

**A 16-3 BAKTERIOFÁG HELYSPECIFIKUS
REKOMBINÁCIÓS RENDSZERE**

Tézisek

Dr. Dorgai László

Szeged, 1997.

Tartalomjegyzék

Bevezetés	2. old.
Tudományos háttér, a munka előzményei	2. “
Célkitűzés	8. “
Megemlékezés	9. “
Alkalmazott módszerek	10. “
Új tudományos eredmények	11. “
Melléklet	22. “



Bevezetés:

1975-ben végeztem biológusként a József Attila Tudományegyetem Természettudományi Karán. Végzés után JATE Biokémiai Tanszékén kezdtem dolgozni. Az 1975-1979 között itt végzett munka eredményeiből készítettem el egyetemi doktori dolgozatomat Dr. Boross László tanszékvezető egyetemi tanár irányításával. 1979 szeptemberétől az egyetem Genetikai Tanszékén dolgoztam 1989-ig, Dr. Orosz László tanszékvezető szakmai irányítása mellett. Téziseimben az ezen időszak alatti munkám azon részét foglalom össze, ami a 16-3 mérsékelt bakteriofág helyspecifikus rekombinációs rendszerének vizsgálatára vonatkozik.

Tudományos háttér, a munka előzményei:

A genetikai rekombináció a mutáció és a kromoszómák független kombinálódása mellett az a természetes folyamat ami az élőlények genetikai állományának változékonyságát, sokféleségét biztosítja, folyamatosan szolgáltatva ezzel a nyersanyagot az evolúció számára. A folyamat kutatása, a mechanizmus minnél jobb megértése ezért vált a klasszikus és később a molekuláris genetika egyik központi célkitűzésévé. A klasszikus felfogás genetikai rekombináción a mai ismereteink szerinti homológiafüggő általános rekombinációt értette. Minden olyan folyamat, ami nem ennek törvényei szerint játszódott le az illegitim rekombináció nevet kapta, és jó ideig csak eseti kivételként, kuriózumként kezelte őket a szakmai közvélemény. Csak később, az ismeretek mennyiségi növekedése után vált nyilvánvalóvá, hogy egy, az élővilágban általánosan elterjedt folyamatról van szó, ami nem csak kivétel, hanem saját jogán is kiköveteli a szakmai érdeklődést, megismerése számos alapvető biológiai folyamat jobb

megértését teszi lehetővé. Ugyancsak az ismeretek gyarapodása vezetett oda, hogy az illegitim rekombináción belül körvonalazódtak speciális esetek, kiderült, hogy a gyűjtőfogalom több, egymástól jól megkülönböztethető jelenséget takar. Ezek egyike a helyspecifikus rekombináció, ami jelen tézisek tárgyát is képezi.

A helyspecifikus rekombináció:

A helyspecifikus rekombinációs folyamatok széles spektrumot fognak át, az egyszerű prokarióta IS elemektől kezdve a fejlett eukarióták immunrendszerében bekövetkező szomatikus DNS átrendeződésig terjedően számos fiziológiai jelenségben játszanak döntő szerepet. Biológiai jelentőségük, pontosabban ismereteink ezen a területen szintén szélsőségesek, a sokak szerint funkció nélküli, önző inzerciós szekvenciákat és a transzpozíciót obligát életfeltételként használó Mu fágot lehet például megemlíteni, mint két szélsőséges pontot. Megkülönböztetését a homológ rekombinációtól alapvetően két tulajdonság indokolja. Az egyik az, hogy a helyspecifikus rekombináció csak specifikus, relatíve rövid szekvenciák között játszódik le, ellentétben a homológ rekombinációval, ami bármilyen két DNS szakasz között katalizálja a rekombinációt, ha azok szekvenciája azonos, vagy közel megegyező, illetve ha a hosszuk elér egy bizonyos méretet, általában minimálisan 50-100 bázispárt. A helyspecifikus rekombináció esetében a specifikus szekvencia vagy mind a két rekombinálódó partneren jelen kell legyen, vagy csak az egyik, rendszertől függően. A másik megkülönböztető tulajdonság a rekombinációt végző enzim/járulékos fehérje apparátus. Ez a helyspecifikus rekombináció esetében általában csak az adott vagy azokhoz nagyon közel álló szekvenciák közötti rekombináció katalízisére képes, arra viszont igen nagy hatékonysággal. Sok esetben pusztán egy vagy néhány nukleotid eltérés is nagyságrendekkel csökkentheti a reakció hatékonyságát.

A helyspecifikus rekombinációk egyik legkorábban felismert és legjobban tanulmányozott képviselője az *Escherichia coli* λ fágjának inzerciós-exciziós rendszere. A λ fág, más mérsékelt bakteriofághoz hasonlóan képes a gazdabaktérium kromoszómájába integrálódni, ahol latens állapotban, a gazda genomjának részeként, profágként szaporodik. Természetes vagy mesterséges indukciós hatás(ok) következtében a profág aktiválódhat, melynek során a gazda kromoszómájába integrálódott fág-DNS kivágódik és így vesz részt az ún. lítikus szaporodási út további lépéseiben. A folyamat mind a fág, mind a baktérium részéről specifikus szekvenciák, az ún. *attachment* helyek (att régiók) jelenlétét igényli. A fágon található szekvencia (*attP*) mintegy 240 bp. hosszúságú, és megtalálhatók rajta a rekombinációban résztvevő összes katalitikus és járulékos fehérje kötőhelyei. Funkcionálisan az *attP* jobb és bal oldali kari szekvenciákra, és az ún. *core* régióra bontható. Ez utóbbi az a hely, ahol a DNS szálak hasítása és kölcsönös kicserélése megtörténik. Szekvenciája két nem tökéletes *invert repeat*-ből áll, melyeket egy 7 bp.-os ún. *overlap* régió választ el egymástól. A baktérium kromoszómán található szekvencia az *attB* régió, hossza 24 bp., tehát az *attP*-nél lényegesen rövidebb. Szekvenciája az *attP* funkcionális *core* régiójához nagyon hasonló, azzal lényegében megegyezik. Integrálódáskor a rekombináció az *attP* és *attB* régiók között játszódik le, a reakció a profágot balról és jobbról határoló, mind fág, mind bakteriális *att* szekvenciát tartalmazó *attL* és *attR* régiókat eredményezi. Ez utóbbiak a szubsztrátjai a kivágódási reakciónak, amely regenerálja az *attP*-t és az *attB*-t.

A rekombinációt a fág által kódolt fehérje, az integráz (Int) katalizálja, központi szerepe van mind az integrációban, mind a kivágódásban. Multifunkcionális fehérje, két, egymástól különböző szekvenciát köt specifikusan. N-terminális, mintegy 55 aminosav hosszú *domain*-ja az *attP* kari részein található, összesen öt, kari típusú Int kötő

szekvenciát ismeri fel, míg a fehérje maradék része a *core* régió Int kötő szekvenciáihoz kapcsolódik. Ezek a szekvenciák azonosak az *attP* és *attB* *core* régiókban található *invert repeat*-ekkel. Az Int a specifikus DNS kötő aktivitásán felül helyspecifikus endonukleáz és I. típusú topoizomeráz is. Aktivitásai mind kapcsolatba hozhatók a rekombinációval. A reakcióban fontos szerepet játszanak az ún. járulékos fehérjék. Ezek a fág által kódolt Xis, illetve a gazda által kódolt IHF és Fis fehérjék. Az IHF mind az integrációban, mind a kivágódásban részt vesz, míg az Xis és a Fis csak a kivágódásban játszik szerepet. Mindegyik járulékos fehérje rendelkezik specifikus kötőhelyekkel az *attP* kari régióban, szerepük a rekombinációhoz szükséges specifikus struktúra, az ún. *intasoma* létrehozásában van, illetve a megfelelően szabályozott expressziójukon keresztül a rekombináció irányultságát (integráció / kivágódás) szabják meg az integrázzal együttműködve.

A rekombináció tényleges helye az *overlap* régió 5' és 3' vége, a *core* típusú szekvenciákhoz kötődő Int itt hasítja a foszfodiészter kötést úgy, hogy egy tirozil oldalláncon keresztül a DNS-hez tranziensen, kovalensen kapcsolódik. A reakció külső energiát nem igényel, a foszfodiészter kötés energiája a fenti kötésben tárolódik. A DNS hasítása meghatározott sorrendben történik, először a konvencionális felírásnak megfelelő bal oldalon, a felső szálon következik be, mind az *attP*-n, mind az *attB*-n. Az ezt követő kölcsönös szálkicserélődés Holliday struktúrát hoz létre, ami a jobb oldalon az alsó szálon bekövetkező hasonló reakció után megoldódik.

A 16-3 fágról:

A 16-3 fág a *Rhizobium meliloti* 41 mérsékelt bakteriofágja, 1961-ben izolálta talajból Ördögh és Szende. Morfológiáját tekintve hasonlít a λ fágra, de a két fág között DNS szinten nincs kimutatható homológia. A fág alapvető genetikai analízise megtörtént. Számos mutánsát izolálták, melyek felhasználásával elkészült a genetikai térképe, ami 40 térképegység hosszú,

és lineáris. A térkép konvencionális felírás szerinti bal oldalán helyezkedik el a *c* regulátor gén, ami jelenleg a legjobban tanulmányozott és ismert génje a fágnek, szekvenciája ismert. Terméke a represszor fehérje, amely az operátor szekvenciákhoz kapcsolódva szabályozza a lítikus és lizogén szaporodási módok közötti döntést, és ezen keresztül a korai és késői funkciók megnyilvánulását. A többi, szinte kizárólag hőérzékeny mutációval azonosított gén negyven komplementációs csoportot alkot, melyek megnyilvánulásuk idejét tekintve a korai és késői funkciók csoportját alkotják. Ismertek ezen kívül a *host-range*, és a lízisben sérült mutánsok, továbbá olyan deléciók, inverziók és inszerciók, melyek nem érintenek létfontosságú funkciókat. Érdekes módon, annak ellenére, hogy nincsenek mutációval azonosítva, ismerjük három rekombinációs funkció és egy második regulátor gén, az immunX helyzetét is a fizikai térképen. Furcsa paradoxon, hogy a fiziológiásan kör alakú fág-DNS genetikai térképe lineáris. Bizonyított, hogy a fizikai térképen számos késői, mutációval azonosított funkció a regulátor géntől balra, míg a genetikai térképen jobbra helyezkedik el. Az ellentmondás feloldása elvileg lehetséges, de kísérletes bizonyításra vár. Ismereteink a fág fiziológiájáról nagyon heterogének. A lizogén állapot kialakulásában szerepet játszó tényezők, a reguláció és a virulencia viszonylag jól ismert, és nagyon alaposan kidolgozott a fág homológ rekombinációja is. Viszont az azonosított cisztronok többségének nem ismerjük a funkcióját, arra csak működési idejükből következtetünk. A fág képes specifikusan transzdukálni a gazda *cys46*⁺ génjét, a kromoszómába a *cys46* és a *met5* gének közé integrálódik. A profág *c* regulátor génje az utóbbival 100%-ig, az előbbivel 87%-ban kapcsolt. Összefoglalva elmondható, hogy a 16-3 a nem *Escherichia coli* fágok közül a genetikailag és molekuláris szinten is lejobban ismertek közé tartozik. A fág eddigi és további vizsgálatát alapvetően két dolog motiválja. Az egyik a megismerés vágya, az, hogy

szaporítsuk ismereteinket a nem hagyományos laboratóriumi objektumok vizsgálatával, hiszen az ilyen munkák során bukkannak fel nem várt jelenségek, új biológiai problémák. A másik indok ennél racionálisabb jellegű. A fág gazdabaktériuma a szimbiotikus nitrogénkötő fajok közé tartozik, ezért genetikai vizsgálata mindenképpen indokolt. Ezt segíti, segítheti elő egy rezidens fág kutatása, amely úgy járulhat hozzá a gazda jobb megismeréséhez, mint a λ fág az *Escherichia coli* vizsgálatához. Nem titkolt célja volt a kutatásnak, hogy végső soron a λ /*Escherichia coli* rendszerhez hasonló genetikai rendszer kerüljön kifejlesztésre.



Célkitűzés

A Genetikai Tanszéken kapott első feladatomban az *attP* régió lokalizálása volt a 16-3 fág fizikai térképén. Ebből nőttem ki magam az itt vázolt projekt, melynek célja a teljes helyspecifikus rekombinációs rendszer minél jobb, mélyebb megismerése lett. Mindenekelőtt azt szerettem volna megtudni, hogy ez a rendszer mennyiben hasonló, és miben különbözik a λ fág rendszerétől. Természetesen az út nem vezetett olyan egyenesen, célirányosan a kitűzött irányba, mint ahogy az jelen tézisekből, legalább is szándékom szerint kitetszhet. Az eredmények sem időben, sem logikailag nem így követték egymást, vakvágánynak bizonyult "jó ötletek" és szerencsés véletlenek járultak hozzá végül is a jelenlegi formához. Össességében azonban elmondhatom, hogy nagy átlagban azért mégis tartani sikerült az eredeti célkitűzést, még ha néhány területen, pl. az integráz szekvenciájának megismerése, nem is jutottam el oda, ahova szerettem volna. Talán kompenzálja ezt az a tény, hogy más területeken, pl. az integrációs vektorcsalád kifejlesztése, sikerült eredményt elérni, pedig ez az eredeti célok kitűzésénél még csak fel sem merült.

Megemlékezés

Ezúttal szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik hozzájárultak a munka eredményeihez. Mindenekelőtt Dr. Orosz Lászlónak, aki erre a területre irányított és lehetőséget biztosított a munka eredményes folytatására. Két kollégámnak, dr. Dallmann Gézának és Olasz Ferencnek szeretném megköszönni a mindennapos szakmai kapcsolatot, vitákat, tanácsaikat és a közvetlen légkört, amiben velük részem volt. Döntő szakmai hozzájárulásukat adott helyen a tézisek között is jeleztem. Nem lehet nem megemlíteni azokat az akkor még szakdolgozó hallgatókat (ma már sokan sikeres kutatók), akik lelkes és eredményes munkájukkal nagyban hozzájárultak jelen tézisek megszületéséhez: Berényi Mária az *attP* lokalizálásában, Ascher Zoltán és Garamszegi Nándor a fizikai térképek elkészítésében, Vőneki Katalin és Stefancsik Rajmund az rekombinációs funkciók lokalizálásában, Hermes Edit a kozmid klónkönyvtárak elkészítésében és analízisében valamint az integrációs vektorok megkonstruálásában szerzett elévülhetetlen érdemeket. Az hogy a téziseket többes szám első személyben fogalmaztam, szándékom szerint köszönetem jele a munkájuk miatt. Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni Szűcsné Tóth Katalinnak és Zsótér Erzsébetnek technikus munkájukat, mely nélkül a bemutatott eredmények biztosan nem jöhettek volna létre.

Felhasznált módszerek

A tudományos eredmények bemutatása során igyekeztem az alkalmazott módszerről is említést tenni, de ez sok esetben nem volt megoldható anélkül, hogy az amúgy is száraz és nehezen megfogalmazható anyag végképp olvashatatlanná ne vált volna. Ezért itt szeretném röviden felsorolni őket.

- standard mikrobiális technikák
- plazmidkonjugáció
- transzdukció
- fág, plazmid és genomiális össz-DNS valamint restrikciós fragment izolálás
- restrikciós analízis
- agaróz és natív valamint denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis
- molekuláris klónozás plazmid és kozmid vektorokba
- nukleinsavak radioaktív jelölése
- Southern hibridizáció
- DNS szekvenálás
- komputeres analízis

Új tudományos eredmények:

1.) A 16-3 fág fizikai térképezése:

vonatkozó publikáció:

Dorgai,L., Polner,G., Jónás,E., Garamszegi,N., Ascher,Z., Páy,A., Dallmann,G.

and Orosz,L.: The detailed physical map of the temperate phage 16-3 of *Rhizobium meliloti* 41.

Mol. Gen. Genet. 191:430-433, 1983

Az *att* régiók, illetve bármilyen fágfunkciónak a fág DNS-én történő lokalizációjához arra van szükség, hogy a fág közel 61 kb. hosszúságú DNS-ének egyes szegmentjeit azonosítani, azok relatív helyzetét a teljes fággenomhoz viszonyítva lokalizálni tudjuk. Ezt a célt szolgálta a fág-DNS fizikai térképezése, melynek során különböző restrikciós enzimek által generált fragmentek sorrendiségét határoztuk meg. Akkor, amikor csatlakoztam a Genetikai Tanszék közösségéhez, dr. Dallmann Géza munkájának eredményeként már ismert volt az első részletes fizikai térkép HindIII enzimre, valamint a kis felbontású HpaI/HindII, a KpnI és a BglII térképek, illetve az EcoRI térkép egy része. Ez megkönnyítette a további térképek készítését, hiszen az ismeretlen pozíciójú hasítóhelyeket a már térképezett helyekhez tudtuk viszonyítani. További hét enzimre, az AhaIII, BamHI, BclI, EcoRV, PstI, PvuII és XbaI enzimekre készítettük el a fizikai térképeket, valamint befejeztük az EcoRI térképet is. A térképezési kísérleteket természetesen nem lehet jelen tézisek keretei között még csak vázlatosan sem leírni, így csak az általános stratégia és a felhasznált módszerek rövid ismertetésére szorítkozom:

a. Első lépésben azt állapítottuk meg, hogy a használt enzim hány fragmentre hasítja a fág-DNS-t, majd meghatároztuk a fragmentek méretét.

b. Hőkezelt illetve kezeletlen minták összehasonlító analízisével azonosítottuk azt a fragmentet, amely a fág ún. ragadós végeit, azaz a fizikailag végálló DNS darabokat tartalmazta. Ez szolgáltatta az első biztos viszonyítási alapot.

c. Olyan enzim esetében, ami csak néhány helyen hasította a fág-DNS-t (AhaIII, PvuII és XbaI), a következő lépés minden esetben kettős emésztés volt. A kettős emésztés másik partnere kezdetben a HindIII volt, később, ismereteink gyarodásával természetesen más enzimeket is alkalmaztunk erre a célra. Abból, hogy a segédenzim fragmentjei közül melyik tűnt el az egyszeres emésztési képekből, és mekkora darabokra esett szét, egyszerű logikát követve az ismeretlen hasítóhelyek térképezhetőek voltak. A kettős emésztést a DNS-t sok fragmentra hasító enzimek esetében is használtuk, ebben az esetben megfordítva a logikát, azaz partnerként a kevés helyen hasító enzimeket választottuk. Ez ugyan nem tette lehetővé teljes térképek elkészítését, de jó néhány fragment helyét lehetett így lokalizálni, ami a további munkát lényegesen leegyszerűsítette.

d. Gyakran alkalmaztunk részleges emésztést, amikor a szükségesnél kevesebb enzimmel, illetve rövidebb ideig emésztettük a DNS-t. A teljes emésztési képhez viszonyítva megjelenő részleges emésztési fragmentek az egymás szomszédságában helyet foglaló fragmentekről szolgáltattak információt, tovább csökkentve ezzel a megoldandó probléma bonyolultsági fokát.

e. Izolált vagy klónozott fragmentek kettős vagy részleges emésztése. Ez a módszer elvben nem különbözik a fent leírtaktól, de az izolálás/klónozás következtében a vizsgált fragment a teljes fággenom zavaró hatásától mentesen vizsgálható így. Az eddigi módszerek a hasítóhelyek döntő többségének lokalizálását lehetővé tették. Néhány "rosszindulatú" esetben azonban további, speciális módszereket is igénybe vettünk.

f. A DNS fizikai megváltozásával járó mutációkat (deléciók, inverziók) tartalmazó fágok DNS-ének analízise információt szolgáltatott arra vonatkozóan, hogy a mutációk által érintett terület az egyes enzimek mely fragmentjeivel fed át. Ez nem csak a fizikai térképezést, hanem a mutációk által érintett fágfunkciók lokalizálását is lehetővé tette, ami a későbbi munkánk során nagyon hasznosnak bizonyult.

g. Radioaktívan jelölt izolált fragmentek visszahibridizálása a fág-DNS restrikciós fragmentjeihez, Southern típusú hibridizációs kísérletekben. Ez lehetővé tette, hogy az eddigiek során még nem lokalizált fragmentek helyzetét is meg tudjuk állapítani az ismert és térképezett fragmentekhez viszonyítva.

h. Az egyes térképek egymáshoz való optimalizálása. A fent leírt módon elkészített térképek egymástól ugyan nem függetlenül, de mégis csak önállóan, egyedileg készültek. A kísérletes adatokból számolt hasítóhely pozíciók a kísérleti hiba miatt nem minden esetben egyeztek meg az ellenőrző kísérletekből meghatározott pozíciókkal, különösen a sok hasítóhelyet tartalmazó zsúfolt területeken. Ezért vált szükségessé hogy az egyes térképeket optimálisan egymáshoz illesszük. Erre a célra egy publikált komputerprogramot használtunk, input adatsorként 108 egyes és 176 kettős emésztés kísérletesen jól mérhető adatait használtuk. A számítástechnikai munkát dr. Pollner Gábor kollégám végezte, én voltam a kísérletes fél.

A munka eredményeképpen elkészült a 16-3 fág részletes fizikai térképe, amely 99 restrikciós helyet tartalmaz, és ezek egymáshoz viszonyított távolsága optimalizált. A térkép a további munkák szempontjából már kellő sűrűséggel tartalmaz hasítóhelyeket, a benne rejlő információt a tanszék munkája során a későbbiekben sokrétűen hasznosítottuk is.

2.) A fizikai és genetikai térképek orientálása:

vonatkozó publikáció:

Dorgai,L., Olasz,F., Berényi,M., Dallmann,G., Páy,A. and Orosz, L.:

Orientation of genetic and physical map of Rhizobium meliloti temperate phage 16-3.

Mol. Gen. Genet. 182:321-325, 1981

A 16-3 fágnek egymástól függetlenül elkészült a genetikai és fizikai térképe. Mindkét térképtípusnak természetes polaritása van, aminek irányát a konvencionális felírási mód rögzíti. Eredményeink lehetővé tették, hogy a két térképet orientáljuk egymáshoz, azaz meghatározzuk, hogy az absztrakt genetikai sorrend a lehetséges két variáció közül melyik fizikai iránynak felel meg. A feladat megoldásához arra volt szükség, hogy mindkét térképen egymástól függetlenül megállapítsuk legalább két, genetikailag és fizikailag is vizsgálható marker helyét. Az egyik ilyen marker a fág *c* regulátor génje volt. Ez a genetikai térképen a baloldali szélső pozíciót foglalta el. Fizikai helyzetét a fizikai térképezésnél már említett deléciók és inverziók DNS-ének analízisével határoztuk meg. Tíz, egymással átfedő különböző deléció és három inverzió helyét határoztuk meg a fizikai térképen. Ezek mindegyike érintette a *c* regulátor gént is, töréspontjuk azonban annak genetikai finomtérképén eltérő helyen volt. A deléciók töréspontjainak illetve a genetikai markerekkel való átfedésének analízisével a *c* regulátor gént egyértelműen sikerült a fizikai térkép HindIII-G fragmentjére, ezen belül is az 59. BamHI és a 60. HindIII hasítóhelyek közé lokalizálni.

Második azonosítási pontként egy olyan transzdukáló fág által hordozott markert választottunk, amely a vad típusú fágon nincs jelen. A marker a *cys46⁺* volt, ami a gazda kromoszómájából származik, és abnormális excízió során kerül a fág-DNSre. Helyzetét restriktációs



térképezéssel egyértelműen lokalizálni lehetett a fizikai térképen, a HindIII-G fragmenttől balra. Genetikailag szintén térképezhető, hiszen funkcionálisan komplementálja a gazda cisztein auxotrófiáját. Térképhelyzetét a *c* regulátor gén ismert helyzetű markereihez (ti3, ti5) illetve az ezekhez képest jobbra elhelyezkedő egyik korai génhez, a ts5124-hez, valamint a még távolabb jobbra található egyik kései markerhez, a ts2-höz viszonyítva határoztuk meg. A kísérleti eredmények egyértelműen arra utaltak, hogy a *cys46*⁺ inzerció a *c* regulátor géntől balra helyezkedik el, ami megegyezett a fizikailag lokalizált helyzettel is. Így a két térkép egymáshoz való orientálása egyértelműen megoldható volt.

3. Az att régiók azonosítása és fizikai lokalizálása:

vonatkozó publikációk:

Dorgai,L., Olasz,F., Berényi,M., Dallmann,G., Páy,A. and Orosz, L.:

Orientation of genetic and physical map of Rhizobium meliloti temperate phage 16-3.

Mol. Gen. Genet. 182:321-325, 1981

Olasz,F., Dorgai,L., Papp,P., Hermes,E., Kósa,E., and Orosz, L.:

On the site specific recombination of phage 16-3 of Rhizobium meliloti: identification of genetic elements and att recombinations.

Mol. Gen. Genet. 201:289-295, 1985

Dorgai,L., Papp,I., Papp,P., Kálmán,M. and Orosz,L.:

Nucleotide sequences of the sites involved in the integration of phage 16-3 of Rhizobium meliloti 41.

Nucl. Acid Res. 21:1671, 1993

A fizikai térképek birtokában megkezdhattuk az att régiókat hordozó restriktós fragmentek azonosítását. A fág *attP* régióját hordozó fragmentet a vegetatív és a profág restriktós térképének összehasonlításával tudtuk

lokalizálni. A profág restrikciós emésztésének képéből ugyanis az integráció miatt bekövetkező fizikai átrendeződés miatt hiányoznia kell annak a fragmentnek, ami az *attP* régiót hordozza, és helyette két másik fragmentnek kell megjelenie, amik részben fág, részben bakteriális DNS eredetűek, és a hibrid *attL* és *attR* régiókat hordozzák. A profág analízisét nem a teljes lizogén baktérium genomján, hanem egy azzal egyenértékű plazmidon, a pGY1-en hajtottuk végre. Kísérleti módszerként Southern hibridizációt használtunk, próbaként radioaktívan jelölt fág-DNST használva. A kísérlet eredményeképpen az *attP* régiót a 48.EcoRI és az 50.HindIII helyek közé tudtuk lokalizálni.

Az *attR* régiót az előző fejezetben már említett transzdukáló fágok DNSének analízisével sikerült lokalizálni. A specifikus transzdukáló fágok képződésének mechanizmusából következik, hogy az abnormálisan kivágódott profág vagy az *attL*, vagy az *attR* régiót kell hogy hordozza. Az általunk izolált transzdukáló fágok esetében ez az *attR* régiónak bizonyult, amit első lépésben sikerült egy 3.8 kb. hosszúságú HindIII fragmentre lokalizálni.

A bakteriális *attB* régiót két lépésben azonosítottuk. Először egy dr. Putnoki Péter szívességéből rendelkezésünkre álló, *Rhizobium meliloti 41* genomiális klónbankból genetikai szelekcióval izoláltuk azt az egyedi klónt, amely várákosaink szerint hordozta az *attB* régiót. A szelekciót arra a tényre építettük, hogy a fág specifikusan transzdukálni képes a *cys46*⁺ markert, így integrációs helye attól fizikailag nem lehet messze. Ezért azt a klónt szelektáltuk, amely komplementálni volt képes a gazdabaktérium cisztein auxotrófiáját. Második lépésben elkészítettük az így izolált plazmidban lévő inzert fizikai térképét. A térképet összehasonlítottuk a transzdukáló fágok megfelelő régiójának térképével, ami a hasonlóság alapján már jelezte, hogy melyik restrikciós fragment hordozhatja az *attB* régiót. A következtetésünket egy hibridizációs kísérlettel erősítettük meg,

ahol próbaként a transzdukáló fágokból klónozott és az *attR* régiót hordozó restriktív fragmentet használtunk. Ebben a lépésben az *attB*-t egy 2.57 kb.-os PstI fragmentre sikerült lokalizálni.

4. Az *att* régiók szekvenciája:

vonatkozó publikáció:

Dorgai,L., Papp,I., Papp,P., Kálmán,M. and Orosz,L.:

Nucleotide sequences of the sites involved in the integration of phage 16-3 of *Rhizobium meliloti* 41.

Nucl. Acid Res. 21:1671, 1993

Az előző fejezetben leírtuk, hogy az *attP*, az *attB* és az *attR* régiókat sikerült restriktív fragmentekre lokalizálni. Ezek mérete azonban meghaladta az akkori feltételek mellett általunk szekvenálható DNS méretét, ezért az *att* régiókat tovább lokalizáltuk az említett restriktív fragmentek fizikai finomtérképek elkészítésével. Az eredményképpen kapott néhány száz bp. nagyságú fragmenteket azután megfelelő vektorba klónoztuk, és a didezoxi terminálós módszerrel megszekvenáltuk. Az *attP* és *attR* szekvenciák összehasonlításából és a rajtuk előforduló ismétlődő szekvenciák analíziséből arra lehetett következtetni, hogy a rekombináció egy megközelítőleg 50 bp. hosszúságú szakaszon belül játszódik le. Ezt a következtetés megerősítést nyert, amikor dr. Papp István kollégám megszekvenálta az *attB* régiót is. Mindent összevetve a rekombináció helyét sikerült egy viszonylag rövid genomterületre lokalizálni. Érdekességként megemlíthető, hogy a 16-3 azon fágok csoportjába tartozik, melyek helyspecifikus rekombinációs rendszere egy viszonylag nagy kiterjedésű DNS szakaszt használ integrációs helyként a gazda genomján, ezen belül is abba a csoportba tartozik, melyek célszekvenciája tRNS génekben van. Nincs bizonyítékunk arra vonatkozóan, hogy ez egy funkcionális gén, de az

integráció helyreállítja a gén struktúráját, így nem interferálna annak expressziójával.

5. A 16-3 fág helyspecifikus rendszerének autonóm működése, az integrációért és kivágódásért felelős funkciók lokalizálása:

vonatkozó publikáció:

Olasz,F., Dorgai,L., Papp,P., Hermes,E., Kósa,E., and Orosz, L.:

On the site specific recombination of phage 16-3 of *Rhizobium meliloti*:

identification of genetic elements and att recombinations.

Mol. Gen. Genet. 201:289-295, 1985

A helyspecifikus rekombinációs funkciók, az integrálódás és a kivágódás lokalizálásához abból a már ismert tényből indultunk ki, hogy a rekombinációhoz elengedhetetlenül szükséges az *attP* régió jelenléte, és hogy a fenti funkciók működése a *c* regulátor gén kontrollja alatt áll. Feltételeztük továbbá, hogy más rendszerekhez hasonlóan a 16-3 esetében is a funkciókat kódoló gének szorosan kapcsolnak a rekombinálódó szekvenciákhoz. Ezért a 16-3 fág-DNSből egy kozmid klóntárat készítettünk, és a klónok közül kerestünk olyanokat, melyek mind az *attP* régiót, mind a *c* gént hordozták. Két ilyen klónt találtunk, inzertjeik a fizikai térkép 48. és 72. helyei között átfedtek egymással. A kérdés ezután az volt, hogy ezek a plazmidok a teljes fághoz hasonlóan képesek-e a gazda DNS-ébe a teljes fághoz hasonlóan integrálódni, illetve onnan kivágódni. Ennek eldöntésére a plazmidokat bejuttattuk *Rhizobium meliloti* 41-be, és megvizsgáltuk, hogy kimutatható-e azok integrált állapota. Ezt az intakt *attB* régió hiánya, illetve az integrálódásra jellemző hibrid *att*, pl. az *attR* megjelenése kellett hogy jelezze, ami be is következett. Az integrálódási képesség bizonyítása után azt is ellenőriztük, hogy az integrálódott plazmidok képesek-e a profág indukciójának analógiájára kivágódásra is.

Ezt egy hőindukciót követő, az integrálódást ellenőrző analitikához hasonló eljárással hajtottuk végre. Ebben az esetben arra voltunk kíváncsiak, hogy az indukciót követően megjelenik-e a kivágódás tényét bizonyító intakt *attB* fragment. A kísérlet igazolta várakozásainkat, mindkét plazmid képes volt kivágódásra is. Levonhattuk tehát azt a következtetést, hogy a két plazmid a natív fághez hasonlóan képes mind integrációra, mind pedig kivágódásra. Ez azt is jelentette, hogy a fág helyspecifikus rendszere a fággenomtól elkülönítve, attól függetlenül, autonóm módon is képes működni. Továbbá azt a következtetést is levonhattuk, hogy a rekombinációs funkciók a két plazmid inzertjeinek átfedő szakaszán, a 48. és 72. hasítóhelyek között helyezkednek el. Ez a régió minden szükséges genetikai elemet tartalmaz ahhoz, hogy a rekombinációs lépések a teljes fághez hasonló módon végbemenjenek. Tartalmazzák továbbá az összes lényeges szabályozó elemet is, hiszen a plazmidok rekombinációja lényegében nem tért el a teljes fág hasonló folyamatától.

6. A 16-3 fág helyspecifikus rekombinációs rendszerének felhasználása egy integratív vektorrendszer kidolgozására:

vonatkozó publikáció:

Hermesz,E., Olasz,F., Dorgai,L. and Orosz,L.:

Stable incorporation of genetic material into the chromosome of *Rhizobium meliloti* 41: construction of an integrative vector system.

Gene 119:9-15, 1992

Az előző fejezetben láttuk, hogy a fág helyspecifikus rekombinációs rendszere a fággenomtól elkülönítve, autonóm módon is képes volt működni. Ez adta az ötletet arra, hogy a rendszert olyan vektorok konstruálására használjuk fel, melyek igen nagy hatékonysággal képesek a gazdabaktérium kromoszómájába beépülni, és az általuk hordozott

genetikai információt annak integráns részévé tenni. A gyakorlati felhasználás szempontjából azonban nem volt kívánatos az, hogy az integrálódó szekvencia és a rekombinációt katalizáló funkciók a vektoron együtt legyenek jelen, hiszen a kivágódási funkció jelenléte az esetleges spontán indukció miatt a bejuttatott információ stabilitását lecsökkentheti, azt nem kívánatos módon el is távolíthatja a kromoszómából. Ezért a rendszert úgy konstruáltuk meg, hogy az *attP* szekvencia a vektoron legyen, viszont az integrálódásért illetve a kivágódásért felelős funkciókat csak időlegesen szolgáltatassa transz helyzetből egy olyan fág, amitől a feladata elvégzése után könnyen meg lehet szabadulni. Három fajta vektort konstruáltunk, mindegyikbe beépítve a fág funkcionális *attP* régióját. Ezek egymástól a *Rhizobium meliloti 41*-ben való replikációs képességükben különböztek. A pATT106 nagy, míg a pATT164 alacsony kópiaszámú a gazdabaktériumban, a pATT202 pedig nem képes replikációra. A plazmidok konjugációval bejuttathatók *Rhizobium meliloti 41*-be, ahol integrációra készíthetők a funkció kívülről történő adásával. Az integrációs illetve a kivágódási funkciók szolgáltatására egy speciális fágszármazékot, a 16-3ti3::Tn5 Δ 22-t használtunk, melyet dr. Olasz Ferenc kollégám konstruált. Ez az *attP* régió deléciója miatt integrálódásra képtelen, de a rekombinációs funkciói, és annak szabályozása sértetlenek. Egy egyszerű fágfertőzéssel ezek a funkciók transz helyzetből szolgáltatathatók. A két funkció között a választás is egyszerű, a fágon jelen lévő hőérzékeny ti3 mutáció miatt 28°C-on az integráció, míg 36°C-on a kivágódás dominál. Az integrációra képtelen fág feladata elvégzése után alacsony hőmérsékleten represszált állapotba kerül, nem replikálódik, így gyorsan kihígul a populációból. Természetesen ellenőriztük, hogy a rendszer elvárásainknak megfelelően működik-e. A pATT106 nem bizonyult a gyakorlati felhasználásra alkalmasnak. Az integráció ugyan bizonyíthatóan lejátszódott, de a kromoszómába beépült kópiának csak

deléciós származékait lehetett izolálni. Ennek oka feltehetően az, hogy a kromoszómába beépült, önálló, nagy kópiaszámú replikon interferál a gazda genomjának replikációjával, így arra nézve toxikus. A másik két vektor azonban megfelel az elvárásoknak, mind az integráció, mind a kivágódás bizonyíthatóan lejátszódott. A stabilitásukkal sem merült fel a fenti probléma. A pATT202 különösen alkalmasnak látszik idegen DNS bejuttatására a *Rhizobium meliloti 41* kromoszómájába, hiszen önálló replikációra ebben a baktériumban képtelen, így csak az integrálódott kópia maradhat fenn. Esetében nincs gond a nem integrálódott kópiáktól való megszabadulással sem. Stabilitását beépülés után két héten át tartó folyamatos tenyésztés után ellenőriztük, amikor is a plazmidot vesztett baktériumok száma kisebb volt mint 10^{-4} .



A tézisekhez felhasznált publikációk:

1. **Dorgai,L.**, Olasz,F., Berényi,M., Dallmann,G., Páy,A. and Orosz, L.:
Orientation of genetic and physical map of Rhizobium meliloti
temperate phage 16-3.
Mol. Gen. Genet. **182**:321-325, 1981
2. **Dorgai,L.**, Polner,G., Jónás,E., Garamszegi,N., Ascher,Z., Páy,A., Dallmann,
G. and Orosz,L.: The detailed physical map of the temperate phage 16-3 of
Rhizobium meliloti 41.
Mol. Gen. Genet. **191**:430-433, 1983
3. Olasz,F., **Dorgai,L.**, Papp,P., Hermesze,E., Kósa,E., and Orosz, L.:
On the site specific recombination of phage 16-3 of Rhizobium meliloti:
identification of genetic elements and att recombinations.
Mol. Gen. Genet. **201**:289-295, 1985
4. Hermesze,E., Olasz,F., **Dorgai,L.** and Orosz,L.:
Stable incorporation of genetic material into the chromosome of Rhizobium
meliloti 41: construction of an integrative vector system.
Gene **119**:9-15, 1992
5. **Dorgai,L.**, Papp,I., Papp,P., Kálmán,M. and Orosz,L.:
Nucleotide sequences of the sites involved in the integration of phage 16-3 of
Rhizobium meliloti 41.
Nucl. Acid Res. **21**:1671, 1993