményeit az **1. táblázat** szemlélteti.

1. Táblázat. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok eredményei

	Antibiotikum	MIC *
Nukleinsav szintézist gátlók		
	Kumermicin	10 ng/ml
	Novobiocin	10 ng/ml
	Rifampicin	1 µg/ml
Fehérje szintézis gátlók		
	Anizomicin	-
	Apramicin	-
	Eritromicin	100 µg/ml
	Klóramfenikol	250 µg/ml
	Tiosztrepton	200 µg/ml
	Tetraciklin	-

A továbbiakban a novobiocint és a rifampicint alkalmaztam kísérleteimhez. A novobiocin, mely az amino-kumarinok csoportjába tartozik, a DNS giráz-t gátolja és szakirodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a szevezet nagyfokú érzékenységet mutat a giráz-t blokkoló novobiocinre. A rifampicin is nukleinsav szinten fejt ki hatását, gátolja a prokarióta transzkripciót a DNS-dependens-RNS polimerázhoz való kötődésen keresztül. Meglepő módon az általam elvégzett *in vivo* kísérletekben a *T. acidophilum* nagy érzékenységet mutatott a rifampicinre, míg ez eddig publikált *in vitro* kísérletekben a *T. acidophilum*-ból izolált RNS polimeráz működését ez az antibiotikum nem gátolta.

Egy adott antibiotikum csak akkor használható megfelelően szelekciós markerként a célszervezetben, ha benne kifejeződő és rezisztenciát okozó szelekciós marker gént tudunk hozzárendelni. A novobiocin esetében már leírtak egy novobiocin rezisztenciát okozó mutáns *gyrB* gént. Novobiocin alapú vektor konstrukcióimhoz a Japánból izolált HO-62N1C *T. acidophilum* törzs Nov^R *gyrB* génjét és annak általam helyspecifikusan módosított verzióját (Nov^R *gyrB*_A136H), továbbá egy azzal aminosav szintén totál homológiát mutató mesterséges *gyrB* gént alkalmaztam. A mesterséges giráz kialakításánál törekedtem arra, hogy nukleotid szinten 5 bp nagyobb teljes átfedés ne legyen. Rifampicin rezisztencia markerként a *Pseudomonas aeruginosa*-ból származó *arr2* gént használtam, mely a rifampicint ADP-ribosziláció során inaktiválja

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (II. tétel, a 3.2 fejezetben bemutatott eredmények alapján): Az elvégzett antibiotikum érzékenységi vizsgálatok alapján az eritromicin 100 µg/ml-es koncentrációban, a klóramfenikol 250 µg/ml-es koncentrációban, a kumermicin 10 ng/ml-es koncentrációban, a novobiocin 10 ng/ml-es koncentrációban, a rifampicin 1000 ng/ml-es koncentrációban és a tiosztrepton 200 µg/ml-es koncentrációban alkalmas a transzformánsok szelekciójára.

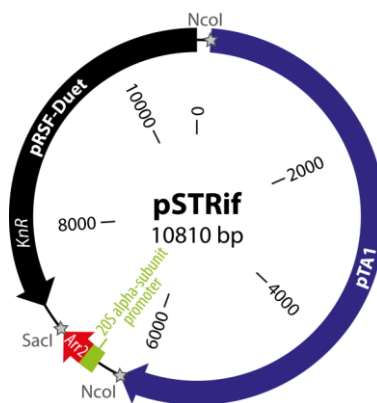
3.3 Vektor konstrukciók

Genetikai eszközrendszer létfontosságú elemei a vektor konstrukciók, amelyekkel a célszervezetet új információval tudjuk felruházni.

3.3.1 Shuttle vektorok

A shuttle (avagy bifunkcionális) vektorok képesek két különböző szervezetben a kromozómától függetlenül, önállóan replikálódni. Ezen vektorokat a későbbi fehérje túltermeltetési célokból terveztem. Az ingázó vektorok önállóan képesek fennmaradni *E. coli* és *T. acidophilum* sejtekben, vagyis tartalmazták a mindkét szervezetre a specifikus replikációs origót (a replikáció kiindulási pontja, amely egy adott szervezetre specifikus szekvenciát hordoz) és a rezisztencia marker gént. Ezen

vektorok 3 fő részből épülnek fel: (a) a vektor alapját képező pRSF Duett *E. coli* specifikus vektor, mely hordozza a *E. coli* specifikus RSF ori-t és Kan^R (kanamicin rezisztenciát), (b) a *T. acidophilum* specifikus rezisztencia marker gént és (c) egy 6106 bp *NcoI* DNS fragmentet a *T. acidophilum*-ból izolált pTA1 plazmidból, (pozíció 13534 – 3916), amely tartalmazza feltételezhető ori-régiót. A pTA1 plazmidot egy Japánban izolált HO-122 *T. acidophilum* törzsből izoláltam QIAGEN Plasmid Mega Kit segítségével. A két shuttle vektor az általuk hordozott rezisztencia génben és a rezisztencia gén promóterében tértek el és ennek megfelelően neveztem el: pSTA – *T. acidophilum* Nov^R *gyrB* gén (génbanki azonosító szám: KC710297), pSTRif – rifampicin rezisztenciáért felelős *arr2* gén (3. ábra). A rezisztencia gének folyamatos vagy nagy mennyiségű átíródását elősegítendő olyan promótereket klónoztam e gének elé, melyek feltételezhetően konstitutív (Ta1137 – fehérje foldingért felelős gén - Nov^R *gyrB*) vagy nagy mennyiségben termelődő fehérje (Ta1288 – proteoszóma alfa alegységének génje - *arr2*) promóterei. A vektorokat a *T. acidophilum*-ba történő transzformációt megelőzően nukleotidsorrend meghatározással ellenőriztem.



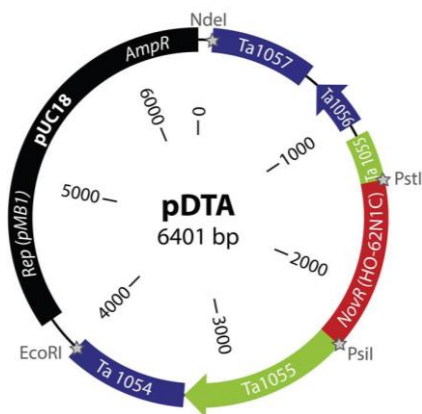
3. ÁBRA A pSTRIF SHUTTLE VEKTOR TÉRKÉPE

3.3.2 Integratív vektorok

Az integratív vektorok, amelyek homológ rekombinációs (a genetikai információ beépülése a kromoszómába) célból lettek építve, nem tartalmazzák a célszervezetben történő önálló replikációhoz szükséges replikációs origót.

Az integratív vektorok alapja a pUC18-as *E. coli* specifikus plazmid volt. *NdeI* és *EcoRI* hasító helyeire klónoztam be a *T. acidophilum* vad típusú (DSM 1728) törzs rövidített giráz operonját, mely a *gyrB* (girázB) és részlegesen a *gyrA* (girázA) gént is hordozó 4 kb nagyságú DNS fragment. Az integratív vektorok az általuk hordozott

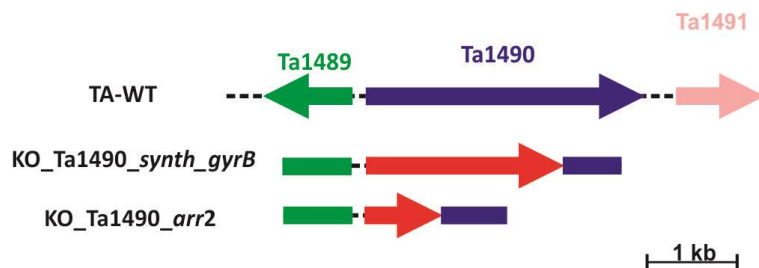
rezisztencia génben tértek el. A pDTA plazmidot (génbanki azonosító szám: KC710295) (4. ábra) a mutáns *gyrB* gént hordozta. A pNTA vektor helyspecifikus mutagenézissel módosított *gyrB* gént hordoz, ahol kicseréltem a 136-os pozícióban levő arginint hisztidinre (*gyrB*_A136H). Szakirodalmi adatok alapján tudtuk, hogy ezen módosítás jelentősen megnöveli (~4,6-szorosára) a tisztított enzim novobiocin rezisztenciáját az *in vitro* kísérletek során. Munkám során ezt a hatást kívántam vizsgálni *in vivo* körülmények között. A pDTA_*synth* vektorban a *gyrB* gént kicseréltem a mesterséges *synth_gyrB* génre, overlapping mega-primer alapú PCR technika segítségével. Végül a pDTA_*arr2* vektorban a *gyrB* gén helyére a rifampicin rezisztenciát okozó *arr2* gént klónoztam overlapping mega-primer alapú PCR módszerrel. Minden vektort a felhasználás előtt szekvenálással ellenőriztem.



4. ÁBRA A pDTA INTEGRATÍV VEKTOR TÉRKÉPE

3.3.3 Lineáris konstrukciók

Ósbaktériumok és eukarióta sejtek esetében számos esetben sikerült a transzformáció lineáris DNS konstrukciók használatával. A knock-out (gén kiütés; KO) konstrukcióimmal két gént céloztak meg: a Ta0895 gén egy nem azonosított funkciójú fehérje génje, melyről úgy tartják, hogy egy ubiquitinhez hasonló kódolt fehérje; míg a Ta1490-es gén a tricorn proteázt kódolja. A KO konstrukciók 3 fő elemből épültek fel: a konstrukció magja a rezisztencia gén (piros nyíl), mely esetemben a *synth_gyrB* és az *arr2* gén volt, ettől upstream (5' irányban, zöld téglalap) és downstream (3' irányban kék téglalap) átfedő, homológ régiók voltak. A 5. ábra a konstrukciók sematikus rajzát mutatja a cél genomi régióval.



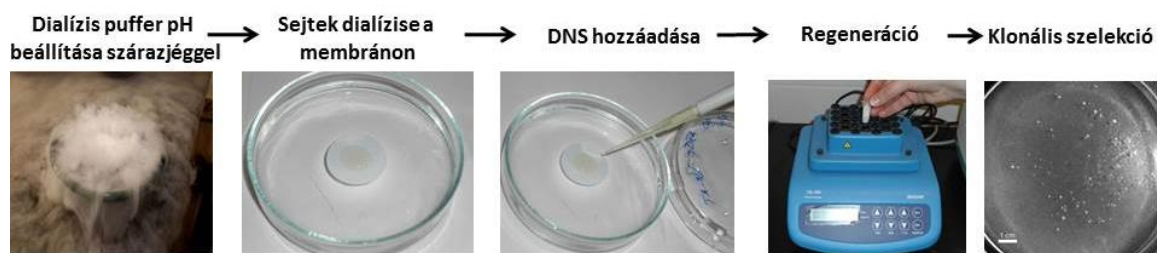
5. ÁBRA A TA1490-ES GÉN KIÜTÉSE CÉLJÁBÓL TERVEZETT LINÁRIS KONSTRUKCIÓK SEMATIKUS RAJZA A GENOMI CÉLRÉGIÓVAL

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (III. tézis, a 3.3. fejezetekben bemutatott eredmények alapján): A szelekciós marker gének (Nov^R *gyrB* és Rif^R *arr2*) alkalmazásával shuttle (pSTA és pSTRif), integratív (pDTA, pNTA, pVTA, pDTA_synth és pDTA_arr2) és lineáris vektor konstrukciókat (KO-Ta1490_synth_gyrB and KO-Ta1490_arr2) építettem a *Thermoplasma acidophilum* számára.

3.4 Új ősbaktérium transzformációs eljárás feljlesztése

Egy genetikai eszközzrendszer fejlesztésénél a legkritikusabb lépés a transzformációs módszer feljlesztése, mely során a célszervezetbe külső DNS-t juttatunk be. A doktori munkám során a *T. acidophilum* transzformációjára az elektroporációt, génpuskát, lipofekciót és magnetofekciót próbáltam adaptálni sikertelenül, ezért egy teljesen új módszert kellett kidolgoznom.

Szakirodalmi adatok alapján tudjuk, hogy ha a *T. acidophilum* pH-ját emeljük, a sejtek plasztikussá válnak. Továbbá számos ősbaktériumról tudott, hogy képes természetes transzformációra, vagyis spontán DNS felvételre a környezetből. Az általam kidolgozott dilazís-transzformációs módszer főbb lépéseit a **6. ábra** szemlélteti. Transzformáció során pozitív növekedési kontrollt annak céljából alkalmaztam, hogy ellenőrizzem a sejtek túlélnek-e a kezelést. Emellett a negatív kontroll az esetleges spontán mutációk azonosítására szolgált. A DNS bevitt követően a regenerációt után 200 μl sejtuszpenziót szélesztettem novobiocin és rifampicin tartalmú Gelrite-bázisú szilárd táptalajra. Ezzel a módszerrel sikerült 10^2 - 10^4 transzformáns/ μg DNS transzformációs hatékonyságot elérnem.



6. ÁBRA A DIALÍZIS ÁLTALI TRANSZFORMÁCIÓ *T. ACIDOPHILUM* ESETÉBEN

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (IV. tézis, a 3.4. fejezetben bemutatott eredmények alapján): Az új és specifikus transzformációs módszer alkalmas a genetikai anyag bejutására a *Thermoplasma acidophilum*-ba, 10^2 - 10^4 transzformáns/μg DNS transzformációs hatékonysággal.

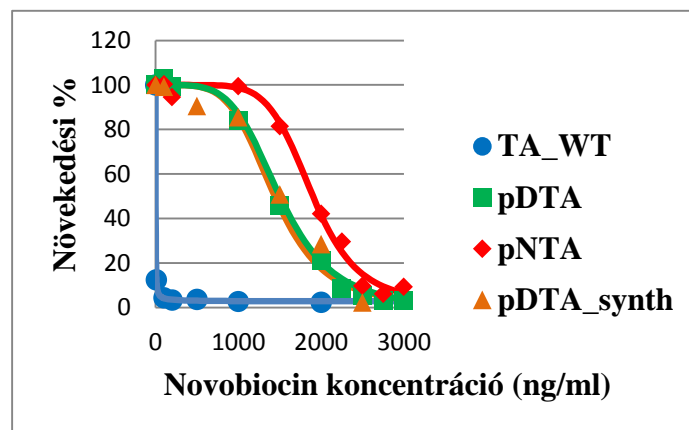
3.5 Rezisztens *T. acidophilum* sejtek analízise

A *T. acidophilum* transzformációját követően, a transzformánsokat első lépésként leoltottam 100 ng/ml novobiocin vagy 2500 ng/ml rifampicin koncentrációjú folyékony médiumba és szilárd táptalajra. A transzformáció sikerességét egyrészt az antibiotikum rezisztencia megjelenésével igazoltam. Ezzel párhuzamosan molekuláris módszerekkel vizsgáltam a plazmid fennmaradást vagy a genomi integrációt a vektor konstrukcióknak megfelelően.

3.5.1 Novobiocin rezisztens *T. acidophilum* sejtvonalak

Novobiocin érzékenységi tesztet végeztem el az alábbi sejtvonallal: TA-WT, pDTA, pNTA, pDTA_*synth*. Az eredményeket a 7. ábra szemlélteti. Jól látható, hogy a vad típusú *T. acidophilum* (kék színű vonal) nem képes tolerálni a novobiocin jelenlétét már kis koncentrációban sem. A pDTA vektort (narancsszínű vonal) és a pDTA_*synth* (zöld színű vonal) hordozó sejtek hozzávetőlegesen 1500 ng/ml-es novobiocin koncentrációt voltak képesek tolerálni. A pNTA vektort tartalmazó sejtek 2500 ng/ml-es novobiocin koncentrációt voltak képesek elviselni. A pDTA vektor ugyanazt a mutáns Nov^R *gyrB* gént hordozta, melyet a HO-62N1C törzsből azonosítottak. Szakirodalmi adatok alapján a HO-62N1C törzs 1000 ng/ml-es novobiocin koncentrációt képes tolerálni. Mivel az általam épített vektor (pDTA) ugyanazt a *gyrB* gént hordozta, arra számítottam, hogy a rezisztenciája meg fog egyezni a környezeti törzsszel, azonban a transzformáns thermoplasmák másfélszeres

rezisztencia növekedést mutattak. Ennek magyarázata lehet, hogy a transzformáns sejtek feltételezhetően több GyrB enzimet expresszáltak, hiszen több kópiában tartalmazták a plazmid lokalizációjú mutáns *gyrB* gént, mint a vad törzs sejtei. A pNTA sejt vonal egy helyspecifikusan módosított Nov^R *gyrB* (A136H)-t hordozott. Szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy ez a módosítás jelentősen megnöveli (~4,6-szorosára) a tisztított enzim novobiocin rezisztenciáját *in vitro* kísérletek során. Így az *in vivo* kísérletek során tapasztalt rezisztencia növekedés nem meglepő, megfelel a szakirodalmi eredményeknek. A pDTA_*synth* vektor aminosav szinten megegyezik a pNTA vektor által hordozott *gyrB* génnel (Nov^R *gyrB*-A136H), viszont rezisztenciája alacsonyabb, valószínűsíthetően a ritka kodonok használata miatt alacsonyabb GyrB expresszió miatt.



7. ÁBRA NOVOBIOCIN ÉRZÉKENYSÉGI TESZTEK KÜLÖNBÖZŐ NOVOBIOCIN REZISZTENS SEJTVONALAKKAL

A plazmid fennmaradását is ellenőriztem a novobiocin rezisztens sejt vonalokban. Az előzetes várákozással ellentétben a shuttle vektorral (pSTA vektor) transzformált *T. acidophilum* sejtekből nem sikerült plazmidot izolálni. Ezzel ellentétben, meglepő módon azt tapasztaltam, hogy a pDTA integratív vektorral transzformált sejtekből néhány esetben, vagy az eredeti vagy egy módosult plazmid volt visszanyerhető és azzal *E. coli* transzformálást lehetett végrehajtani.

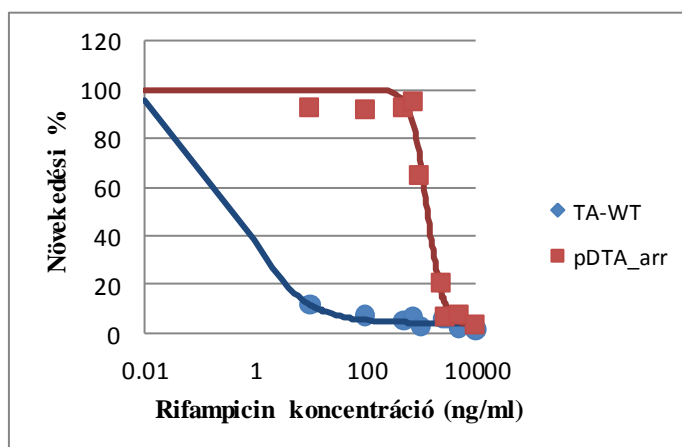
A genetikai elemek genomai integráció vizsgálatánál első lépésként genomai DNS-t izoláltam a novobiocin rezisztens *T. acidophilum* sejtekből. Az integratív genomai régió kívül eső szakaszra specifikus primerek segítségével felszaporítottam első lépésként a tágabb genomai régiót, majd nested PCR reakciók után szekvenáltam a

gyrB gént. A pSTA, pDTA és pNTA vektorok (melyek a mutáns *gyrB* vagy annak helyspecifikusan módosított változatát hordozták) esetében sikerült visszaigazolnom a homológ rekombinációt. Az azonosított szekvenciák génbanki azonosító száma pSTA vektor esetében: KC710298– KC710299; a pDTA és pNTA vektorok esetében: KC710300–KC710319. A pDTA_*synth* vektor esetében azonban a *synth_gyrB* gént nem sikerült az adott régióból visszaigazolni. Mivel a novobiocin rezisztencia tesztek során ez a sejtvonala rezisztensnek bizonyult, elvégeztem a rezisztencia génre specifikus PCR reakcióit a teljes genomra, amely pozitívnak bizonyult, ezt nukleotidsorrend meghatározással is igazoltam. Vagyis, a rezisztencia gén jelen volt, viszont aspecifikusan integrálódott.

A lineáris KO konstrukciókkal elvégzett transzformációkat követően sikerült novobiocin rezisztens sejtvonalaikat létrehoznom, ugyanazt tapasztalva mint a pDTA_*synth* vektorral való transzformációt követően. A lineáris konstrukciót nem tudtam a célrégióból visszaigazolni, viszont az illegitim rekombinációt jelezte sikerült detektálnom a genomból.

3.5.2 Rifampicin rezisztens *T. acidophilum* sejtvonalak

Rifampicin érzékenységi tesztet végeztem el az alábbi sejtvonallal: TA-WT, pDTA_*arr2*. Az eredményeket a **8. ábra** szemlélteti. Jól látható, hogy a vad típusú *T. acidophilum* sejtvonala (kék szín) nem képes tolerálni a rifampicin jelenlétét már kis koncentrációban sem, ahogy azt már korábban is igazoltam. A pDTA_*arr2* vektorral (piros szín) hordozó sejtvonala rezisztensnek bizonyult, hozzávetőlegesen 2500 ng/ml rifampicin koncentrációt volt képes elviselni.



8. ÁBRA RIFAMPICIN ÉRZÉKENYSÉGI TESZT KÖLÖNBÖZŐ *T. ACIDOPHILUM* SEJTVONALAK ESETÉBEN

Sikerült a shuttle (pSTRif) vektorral transzformált Rif^R *T. acidophilum* sejtekből plazmid DNS-t is izolálnom, intakt vagy deléciós formákban.

Az integratív pDTA_*arr2* vektorok esetében a genomi integráció vizsgálatát is elvégeztem a korábbiakban már leírt módon és említett primerekkel. Kimutattam, hogy helyspecifikus homológ rekombináció nem történt egyetlen *arr2* gén alapú konstrukció esetében, viszont a rezisztencia gén jelen volt a genomban.

A lineáris KO-Ta1490_*arr2* konstrukcióval transzformált *T. acidophilum*-nál azonosítottam a genomi integráció helyét: Ta0060, Ta710 és Ta1490-es gének esetében. A legutóbbi esetben, bár a célgénbe (Ta1490) történt a beépülés, de nem az eredetileg tervezett régióba. Az integrációk szekvenciái megtalálhatóak az alábbi génbanki azonosító számok alatt: JX890289-JX890291.

A fenti eredmények egyértelműen jelzik, hogy a *T. acidophilum* DSM 1728-as törzse az illegitim rekombinációs mechanizmussal képes idegen, külső DNS genomi integrációjára. A mechanizmus feltárása érdekes jövőbeli kutatási irány lehet.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (V. tézis, a 3.5. fejezetben bemutatott eredmények alapján): A sikeres transzformációt antibiotikum rezisztencia tesztekkel és molekuláris módszerekkel – plazmid fennmaradási tesztekkel és a genomi integráció vizsgálatával igazoltam.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Az ősbaktériumok felfedezésük óta az érdeklődés középpontjában állnak, számos különleges tulajdonságuk miatt. Egy organizmus megismeréséhez, részletes, mélyreható tanulmányozásához elengedhetetlen a genetikai manipulációs eszközrendszer megléte. Csak így érthetők meg teljesen a sejtben lezajló folyamatok és azok kapcsolata, a fehérjék szerepe és a fehérje-enzim-komplexek alegység szerveződése. A munkám fókuszában a termoacidofil ősbaktérium, a *Thermoplasma acidophilum* állt. Ez a szervezet az elmúlt évtizedben a strukturális proteomika jelentős modellszervezetévé vált, köszönhetően eukarióta sejthez közeli tulajdonságainak, egyszerű genom és proteom felépítésének, illetve annak, hogy a krioelektronmikroszkópos vizsgálatokhoz tökéletesen megfelelnek a mikronos tartományba eső gömbalakú sejtjei. A proteomikai, struktúrbiológiai munkák kiszélesítését nagyban hátráltatja a genetikai manipulációs eszközök teljes hiánya e taxonban, így e probléma megoldása volt doktori munkám fő célja.

A feladat nehézségét az adta, hogy a területen szinte alig volt a munkámban felhasználható előzetes eredmény, és munkám kezdetéig két független csoport is feladta a *Thermoplasma* genetika kutatását előre nem látható akadályok miatt.

A genetikai eszközrendszer kialakításakor négy területre kellett koncentrálnom párhuzamosan: a klonális munka megoldására, szelekciós markerek megtalálására, vektorok építésére és hatékony transzformációs rendszer kiépítésére.

A genetikai eszköztár fejlesztésének első lépéseként a szervezet tenyésztésének, ezen belül is a szilárd táptalajon történő kultiváció fejlesztését végeztem, azaz a klonális munka feltételeinek megteremtését dolgoztam ki. A szervezetet már korábban is képesek voltak japán kutatók szilárd médiumon tenyészteni, viszont az inkubációs idő olyan hosszú volt (30 nap), hogy a rutinszerű klonális szelekció kivitelezhetetlen volt. Annak érdekében, hogy fokozzam a Gelrite-bázisú szilárd médium szilárdságát, növeltem a szilárdító anyag koncentrációját, ami lehetővé tette, hogy egy, a mechanikai hatásokra sokkal ellenállóbb, az oltókacsos szélesztést is lehetővé tevő szilárd médiumot hozzak létre. Ezzel párhuzamosan kísérleteket indítottam, hogy csökkentsem a látható telepek megjelenéséhez szükséges inkubációs időt, azaz csökkentsem a generációs időt. A *T. acidophilum* szaporodásához nélkülözhetetlen

egy általában élesztőkivonatot tartalmazó komplex médium, melynek előállítási módja meghatározó a növekedést serkentő hatás szempontjából. Annak érdekében, hogy növeljem a szaporodási rátát, a gyári élesztőkivonat mennyiségét növeltem a táptalajban. Emellett kidolgoztam egy élesztő vitamin készítési eljárást, amely jelentősen serkentette a sejtek szaporodását. Mivel a sejtek a szilárd táptalajon történő tenyésztés során kimondottan érzékenyen reagálnak a hőmérséklet és nedvességtartalom változására, a probléma megoldására egy zárt edényt (anaerob jar) használtam. Ezen módosítások segítségével sikerült egy hatékony és rutinszerűen alkalmazható szilárd médiumot fejlesztenem, melyen a *T. acidophilum* képes 12 napos inkubációt követően 1-3 mm átmérőjű telepeket formálni, vagyis a klonális szelekció kivitelezhető a szervezetenél. A továbbiakban tervezem az élesztő vitamin részletesebb vizsgálatát, hogy azonosíthassam a korábbi szakirodalmak alapján feltehetően oligopeptid természetű serkentő hatású faktort.

A tenyésztési kísérletekkel párhuzamosan, a szelektív markerek keresésénél, számos antibiotikumot vizsgáltam meg annak érdekében, hogy a genetikailag módosított sejteket el tudjam különíteni a vad típusúaktól. A *T. acidophilum* esetében csupán pár antibiotikummal szembeni érzékenységről van elérhető publikáció. Ezek közé tartozik a novobiocin, egy aminokumarin amely már kis koncentrációban (10 ng/ml) képes a szervezet növekedését gátolni és az aminoglikozidok csoportjába sorolt neomicin. A fentiek mellett az eritromicin, klóramfenikol, kumermicin, rifampicin és tiosztrepton antibiotikumokról is igazoltam, hogy az általánosan használt koncentrációban gátolják a szervezet szaporodását. A szakirodalmi adatok ismeretében meglepő volt, hogy a rifampicin már nagyon kis koncentrációban (1000 ng/ml) gátló hatást váltott ki a szervezetenél. Ez az antibiotikum az eukariótákra és ősbaktériumokra nem, csak a baktériumokra hatásos szer, amit a *T. acidophilum* eukariótaszerű, DNS-dependens RNS-polimerázának rezisztenciája kapcsán *in vitro* kísérletekben igazoltak a múlt század nyolcvanas éveiben. *In vivo* kísérleteim során viszont ennek az ellenkezőjét tapasztaltam, ami cáfolja a legnívósabb prokarióta taxonómiai könyvekben napjainkig hivatkozott rifampicin rezisztencia bélyeget e taxonban (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Prokaryotes). A adott antibiotikumot csak akkor lehet használni genetikai eszközzel fejlesztésben, ha az adott antibiotikumra specifikus rezisztenciát okozó marker gént is tudunk hozzárendelni, amely képes kifejeződni a célszervezetben. A novobiocin és rifampicin esetében találtam olyan

marker géneket, melyek segítségével rezisztenciát tudtam kialakítani a *T. acidophilum*-ba: ezek egy *T. acidophilum* eredetű mutáns girázB (*gyrB*-novobiocin) és egy *Pseudomonas* eredetű rifampicin-riboziláz (*arr2*) rezisztencia gének voltak. További lehetőségként az eritromicin, klóramfenikol és tiosztrepton esetében valószínűleg lehet találni marker géneket, amelyeknek a későbbiekben jelentősége lehet pl. több gén inaktiváláskor, a jelen munkában erre nem volt lehetőségem.

A genetikai manipuláció legkritikusabb pontja a transzformáció, az idegen genetikai anyag bejuttatása a célszervezetbe. Mivel a *T. acidophilum* genetikai transzformációját ez idáig senkinek sem sikerült megoldania, talán ez volt a legnehezebb feladatom. Számos fizikai, kémiai és biológiai módszer létezik, melyek segítségével rutinszerűen tudnak más ősbaktérium fajokat transzformálni, ilyenek az elektroporáció, liposzóma-mediált vagy PEG-szferoplaszt transzformáció. A kísérleteim során az ősbaktérium genetikában általánosan használt és számos különleges transzformációs módszert, például a génpuska alapú biolisztikus transzformáció, teszteltem reprodukálható eredmény nélkül. Emiatt egy teljesen új és egyedi transzformációs módszert kellett kifejlesztenem, amely a szervezet egyedi morfológiai tulajdonságán (nem rendelkezik sejtfallal) és fiziológiai sajátosságán (a sejtek a pH növelése hatására plaztikussá válnak) alapul. Az új transzformációs módszerrel 10^2 – 10^4 transzformáns/ μ g DNS hatékonyságot tudtam elérni, amely összevetve más ősbaktériumok transzformációs hatékonyságával átlagosnak mondható. Az általam fejlesztett dialízis-transzformációs módszer járulékos haszna lehet az is, hogy az valószínűleg használható lesz a *Thermoplasmatales* rend további, eddig genetikailag manipulálhatatlan tagjainak vizsgálatára is.

A választott szelekciós markerek, a mutáns girázB (*gyrB*-novobiocin) és a rifampicin-riboziláz (*arr2*) rezisztencia gének alapján vektor konstrukciókat építettem, hogy teszteljem az génbevitel lehetőségét a kifejlesztett transzformációs módszer segítségével. A novobiocin szelekciós marker gén egy novobiocin rezisztens környezeti izolátumból azonosított giráz (*gyrB*) gén volt (HO62N1C) és annak helyspecifikusan módosított változata, mivel korábban *in vitro* vizsgálatokban igazolták a módosítás hatására bekövetkezett rezisztencia növekedést a novobiocinnal szemben, egy tisztított girázB–nukleinsav rendszerben. Munkám legjelentősebb pillanata volt, amikor elsőként sikerült novobiocin rezisztens *T. acidophilum* klónokat előállítanom. A transzformánsok novobiocin rezisztenciája 1500 ng/ml volt, mely

másfélszeres növekedést jelent a rezisztens japán *T. acidophilum* környezeti izolátumhoz képest, amely ugyanazt a girázt hordozza. Ennek magyarázata lehet, hogy a transzformáns sejtekben több a Nov^R *gyrB* kópia száma, így az expresszált enzim mennyisége is. A helyspecifikus mutagenézissel tovább módosított Nov^R *gyrB*-A136H gént hordozó sejtvonalak novobiocin rezisztenciája 2500 ng/ml-re nőtt, ami egybevág a publikált adatokkal, mi szerint ez az aminosav a kitüntetett pontja az antibiotikum-enzim kapcsolat kialakulásának. A kialakított Nov^R *gyrB*-A136H kiváló szelekciós marker jelölt a további kutatásokhoz is.

A kísérletek során tapasztaltam, hogy a novobiocin rezisztens sejtvonalakban a vektoron található Nov^R *gyrB* gén genomi rekombinációra volt képes a genomi *gyrB* génnel, amely a két gén nagymértékű nukleotid szekvencia hasonlóságára vezethető vissza. Annak érdekében, hogy irányítani tudjam a rekombinációt, olyan szelekciós marker génre volt szükségem, amely nem képes spontán rekombinációra. Annak érdekében hogy ezen problémát megoldjam, egy mesterséges Nov^R *gyrB* gén terveztem, amelynek aminosav szekvenciája teljes mértékben megegyezik a *T. acidophilum* Nov^R *gyrB*-A136H génjével, viszont nukleotid szinten törekedtem az 5 bázisnál nagyobb homológia elkerülésére. A mesterséges *gyrB* gén alapú integratív vektorral is sikerült novobiocin rezisztens sejtvonalat létrehoznom és a szelekciós marker gén fennmaradását igazolnom. Az integráció helyének vizsgálatánál nem-specifikus integrációt tapasztaltam.

Párhuzamosan a Rif^R *arr2* génnel is fejlesztettem integratív vektort. Ennek a rezisztencia markernek számos előnye van a novobiocin markerhez képest: 1. a rezisztencia kifejeződése az antibiotikum inaktivációja útján valósul meg és nem a célenzim aktív helyének struktúrájának módosulása révén; 2. az *arr2* gén egy igen rövid rezisztencia gén, amely előny lehet a kisebb méretű vektorok építése során. A transzformációt követően sikerült rifampicin rezisztens sejtvonalat létrehoznom, melyek 2500 ng/ml rifampicint is toleráltak. Az *arr2* gén alapú integratív vektornál is tapasztaltam a random integráció jelenségét. Ezen eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy a *T. acidophilum* DSM1728-as törzsből a homológ rekombináció mellett egy illegitim rekombinációs mechanizmus is működik, melynek feltárása túlmutatott a jelen disszertáción.

A szervezet plazmid fenntartó képességének tesztelésére shuttle vektorokat fejlesztettem, melyhez a *T. acidophilum* HO-122 törzsből izoláltam ~16 kb endogén

plazmidot (pTA1). A pTA1 plazmid ori-régióját tartalmazó 6000-bázispárnyi fragmentjéből és az *E. coli* eredetű pRSF-Duet plazmid fúziójából kialakított *E. coli*-*T. acidophilum* shuttle vektorokkal végrehajtott transzformációt követően sikerült rezisztens (novobiocin és rifampicin) sejtvonalakat létrehozni, viszont a plazmid fennmaradását csak az *arr2* gén alapú shuttle vektorral (pSTRif) transzformált sejtekből sikerült visszaigazolni kis mennyiségben. Ennek magyarázata talán a plazmid méretében (a pSTRif plazmid ezer bázisnyival kisebb volt mint a *gyrB* gén alapú plazmid) vagy a szelekciós gének kisebb homológiájában keresendő. Az eredetileg fehérje expressziós célra készült plazmid ugyan fennmaradt, de olyan alacsony kópiaszámmal sikerült visszaigazolni azt, hogy az nem teszi lehetővé a konstrukció használatát fehérje overexpressziós (túltermeltetési) célokra. A kópiaszám növelésére a *T. acidophilum*-ban a továbblépést az jelentheti, ha sikerül a pTA1 fragment méretét csökkenteni, mely csak pTA1 plazmidon kódolt ismeretlen gének szerepének feltárásával történhet. A pTA1 plazmid funkcionális térképezéséhez egy EZ-transzpozon alapú random mutagenézis látszik a leggyorsabb megoldásnak, ahol a plazmidon található 17 ismeretlen gén egyenkénti kiütése, majd a plazmid sorozat *T. acidophilum*-ba való transzformálása és a kópiaszám követése vezethet egy működő expressziós vektor elkészítéséhez. A munka jelenleg folyamatban van.

Munkám eredményei elindíthatják a *Thermoplasma acidophilum* modellszervezet széleskörű genetikai kutatásait. Egy átfogó genetikai eszközrendszer alappilléreit sikerült lefektetnem a PhD kutatási periódus alatt. Sikerült megoldani a mikroba klonális tenyésztését, hatékony transzformációs rendszert dolgoztam ki, két független szelekciós marker segítségével pedig az első működő vektorokat sikerült létrehoznom. Ez az eszközrendszer, vagy annak elemei, egy sor, a *Thermoplasmatales* rendbe tartozó, jelenleg genetikailag nem manipulálható fajnál is várhatóan jó eséllyel alkalmazható lesz. Egy praktikusán használható, különleges fehérjék expressziójára vagy *T. acidophilum* gének KO-jára alkalmas rendszerhez azonban további erőfeszítések szükségesek, hiszen a *T. acidophilum* DSM1728 törzsnél tapasztalt illegitim rekombinációs események nehezítik a célzott feladatok végrehajtását. Talán megoldást jelenthet erre a problémára más, vad típusú, nem harminc éve folyamatosan passzált *T. acidophilum* törzsek használata, amelyek már egy éve elérhetőek a japán nemzeti törzsgyűjteményben.

5. A TÉMÁBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

Folyóiratcikk:

Baka E., Varga S, Hobel C, Knispel RW, Fekete Cs, Ivanics M, Kriszt B, Nagy I, Kukolya J (2013): The first transformation method for the thermo-acidophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum*, *Journal of Microbiological Methods*, 95:145-148p, (IF 2012: 2.161)

Teljes közlemény konferencia kiadványban:

Baka E., Kriszt B., Jenes B., Ivanics M., Nagy I., R. W. Knispel, C. Hobel, Kukolya József (2010): Genetikai eszközrendszer fejlesztése a termoacidofil *Thermoplasma acidophilum* modellszervezet molekuláris biológiai vizsgálatához, TUDOC – Kárpát Medencei Doktoranduszok Nemzetközi Konferenciája, 2010. Május 27-28, Gödöllő, Konferencia kötet ISBN szám: 978-963-269-186-2, p

Kongresszusi kiadványokban megjelent közlemény (az ISBN, ISSN vagy más, hitelesített kiadványaira vonatkozóan)

E. Baka, C. Fekete, S. Varga, RW. Knispel, I. Nagy, J. Kukolya (2013): Development of basic genetic manipulation system for the thermoacidophil *Thermoplasma acidophilum*. Hungarian Life Science Conference, Book of abstracts, p 104-105. ISBN Number: 978-615-5270-02-4

E. Baka, S. Varga, Cs. Fekete, Á. Hubert, I. Nagy, J. Kukolya (2013): Plasmid isolation from *Thermoplasma acidophilum* HO-122 for shuttle vector construction. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 60: 111-112.

S. Varga, **E. Baka**, B. Kriszt, S. Szoboszlay, RW. Knispel, W. Baumeister, I. Nagy, J. Kukolya (2012): New approaches in the development of genetic tools for *Thermoplasma acidophilum*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 60: 106.

E. Baka, S. Varga, B. Kriszt, S. Szoboszlay, R. W. Knispel, W. Baumeister, I. Nagy, J. Kukolya (2011): Screening and application of new genetic markers for *Thermoplasma acidophilum*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 58: 118-119.

E. Baka, B. Kriszt, C. Hobel, R. W. Knispel, W. Baumeister, I. Nagy, J. Kukolya (2010): Genetic tools for *Thermoplasma acidophilum*: achievements and applications. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 58: 4-5.

Baka E., Kriszt B., Jenes B., Ivanics M., Nagy I., Kukolya J. (2009): Developing of genetic tools for the model organism, *Thermoplasma acidophilum*. *Acta Microbiologica et Immunologica*, 56: 118-119.

Összes közlemény impakt faktora: 2.161