SZENT ISTVÁN EGYETEM

DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

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

„Exciting discoveries await those who take the third way.”

„Izgalmas felfedezések várnak azokra, akik a harmadik utat választják.”

Thorsten Allers & Moshe Mevarech

Szüleimnek

Tartalomjegyzék

ÁBRA ÉS TÁBLÁZATJEGYZÉK IV

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE VI

1. BEVEZETÉS 1

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 5

2.1 AZ ŐSBAKTÉRIUMOK RENDSZERTANÁNAK, MORFOLÓGIÁJÁNAK, ANYAGCSERÉJÉNEK, GENETIKÁJÁNAK FŐBB JELLEMZŐI 5
2.2 ŐSBAKTÉRIUMOK, MODELL ORGANIZMUSOK 9
2.2.1 Thermoplasma acidophilum 11
2.2.1.1 Taxonómia 11
2.2.1.2 Élőhely és izolálás 11
2.2.1.3 Morfológia 12
2.2.1.4 Tenyésztés 12
2.2.1.5 Fiziológia 13
2.2.1.6 Genetika 14
2.3 EGY ÚJ GENETIKAI ESZKÖZRENDSZER LÉTREHOZÁSÁNAK ALAPJAI 16
2.3.1 Szilárd médium, mint a klonális szelekció alapfeltétele 16
2.3.2 Szelekciós markerek 18
2.3.3 Vektor konstrukciók 19
2.3.4 Transzformációs módszer 21
2.3.4.1 Polietilén-glikol (PEG) mediált transzformációs módszer 21
2.3.4.2 $CaCl_2$ kezelést követő hősokk transzformáció 22
2.3.4.3 Liposzóma mediált transzformáció 23
2.3.4.4 Elektroporáció 23
2.3.4.5 Magnetofekció 24
2.3.4.6 Génpuska – biolisztikus transzformációs módszer 25
2.4. *T. ACIDOPHILUM*, MINT A PROTEOMIKA MODELLSZERVEZETE 26

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 29

3.1 MIKROBA TÖRZSEK ÉS TÁPTALAJOK 29
3.1.1 Mikroba törzsek 29
3.1.2 Alkalmazott táptalajok és táptalaj komponensek 29
3.2 MIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATOK 31
3.2.1 Alkalmazott mikroszkópok 31
3.2.2 Különleges elektron-mikroszkópos eljárás 31
3.3 VEGYSZEREK ÉS REAGENSEK 31
3.4 PUFFEREK ÉS OLDATOK ÖSSZETÉTELE 31
3.5 FELHASZNÁLT KITEK ÉS ENZIMEK 31
3.6 MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK 32
3.6.1 Genomi DNS izolálás 32
3.6.1.1 T. acidohilum genomi DNS izolálás 32
3.6.1.1.1 Fenol-kloroformos DNS izolálás 32
3.6.1.1.2 Na-perklorát segítségével történő DNS izolálás 32
3.6.2 Agaróz gélelektroforézis 33
3.6.3 Vektor építés 33
3.6.4 Primer tervezés 34
3.6.5 Polimeráz láncreakció 35
3.6.6 Helyspecifikus mutagenezis 35
3.6.7 A PCR-termék tisztítása és fragmentek tisztítása gélből 36
3.6.8 Emésztés restrikciós endonukleázokkal 36
3.6.9 Transzformáció E. coli-ba 36

3.6.10 Dialízis transzformáció T. acidophilum-ba ... *37*
3. 6. 11. Magnetofekció általi transzformációs T. acidophilum-ba ... *37*
3. 6. 12. Liposzóma által mediált transzformáció T. acidophilum-ba ... *38*
3.6.13. Nukleotidsorrend meghatározás ... *38*
3. 7 STATISZTIKAI MÓDSZEREK ... 39

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK ... 41

4.1 *THERMOPLASMA* MÉDIUM OPTIMALIZÁLÁSA ... 41
4.1.1 Módosítások a Thermoplasma folyékony médiumban ... *41*
4.1.2 Natív élesztőkivonat hatásának vizsgálata ... *42*
4.1.3 Szilárd médium fejlesztése ... *44*
4.2 ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLATOK ÉS MARKER GÉNEK ... 47
4.2.1 Nukleinsav szintézis gátlók ... *47*
4.2.2 Fehérje szintézis gátlók ... *49*
4.2.3 A szelekciós markerekhez alkalmazott rezisztencia gének ... *52*
4.3 VEKTOR KONSTRUKCIÓK ... 55
4.3.1 Shuttle vektorok ... *55*
4.3.1.1 Plazmid izolálás T. acidophilum környezeti törzsekből ... 55
4.3.1.2 Kísérleteink során alkalmazott vektor konstrukciók – pSTA, pSTRif ... 56
4.3.2 Integratív vektorok ... *57*
4.3.2.1 pDTA és pNTA vektorok – helyspecifikus mutagenezis ... 57
4.3.2.2 pVTA – Thermoplasma volcanium gyrB ... 58
4.3.2.3 pDTA_synth és a mesterséges gyrB ... 59
4.3.2.4 pDTA_arr2 és a rifampicin rezisztencia ... 59
4. 3.3 Lineáris konstrukciók ... *59*
4.3.3.1 KO konstrukciók ... 60
4.3.3.2 HIS-tag konstrukciók ... 60
4.4 TRANSZFORMÁCIÓS MÓDSZER ... 62
4.4.1 Génpuska ... *62*
4.4.2 Magnetofekció ... *63*
4.4.3 Liposzóma mediált transzformáció ... *63*
4.4.4 Dialízis ... *63*
4. 5 REZISZTENS *T. ACIDOPHILUM* SEJTEK ANALÍZISE ... 66
4.5.1 Novobiocin rezisztens T. acidophilum sejtvonalak ... *66*
4.5.1.1 Antibiotikum érzékenységi tesztek ... 66
4.5.1.2 Molekuláris biológiai analízis ... 67
4.5.1.2.1 Plazmid fennmaradási tesztek ... 68
4.5.1.2.2 Genomi integráció igazolása ... 69
4.5.2 Rifampicin rezisztens T. acidophilum sejtvonalak ... *71*
4.5.2.1 Antibiotikum érzékenységi tesztek ... 71
4.5.2.2 Molekuláris biológiai analízis ... 72
4.5 2.2.1 Plazmid fennmaradási tesztek ... 72
4.5 2.2.2 Genomi integráció igazolása ... 73

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ... 76

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK ... 77

7. ÖSSZEFOGLALÁS ... 83

8. SUMMARY ... 86

1. MELLÉKLET: IRODALOMJEGYZÉK ... 89

2. MELLÉKLET ... 102

3. MELLÉKLET ... 106

4. MELLÉKLET ... 108

5. MELLÉKLET 110
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 111

ÁBRA ÉS TÁBLÁZATJEGYZÉK

1. ábra Ősbaktériumok filogenetikája (Allers and Mevarech, 2005) 6
2. ábra Az ősbaktériumok sejtmembrán felépítése 7
3. ábra *T. acidophilum* sejt keresztmetszeti képe (Darland et al., 1970) 12
4. ábra A HO-122 törzsből azonosított plazmid fizikai térképe (Yamashiro et al., 2006) 15
5. ábra integratív vektor általános térképe (a szerző saját ábrája) 20
6. ábra shuttle vektor általános térképe (a szerző saját ábrája) 21
7. ábra A DOTAP szerkezeti felépítése (Choosakoonkriang et al., 2001) 23
8. ábra A magnetofekció főbb lépései (HTTP2) 24
9. ábra Különböző magnetit mikrohordozók (HTTP3) 25
10. ábra A génpuskával történő transzformáció elvi magyarázata (HTTP4) 26
11. ábra A vizuális proteomika áttekintő ábrája (Nickell et al., 2006) 27
12. ábra Overlapping mega-primer módszer főbb lépései 33
13. ábra Növekedési test különböző koncentrációjú gyári élesztőkivonattal 41
14. ábra Növekedési teszt 2 gramm gyári élesztőkivonat és különböző mennyiségű élesztő vitamin jelenlétében 43
15. ábra Növekedési teszt 4 gramm gyári élesztő kivonat és különböző mennyiségű élesztő vitamin jelenlétében 43
16. ábra *T. acidophilum* telepek szilika-bázisú médiumon 44
17. ábra *T. acidophilum* telepek phytagel-bázisú médiumon 45
18. ábra *T. acidophilum* telepek gelrite-bázisú szilárd 45
19. ábra *T. acidophilum* telepek gelrite-bázisú szilárd médiumon 46
20. ábra *T. acidophilum* kumermicin érzékenységi teszt eredményei 47
21. ábra *T. acidophilum* novobiocin érzékenységi teszt eredményei 48
22. ábra *T. acidophilum* rifampicin érzékenységi teszt eredményei 49
23. ábra *T. acidophilum* anizomicin érzékenységi teszt eredményei 49
24. ábra *T. acidophilum* apramicin érzékenységi teszt eredményei 50
25. ábra *T. acidophilum* eritromicin érzékenységi teszt eredményei 50
26. ábra *T. acidophilum* klóramfenikol érzékenységi teszt eredményei 51
27. ábra *T. acidophilum* tiosztrepton érzékenységi teszt eredményei 51
28. ábra *T. acidophilum* tetraciklin érzékenységi teszt eredményei 52

29. ábra A HO-122 törzsből izolált plazmid (1), restrikciós hasítása *Nco*I-gyel (2) 56
30. ábra A pSTA shuttle vektor térképe..... 56
31. ábra A pTSRif shuttle vektor térképe 57
32. ábra A pDTA integratív vektor térképe 58
33. ábra A pVTA integratív vektor térképe 59
34. ábra Lineáris konstrukciók: KO_Ta1490_*synth_gyrB* és KO_Ta1490_*arr2*..... 60
35. ábra Lineáris konstrukció: HIS_Ta0895_*arr2*..... 61
36. ábra *E. coli* génpuska általi transzformáció eredménye..... 63
37. ábra Krio-elektronmikroszkópos felvétel *T. acidophilum* sejtekről normál állapotban (A) és dialízist követően (B) (Kofler, 2006) 65
38. ábra A dialízis-transzformáció főbb lépései 65
39. ábra Novobiocin érzékenységi tesztek különböző rezisztens sejtvonalakkal 67
40. ábra *T. acidophilum*-ból izolált, majd *E. coli* sejtekbe transzformált és újraizolált plazmidok restrikciós emésztése *Xho*I és *Eco*RI-*Xho*I enzimekkel 69
41. ábra A homológ rekombináció visszaigazolásának genomi alapjai 69
42. ábra *T. volcanium* novR *gyr*B gén specifikus PCR reakciójának eredményei 70
43. ábra *Synth_gyrB* gén specifikus PCR reakció eredményei 70
44. ábra Rifampicin érzékenységi teszt kölünböző sejtvonalak esetében..... 72
45. ábra *T. acidophilum*-ból (pSTRif) izolált, majd *E. coli* sejtekbe transzformált és újraizolált plazmidok restrikciós emésztése *Nco*I és *Sac*I enzimekkel 73
46. ábra *Arr*2 gén specifikus PCR reakció eredményei genomi DNS-re..... 74

1. táblázat Vizsgált mikroba törzsek 29
2. táblázat Alkalmazott táptalajok és táptalaj komponensek 29
3. táblázat Alkalmazott mikroszkópok 31
4. táblázat Alkalmazott vegyszerek és reagensek 102
5. táblázat Pufferek és oldatok összetétele.....104
6. táblázat Felhasznált kitek és enzimek 104

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Ani	anizomicin
Apr	apramicin
bp	bázispár
Cou	kumermicin – Coumermycin A1
Chl	klóramfenikol – Chloramphenicol
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
E. coli	*Escherichia coli*
Eri	eritromicin
gyrA	girázA gén
gyrB	girázB gén
JCM	Japanase Collection of Microorganisms
LB médium	Luria-Broth médium
Nov	novobiocin
Nov^R	novobiocin rezisztens
ORF	open reading frame – nyitott leolvasási keret
PCR	polimeráz láncreakció
PEG	polietilén-glikol
R136H	a 136-os pozícióban levő arginin módosítása hisztidinre
Rif	rifampicin
Rif^R	rifampicin rezisztens
*rop*B	DNS-dependens-RNS-polmeráz β-alegység
synth_gyrB	mesterséges Nov^R *gyrB* gén
T. acidophilum – TA	*Thermoplasma acidophilum*
TE puffer	TRIS-EDTA puffer
Tet	tetraciklin
Tio	tiosztrepton

1. BEVEZETÉS

Az ősbaktériumok felfedezését követően azok rögtön a tudományos érdeklődés középpontjába kerültek, mivel olyan tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek a prokarióta és az eukarióta sejtekre is jellemzőek, és melyeket sok esetben még extrém tulajdonságok egészítenek ki. A kezdeti vizsgálatok alapján úgy gondolták, hogy e 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 (DeLong & Pace, 2001). Felfedezésük után, a kutatók úgy vélték, hogy megtalálták a legősibb csoportot, amely magyarázatul szolgál számos evolúciós kérdésre, mivel ezek a mikroszervezetek képesek voltak az extrém körülményekhez adaptálódni, amelyek főként a Föld keletkezésének korai időszakában voltak jellemzőek. Emellett az ősbaktériumok a biotechnológusok érdeklődését is felkeltették, ugyanis enzimeik adaptálódtak az extrém környezeti körülményekhez (például kis víztartalmú közegekhez, magas hőmérséklethez), vagyis sokkal ellenállóbbak, mint a normál körülmények között aktív enzimek.

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 is lényegesen jobban hasonlítanak az eukariótákra, mint a baktériumokra, ezért is kerültek a kutatások fókuszába.

Egy különleges ősbaktériumot, a *Thermoplasma acidophilum*-ot választottam kutatásaim tárgyául. A mikroorganizmus extrém termoacidofil tenyészkörülményeihez meglepő morfológiai tulajdonság társul, a szervezet nem rendelkezik sejtfallal, ennek háttere nem teljes mértékben feltárt. 1970-ben történt izolálását követően azt feltételezték, hogy ez az organizmus az eukarióta sejtek őse (Searcy et al., 1978), de ez az elmélet hamar megdőlt az organizmus genom projektjének eredményei alapján. A 2000-ben befejezett genom projekt eredményei viszont feltárták a *T. acidophilum* számos egyedülálló tulajdonságát. A *T. acidophilum*-nak fontos szerep jut napjainkban az eukarióta fehérjék,

enzimkomplexek struktúrájának feltárásában. A szervezet kis mérete és a sejtfal teljes mértékű hiánya miatt ideális vizsgálati alanya a legmodernebb elektronmikroszkópián alapuló struktúrbiológiai vizsgálatoknak. Ilyen vizsgálatok segítették megérteni többek között az eukarióta sejtekben is megfigyelhető, a már szükségtelen fehérjék lebontását végző proteaszómák térbeli szerkezetét és funkcióját. Feltárták, hogy a *T. acidophilum*-ban lezajló proteolitikus folyamatok analógjai az eukarióta sejtekben zajló folyamatoknak, és így ezen enzimkomplexek vizsgálatának igen jelentős klinikai vonatkozásai vannak. Érdekes adalék, hogy az e szervezetben feltárt proteoszóma szerkezet a 2004-ben odaítélt kémiai Nobel díj, a humán proteoszóma működésének leírásához vezetett, melynek magyar származású díjazottja is volt, Avram Hershko személyében.

A *T. acidophilum*-mal folytatott intenzív proteomikai kutatások és genom projekt eredmények 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 eszközrendszer a *Thermoplasma* genus tagjainak genetikai manipulálására. Továbbá, e szervezet fehérjéi nem minden esetben alkalmasak a heterológ expresszióra, az *Escherichia coli*-ban kifejezett fehérjék, fehérje komplexek pedig sok esetben elveszítik biológiai aktivitásukat. Ez a hiányzó eszközrendszer lehetetlenné teszi számos fehérje szerkezet-funkció vizsgálatát, valamint az annotált genom 29%-át kitevő ismeretlen funkciójú fehérje biológiai hatás alapú azonosítását, továbbá az annotált genom 16%-át kitevő ismeretlen fehérjék vizsgálatát.

Munkám célja az eddig hiányzó alapvető genetikai eszközrendszer fejlesztése volt a *T. acidophilum* modellszervezet számára. Ennek elemei a következők voltak:

- Az organizmus rutinszerű tenyésztésének megoldása szilárd táptalajon, amely 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 tenyészkörülményeit.
- A genetikai elemek transzferére alkalmas vektorok és konstrukciók kialakítása, amelyek tartalmazzák a megfelelő szelekciós marker gént.

- Egy működő transzformációs rendszer fejlesztése, amellyel a vektorok, nukleinsav konstrukciók hatékonyan és megismételhető módon bejuttathatók az ősbaktérium sejtekbe.

A kitűzött célok megvalósulása teljesen új utakat nyithat a *Thermoplasma* kutatásban. Az ismeretlen funkciójú fehérjék szerepének feltárására a munkámat támogató müncheni Max Planck Intézet Struktúrbiológiai osztályán 80 célfehérjét jelöltek ki idáig és a kis mennyiségben jelenlevő nagy molekulakomplexek vizsgálatánál, a szerkezet-funkció relációk analízisénél is használnák a genetikai eszközrendszert.

A doktori értekezésben bemutatott kísérletek, eredmények és tézisek saját laboratóriumi vizsgálatokon és méréseken alapulnak, az eredmények összevetéséhez pedig az összegyűjtött és hivatkozott szakirodalom szolgált alapul.

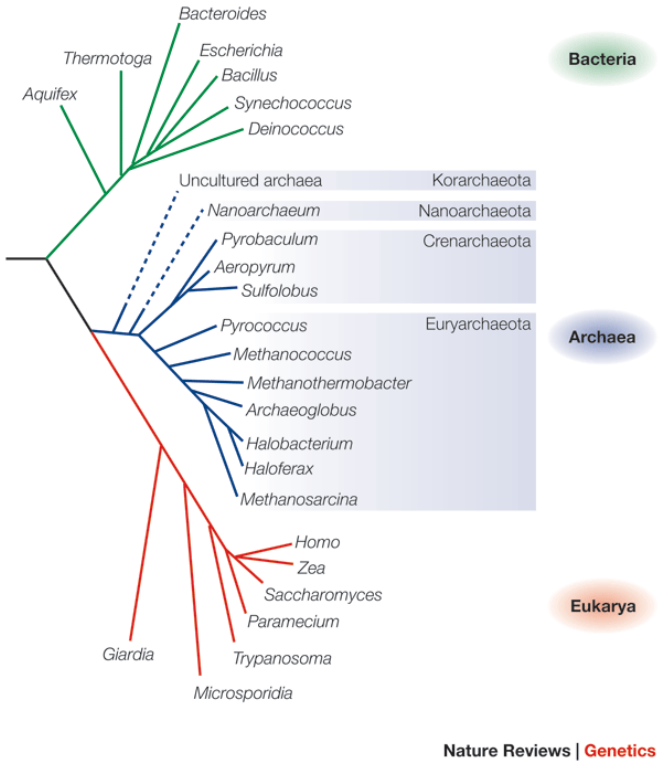
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Az ősbaktériumok rendszertanának, morfológiájának, anyagcseréjének, genetikájának főbb jellemzői

Az ősbaktériumokról vagy más néven archeákról kezdetben azt gondolták, hogy a baktériumok egy speciális csoportja, amelyek képesek extrém körülmények között élni. Az 1970-es években Carl Woese munkássága nyomán nyílt lehetőség ezen csoport taxonómiai elkülönítésére. Carl Woese volt az első, aki egy univerzális, minden mikroorganizmusban megtalálható riboszóma egyik alegységének nukleinsav sorrendje alapján vizsgálta a mikroorganizmusok rokonsági-leszármazási viszonyait (Woese & Fox, 1977). Az élővilág rendszerét ez alapján megreformálták és első lépésként 6 fő domént alakítottak ki: *Eubacteria, Archaebacteria, Protista, Fungi, Plantae, Animalia*. Ezt követően 1990-ben ezt módosították egy 3 domén-es rendszerre: *Bacteria, Archaea, Eukarya* (Woese et al., 1990).

Habár az *Archaea* és *Bacteria* filogenetikai szempontból két különálló domén, számos, főként morfológiai és a központi anyagcsere folyamataik tekintetében nagyon hasonlóak, viszont az *Archaea* domén molekuláris biológiai folyamatai, az információ feldolgozása nagyban hasonlít az *Eukarya* doménhez (Allers & Mevarech, 2005).

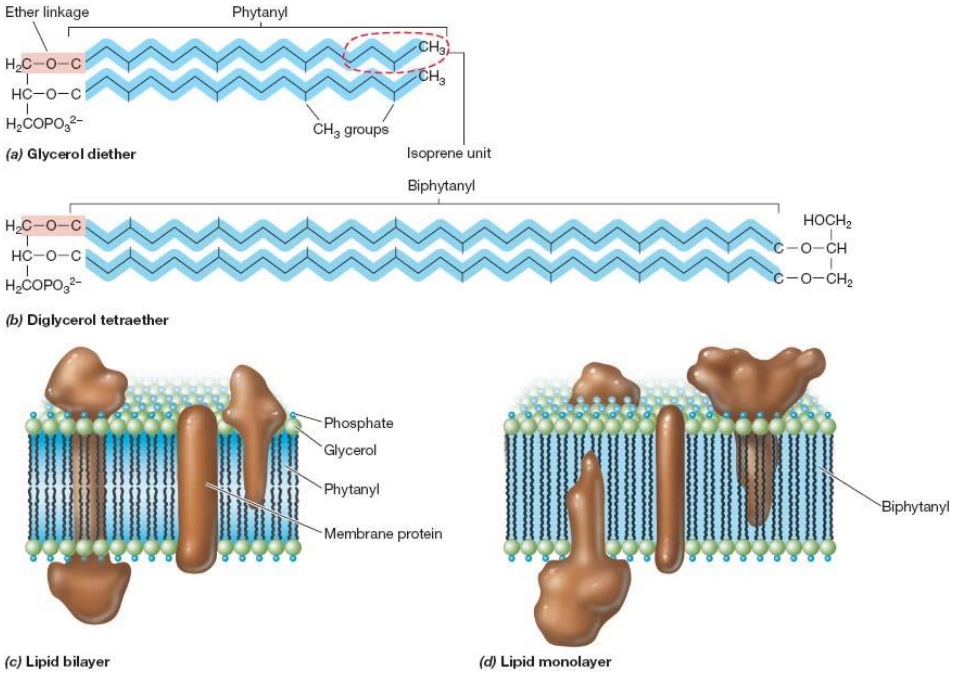
Az *Archaea* domén 4 törzsből áll: *Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota, Nanoarchaeota* (**1. ábra**).



1. ÁBRA ŐSBAKTÉRIUMOK FILOGENETIKÁJA (ALLERS AND MEVARECH, 2005)

Morfológiai szempontból a számos hasonlóság (*Archaea-Bacteria*) mellett az egyik jelentős különbség az ősbaktériumok sejtmembránja, melynek alkotóelemeiben a lipidekben éter és nem észter kötések vannak. A legjelentősebb lipid komponens az ősbaktériumok membránjában a glicerol-diéter, amelyhez 20 szénatomból álló egység kapcsolódik, és a diglicerol-tetraéter, amelyhez 30 szénatomból álló egység kapcsolódik. Ez a szerkezet általában eredményezhet kettős lipid-réteget és egyszeres lipid-réteget is (**2. ábra**).

Az ősbaktériumok sejtfalát nem a bakteriális genetikában ismert jellegzetes peptidoglikán (más néven murein) alkotja, hanem különböző poliszacharidok, fehérjék és glikoproteinek. A metánt és természetes gázokat termelő ősbaktériumok (metanogének) sejtfalát pszeudomurein alkotja, amely egy mureinhez hasonló poliszacharid. Viszont míg a mureint N-acetil-glükózamin és N-acetil-muraminsav alkotja, addig az pszeudomureinnél a második komponens N-acetil-tallózamin-uronsav. Például *Methanosarcina* fajok esetében a sejtfalat más poliszacharidok alkotják, úgymint a glükóz, glükuronsav és acetát.



2. ÁBRA AZ ŐSBAKTÉRIUMOK SEJTMEMBRÁN FELÉPÍTÉSE

A sejtmembrán alkotóelemeit az ábra a. és b. részei mutatják, míg az egyrétegű és kétrétegű lipid membránt a c. és d. részek (Madigan et al., 2008).

Az ősbaktériumok az anyagcsere folyamatok szempontjából a legkülönlegesebb élőlények. Unikális metabolikus útvonalak egész arzenáljával rendelkeznek, számos különböző szén és energiaforrást képesek hasznosítani. Energiaforrás szempontjából megkülönböztetünk oxigén, nitrát, szulfát, kén, fémion (vas, arzén vagy szelén) légzőket, és metanogenezisre képes fajokat (Blum, 2008). A központi anyacsere folyamatok, glikolízis, glükoneogenezis, citrát ciklus, részben hasonlítanak a baktériumok központi anyagcsere folyamataira (Zillig, 1991). Habár számos enzim megegyezik a baktériumok által termeltekkel, jónéhány esetben csak ősbaktérium-specifikus enzimeket azonosítottak, mint például egy bifunkcionális fruktóz-1,6-bifoszfátot, melyet thermofil ősbaktériumokból izoláltak és a glükoneogenezisben játszik szerepet (Sato & Atomi, 2011). Az ősbaktériumokban a cukor metabolizmus a klasszikus vagy egy módosult Embden-Meyerhof és Entner-Doudoroff útvonalon zajlik, amelyekben számos olyan enzim vesz részt – például ADP-dependens glükokináz -, amelyek más doménekben nincsenek is jelen (Sato & Atomi, 2011).

Az ősbaktériumok genetikai felépítése és szerveződése részben bakteriális, részben eukarióta jegyeket hordoz, emellett számos egyedi tulajdonsággal rendelkeznek.

Általában egy cirkuláris kromoszómát hordoznak, amely nincsen membránnal elzárt sejtrészecskében – ebben például a baktériumokhoz hasonlítanak, – emellett extrakromoszómális elemeket is tartalmaznak, például plazmidokat; ezeket ugyanúgy képesek átadni egymás között, mint a baktériumok. A baktériumokhoz hasonlóan a gének operonokba szerveződtek, vagyis egy szabályozó régió egyszerre több, a DNS-en egymás után levő, fehérje szintézisét szabályozza. Viszont az információ feldolgozásában részt vevő enzimek és molekulák szerkezetükben és felépítésükben főként az eukariótákra hasonlítanak. A DNS szerkezetében kiemelkedő szerepet játszó fehérjék, az eukarióta genetikából már jól ismert hisztonok homológjai az *Euryarchaeaota* csoportban is megtalálhatóak, míg *Crenarchaeota* ősbaktériumok teljesen más DNS-kötő fehérjéket alkalmaznak (White & Bell, 2002). Wolfram Zillig és munkatársai részletes vizsgálatokat végeztek a 80-as években az ősbaktériumokban található DNS-dependens-RNS-polimerázzal, és felismerték, hogy az ősbaktériumok ezen polimerázának központi egysége strukturálisan sokkal közelebb áll az eukarióta RNS-polimeráz II enzimhez, mint a bakteriálishoz (Huet et al., 1983). Emellett, hasonlóan az eukarióta RNS-polimeráz II-höz, az ősbaktériumok RNS-polimeráza is igényel több, a genomon elhelyezkedő, felismerő helyet a hatékony promóter felismerés és szabályozás érdekében. Az ősbaktériumoknál is azonosítottak egy TATA-box-hoz hasonló strukturát, melyet kezdetben AT-gazdag felismerő régiónak véltek, majd a helyzetéből fakadóan – 25 bp upstream található az első struktúrgéntől – felismerték a hasonlóságot az eukarióta TATA-box-szal (Garrett & Klenk, 2007; Thomm, 1996); emellett szintén azonosították a eukariótákkal homológ transzkripciós faktort (TFB) (Bell & Jackson, 2001). Ezzel párhuzamosan felfedeztek transzkripciós szabályozó elemeket, amelyek homológok a baktériumoknál találhatóakkal, többek között helix-turn-helix régiókat, amelyek DNS-kötő domének (Aravind & Koonin, 1999). Az ősbaktériumokban a transzláció folyamata nem olyan részletesen tanulmányozott, mint a transzkripció, viszont komplexitását tekintve az eukariótákra hasonlít a mechanizmus, az ősbaktériumokban és eukariótákban több, mint tíz iniciációs faktort azonosítottak, míg baktériumokból csak hármat. Ezenkívül a transzláció kezdetéhez az ősbaktériumok és az eukarióták metionint használnak, míg a baktériumok N-formil-metionint. Összességében elmondható, hogy az ősbaktériumok központi anyagcsere funkciói és útvonalai a baktériumokra hasonlítanak, míg az információ feldolgozás folyamatai jellegzetesen az eukariótákra.

2.2 Ősbaktériumok, modell organizmusok

Számos ősbaktérium vált modell organizmussá a felfedezésük óta, mivel olyan tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek egyediek az élővilágban, sehol máshol nem találhatóak meg, mint például a metanogenezis, vagy más doménre (*Eukarya*) jellemző tulajdonságaik vannak, viszont lényegesen egyszerűbb felépítésűek. Ezenkívül az ősbaktériumok olyan körülmények között képesek élni, amelyek a Föld keletkezésekor voltak jellemzőek, ezáltal megismerésük segítséget nyújthat az evolúció és az élet kialakulásában megértésében (Fani & Fondi, 2009).

Az ősbaktériumok között is négy kiemelkedő fő modell organizmus csoport van:

Methanogens - metanogének

A metanogének minden esetben anaerob körülmények között élnek, ahol a szerves anyagok lebontásának végső terméke a metán, melyet a metanogének termelnek, innen származik a nevük. A metanogenezisről úgy tartják, hogy a Földön kialakult egyik első metabolizmus típus, amely a fotoszintézissel versenyzett (Kasting & Siefert, 2002). Már csak a metanogenezis folyamata miatt is kiemelkedő csoportról van szó, emellett az ősbaktériumok transzkripciós, transzlációs folyamatainak és ozmoregulációjának modell szervezetei (Geiduschek & Ouhammouch, 2005; Spanheimer & Müller, 2008; Walters & Chong, 2009). Az ősbaktérium közül az első faj, melynek teljes genom szekvenciáját megfejtették, a metanogén *Methanocaldococcus jannaschii* volt (Bult et al., 1996). A metanogének közül két csoport emelkedik ki a *Methanococcus* és *Methanosarcina*, amelyeknek genomi manipulációs eszköztárát már kifejlesztették (Leigh et al., 2011).

Halophiles - halofilek

Az ősbaktériumokon kívül baktériumok, gombák és algák is életképesek magas sókoncentráció jelenlétében, viszont az ősbaktériumok az egyedüli csoport, amely képes az ozmotikus egyensúlyt úgy fenntartani a környezettel, hogy a citoplazmájukban ekvimoláris mennyiségű sót halmoznak fel (Oren, 2008). Más organizmusok az úgynevezett „salt-out” stratégiát alkalmazzák, vagyis megkísérelik eltávolítani a felesleges sót a citoplazmából, e folyamat meglehetősen nagy energiaigényű, ezért is válhattak a halofil ősbaktériumok a magas sótartalmú közegek domináns csoportjává, néhány kivételtől eltekintve (pl. a *Salinibacter ruber* baktérium

hasonló stratégiát folytat, mint a halofil archaeák) (Oren, 1999; Oren et al., 2002). Mivel az ősbaktériumok halofilek, fehérjéik és enzimeik képesek kimondottan nagy sókoncentráció és kis vízellátottság mellett is hatékonyan működni, így kiemelkedő előnnyel rendelkeznek biotechnológiai szempontból és a strukturális biológiai vizsgálatokban is fontos szerepük van. A halofilek ma már teljes genetikai eszköztárral rendelkeznek, és ezen csoport tagjainál oldották meg elsőként az idegen DNS bejuttatásának problémáját, vagyis a transzformációt (Charlebois et al., 1987; Cline et al., 1989).

Thermococcales

A *Thermococcales* csoport tagja hipertermofilek, az optimális növekedéshez 80 ^{o}C feletti hőmérsékletet igényelnek, enzimeik kiemelkedő fontosságúak voltak az enzim aktivitás hőfüggésének megértésében és azon strukturális jegyek azonosításában, amelyek a thermostabilitásért felelnek (Daniel et al., 2010). A proteomikai kutatások mellett az archea genetika és információ feldolgozás megértésében is jelentős szerepük van (Hirata et al., 2008; Mayanagi & Kiyonari, 2009; Yoshimochi et al., 2008), továbbá szén és energia metabolizmusuk is részletesen kutatott (Siebers & Schönheit, 2005; Verhees et al., 2003). A *Thermococcales* renden belül négy faj van, amelynek genetikai manipulációja már megoldott, ezek az alábbiak: *Pyrococcus abyssi, Pyrococcus furiosus, Thermococcus kodakarensis* és *Thermococcus onnurineus* (Atomi et al., 2012)

Sulfolobales

A *Crenarchaeota* törzs egyetlen rendjében oldották eddig meg a genetikai manipulációt, a *Sulfolobales* rend tagjainál, amelyek optimális növekedésükhöz thermoacidofil körülményeket igényelnek (hőmérsékleti optimum 70–85 ^{o}C, pH 2–3). Ezen szervezetek az ősbaktériumok információ feldolgozásának (transzkripció, transzláció, replikáció) és sejt metabolizmusának modellszervezetévé váltak (Duggin et al., 2008; Siebers & Schönheit, 2005). Emellett egyre inkább a strukturális proteomikai vizsgálatok fókuszába kerülnek, mivel fehérjéik módfelett alkalmasak a 3D strukturális vizsgálatokra. A rend tagjai – mint például *Sulfolobus acidocaldarius, Sulfolobus islandicus, Sulfolobus solfataricus* fajok - rendelkeznek teljes genetikai eszköztárral, melyek alkalmazása napjainkban már rutinszerű (Berkner & Lipps, 2008; Leigh et al., 2011).

2.2.1 *Thermoplasma acidophilum*

2.2.1.1 Taxonómia

Az általunk vizsgált *Thermoplasma acidophilum* DSM 1728 taxonómiai besorolása a következő (Huber & Stetter, 2006):

Domén : *Archaea*

Törzs: *Euryarchaeota*

Osztály: *Thermoplasmata*

Rend: *Thermoplasmatales*

Család: *Thermoplasmataceae*

Nemzetség: *Thermoplasma*

Fajok: *Thermoplasma acidophilum*

Thermoplasma volcanium

A *Thermoplasmatales* rendbe egészen 1995-ig egyetlen család és nemzetség tartozott, a *Thermoplasmataceae* – *Thermoplasma*. Majd először a *Picrophilaceae,* majd a *Ferroplasmaceae* családok tagjait izolálták és azonosították (Golyshina et al., 2000; Schleper et al., 1995). A rend minden tagja fakultatív anaerob, termoacidofil és autotróf vagy heterotóf anyagcseréjű. A *T. acidophilum* fajt elsőként Darland és munkatársai izolálták. Egészen az 1970-es évek végéig úgy vélték, hogy a *Mycoplasmatales* rendbe (*Bacteria*) tartozik (Darland et al., 1970). A 70-es évek végén Carl Woese és munkatársai elsőként reformálták meg az élővilág rendszerét, majd a *Mycoplasma* csoportot is részletesebb analízisnek vetették alá (Woese & Fox, 1977; Woese et al., 1980), ekkor sorolták az ősbaktériumok közé.

2.2.1.2 Élőhely és izolálás

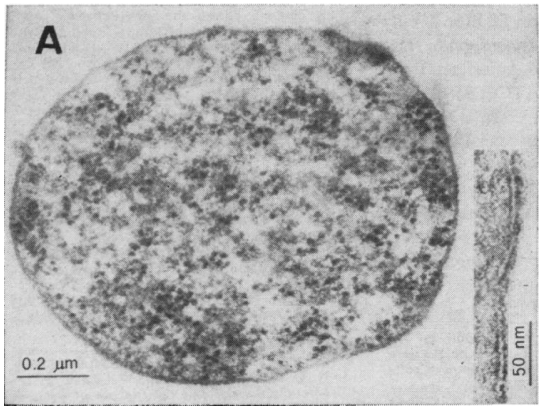
Első törzseit egy szénbánya felmelegedő meddőhányójából izolálták (Friar Tuck Bánya, Délnyugat Indiana, Egyesült Államok) a hatvanas években (Darland et al., 1970), ezzel párhuzamosan igazolták azt a teóriát, hogy a szervezet csak emberi beavatkozás következében keletkezett élőhelyen fordul elő, természetes közegben, mint például a Yellowstone Park savas forrásaiban nem (Belly et al., 1973), bár ezt a későbbiek során megcáfolták. 1988-ban Segerer és munkatársainak sikerült különböző szolfatara területekről (Azori-szigetek, Olaszország - Nápoly) *T. acidophilum* törzseket azonosítani, emellett felfedezték a közel rokon *Thermoplasma*

volcanium fajt (Segerer et al., 1988). Ezt követően 1995-ben japán melegvizű forrásokból (Hakone, Japán) is sikerült számos törzset izolálni, melyeket *T. acidophilum* fajként azonosítottak, viszont morfológiájukban különböznek az eddig leírtaktól (Yasuda et al., 1995a).

A thermoplasma-k eredeti élőhelye minden esetben meleg, 50 ^{o}C-fölötti miliő (Friar Tuck bánya: 56 ^{o}C; Hakone: 53-63 ^{o}C; Nápoly: 50-85 ^{o}C), amely jelentősen savas pH-val (Friar Tuck bánya pH 1,96; Hakone pH 2,5-3,5; Nápoly pH 1-4,5) jellemezhető környezet volt. Aerob és anaerob körülmények közül is izolálták e faj képviselőit.

2.2.1.3 Morfológia

A *T. acidophilum* sejtek gömbölyded vagy szabálytalan alakúak, méretük igen változó lehet, átmérőjük 0,2 és 5,0 µm között váltakozik (**3. ábra**). A szervezet nem rendelkezik sejtfallal, csak egy háromrétegű, 5-10 nm vastag membrán határolja, ami meglepő a mikroba különleges környezeti igényei tükrében. Membránja egy egyrétegű tetraéter-lipidből épül fel, melyhez mannóz és glükóz oligoszacharid láncok kapcsolódnak, emellett tartalmaz glikoproteint és lipoglikánt, ez utóbbit tartják felelősnek a szervezet rendkívüli toleranciájáért. A szervezet rendelkezik flagellummal, mely általában monopoláris és monotrich, de néhány esetben megfigyeltek multiflagellumot is (Black & Freundt, 1979).



3. ÁBRA *T. ACIDOPHILUM* SEJT KERESZTMETSZETI KÉPE (DARLAND ET AL., 1970)

2.2.1.4 Tenyésztés

Számos folyékony médiumot fejlesztettek ki a *T. acidophilum* aerob tenyésztéséhezí. A törzs első izolálásánál Darland és munkatársai a legkevésbé komplex médiumot alkalmazták, amely tartalmazott 3 g KH_2PO_4 -ot, 1 g $MgSO_4$-ot, 0,25 g $CaCl_2$-ot, 0,2 g $(NH_4)SO_4$-ot, 1 g élesztőkivonatot és 10 g glükózt 1 liter

médiumra vonatkoztatva. A élesztőkivonatból és glükózból külön steril oldatot készítettek, amit utólag adtak a steril médiumhoz (Darland et al., 1970). A tenyésztés ezzel a táplevessel nagyjából három hetet vett igénybe. Ezt a médiumot módosították Yasuda és munkatársai, kiegészítették kazaminosavval és $NaCl_2$-dal, emellett a komponensek mennyiségét is optimalizálták és a glükózt kihagyták a rendszerből. A Yasuda-médium összetétele az alábbi (1 liter médiumra vonatkoztatva): 1 g élesztőkivonat, 1 g kazaminosav, 0,3 g KH_2PO_4, 0,25 g $MgSO_4$, 0,05 g $CaCl_2$, 1,3 g $(NH_4)SO_4$, 0,2 g NaCl (Yasuda et al., 1995a). Christiansen és munkatársai fejlesztették a legkomplexebb médiumot: 100 ml Médium B-t, 10 ml Médium A-t, 100 ml 10%-os glükóz oldatot, 20 ml 10%-os élesztő oldatot tartalmazott, minden médiumot külön sterileztek, majd 1000 ml-re egészítették ki steril ultratiszta vízzel és pH 2-re állították tömény kénsavval. Médium A összetétele (g/liter): 1,93 g $FeCl_3{*}6H_2O$, 0,18 g $MnC1{*}4H_2O$, 0,45 g $Na_2B_4O_7{*}10H_20$, 0,022 g $ZnSO_4{*}7H_2O$, 0,005 g $CuC1_2{*}H_2O$, 0,003 g $NaMoO_4{*}2H_2O$, 0,003 g $VOSO_4{*}2H_2O$, 0,001 g $CoSO_4$. Médium B összetétele (g/liter): 13,2 g $(NH_4)_2SO_4$, 3,72 g KH_2PO_4, 2,47 g $MgSO_4{*}7H_2O$ és 0,74 g $CaC1_2{*}2H_2O$ (Christiansen et al., 1975).

A szervezet anaerob körülmények közötti tenyésztésekor 0,4% (w/v) elemi kénnel egészítették ki a médiumot, továbbá a légkört N_2, N_2/CO_2 (80:20 v/v) vagy H_2/CO_2 (80:20 v/v) gázokra cserélték le (Huber & Stetter, 2006; Segerer et al., 1988).

2.2.1.5 Fiziológia

A *T. acidophilum*, éppúgy a *Thermoplasma* nemzetség minden tagja, obligát heterotróf, fakultatív anaerob és termoacidofil. A szervezetet laboratóriumi körülmények között csak komplex médiumban voltak ezidáig képesek szaporitani, melyet élesztőkivonattal egészítettek ki. Továbbá igazolták, hogy az élesztőkivonat előállításának módja nagyban meghatározza annak növekedést serkentő hatását. Emellett feltétlezték, hogy egy 8-10 aminosav hosszúságú oligopeptid felelős a növekedést serkentő hatásért (Smith et al., 1975). Továbbá igazolták, hogy az élesztőkivonatot felválthatja húskivonat vagy bakteriális biomasszából készült kivonat is (Segerer et al., 1988). A mikroba növekedését fokozza a szénhidrátok jelenléte, szacharóz, glükóz, mannóz, galaktóz és fruktóz, habár hiányukban is képes szaporodni. Nem tapasztaltak növekedést csak cukor vagy csak élesztőkivonat jelenlétében (Huber & Stetter, 2006). Egészen 1988-ig úgy tartották, hogy a *T. acidophilum* nem képes szaporodni anaerob körülmények között, ekkor igazolták,

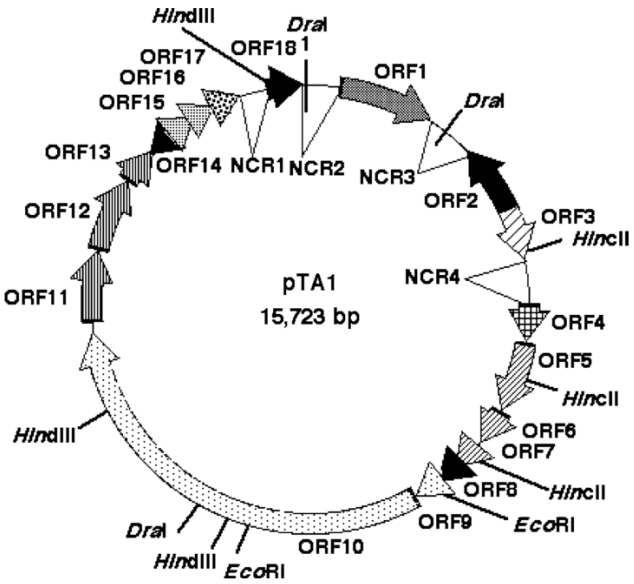
hogy a szervezet képes szulfátlégzésre (Segerer et al., 1988). A mikroba szaporodásához 45-67 ^{o}C szükséges, az optimális hőmérséklet 59 ^{o}C körül van, továbbá a szervezet képes növekedni a 0,5–4 pH tartományban, az optimális pH 2 körül van. Neutrális pH-n a sejtek spontán lízise következik be, mely nagyban megkönnyíti a fehérje és nukleinsav izolálást a szervezetből.

2.2.1.6 Genetika

A *T. acidophilum* DSM 1728 törzs teljes genomját 2000-ben fejtették meg Ruepp és munkatársai. A genom teljes mérete 1 564 905 bázispár, mely az akkor már azonosított genomok közül az egyik legkisebb. Azonosítottak 1509 nyitott leolvasási keretet (ORF – open reading frame), a G+C arány 46,0%, melyek közül 360 ORF (23,9%) csak a *T. acidophilum* genomjában található meg. A többi fehérje homológia szempontjából az alábbi módon oszlik meg: 185 (12,3%) csak az archeákban található fehérjékkel homológ, 254 (16,8%) archeákban és baktériumokban található fehérjékkel homológ, 66 (4,4%) archeákban és eukariótákban található fehérjékkel homológ, 40 (2,6%) csak baktériumokban található fehérjékkel homológ, 24 (1,6%) baktériumokban és eukariótákban található fehérjékkel homológ, 6 (0,4%) csak baktériumokban található fehérjékkel homológ, 574 (38%) archeákban, baktériumokban és eukariótákban is megtalálható fehérjékkel homológ (Ruepp et al., 2000). A *T. acidophilum* genomjában azonosított géneket két nagy csoportba lehet sorolni: „háztartási” vagy ’housekeeping” gének, amelyek főként a filogenetikai eredetre utalnak; „lifestyle” gének, melyek főként a szervezet specifikus környezeti igényeit tükrözik vissza, ezek a gének fehérjéi főként az anyagcserében vesznek részt (Ruepp et al., 2000). A genom projekt során azonosított fehérjék 29%-ának nem ismert a funkciója, továbbá a fehérjék 16%-a nem mutat hasonlóságot eddig ismert fehérjeszekvenciákkal. A riboszómális gének (mRNS, tRNS, rRNS) közül mind a három jelen van a genomban, viszont ellentétben más ősbaktériumokkal szétszórva vannak jelen a genomban. Az azonosított fehérje gének közül 252 (16.7%), amelyek főként a fehérjék lebontási útvonalában és transzportjában vesznek részt, a legnagyobb homológiát a *S. solfataricus* faj fehérjéivel mutatta, ami nem meglepő, figyelembe véve a két faj hasonló környezeti igényeit (Huber & Stetter, 2006). A genomi vizsgálatok során továbbá azonosítottak egy DNS-kötő fehérjét, amely nagyban hasonlít az eukarióta sejtekben megtalálható hisztonhoz, többek között

aminosav szekvenciában is, és hiszton-like protein-nek (Hta) nevezték el (DeLange et al., 1981).

A *T. acidophilum* típustörzsének (DSM 1728) genom analízise során nem azonosítottak extrakromoszomális genetikai elemet, például plazmidot. 1995-ben japán kutatók számos plazmidot azonosítottak a meleg vizű forrásból izolált törzsekből, ezek közül egy a pTA1 plazmid, amelyet a későbbiekben részletesen jellemeztek (Yasuda et al., 1995b). A plazmid 15,2 kbp nagyságú, 7–13 kópiaszámú (**4. ábra**). A pTA1 plazmidon tizennyolc ORF-et (Open Reading Frame – Nyitott Leolvasási Keret) azonosítottak, melyek termékei az ORF1-es gén termékét kivéve egyetlen eddig leírt szekvenciával sem egyeznek (Yamashiro et al., 2006). Az ORF1-es gén terméke hasonlóságot mutatott a Cdc6 genom replikációs iniciátor fehérjével, amelyet archeákban és eukariótákban is azonosítottak már (Giraldo, 2003).



4. ábra A HO-122 törzsből azonosított plazmid fizikai térképe (Yamashiro et al., 2006)

Yasuda és munkatársai a japán melegvizű forrásból izolált törzsek közül létrehoztak egy novobiocin rezisztens sejtvonalat (HO-62N1C). Az eredetei HO-62-es sejtvonalat hosszú időn keresztül (3 hónap) inkubálták alacsony novobiocin koncentráció jelenlétében (Yasuda et al., 1995a). A későbbiek folyamán megállapították a sejtvonal novobiocin érzékenységét: IC_{50} 1000 ng/ml, amely 100-szoros rezisztencia növekedést jelent a vad típushoz képest (HO-62 IC_{50} 10 ng/ml). Összehasonlítva a HO-62N1C és a típustörzs giráz szekvenciáját, azonosították a giráz génben történt

mutációkat: 8 aminosav a *gyrA* alegységben és 9 aminosav a *gyrB* génben mutálódott (Yamashiro & Yamagishi, 2005). Szakirodalmi adatok alapján tudjuk, hogy számos aminosav a *gyr*B génen kulcsfontosságú a novobiocin rezisztencia szempontjából. Halofil ősbaktériumoknál állapították meg, ha három aminosavat kicseréltek, a törzs rezisztenciája 1000-szeresre nőtt. Az egyik ilyen aminosav a 136-os pozícióban levő arginin, melyet hisztidinre cseréltek ki az említett halofileket érintő kísérletben (Holmes & Dyall-Smith, 1991). A HO62N1C törzs *gyrB* génjén is elvégezték ezt a mutációt (R136H), amely az *in vivo* kísérletek során további 4,6-szoros rezisztencia növekedést okozott (Yamashiro & Yamagishi, 2005).

2.3 Egy új genetikai eszközrendszer létrehozásának alapjai

Egy működő genetikai eszközrendszernek négy alappillére van:

1. Genetikailag homológ sejtvonalakkal való munka képessége – klonális szelekció

2. A vad típus és a transzformáns elkülönítése – szelekció

3. Vektor konstrukciók

4. Transzformációs módszer a genetikai anyag bejuttatására a célszervezetbe.

2.3.1 Szilárd médium, mint a klonális szelekció alapfeltétele

A rutinszerű klonális munka kivitelezéséhez elengedhetetlen a szilárd táptalajon való tenyésztés, mert ezzel a módszerrel lehet genetikailag homológ sejtvonalakat létrehozni. Robert Koch az 1860-as években dolgozta ki a szilárd táptalajon történő tenyésztés alapjait és ezáltal tiszta tenyészeteket hozott létre, megteremtve a modern mikrobiológia alapjait. A szilárd táptalaj az esetek többségében a mikroorganizmus folyékony médiuma megszilárdítva. A legelterjedtebb szilárdító ágens a tengeri algából kivont agar (vagy agar-agar), amely egy komplex poliszacharid, olvadáspontja 84 ^{o}C és 37 ^{o}C-on szilárdul meg. Az ősbaktériumoknál csak elenyésző esetben lehet az agart, mint szilárdító ágenst alkalmazni (Pritchett et al., 2004). Az esetek túlnyomó részében az extrém tenyészkörülmények (magas hőmérséklet, alacsony pH) miatt az agar nem képes megszilárdítani a médiumot. Kevés olyan szilárdító ágenst azonosítottak ez idáig,

amely képes az extrém körülményeket tolerálni, ezért sok ősbaktérium– többek között az általunk vizsgált *T. acidophilum* – esetében nem megoldott a rutinszerű szilárd táptalajon történő tenyésztés. Mostanáig három szilárdító ágenst alkalmaztak az archea genetikában: gelrite, noble agar és phytagel. A phytagel egy bakteriális szénhidrát, amely glükuronsavat, ramnózt és glükózt tartalmaz; főként növényi szövetek tenyésztésére használják az agar helyettesítésére. Néhány esetben már alkalmazták ősbaktériumok tenyésztésére, többek között a *Thermogymnomonas acidicola* (Itoh et al., 2007) és *S. islandicus* (Zheng et al., 2012) fajok szaporítására 0,8–1,2%-os koncentrációban. A noble agar az agarnak egy nagy tisztaságú típusa, amely nem tartalmaz szennyeződéseket. A *Methanococcus maripaludis* faj esetében sikeresen alkalmazzák a noble agart 1,5%-os koncentrációban szilárdító ágensként (Sandbeck & Leigh, 1991). Az ősbaktérium genetikában legelterjedtebben alkalmazott szilárdító ágens a gelrite, egy nagy tisztaságú heteropoliszacharid, amely nem tartalmaz olyan szennyeződéseket, ami gátolhatná a mikroorganizmus szaporodását; továbbá magas hőmérsékleten stabil, ami a termofil mikroorganizmusok tenyésztése szempontjából jelentős. A gelrite megszilárdulásához szükség van egyértékű vagy kétértékű kation jelenlétére, ami általában magnézium vagy kálcium; a legjobb eredményeket $CaCl_2$ alkalmazásával érték el. A gelrite-ot *Sulfolobus* fajok és *P. furiosus* esetében már rutinszerűen alkalmazzák magas hőmérsékleten (75– 85 ^{o}C-on) (Aucelli et al., 2006; Waege et al., 2010).

T. acidophilum esetében Black és munkatársai az 1980-as években kifejlesztettek egy noble agar bázisú szilárd médiumot, hogy vizsgálják a szervezet flagellációját és úszási képességét (Black & Freundt, 1979). Japán kutatók különböző morfológiájú *T. acidophilum* törzseket izoláltak egy 0,6%-os gelrite bázisú szilárd médiumon, 30 napos inkubációs időt követően 1 mm átmérőjű tükörtojás formájú telepeket figyeltek meg (Yasuda et al., 1995a).

Néhány esetben használják az úgynevezett extinkciós hígítás technikát, amikor a kevert mintát egy sejtre hígítják, majd ezt követően tenyésztik. Többek között e módszer segítségével vizsgálták a fekete füstölők ősbaktérium populációit (Takai & Komatsu, 2001), hipertermofileket (Baross, 1995) vagy a *Thermoplasma* rendbe tartozó *Ferroplasma acidiphilum* első törzsét is (Golyshina & Timmis, 2005). A módszer nagy hátránya, hogy néhány mikroorganizmus nem képes szaporodni egy bizonyos kiindulási sejtkoncentráció alatt és a módszer kimondottan időigényes.

2.3.2 Szelekciós markerek

A szelekciós markerek, – melyek a vad típusú és genetikailag manipulált sejtek elkülönítésére szolgálnak – a genetikai anyag bejutásával a célszervezetet új tulajdonsággal, szelekciós előnnyel ruházzák fel. Erre a feladatra a legkülönbözőbb szelekciós ágensek használatosak, melyek közül legelterjedtebbek, egyszerű alkalmazhatóságuk miatt, az antibiotikumok. Emellett szelekciós markerként auxotrófiát is szoktak használni, amikor a mutáns törzs nem képes előállítani egy adott szerves vegyületet (például aminosavat vagy vitamint), és annak hiányában nem képes növekedni, míg a vad típus képes. Ilyen például az élesztő genetikában és a *Sulfolobus* fajoknál is használatos uracil-auxotrófia vagy az *E. coli* baktériumnál használatos fenilalanin auxotrófia (Kurosawa & Grogan, 2005). A mutánsok szelekciója replika technikával történik.

A bakteriális genetikában hagyományosan használt antibiotikumok a legtöbb esetben hatástalanok az extrém környezeti feltételek vagy az ősbaktériumok fiziológiai-szerkezeti adottságai miatt. Például az antibiotikumok nagy része nem képes tolerálni a magas hőmérsékletet, sótartalmat vagy az alacsony pH-t, amely a legtöbb ősbaktérium optimális növekedéséhez szükséges. Tovább nehezíti a szelekciót, hogy az ősbaktériumok számos olyan fiziológiai-szerkezeti tulajdonsággal rendelkeznek, amelyekre hatástalanok a bakteriális antibiotikumok, ilyenek például a sejtfal szintézist gátló penicillin származékok. Ennek ellenére néhány antibiotikum esetében igazolták, hogy képesek különböző ősbaktériumok növekedésének gátlására. A nukleinsavszintézist gátló antibiotikumok közül a novobiocin egy lehetséges szelekciós ágens, mivel a DNS girázt (*gyrB*) gátolja, amely megtalálható a baktériumokban és az archeákban is. Szakirodalmi adatok alapján tudjuk, hogy számos archea érzékeny a novobiocinra, és ez az antibiotikum képes tolerálni az extrém körülményeket is (Allers & Mevarech, 2005). Holmes és munkatársa azonosítottak egy novobiocin rezisztens *Haloferax* törzset, melynek segítségével vektort fejlesztettek és sikeresen létrehoztak rezisztens sejtvonalakat (Holmes & Dyall-Smith, 1990). Ezt követően sikerült feltárni a rezisztencia hátterét, a *gyrB* génben jelen levő három mutációt (Holmes & Dyall-Smith, 1991). Fehérjeszintézis-gátló antibiotikumok közül is néhány esetben azonosították a gátló hatást, pl: a *Halobacterium* fajokat gátló anizomicint (10 µg/ml koncentrációban) (Mankin et al., 1992), a *Halobacterium volcanii* fajt gátló mevinolint, más néven lovastatint (10 µM

koncentrációban) (Lam & Doolittle, 1989), a *Methanococcus maripaludis* fajt gátló neomicint (1000 µg/ml koncentrációban) (Argyle et al., 1996) és puromicint (2–20 µg/ml koncentrációban) (Sandbeck & Leigh, 1991), és a *Halobacterium halobium* fajt gátló tiosztreptont (3 µg/ml koncentrációban) (Mankin et al., 1992).

Antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat a *Thermoplasma* rendbe tartozó fajoknál is végeztek már. A már említett novobiocinra érzékenységet mutat az általunk is vizsgált *T. acidophiulm* (100 ng/ml koncentrációban) (Darland et al., 1970) és a nem olyan régen leírt *T. acidicola* faj is (100 µg/ml koncentrációban) (Itoh et al., 2007). Ez utóbbi faj érzékenységet mutatott a rifampicinre is (100 µg/ml koncentrációban), ellentétben a *T. acidophilum*-mal, ahol *in vitro* kísérletek során a DNS-dependens-RNS-polimeráz nem mutatott érzékenységet erre az antibiotikumra (Sturm et al., 1980). Emellett a *T. acidophilum* érzékenységet mutatott neomicinre 10 µM-os koncentrációban (Londei et al., 1988). Továbbá a rendbe tartozó *Ferroplasma acidophilum* kiemelkedő érzékenységet mutatott tetraciklinre (2 µg/ml koncentrációban) és gentamicinre (2 µg/ml koncentrációban) (Golyshina et al., 2000).

2.3.3 Vektor konstrukciók

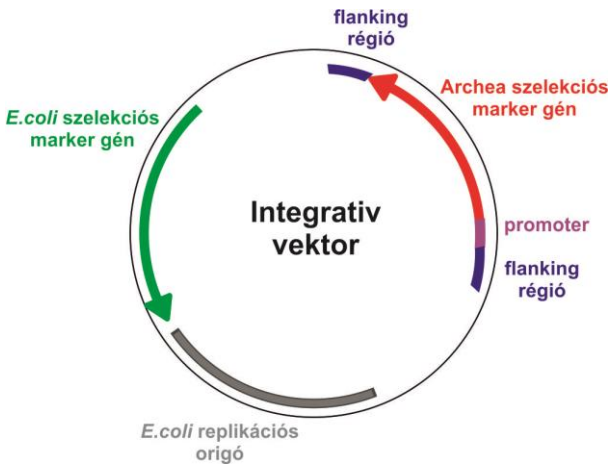
Az ősbaktériumok genetikai manipulálására két vektortípust szoktak alkalmazni:

1; **integratív vektorok**at, amelyekkel homológ rekombinációt (a genetikai információ beépülését a kromoszómába) akarnak elérni

2; **shuttle vektorok**at, amelyek képesek két különböző törzsben a kromoszómától függetlenül, önállóan replikálódni (Allers & Mevarech, 2005).

Az integratív vektorokat a genomba való beépülésre (integrálódásra) tervezték, emiatt nem tartalmaznak ősbaktérium-specifikus replikációs origót, ezáltal nem képesek a célszervezetben (ősbaktériumban) a kromoszómától függetlenül replikálódni. Egy integratív vektor általános térképét az **5. ábra** szemlélteti. A vektor konstrukciónak három fő építőeleme van: 1. *Archea*-specifikus szelekciós marker gén (5. ábra, piros nyíl); 2. *E. coli* specifikus replikációs origó (5. ábra, szürke szakasz); 3. *E. coli*-specifikus szelekciós marker gén (5. ábra, zöld nyíl). Az ősbaktérium-specifikus régiónak tartalmaznia kell egy promótert (5. ábra, lila szakasz), amely felelős a szelekciós marker gén átíródásáért, továbbá egy úgynevezett „flanking” vagy kísérő

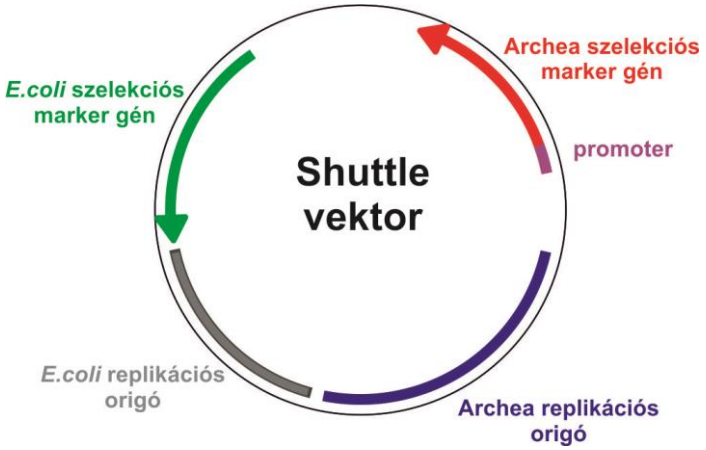
szakaszt (5. ábra, kék szakaszok), amely meghatározza a gén beépülésének helyét: ez a szakasz teljes mértékben homológ a megszakítandó – kiüttetendő génnel. Amennyiben az *Archea* specifikus régió nem tartalmaz flanking szakaszt, a beépülés random lesz. Az *E. coli*-specifikus replikációs origó felelős a vektor fennmaradásáért az *E. coli* baktériumban, ezáltal lehet a vektort nagy mennyiségben megtermeltetni. Az *E. coli*-specifikus szelekciós marker gén segítségével lehet a vektort tartalmazó *E. coli* sejteket elválasztani a transzformáció során. Az integratív vektorokat gének kiütése (knock-out) céljából tervezik, melynek homológ rekombinációs mechanizmus az alapja (Albers & Driessen, 2008; Allers & Ngo, 2003; Allers et al., 2004; Zhang & Whitaker, 2012).



5. ÁBRA INTEGRATÍV VEKTOR ÁLTALÁNOS TÉRKÉPE (A SZERZŐ SAJÁT ÁBRÁJA)

A shuttle vagy bifunkcionális avagy ingázó vektorokat általában önálló replikációra tervezték két különböző szervezetben. A shuttle vektorok négy fő részből épülnek fel (**6. ábra**): 1. *Archea*-specifikus szelekciós marker gén (6. ábra, piros nyíl) promóterrel együtt; 2. *Archea*-specifikus replikációs origó (6. ábra, kék szakasz); 3. *E. coli*-specifikus replikációs origó (6. ábra, szürke szakasz); 4. *E. coli*-specifikus szelekciós marker gén (6. ábra, zöld nyíl). Tehát az integratív vektorhoz képest minden esetben egy ősbaktérium specifikus replikációs origó is található, mely a vektor a kromoszómától való független replikálódásáért, és ezáltal a fennmaradásáért is felelős a célszervezetben. Általában ez az ori régió az ősbaktériumból izolált endogén plazmid ori régiója, például a *H. volcanii* shuttle vektorához a szervezetből korábban izolált pHV2 vektort használták fel (Charlebois et al., 1987; Lam & Doolittle, 1989); ilyen továbbá a *P. abyssi* shuttle vektorához alkalmazott pGT5 plazmid ori régiója (Aagaard et al., 1996) vagy a *Methanosarcina* fajok shuttle vektora esetében

alkalmazott *M. acetivorans* fajból izolált pC2A plazmid ori régiója (Metcalf et al., 1997). *Sulfolobus* fajok esetében egy a *Sulfolobus shibatae* fajból izolált vírus (SSV1) DNS-ét használták egy önállóan replikálodó vektor építésére és tapasztalták, hogy a vektor sikeresen fennmarad *E. coli* és *S. solfataricus* mikroorganizmusban is (Cannio et al., 1998; Jonuscheit et al., 2003). A shuttle vektorokat általában homológ vagy heterológ fehérje túltermeltetésre (overexpresszió) tervezik, ennek érdekében a megtermelendő fehérjét rendszerint egy konstitutív vagy indukálható promóter irányítása alá helyezik (Berkner et al., 2010). Továbbá a későbbi fehérje tisztítás érdekében a fehérjét egy mesterséges farokkal (tag) látják el, például a hat hisztidinből álló HIS-tag vagy a Strep-tag, amely egy nyolctagú mesterséges fehérjelánc (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys).



6. ÁBRA SHUTTLE VEKTOR ÁLTALÁNOS TÉRKÉPE (A SZERZŐ SAJÁT ÁBRÁJA)

2.3.4 Transzformációs módszer

A transzformációs módszer egy genetikai eszközrendszer központi eleme, melynek segítségével külső DNS anyagot jutattunk be a célszervezetbe. Számos módszert fejlesztettek ősbaktériumok transzformációjára, ilyen a PEG-mediált transzformáció, hősokk általi transzformáció, lipofekció és elektroporáció. Néhány olyan potenciális módszer is tárgyalásra kerül, amelyek elméletileg alkalmazhatók genetikai anyag bejuttatására a *T. acidophilum* fajba (génpuska és magnetofekció).

2.3.4.1 Polietilén-glikol (PEG) mediált transzformációs módszer

A módszer első lépéseként a felszaporított és lecentrifugált sejteket egy szferoplaszt oldatba felszuszpendálták, majd EDTA-t (etilén-diamin-tetraecetsav) adtak a mintához, ami a sejtfal átjárhatóságát segíti elő. Ezt követően a transzformálandó DNS-t majd PEG-et (polietilén-glikol) adtak a mintához, ami a

sejtmembránt instabillá teszi, ezáltal a pórusokon keresztül a DNS be tud jutni a sejtbe. A módszert elsőként a halofil ősbaktériumok esetében alkalmazták a *Halobacterium volcanii*[1] és *Halobacterium halobium*[2] fajokra (Charlebois et al., 1987; Cline & Doolittle, 1987; Cline et al., 1989). Ezt követően Tumbula és munkatársai a módszert adaptálták az obligát anaerob metanogén ősbaktérium, a *Methanococcus maripaludis,* transzformációjára (Tumbula et al., 1997). A módszert kisebb módosításokkal sikeresen alkalmazták a metanococcusok egyik jeles képviselőjére, a *P. abyssi* fajra (Lucas et al., 2002). Ezen a fajon tesztelték, hogy eltérő molekulasúlyú PEG alkalmazása nem okoz-e változást a sejtek túlélésében, vagy a transzformációs hatékonyságban; a legnagyobb transzformációs gyakoriságot egy csökkentett PEG mennyiségű (30%-ról 25%-ra) transzformáció során érték el, ahol 10^2 transzformáns volt életképes 1 µg DNS-re vetítve.

2.3.4.2 $CaCl_2$ kezelést követő hősokk transzformáció

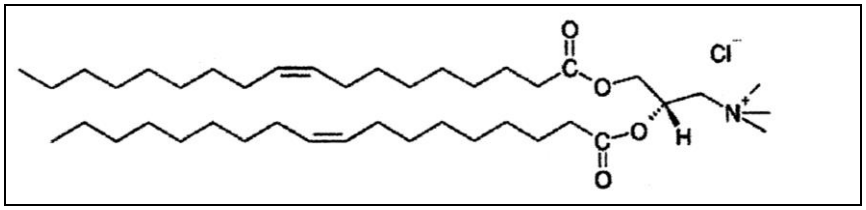
A módszerhez a felszaporított sejteket hűtve centrifugáljuk, felszuszpendálást követően $CaCl_2$ oldatot adunk hozzá, mely elősegíti a DNS sejthez kötődését. Ezt követi a hősokk, mely a mikroorganizmus optimális növekedési hőmérséklete vagy annál magasabb hőmérséklet, mely során a genetikai anyag átjut a sejtmembránon. Végső lépésként a sejtek regenerációja és szelekciója következik. A módszert eredetileg az *E. coli* K12-es törzsre fejlesztették ki, melynél a sejteket több alkalommal mosták és szuszpendálták különböző koncentrációjú $CaCl_2$ oldattal (Cosloy & Oishi, 1973). Ősbaktériumok esetében elsőként a *M. voltae* fajnál alkalmazták e transzformációs módszert, ahol vizsgálták, hogy szükséges-e a magas koncentrációjú $CaCl_2$ oldat használata. Azt tapasztalták, hogy a transzformációs gyakoriság nem változott a $CaCl_2$ kezelés kihagyása következtében, sőt növekedett. Megjegyezendő, hogy a tenyésztési médium tartalmazott $CaCl_2$-ot, de lényegesen kisebb koncentrációban, ami létfontosságúnak bizonyult a transzformáció szempontjából (Bertani & Baresi, 1987). Az anaerob *T. kodakaraensis* fajnál a DNS hozzáadását követően újabb hideg inkubációs lépéssel módosították a *M. voltae* fajnál alkalmazott módszert, és a hideg inkubációt jégen végezték el. Továbbá azt észlelték, hogy a $CaCl_2$ nem létfontosságú a transzformációhoz (Sato et al., 2003). Egy másik *Thermococcales* nemzetségbe tartozó faj, a *P. furiosus,* transzformációjára is sikerrel

[1] A későbbiekben ezt a fajt egy új nemzetségbe (*Haloferax*) sorolták, és *Haloferax volcanii* fajnak nevezték el.
[2] A fajt átnevezték *Halobacterium salinarum*-ra.

adaptálták a módszert, abban az esetben ha a hősokk időtartamát az eredeti 45 másodpercről 3 percre növelték (Waege et al., 2010); egyébként az eredeti protokoll nem volt megfelelő e faj transzformációjára (Lipscomb et al., 2011).

2.3.4.3 Liposzóma mediált transzformáció

A liposzóma mediált transzformáció vagy lipofekció során a transzformálandó sejteket biomolekulával határolt vezikulummal DNS-t tartalmazó transzformálják. Ősbaktériumok esetében a *Methanosarcina* nemzetségbe tartozó fajokat transzformálják rutinszerűen e módszerrel. A biomolekula *Methanosarcina* fajok esetében egy a Boehringer Mannheim GmbH (Németország) által fejlesztett DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate) volt (**7. ábra**). Ez egy negatívan töltött biomolekula, ezáltal képes DNS, RNS, oligonukleotid vagy fehérje kötésére. A DOTAP transzformáció során összeolvad a sejtmembránnal, így bejuttatva a DNS anyagot a sejtbe.



7. ábra A DOTAP szerkezeti felépítése (Choosakoonkriang et al., 2001)

A transzformáció első lépéseként a log-fázisban levő sejteket lecentrifugálták és szacharóz oldatban felszuszpendálták. Ezzel párhuzamosan előállították a DNS:liposzóma komplexet, összekeverve a DNS-t a DOTAP-pal, majd szobahőmérsékleten inkubálták 15 percig. Ezt követően a sejtekhez hozzámérték a DNS:DOTAP komplexet, majd 4 órán keresztül szintén szobahőmérsékleten inkubálták. Ezzel a módszerrel sikeresen transzformálták a *M. acetivorans, M. barkeri, M. siciliae* és *M. thermophila* fajokat (Metcalf et al., 1997).

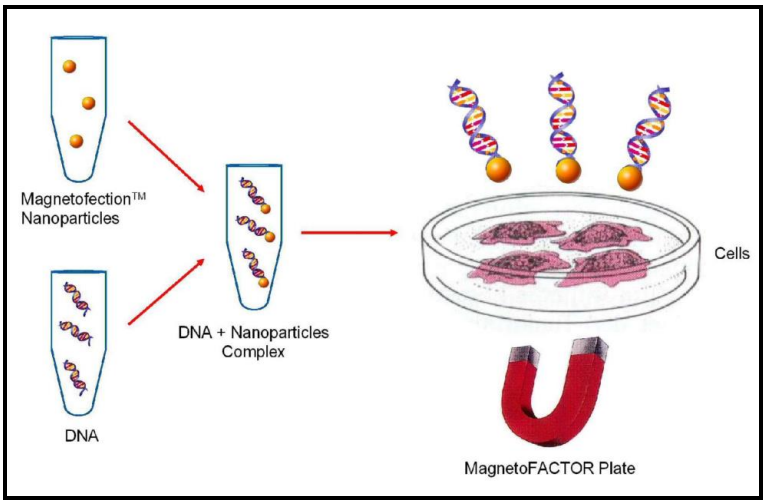
2.3.4.4 Elektroporáció

Elektroporáció során elektromos impulzusok segítségével az elektromos erőtér tranziens lyukakat eredményez a sejteken, ezen keresztül tud a DNS a szervezetbe bejutni. Elektroporációt prokarióta és eukarióta sejtek transzformációjára rutinszerűen alkalmaznak. Ősbaktériumok esetében főként *Sulfolobus* fajok transzformációjára

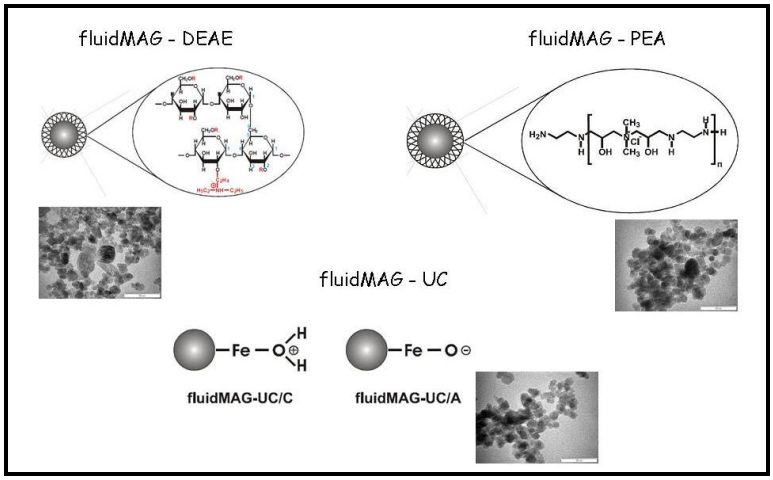
alkalmazzák (Berkner & Lipps, 2008). Elsőként a *S. solfataricus* faj esetében alkalmaztak elektroporációt, melynél a sejtek túlélése még csak 50%-os volt (Schleper et al., 1992); az előinkubációkat ekkor még jégen végezték el és nem történt regeneráció a transzformációt követően. Az alacsony túlélési ráta feltételezhetően a jégen történő inkubációnak volt köszönhető, mivel a faj optimális szaporodásához 75–80 ^{o}C szükséges. Ezt követően a módszert adaptálták a *S. acidocaldarius* fajra, a elektroporációt már szobahőmérsékleten végzeték el, és egy regenerációs lépést is beiktattak, ezáltal a sejtek túlélése jelentősen növekedett (Aravalli & Garrett, 1997). A *S. islandicus* fajnál az eredeti, Scleper és munkatársai által fejlesztett módszeren két módosítást eszközöltek, minden inkubációt szobahőmérsékleten végeztek el, továbbá egy regenerációs lépést vezettek be (Deng et al., 2009). A *Sulfolobus* fajok mellett a korábban már említett *M. voltae* faj esetében is sikeresen alkalmazták az elektroporációt (Patel et al., 1994).

2.3.4.5 Magnetofekció

A magnetofekció során a transzformálandó DNS-t mágneses részecskékhez kötik, majd kihasználva a mágneses erőteret, a DNS-t a sejtbe juttatják (**8. ábra**). A módszert főként eukarióta sejtek transzformációjára, ezen belül is emlős sejtek esetében használják (Mehier-Humbert & Guy, 2005). Napjainkban már elérhető olyan kisméretű magnetit mikrohordozó (50–200 nm átmérőjű), amely megfelelő mikroorganizmusok transzformációjához (**9. ábra**).



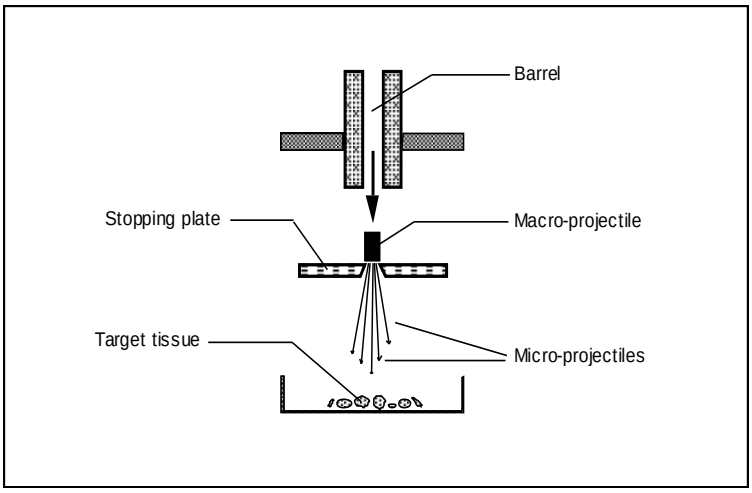
8. ábra A magnetofekció főbb lépései (HTTP2)



9. ÁBRA KÜLÖNBÖZŐ MAGNETIT MIKROHORDOZÓK (HTTP3)

2.3.4.6 Génpuska – biolisztikus transzformációs módszer

A génpuska az egyik legelterjedtebb biolisztikus módszer, melyet főként állati és növényi sejtek és szövetek transzformációjára, néhány esetben mikroorganizmusoknál is használják (Klein & Fitzpatrick-McElligott, 1993; Sawahel & Cove, 1992). A módszer első lépéseként a transzformálandó DNS-t egy biológiailag inert mikrohordozóhoz kötik, amely általában wolfram vagy arany. A génpuska segítségével, nagy sebességgel belövik a mikrohordozóra kötött DNS-t (**10. ábra**). A transzformáció sikeressége szempontjából fontos tényezők, hogy a lövést milyen nyomással végezzük el és hogy a tárgylemez milyen távolságra található. A génpuska mikroorganizmusok transzformációjára való alkalmazására nagyon kevés példa van, ennek oka valószínűsíthetően a nagyméretű mikrohordozó volt. A mikrohordozó átlagos átmérője 1 µm volt egész az elmúlt néhány évig, ez nem okozott problémát a nagyméretű növényi-állati sejtek transzformációjánál, viszont közel lehetetlenné tette a kisméretű baktériumok transzformációját (például az *E. coli* baktérium 0,5x2 µm nagyságú). Ennek ellenére néhány kísérletet tettek baktériumok transzformációjára génpuska segítségével. Elsőként a *Bacillus megaterium* fajra alkalmazták sikeresen a módszert, amely az egyik legnagyobb ismert talajlakó baktérium (Shark et al., 1991). Ezt követően további öt fajra adaptálták a módszert – *E. coli, Agrobacterium tumefaciens, Erwinia amylovora, Erwinia stewartii* és *Pseudomonas syringae*. Bár transzformációs gyakoriság meglehetősen eltérő volt (10^2–10^4/µg DNS).

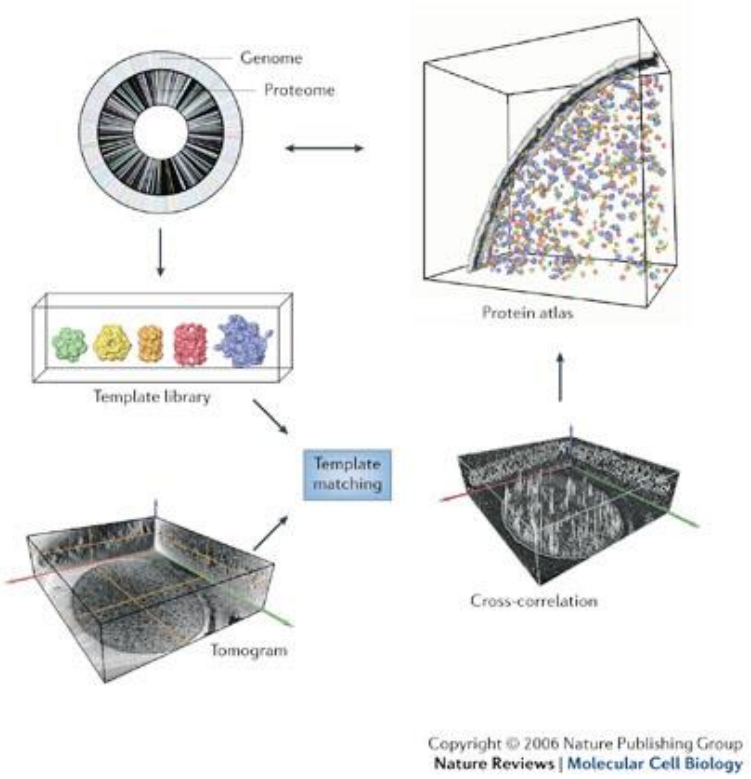


10. ÁBRA A GÉNPUSKÁVAL TÖRTÉNŐ TRANSZFORMÁCIÓ ELVI MAGYARÁZATA (HTTP4)

2.4. *T. acidophilum*, mint a proteomika modellszervezete

Ez az ősbaktérium az elmúlt évtizedben a „vizuális proteomika” (**11. ábra**) kiemelkedő modellszervezetévé vált, köszönhetően számos, az eukarióta sejthez közeli, tulajdonságának, amely főként protein- és enzimkomplexek felépítésében és szerveződésében nyilvánul meg (Nickell et al., 2006). Egészen a 2000-ben befejezett genom projektig úgy tekintettek a thermoplasmákra, mint az eukarióta sejt lehetséges ősére (Ruepp et al., 2000). Annak ellenére, hogy a genom projekt a rokonságot megcáfolta, a *T. acidophilum* a mai napig a proteomika kiemelt fontosságú modellszervezete (Sun et al., 2009, 2007). Köszönhetően a már említett, az eukarióta sejthez közeli tulajdonságainak, kis méretű genomjának és a szervezet fehérjéinek könnyű izolálása miatt, számos kutatás és módszerfejlesztés alapját képezi e faj vagy e faj fehérjéinek vizsgálata (Knispel et al., 2012). Ezt bizonyítják a szervezet 20S proteaszómáján végzett struktúra/funkció vizsgálatok, amelyek feltárták, hogy a proteolitikus folyamatok analógjai az eukarióta sejtekben zajló folyamatoknak és így igen jelentős klinikai vonatkozása is van az itt folyó kutatásoknak. A *T. acidophilum* proteoszómája ugyanazt a proteolitikus lebontási útvonalat használja, mint a humán proteoszóma, habár kisebb hatékonysággal (Mayr et al., 1999). A 2004-es évben kémiai Nobel díjjal értékelték az ubiquitin által irányított fehérje lebontás felfedezését és e molekula szerepének tisztázását a proteoszóma általi lebontásban (HTTP1). Korábbi vizsgálatok során igazolták, hogy fehérjék ubiquitinnel történő előinkubációja elegendő ahhoz, hogy a *T. acidophilum* 20S proteaszómája felismerje és lebontsa ezen fehérjéket (Wenzel & Baumeister, 1993). Erről az ubiquitin

molekuláról ezzel egy időben igazolták, hogy az N-terminális aminosav szekvenciája nagyban megegyezik a humán és más eukarióta ubiquitin molekulákéval (Wolf et al., 1993).



11. ÁBRA A VIZUÁLIS PROTEOMIKA ÁTTEKINTŐ ÁBRÁJA (NICKELL ET AL., 2006)

A Müncheni Max Planck Intézet Wolfgang Baumeister professzor által vezetett Molekuláris Struktúrbiológiai Tanszéke az élen jár a *T. acidophilum* modellen alapuló proteomikai kutatásokban. Ezt kétségkívül alátámasztja az elmúlt évtizedben mutatott publikációs tevékenységük - 14 Nature és 9 Science cikk született az egység közreműködésével. A proteomikai, úgymint a már említett „vizuális proteomikai", kutatásokat öt hagyományos elekronmikroszkóppal és jelenleg a legmagasabb tudományos színvonalat képviselő Titan krio-elekronmikroszkópokkal végzik. A genetikai eszközök alkalmazásának hiánya a modellszervezetnél nagyban gátolja, hogy kiterjesszék munkájukat többek között (a) labilis ismeretlen komplexek vizsgálatára – amely megoldható lenne a célfehérjék HIS-taggal való ellátásával, *in vivo* expresszióval és az azt követő kíméletes affinitás kromatográfiával; (b) a szervezet genom projektje során azonosított ismeretlen funkciójú fehérjék vizsgálatára, ahol knock-out mutagenezis segítségével az ismeretlen funkciójú fehérjékhez biológiai hatás lenne kapcsolható; (c) olyan fehérjék natív expressziójára,

melyek heterológ expresszió során elveszítik biológiai aktivitásukat (pl. peroxiredoxin komplex).

A PhD disszertáció fő célkitűzése nem volt kevesebb, mint e hiányzó genetikai eszközrendszer megteremtésére tett kísérlet.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Mikroba törzsek és táptalajok

3.1.1 Mikroba törzsek

A munkám során alkalmazott törzseket a 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat Vizsgált mikroba törzsek

Név	**Genotípus**
E. coli SURE2	endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14- Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 F'[proAB^{+} lacI^{q} lacZΔM15 Tn10 Amy Kan^{R}]
E. coli TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^{R}) endA1 λ^{-}
T. acidophilum DSM 1728 (típustörzs)	-
T. acidophilum JCM 17946 – 17956	-

3.1.2 Alkalmazott táptalajok és táptalaj komponensek

A táptalajok és komponensek mennyiségét minden esetben 1 liter médiumra adtam meg (2. táblázat), és 121 ^{o}C-on 1 atm nyomáson 20 percen keresztül sterileztem. Amennyiben a csíramentesítés során eltérő eljárást alkalmaztam, azt külön jelöltem.

2. táblázat Alkalmazott táptalajok és táptalaj komponensek

Név	**Összetétel**
LB folyékony médium	10 g Tripton, 5 g Élesztő kivonat 10 g NaCl pH 7,0-ra állítva
LB agar	LB folyékony médium, 1,5% agar
Thermoplasma alap folyékony médium	100 ml MédiumB 10 ml MédiumA 20 ml Élesztő kivonat (10w%) 100 ml Glükóz oldat (10w%) pH 2,0-ra állítva tömény kénsavval
Thermoplasma továbbfejlesztett folyékony médium vitaminnal	100 ml MédiumB 10 ml MédiumA 40 ml Élesztő kivonat (10w%) 100 ml Glükóz oldat (10w%)

	50 ml Élesztő vitamin
Glükóz oldat (10w%)	100 g glükóz Sterilezése: sterilre szűrés, 0,2 µm pórusú szűrön (Millipore Corporation, Darmstadt, Germany)
Thermoplasma Folyékony MédiumB	13,2 g $(NH_4)_2SO_4$ 3,72 g KH_2PO_4 2,47 g $MgSO_4{*}7H_2O$ 0,74 g $CaCl_2{*}2H_2O$
Thermoplasma Folyékony MédiumA	1,93 g $FeCl_3{*}6H_2O$ 0,18 g $MnCl_2{*}4H_2O$ 0,45 g $Na_2B_4O_7{*}10H_2O$ 2,2 ml $ZnSO_4{*}7H_2O$ (1 w%) 0,5 ml $CuCl_2{*}2H_2O$ (1 w%) 0,3 ml $Na_2MoO_4{*}2H_2O$ (1 w%) 0,38 ml $VOSO_4{*}5H_2O$ (1 w%) 0,1 ml $CoSO_4{*}7H_2O$ (1 w%)
Élesztő vitamin	10 g sütőélesztő 100 ml 0,5 M H_2SO_4 Az oldalt szonikálása 2-szer 1 percig 40%-os teljesítményen (Branson Sonicator, Thomas Scientific, Swedesboro, USA); majd 3 órán át inkubáció 60 ^oC-on; ezt követően centrifugálás: 4600 rpm, 4 ^oC, 20 perc; végül a felülúszó sterilezése szűréssel.
Thermoplasma szilárd médium (Phytagel, Nobel agar, Seakem Gold agaróz, Szilika)	*Thermoplasma* folyékony médium, 2% szilárdító ágens, szilika esetében 1%
Thermoplasma szilárd medium gelrite	500 ml gelrite MédiumA 450 ml gelrite MédiumB 2 ml glükóz oldat (10%) 2,5 ml $CaCl_2$ 10 mM 50 ml élesztő vitamin A médiumot minimum 80 ^oC-on kell összeállítani.
Thermoplasma szilárd médium gelrite MédiumA	2 g élesztőkivonat 2 g kazaminosav 1,3 g $(NH_4)_2SO_4$ 0,2 g NaCl 0,3 g KH_2PO_4 0,25 g $MgSO_4{*}7H_2O$ 0,05 g $CaCl_2{*}2H_2O$,
Thermoplasma szilárd médium gelrite MédiumB	1,2 g gelrite Először 100 ^oC-on 30 percig tartjuk, majd 121 ^oC-on 1 atm-n 30 percig sterilezzük.

3.2 Mikroszkópos vizsgálatok

3.2.1 Alkalmazott mikroszkópok

A munkám során alkalmazott mikroszkópokat a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat Alkalmazott mikroszkópok

Név	Gyártó - forgalmazó
LEICA M205FA Automata fluoreszcens sztereó mikroszkóp LEICA DFC425C Kamera	BioMarker Kft, Gödöllő, Magyarország
Olympus SZH Sztereó mikroszkóp Canon PowerShot A540 Kamera	Olympus Optical Co., Hamburg, Németország
Philips CM300 FEG Cryo-electron-microscope with Gatan CCD digital camera and energy filter	Philips Ltd, Brüsszel, Belgium

3.2.2 Különleges elektron-mikroszkópos eljárás

A krio-elektronmikroszkópos vizsgálatok a Müncheni Max Planck Intézet Molekuláris Struktúrbiológiai Tanszékén Christine Kofler végezte. A *T. acidophilum* sejteket normál *Thermoplasma* médiumban tenyésztettük. A sejtszuszpenziót Quantifoil 4/1 szénfilmmel bevont réz gridekre mértük. Egy 30 másodpercig 60 ^{o}C-on történő inkubációt követően a sejteket lefagyasztottuk folyékony etilénben (vitrifikáció) és a további fejdolgozásig folyékony nitrogénben tároltuk. Az elektronmikroszkópos vizsgálatokat egy CM300 FEG elektronmikroszkóppal végeztük -8 µm-es fókusz alatt.

3.3 Vegyszerek és reagensek

A munkám során alkalmazott vegyszereket és reagenseket a 2. Melléklet 4. táblázat tartalmazza.

3.4 Pufferek és oldatok összetétele

Minden puffert és oldatot ultratiszta vízben állítottunk össze, a pufferek és oldaltok összetétele a 2. Melléklet 5. táblázata tartalmazza.

3.5 Felhasznált kitek és enzimek

A munkám során alkalmazott kiteket és enzimeket a 2. Melléklet 6. táblázat tartalmazza.

3.6 Molekuláris biológiai módszerek

3.6.1 Genomi DNS izolálás

A genomi DNS izolálásához baktériumok esetében a MoBio UltraClean Microbial DNA Isolation Kit-et alkalmaztam a gyártó által megadott protokoll szerint. Az izolált genomi DNS minőségét minden esetben agaróz gélelektroforézissel és nanofotométer (Implen GmbH, München, Germany) segítségével ellenőriztem.

3.6.1.1 T. acidohilum genomi DNS izolálás

A *T. acidophilum* esetében több különböző DNS izolálási módszert alkalmaztam, többek között kis mennyiségű genomi DNS előállítására a MoBio UltraClean Microbial DNA Isolation Kit-et használtam a gyártó által megadott protokoll szerint. Nagyobb mennyiségű genomi DNS előállítására az alábbi két módszert alkalmaztam.

3.6.1.1.1 Fenol-kloroformos DNS izolálás

A biomasszát lecentrifugálást követően előmelegített steril pH 2-es vízzel háromszor mostam. Ezt követően a biomasszát vízben felszuszpendáltam és 1:1 arányban 100 mM-os Tris-t adtam hozzá. Ekkor következett be a sejtek lízise. Következő lépésként 500 µl fenolt adtam a mintához, 2 percig szobahőmérsékleten inkubáltam, majd 15 000 rpm-en 20 percig 4 ^{o}C-on centrifugáltam. A felülúszót a pellettől elválasztottam, majd a felülúszóhoz 500 µl fenolt és 500 µl kloroformot mértem, szobahőmérsékleten inkubáltam 1 percig, majd 15 000 rpm-en 20 percig 4 ^{o}C-on centrifugáltam. A felülúszóhoz 500 µl kloroformot adtam, majd lecentrifugáltam a korábbiakban alkalmazott módon. A felülúszó DNS-tartalmát ezt követően 700 µl jéghideg izopropanollal kicsaptam, majd egy újabb centrifugálást és 70%-os alkohollal történő mosást követően kiszárítottam. A DNS-t végül TE pufferben vettem fel. A későbbi felhasználás előtt minden esetben a DNS minőségét agaróz-gélelektroforézissel és nanofotométer (Implen GmbH, München, Germany) segítségével ellenőriztem.

3.6.1.1.2 Na-perklorát segítségével történő DNS izolálás

A biomasszát centrifugálást és többszöri mosást (előmelegített, steril, pH 2-es vízzel) követően 1:1 arányban 100 mM-os Tris pufferben szuszpendáltam, majd RNázos kezelést alkalmaztam az RNS molekulák degradációjára. Ezt követően az extraktumhoz először Na-perklorátot (1 M-os végső koncentrációban), majd egyenlő

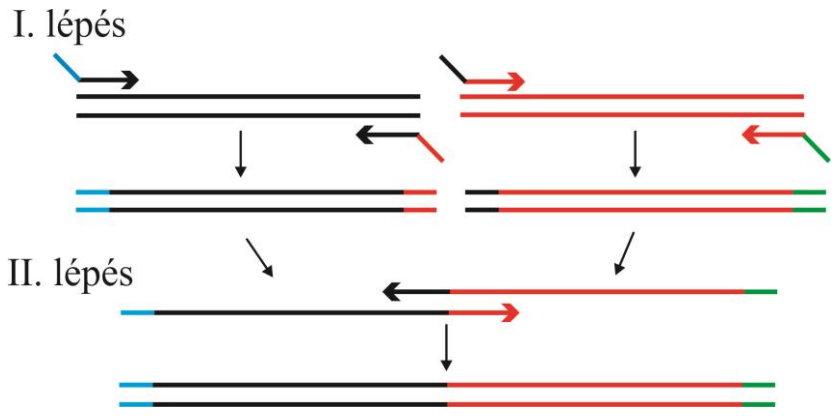
térfogatnyi kloroform:izoamil-alkohol 24:1 arányú keverékét adtam és extrahálással eltávolítottam a fehérjéket (60 perc lassú rázatás 4 ^{o}C-on). A DNS-t tartalmazó vizes oldatot centrifugálással elválasztottam a kloroformtól, és a DNS-t két térfogatnyi etilalkohol/izopropanollal kicsaptam. A DNS csapadékot négyszer mostam 70%-os etanolban, majd szárítást követően TE pufferben feloldottam. A későbbi felhasználás előtt minden esetben a DNS minőségét agaróz-gélelektroforézissel és nanofotométer (Implen GmbH, München, Germany) segítségével ellenőriztem.

3.6.2 Agaróz gélelektroforézis

A genomi DNS, PCR termékek és restrikciós emésztmények detektálásához 1%-os agaróz gélt öntöttem, amely a következőket tartalmazta: 1 g agaróz, 10 ml 10xTBE, 90 ml bdH_2O, és 0,5 µl/ml etídium-bromid. A gél zsebeibe 5-15 µl DNS-mintát és 3-6 µl STOP TBE puffert, illetve az első zsebbe 5 µl DNS létrát (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA) pipettáztam. A gélt 1xTBE pufferben 100-130 V-on 20-60 percig futtattam, majd UV fényben detektáltam a gélfutattás eredményét.

3.6.3 Vektor építés

Vektor konstrukcióim alapja minden esetben *E. coli* vektorok voltak, pUC18 és pRSF-Duet. A *T. acidophilum* genetikai elemek és kazetták elkészítéséhez hagyományos klónozási módszereket (Sambrook & Russel, 2001) és overlapping mega-primer alapú PCR technika (Kanoksilapatham & Gonzalez, 2007) módosított változatát alkalmaztam. Az overlapping mega-primer módszernél több fragmentet vagy linearizált vektort fragmenttel kívántam összeilleszteni. Minden esetben a primerek segítségével létrehoztam egy átfedő régiót a két fragment között. A módszer lépései az alábbiak (**12. ábra**):



12. ábra Overlapping mega-primer módszer főbb lépései

I. lépés: A kiinduló szakaszok PCR-je, hagyományos PCR reakció optimalizálva a fragment várt méretére és az anellációs hőmérsékletre. A fragmentet ellenőriztem agaróz gélelektroforézissel. Ezt követően a PCR terméket megtisztítom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System-mel.

II. lépés: A túlnyúló részekkel (overhang-gal) rendelkező tisztított PCR termékek összeillesztése. A reakcióknál kritérium, hogy az összefűzendő szakaszok ekvimolárisan egyezzenek. A PCR reakciót az alábbi módon állítottam össze steril PCR csövekbe 10 µl dNTP, 4 µl *Pfu* puffer, 6 µl $MgSO_4$, 1 U *Pfu* enzim, PCR termékek az előző reakcióból és annyi desztillált víz, hogy a végső térfogat 50 µl legyen. A reakció hőprofilja a következő volt:

▪ 98 °C	3-5 perc	Kezdeti denaturáció	
▪ 95 °C	3 perc	Denaturáció	
▪ 48-65 °C	30 mp	Anelláció	20 ciklus
▪ 72 °C	30 mp–8 perc	Elongáció	
▪ 94 °C	30 mp	Denaturáció	
▪ 72 °C	10 perc	Végső extenzió	

A 20 ciklust követően hozzá lehet adni a flanking primereket és még 1µl *Pfu*-t. Az annealing értelemszerűen a primerek Tm-je alapján történik. Ciklusszám: 32.

A vektorkonstrukciók készítéséhez minden esetben *Pfu* nagy pontosságú DNS polimeráz enzimet használtam.

3.6.4 Primer tervezés

A primerek tervezése során minden esetben betartottam a tervezés alapszabályait. Az újonnan tervezett primereket minden esetben ellenőriztem az IDT – Integrated DNA Technologies - honlapján megtalálható Oligo Analyzer program segítségével. Számos esetben a primer túlnyúló (overhang) végével hoztam létre restrikciós enzim felismerő helyet, mely a későbbi vektorba klónozást, vagy a két fragment összeligálását (az átfedő túlnyúló szakaszok segítségével) szolgálta. A munka során felhasznált primereket a Integrated DNA Technologies Inc (USA) cégtől rendeltem minden esetben. Az alkalmazott primerek szekvenciája és olvadási hőmérséklete a 2. számú mellékletben található.

3.6.5 Polimeráz láncreakció

A polimeráz láncreakcióhoz a korábbiakban leírt módon specifikus primereket terveztem. A PCR reakciót az alábbi módon állítottam össze: steril PCR csövekbe 5 µl 10x-es PCR puffert (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA), 3 µl 2 mmol/l koncentrációjú $MgCl_2$ oldatot (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA), 0,5 µmol forward és 0,5 µmol reverse primert, 1 U *Taq* DNS polimerázt, 10 µl dNTP-t (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA), 1-5 µl templátot és annyi desztillált vizet pipettáztam, hogy a végső térfogat 50 µl legyen. Ezután a PCR csövek tartalmát kémcsőkeverő segítségével összekevertem, majd lecentrifugáltam. A PCR reakciót Eppendorf Mastercycler EP Gradient S (Eppendorf AG készülékkel végeztem. A hőprofil a következő volt:

▪ 98 °C	3-5 perc	Kezdeti denaturáció	
▪ 95 °C	3 perc	Denaturáció	28- 32 ciklus
▪ 48 - 65 °C	30 mp	Primer anelláció	28- 32 ciklus
▪ 72 °C	30 mp–8 perc	Extenzió - elongáció	28- 32 ciklus
▪ 72 °C	10 perc	Végső extenzió	
▪ 4 °C	∞	Hűtés	

A primer anelláció minden esetben 3 fokkal volt alacsonyabb a primerpárok közös olvadási hőmérsékleténél. Az extenziót minden esetben 1000 bp/1 perccel számoltam. Minden PCR terméket agaróz gélelektroforézissel detektáltam a 3.6.2-as pontban leírtak szerint.

3.6.6 Helyspecifikus mutagenezis

Helyspecifikus mutagenezist QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit-tel végeztem a gyártó által megadott protokoll szerint, valamint overlapping PCR mutagenezis módszert is használtam:

A reakcióhoz minden esetben *Pfu*, nagy pontosságú DNS polimerázt használtam. A reakciót az alábbi módon állítottam össze: steril PCR csövekbe 10 mM dNTP-t (mind a 4 nukleotidot tartalmazza 10 mM végső koncentrációban), 5 µl 10x *Pfu* polimeráz puffert (mely Mg-t is tartalmaz), 0,2 µmol forward és 0,2 µmol reverse primert, 1 U *Pfu* DNS polimerázt, 10 ng plazmid templátot és annyi ultratiszta vizet pipettáztam, hogy a végső térfogat 50 µl legyen. A reakciót jégen mértem össze, legutoljára az enzimet mértem be, majd az előmelegített PCR gépbe helyeztem a csöveket. A PCR program a következő volt:

▪ 95 ^{o}C	1 perc	Kezdeti denaturáció	
▪ 94 ^{o}C	30 mp	Denaturáció	⎫
▪ 55 ^{o}C	30 mp	Primer anelláció	⎬15ciklus
▪ 68 ^{o}C	13 perc	Elongáció	⎭
▪ 68 ^{o}C	10 perc	Végső extenzió	
▪ 4 ^{o}C	∞	Hűtés	

A reakciót követően a terméket szobahőmérsékletűre hűtöttem, majd 1 U *Dpn*I enzimet adtam a reakcióhoz és 37 ^{o}C-on egy órát inkubáltam. A *Dpn*I enzim a metilált (szülői, nem mutáns) dsDNS-t hasítja el. A szülői plasmid DNS-t korábban dam+ (DNS adenin metil-transferáz) *E. coli* sejtvonallal termeltettem meg. Így az eredeti nem mutált DNS szálak fel lesznek hasogatva, viszont az újonnan szintetizált DNS szálakat érintetlenül hagyja.

Ezt követően 5 µl terméket 50 µl *E. coli* kompetens sejtbe transzformáltam a későbbiekben leírt módon.

3.6.7 A PCR-termék tisztítása és fragmentek tisztítása gélből

A PCR termékek tisztítást a PCR reakciót követően és a fragmenetek tisztítást gélből a Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System-mel végeztem a gyártó által megadott protokoll szerint. A PCR termék és fragment tisztítás lényege, hogy a 100 bp- 10 kbp méretű DNS fragmentek kaotripikus sók jelenlétében a szilika alapú membránhoz kötődnek, majd több tisztítási fázist követően, melyek során lemossuk a felesleges sókat, primereket, dNTP-t, eluálom a terméket a membránról.

3.6.8 Emésztés restrikciós endonukleázokkal

Az emészteni kívánt DNS-t különböző specifikus endonukleázokkal hasítottam el, melyekhez a megfelelő restrikciós enzim puffereket alkalmaztam; az emészteni kívánt DNS koncentrációja 0,5–5 µg volt. A reakció végtérfogata minden esetben 50 µl volt, amelyet ultratiszta vízzel állítottam be, majd megfelelő hőmérsékleten 1-2 órát inkubáltam. Magas DNS koncentráció esetén az időtartamot megnöveltem.

3.6.9 Transzformáció *E. coli*-ba

A -80 ^{o}C-on tárolt *E. coli* kompetens sejteket jégen lassan felolvasztottam, 50 µl sejthez (Top10-Ca-os kompetens és SURE2-szuperkompetens sejtek) 1-3 µl plazmidot hozzámértem, majd jégen inkubáltam 30 percig. Ezt követően 30 másodpercig 42 ^{o}C-on (hősokk) inkubáltam, majd megint 2-3 percig jégre helyeztem, végül 450 µl 37 ^{o}C-ra előmelegített LB médiummal rázattam egy órán keresztül 37

^{o}C-on. Antibiotikum tartalmú lemezekre szélesztettem, majd 16 órán át növesztettem 37 ^{o}C-on.

3.6.10 Dialízis transzformáció *T. acidophilum*-ba

Egy dialízis membránra (Millipore VSWPO2500 - Millipore GmbH, Németország) 200 µl 2-3 napos *T. acidophilum* kultúrát (OD_{600}: 0,8–1) helyeztem. A membránt 60 ^{o}C-ra előmelegített petri-csészényi ultratiszta víz felszínére helyeztem (20 ml), melynek pH-ját 4,5-re állítottam szárazjég segítségével. A sejteket ezt követően 60 percig inkubáltam, melynek során a sejtszuszpenzió 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, végül 1 ml antibiotikumot nem tartalmazó friss médiumba helyeztem 58 ^{o}C-ra 12 órára regeneráció céljából. A regenerációt thermomixerben (Eppendorf) végeztem el 600 rpm-es rázatással. A regenerálódott sejteket megfelelő antibiotikumot tartalmazó 10 ml médiumba helyeztem és 3-4 napon keresztül inkubáltam 58 ^{o}C-on; ezzel párhuzamosan antibiotikumot tartalmazó szilárd médiumra is kiszélesztettem a sejteket. Minden transzformációnál alkalmaztam egy pozitív növekedési kontrollt, amely ugyanazt a kezelést kapta, mint a transzformációs minták, viszont antibiotikumot nem tartalmazó médiumban inkubáltam. A pozitív növekedési kontrollt annak céljából alkalmaztam, hogy ellenőrizzem a sejtek túlélik-e a transzformációt. Továbbá használtam minden transzformáció során negatív kontrollt, amelyhez a transzformáció során nem adtam plazmidot, viszont ezt követően antibiotikumot tartalmazó médiumban inkubáltam. Ezen kontroll célja, hogy teszteljem az esetleges spontán mutációkat.

3. 6. 11. Magnetofekció általi transzformációs T. acidophilum-ba

Két különböző DNS-t kötni képes magnetit szemcsét alkalmaztam: fluidMAG-DEAE, fluidMAG-PEA. A magnetofekciót a gyártó által javasolt transzformációs módszernek megfelelően vittem véghez, optimalizálva a *T. acidophilum* tenyészkörülményeihez. 200 µl sejtkultúrát (OD_{600}: 0,8-1,0) lecentrifugáltem 4600 rpm-en 40 ^{o}C-on 10 percig, majd 50 µl pH 2-es ultratiszta vízben óvatosan felszuszpendáltem. Ezzel párhuzamosan 1-2 µg/µl koncentrációjú DNS-ből 5 µl-t mértünk 20 µl magnetit szemcséhez, majd összepipettáztam és 10-15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően az 50 µl biomasszát egy MagnetoFACTOR plate-be mértem, 25 µl végtérfogatú DNS:magnetit keveréket adtunk hozzá és az 58 °C-os termosztátban előmelegített mágnes platet aláhelyeztem.

Miután hozzáadtuk a DNS:magnetit keveréket a sejtekhez, 20-60 percig inkubáltuk 58 °C-on. A transzformációt követően a transzformált sejteket 1 ml friss antibiotikumot nem tartalmazó *T. acidophilum* folyékony médiumba mértem és 12-14 órán keresztül 58 °C-on 700 rpm rázatás mellett Eppendorf Thermomixerben regeneráltattam. A regenerációt követően 200 µl-t kiszélesztettem novobiocin és rifampicin tartalmú gelrite-bázisú szilárd táptalajra.

3. 6. 12. Liposzóma által mediált transzformáció T. acidophilum-ba

A liposzóma mediált transzformációhoz a DOTAP-ot (Roche GmbH) alkalmaztam a *Methanosarcina* nemzetségnél fejlesztett protokoll alapján. 200 µl sejtkultúrát (OD_{600}: 0,8-1,0) lecentrifugáltam 4600 rpm-en 40 °C-on 10 percig, majd 50 µl pH 2-es ultratiszta vízben óvatosan felszuszpendáltam. Ezzel párhuzamosan 1-2 µg/µl koncentrációjú DNS-ből 5 µl-t mértem 2-25 µl DOTAP-hoz és inkubáltam 10-30 percig. Ezt követően a DNS:DOTAP mixet hozzámértem az 50 µl biomasszához és 30-180 percig inkubáltam 58 °C-on. A transzformációt követően a transzformált sejteket 1 ml friss antibiotikumot nem tartalmazó *T. acidophilum* folyékony médiumba mértem és 12-14 órán keresztül 58 °C-on 700 rpm rázatás mellett Eppendorf Thermomixerben regeneráltattam. A regenerációt követően 200 µl kiszélesztettem novobiocin és rifampicin tartalmú gelrite-bázisú szilárd táptalajra.

3.6.13. Nukleotidsorrend meghatározás

Minden konstrukciót a későbbi alkalmazás előtt restrikciós emésztésnek és nukleotidsorrend meghatározásnak vetettem alá. A nukleotidsorrend meghatározást BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit felhasználásával végeztem el. A kapott szekvenciákat a MEGA4 program segítségével dolgoztam fel. A szekvenciákat GenBank adatbázisban BLAST segítségével azonosítottam.

A szekvenáló reakciót az alábbi módon állítottam össze: steril PCR-csövekbe a következőket mértem be: 2 µl BigDye Terminator, 3 µl puffer, 1 µl primer, 8 µl dH_2O, 6 µl tisztított DNS. A reakciót Eppendorf Mastercycler EP Gradient S (Eppendorf AG) készülékben végeztem el az alábbi hőprofil szerint:

- 96 °C 10 mp
- 50 °C 5 mp } 28 ciklus
- 60 °C 4 perc
- 4 °C ∞

A termékhez a reakció után hozzámértem: 3 µl 3 M Na-acetát oldatot (pH 4,6); 62,5 µl 96%-os etanolt; 14,5 µl dH_2O-t. A reakcióelegyet kémcsőkeverővel összekevertem, majd 15 percig állni hagytam szobahőmérsékleten. A mintákat lecentrifugáltam (14000 rpm; 20 perc, 4 ^{o}C), majd a felülúszót óvatosan eltávolítottam. A pelletre 250 µl 70%-os etanolt mértem, ezután kémcsőkeverővel összekevertem. Ismét lecentrifugáltam (14000 rpm; 10 perc, 4 ^{o}C) a mintát, majd a felülúszót ismét leszívtam, végül vákuum centrifugában kiszárítottam (15-20 perc). A mintát Hi-Di formamidban vettem fel és Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzerrel vizsgáltam.

3. 7 Statisztikai módszerek

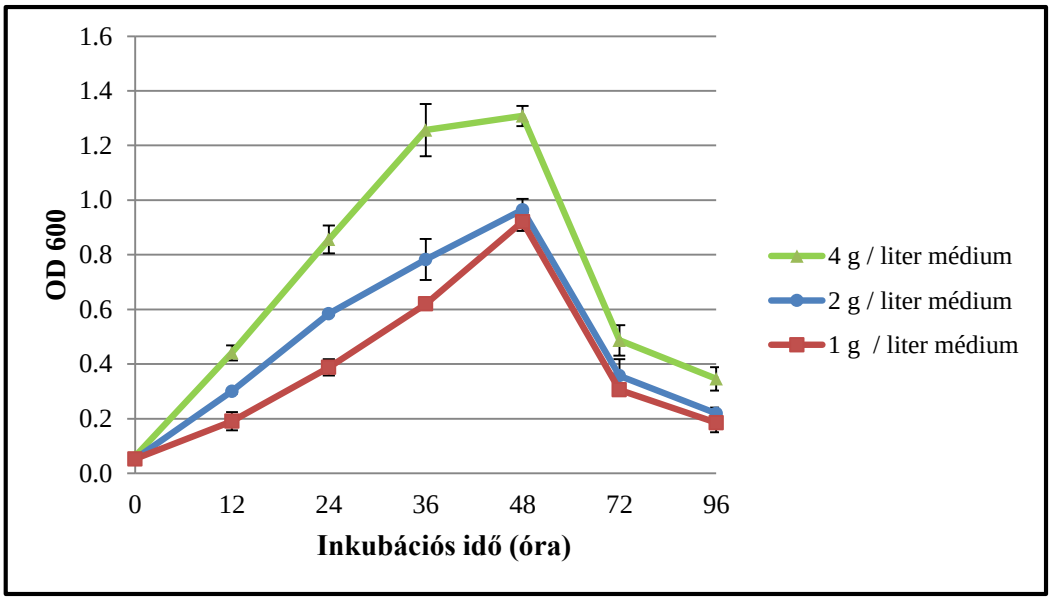
A tenyésztéses vizsgálatok eredményei közötti kapcsolatrendszer vizsgálatát statisztikai módszerrel végeztem el. A statisztikai vizsgálatokat Microsoft EXCEL (Microsoft Inc.) szoftver felhasználásával végeztem.

4. Eredmények és megvitatásuk

4.1 *Thermoplasma* médium optimalizálása

4.1.1 Módosítások a *Thermoplasma* folyékony médiumban

Munkám egyik alapfeltétele volt a *T. acidophilum* rutinszerű tenyésztése folyékony médiumban. A szervezet 1970-ben történt felfedezése óta számos különböző médiumot fejlesztettek tenyésztéséhez. Folyékony tápközegben elvégzett kísérleteim során a Christiansen és munkatársai (Christiansen et al., 1975) által fejlesztett médiumot használtam. Szakirodalmi eredmények alapján tudjuk, hogy a szervezet minden esetben igényel élesztőkivonatot, míg a táptalaj más komponensei, például a glükóz, nem esszenciálisak. Az eredeti folyékony médium 1 g gyári élesztőkivonatot tartalmazott literenként. Kísérleteim során azt tapasztaltam, hogy a *T. acidophilum* pozitívan reagált a megnövelt élesztőkivonat mennyiségre (**13. ábra**). A kétszeresre növelt élesztő mennyiség csekély mértékben, míg a négyszeres élesztőkivonat mennyiség jelentősen megnövelte a sejtek szaporodási sebességét.

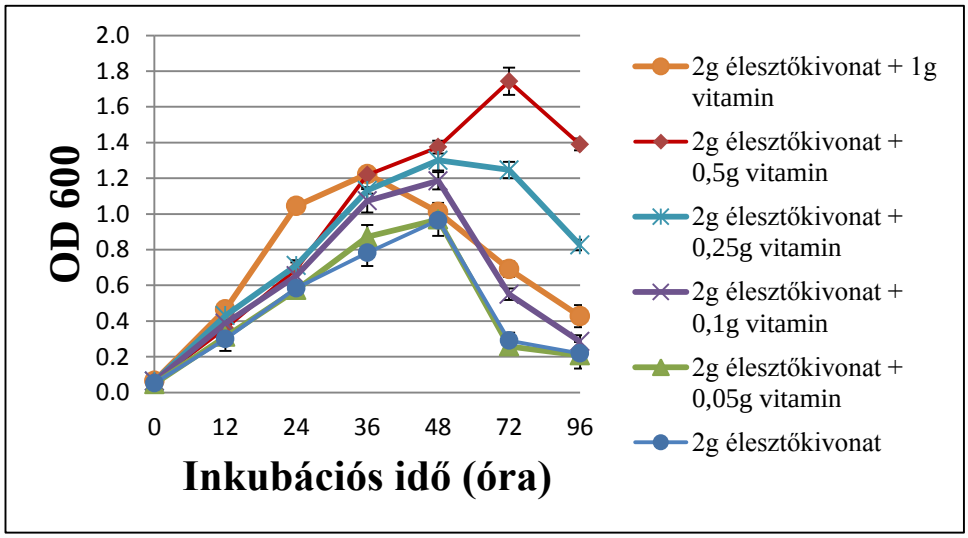


13. ábra Növekedési test különböző koncentrációjú gyári élesztőkivonattal

Az optikai denzitás 600 nm-en történő meghatározásával, az ábra minden egyes koncentrációnál három mérés átlagát és szórását mutatja.

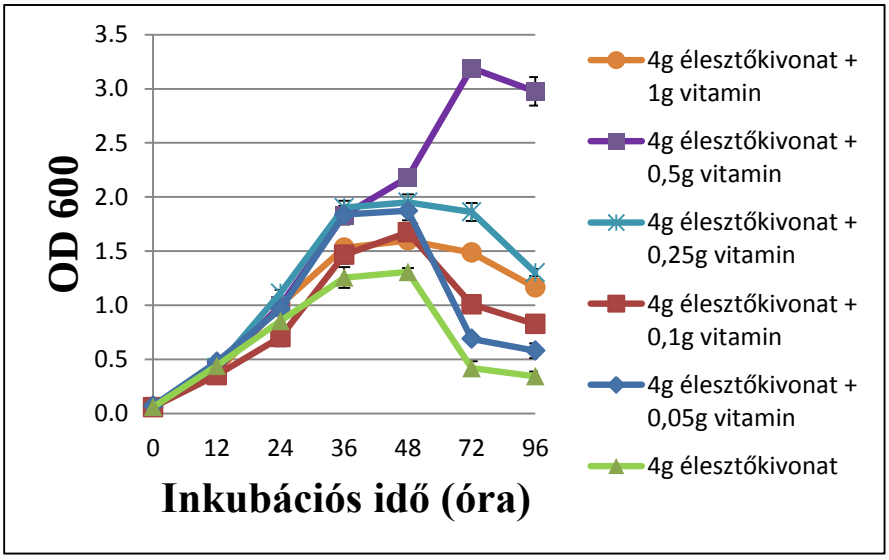
4.1.2 Natív élesztőkivonat hatásának vizsgálata

Korábbi kísérleteim során igazoltam (4.1.1 fejezet), hogy a szervezet pozitívan reagál a megnövelt gyári élesztőkivonat mennyiségre. Szakirodalmi adatok alapján tudjuk, hogy az élesztőkivonat előállításának módja meghatározó a növekedést serkentő hatás szempontjából (Smith et al., 1975). Mivel nem rendelkeztem információval a gyári élesztőkivonat előállításnak módjáról, emiatt saját-készítésű élesztőkivonatot kívántam előállítani, hogy megvizsgáljam a különböző módon előállított élesztőkivonatok hatását. Előkísérleteim során számos módszert teszteltem szakirodalmi adatok alapján, úgymint: acetonos kicsapás, kloroform-metanolos kezelés és savas hidrolízis. Ezek közül a savas hidrolízist választottam, mivel így a későbbiekben nem kellett a médiumból acetont vagy kloroform-metanolt eltávolítanom és a *Thermoplasma* médium alapvetően tartalmaz. A továbbiakban ezt a saját-készítésű élesztő hidrolizátumot élesztő vitaminnak nevezem. Az élesztő vitamint hagyományos sütőélesztőből (*Saccharomyces cerevisiae*) állítottam elő savas hidrolízis és hősokk kombinációjával. Az élesztő vitamin előállítását az anyagok és módszerek fejezetben foglaltam össze. Mivel a *Thermoplasma* médium pH-ját minden esetben kénsavval állítottam be, ezért az élesztő vitamin előállításhoz is ezt használtam. Az optimális élesztő vitamin mennyiségének meghatározása érdekében teszteltem a 2 g és 4 g gyári élesztő és különböző koncentrációjú élesztő vitaminok hatását (0,05–1 g élesztő vitamin/liter médium). A feltüntetett élesztő vitamin mennyiség minden esetben a szárazanyagtartalmat (DCM-Dry Cell Mass) jelenti. Az eredményeket a **14. és 15. ábra** szemléltetik. Jól látható, hogy mindkét esetben a 0,5 g élesztő vitamin/liter dózis váltotta ki a legnagyobb serkentő hatást, míg ha tovább növeltem a vitamin koncentrációját (1 g/liter), már nem volt olyan mértékű a pozitív hatása. Az élesztő vitamin egyrészt növelte a sejtek szaporodásának sebességét, ezáltal lecsökkentve a generációs időt, emellett a sejtkultúra denzitására is pozitív hatással volt. A legjobb eredményt a 4 g gyári élesztőkivonat és 0,5 g élesztő vitamin kombinációjával tudtam elérni (15. ábra, lila színű görbe). A későbbiekben az élesztő vitamint a szilárd tenyésztés során az inkubációs idő csökkentésére alkalmaztam.



14. ábra Növekedési teszt 2 gramm gyári élesztőkivonat és különböző mennyiségű élesztő vitamin jelenlétében

Az optikai denzitás 600 nm-en történő meghatározásával, az ábra minden egyes koncentrációnál három mérés átlagát és szórását mutatja.



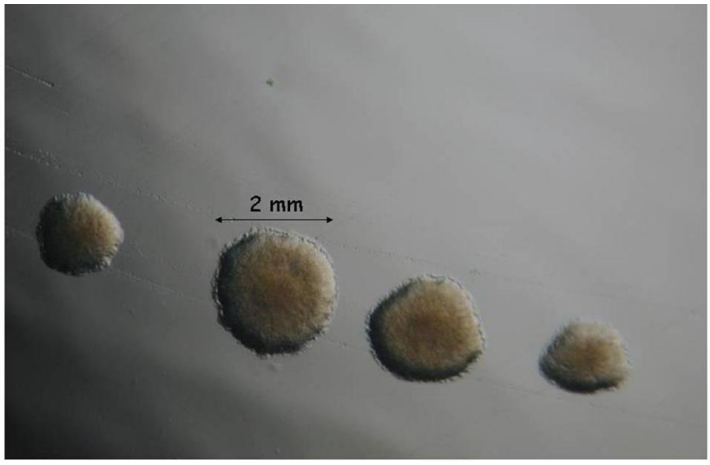
15. ábra Növekedési teszt 4 gramm gyári élesztő kivonat és különböző mennyiségű élesztő vitamin jelenlétében

Az optikai denzitás 600 nm-en történő meghatározásával, az ábra minden egyes koncentrációnál három mérés átlagát és szórását mutatja.

4.1.3 Szilárd médium fejlesztése

A genetikai eszközrendszer fejlesztésének egyik kiemelkedő fontosságú alapfeltétele, a klonális munka lehetősége, ezáltal tudunk genetikailag homogén sejtvonalakat létrehozni. Ennek feltététele a megfelelő szilárd médium alkalmazása.

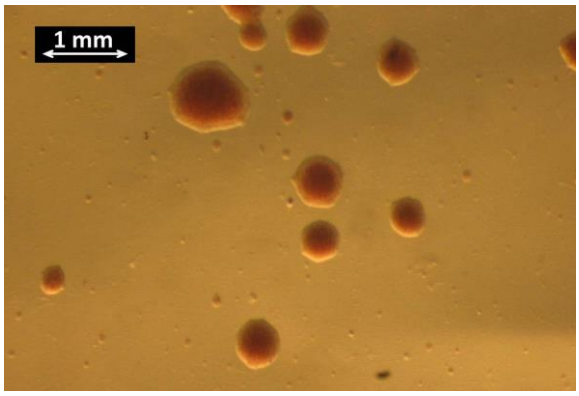
A rendelkezésemre álló információk alapján egy olyan szilárd táptalaj fejlesztését kezdtem el, amelyen a *T. acidophilum* sejtek telepet formálnak viszonylag rövid idő alatt, és a szilárdító anyag nem hidrolizál a sejtek szaporodásához szükséges magas hőmérsékleten és alacsony pH-n. Szakirodalmi adatok alapján számos szilárdító anyagot teszteltem, úgymint gelritet-ot (Sigma Aldrich Ltd) (Yasuda et al., 1995a), szilikát (Sigma Aldrich Ltd.), phytagelt (Sigma Aldrich Ltd.) (Itoh et al., 2007), noble-agart (Becton Dickinson Hungary Kft) (Black & Freundt, 1979) és seakem gold agarózt (Lonza Group Ltd). A szilárd médiumokat minden esetben az Anyagok és Módszerek fejezetben leírt módon készítettem el. Az általam kiválasztott szilárdító ágensek minden esetben képesek voltak tolerálni a magas hőmérsékletet és az alacsony pH-t, viszont a *T. acidophilum* nem volt képes növekedni, telepeket formálni a seakem gold agaróz és a noble-agar alapú szilárd médiumon. A mikroba növekedett a szilika-bázisú szilárd médiumon, melyet 10%-os szilika oldattal szilárdítottam meg. Ezen a táptalajon a *T. acidophilum* sárgás-barnás 1-2 mm átmérőjű telepeket formált az inkubáció 7. napjára 58 °C-on (**16. ábra**). Ezek a telepek azonban a következő átoltást követően már nem voltak szaporodásra képesek folyékony médiumban.



16. ÁBRA *T. ACIDOPHILUM* TELEPEK SZILIKA-BÁZISÚ MÉDIUMON

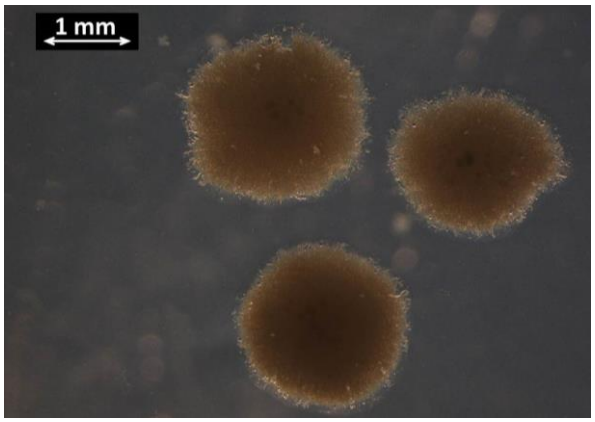
A phytagel-bázisú szilárd médiumon a szervezet 0,5-2 mm átmérőjű barnás telepeket képzett az inkubáció 10. napjára (**17. ábra**). A táptalajon kinőtt telepeket alkotó sejtek

szintén nem növekedtek folyékony médiumban a passzálást követően, ami kizárta a további felhasználását.

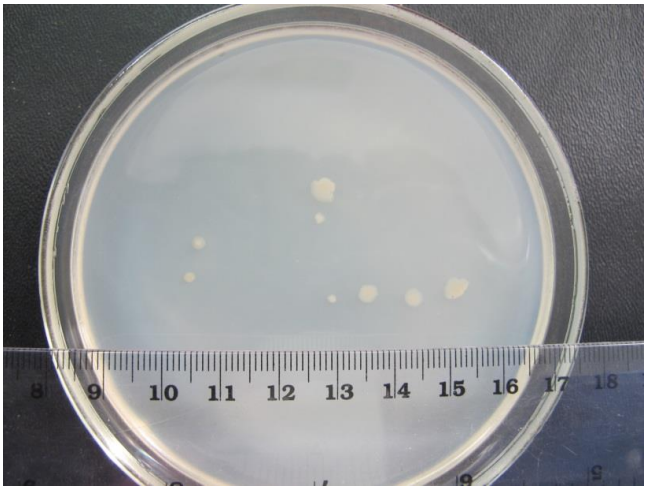


17. ÁBRA *T. ACIDOPHILUM* TELEPEK PHYTAGEL-BÁZISÚ MÉDIUMON

A gelrite-bázisú szilárd médiumot Yasuda (Yasuda et al., 1995a) leírása alapján készítettem, amelyet a japán szerzők által közölt 30 napos inkubációs idő csökkentése érdekében módosítottam. Annak érdekében, 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 (**18. és 19. ábra**).



18. ÁBRA *T. ACIDOPHILUM* TELEPEK GELRITE-BÁZISÚ SZILÁRD



19. ÁBRA *T. ACIDOPHILUM* TELEPEK GELRITE-BÁZISÚ SZILÁRD MÉDIUMON

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 a klonális szelekció céljából.

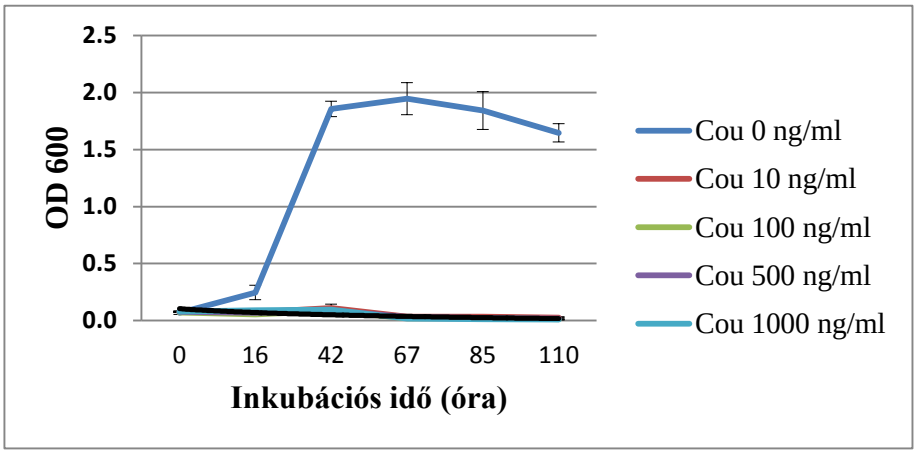
ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (I. tézis, a 4.1.3. fejezetben bemutatott eredmények alapján): A módosított gelrite-bázisú szilárd médium alkalmas a *Thermoplasma acidophilum* rutinszerű tenyésztésére szilárd médiumon, így ez a médium megfelel a klonális szelekcióra, genetikailag homogén sejtvonalak létrehozására. Az eredményeket nemzetközi publikációban adtuk közre (Baka et al., 2013).

4.2 Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok és marker gének

Egy genetikai eszközrendszer fejlesztésénél kritikus elem, hogy hogyan választjuk el a genetikailag manipulált sejteket a vad típustól. Ennek érdekében általában különböző antibiotikumokat szoktak alkalmazni. Ezen antibiotikumoknak tolerálniuk kell a magas hőmérsékletet és alacsony pH-t, ami a *T. acidophilum* tenyészkörülményeire jellemző. A rezisztencia vizsgálatokat először folyékony médiumban majd szilárd táptalajon is elvégeztem. A szilárd táptalajon elvégzett kísérleteknél tapasztaltam, hogy a folyékony médiumban eredményesen alkalmazott antibiotikum koncentráció nem volt hatékony szilárd médiumon, mert azon szatellit telepek jelentek meg. Ezen probléma megoldására szilárd táptalajon tízszeres antibiotikum koncentrációt alkalmaztam a továbbiakban. A minimum gátló koncentrációt (Minimum Inhibitory Concentration – MIC) minden egyes antibiotikumnál meghatároztam, viszont a *T. acidophilum* generációs idejére való tekintettel a MIC-et 4 napos (96 órás) inkubációt követően határoztam meg.

4.2.1 Nukleinsav szintézis gátlók

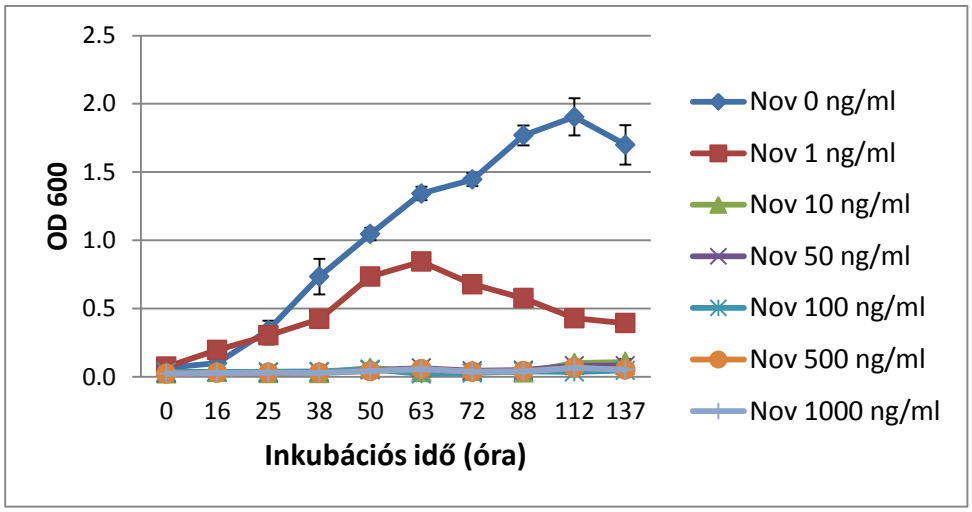
A kumermicin (Coumermycin A1) egy amino-kumerin antibiotikum, mely a DNS giráz működését gátolja, ezáltal lehetetlenné teszi a sejtek szaporodását. *T. acidophilum* esetében a kumermicin MIC értéke 10 ng/ml (**20. ábra**).



20. ábra *T. acidophilum* kumermicin érzékenységi teszt eredményei

Az optikai denzitás 600 nm-en történő meghatározásával, az ábra minden egyes koncentrációnál három mérés átlagát és szórását mutatja.

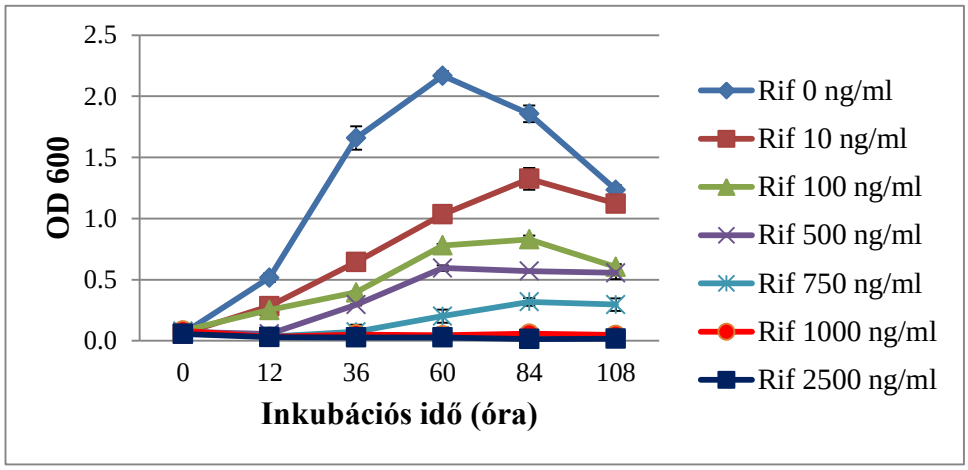
A novobiocin, mely szintén az amino-kumarinok csoportjába tartozik, hatásmechanizmusában megegyezik a kumermicinnel. Szakirodalmi adatok alapján tudtam, hogy a thermoplasma sejt nagyfokú érzékenységet mutat erre az antibiotikumra (Darland et al., 1970). A novobiocin érzékenységi teszt eredményeit a **21. ábra** szemlélteti. A novobiocin *T. acidophilum*-ra vonatkoztatott MIC értéke 10 ng/ml. Kísérleteink során 100 ng/ml-es koncentrációval szelektáltam a rezisztens sejteket.



21. ÁBRA *T. ACIDOPHILUM* NOVOBIOCIN ÉRZÉKENYSÉGI TESZT EREDMÉNYEI

Az optikai denzitás 600 nm-en történő meghatározásával, az ábra minden egyes koncentrációnál három mérés átlagát és szórását mutatja.

A rifampicin 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 a korábbi *in vitro* kísérletekben a *T. acidophilum*-ból izolált RNS polimerázt rezisztensnek találták (Sturm et al., 1980), ez utóbbi cikk alapján jelenleg valamennyi mikroba taxonómiával foglalkozó kiadványban rifampicin rezisztensként tartják nyilván a *T. acidophilum*-ot (Prokaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology). A rifampicin antibiotikum *T. acidophilum*-ra vonatkoztatott MIC értéke 1000 ng/ml (**22. ábra**) méréseim szerint.

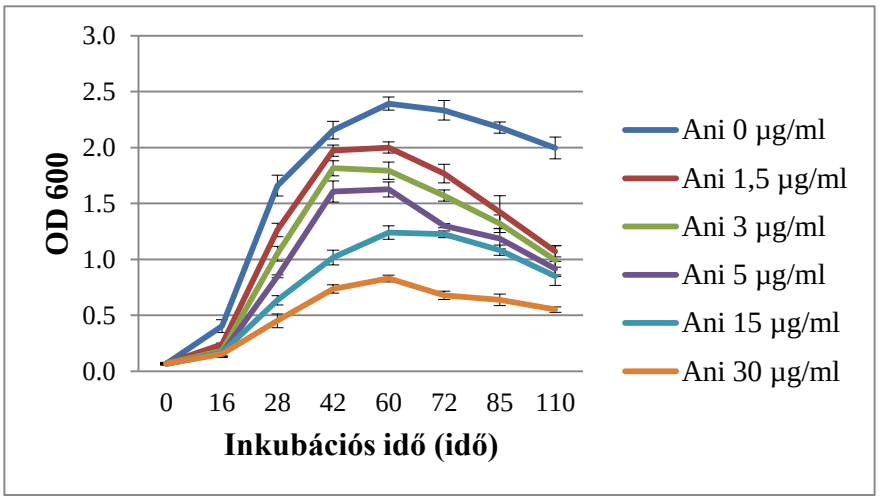


22. ÁBRA *T. ACIDOPHILUM* RIFAMPICIN ÉRZÉKENYSÉGI TESZT EREDMÉNYEI

Az optikai denzitás 600 nm-en történő meghatározásával, az ábra minden egyes koncentrációnál három mérés átlagát és szórását mutatja.

4.2.2 Fehérje szintézis gátlók

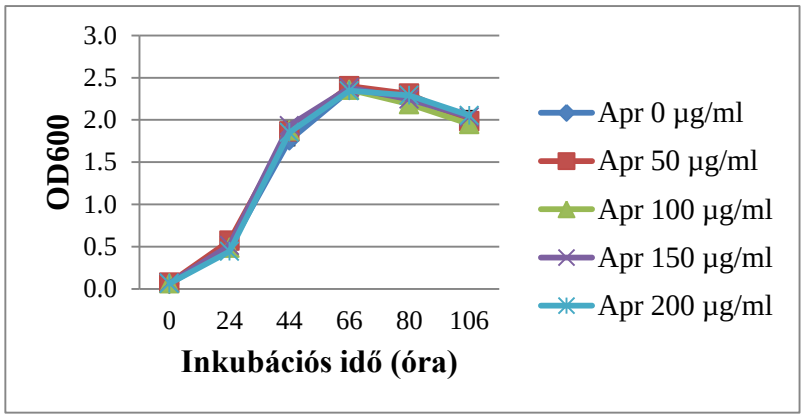
Az anizomicin gátolja a fehérje szintézist az 50S riboszóma alegység gátlásán keresztül. Az általánosan használt koncentrációban nem gátolta teljes mértékben a szervezet szaporodását (**23. ábra**).



23. ÁBRA *T. ACIDOPHILUM* ANIZOMICIN ÉRZÉKENYSÉGI TESZT EREDMÉNYEI

Az optikai denzitás 600 nm-en történő meghatározásával, az ábra minden egyes koncentrációnál három mérés átlagát és szórását mutatja.

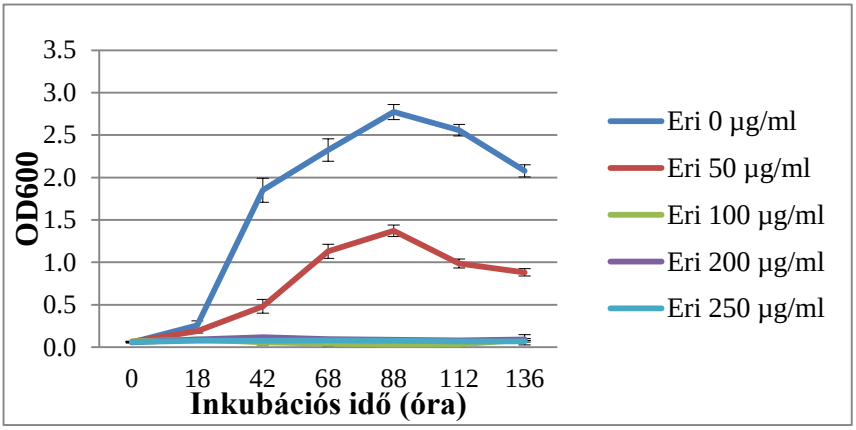
Az apramicin a fehérje szintézis során a transzlokációt gátolja. Az általánosan használt koncentráció tartományban nem gátolta a mikroba szaporodását (**24. ábra**).



24. ÁBRA *T. ACIDOPHILUM* APRAMICIN ÉRZÉKENYSÉGI TESZT EREDMÉNYEI

Az optikai denzitás 600 nm-en történő meghatározásával. Az ábra minden egyes koncentrációnál három mérés átlagát és szórását mutatja.

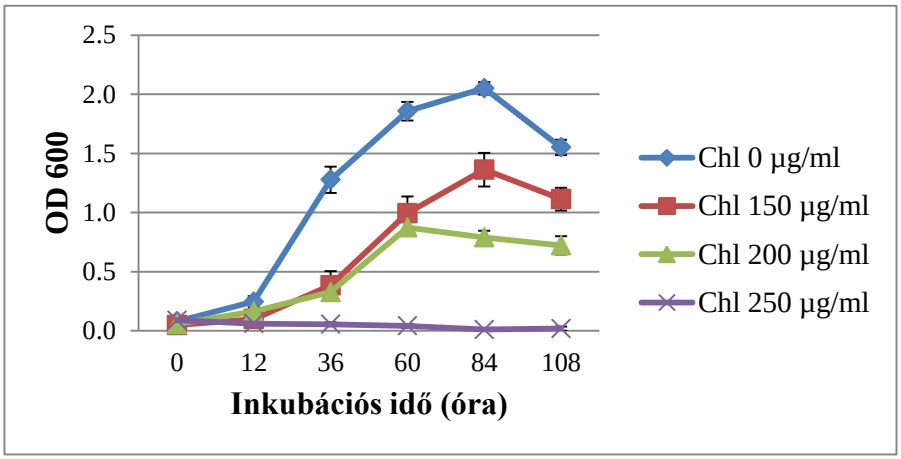
Az eritromicin a prokarióta riboszóma nagy alegységét gátolja. A eritomicin *T. acidophilum*-ra vonatkoztatott MIC értéke 100 µg/ml (**25. ábra**).



25. ÁBRA *T. ACIDOPHILUM* ERITROMICIN ÉRZÉKENYSÉGI TESZT EREDMÉNYEI

Az optikai denzitás 600 nm-en történő meghatározásával. Az ábra minden egyes koncentrációnál három mérés átlagát és szórását mutatja.

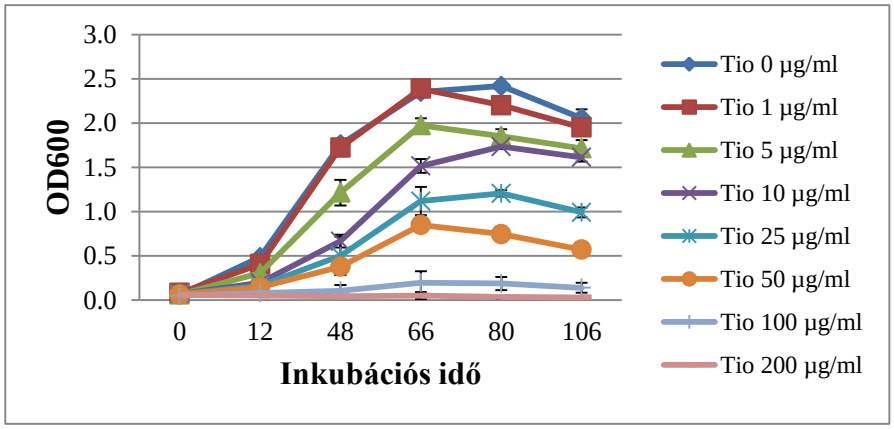
A klóramfenikol a riboszóma 50S alegységét ezen belül is a peptidil-transzferáz működését gátolja, *T. acidophilum*-ra vonatkoztatott MIC értéke 250 µg/ml (**26. ábra**).



26. ÁBRA *T. ACIDOPHILUM* KLÓRAMFENIKOL ÉRZÉKENYSÉGI TESZT EREDMÉNYEI

Az optikai denzitás 600 nm-en történő meghatározásával. Az ábra minden egyes koncentrációnál három mérés átlagát és szórását mutatja.

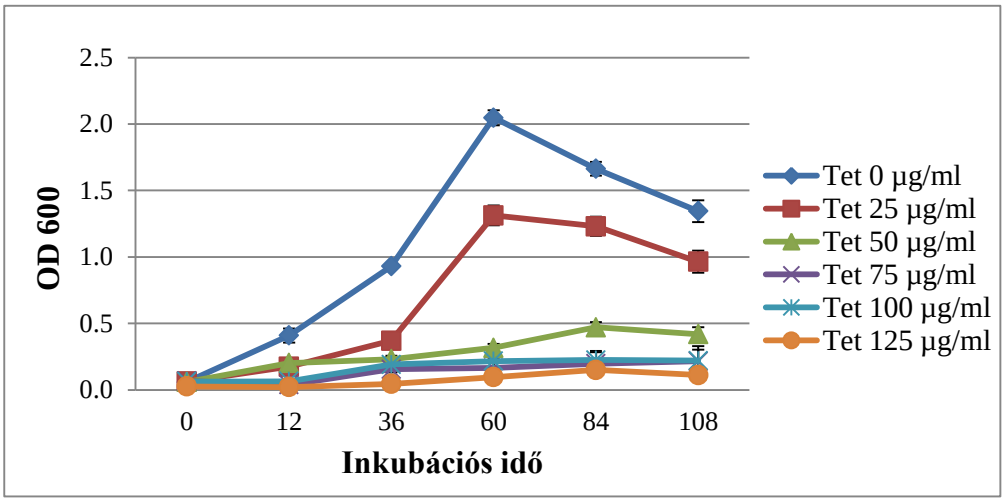
A tiosztrepton akadályozza a prokarióta fehérje szintézist, azáltal hogy gátolja az elongációs faktor és a GTP kötödését a riboszóma nagy alegységéhez. A tiosztrepton *T. acidophilum*-ra vonatkoztatott MIC értéke 200 µg/ml (**27. ábra**).



27. ÁBRA *T. ACIDOPHILUM* TIOSZTREPTON ÉRZÉKENYSÉGI TESZT EREDMÉNYEI

Az optikai denzitás 600 nm-en történő meghatározásával, az ábra minden egyes koncentrációnál három mérés átlagát és szórását mutatja.

A tetraciklin a riboszóma kis alegységét gátolja a tRNS-hez való kötődésén keresztül. Az általánosan használt koncentráció gradiensben nem gátolta teljes mértékben a szervezet növekedését, kismértékű szaporodás megfigyelhető volt minden esetben (**28. ábra**).



28. ÁBRA *T. ACIDOPHILUM* TETRACIKLIN ÉRZÉKENYSÉGI TESZT EREDMÉNYEI

Az optikai denzitás 600 nm-en történő meghatározásával, az ábra minden egyes koncentrációnál három mérés átlagát és szórását mutatja.

4.2.3 A szelekciós markerekhez alkalmazott rezisztencia gének

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat követően két antibiotikumot – novobiocin és rifampicin – választottam ki a további kísérletekhez. Egy adott antibiotikum csak akkor használható megfelelően szelekciós markerként a célszervezetben, ha benne kifejeződő és rezisztenciát okozó szelekciós marker gént tudunk hozzárendelni.

Novobiocin és marker génjei

A novobiocin esetében már leírtak egy novobiocin rezisztenciát okozó mutáns *gyrB* gént. Első generációs vektor konstrukcióimhoz az eredeti vad típusú *gyr*B génben *Pst*I és *Psi*I hasító helyei közötti DNS darabot eltávolítottam és a HO-62N1C törzs *gyrB* génjének hasonló, de a megfelelő (novobiocin rezisztenciáért felelős) mutációkat hordozó darabjával helyettesítettem (génbanki azonosító szám: AB206999) (Yamashiro & Yamagishi, 2005). A későbbiek során ezáltal novobiocinnal tudtam szelektálni a manipulált sejteket. A két gén kilenc aminosavban tér el, ezen aminosavakat kódoló nukleotidok megtalálhatóak a *Pst*I és *Psi*I hasítóhelyek közötti régióban.

A második generációs konstrukciókhoz a kevésébe homológ *T. volcanium gyrB* génjét alkalmaztam. A vad típusú *T. volcanium gyr*B génje nem okoz novobiocin

rezisztenciát, ezért, hogy céljaimnak megfeleljen, 7 aminosavat kicseréltem helyspecifikus mutagenezissel szakirodalmi adatok alapján. A kicserélt aminosavak az alábbiak voltak: a 136-os pozícióban levő arginint hisztidinre, a 174-es pozícióban levő glicint glutaminsavra, a 177-es pozícióban levő treonint alaninra, a 224-es pozícióban levő leucint lizinre, a 226-os pozícióban treonint izoleucinre, a 246-os pozícióban levő leucint alaninra, a 348-as pozícióban levő lizint argininre.

A harmadik generációs vektorokhoz egy mesterséges *gyrB* gént használtam, amely aminosav szinten 100% homológiát mutatott *gyrB*_A136H fehérjével, míg nukleotid szinten törekedtem arra, hogy 5 bázisnál nagyobb teljes átfedés ne legyen a két gén között. Ezt a *T. acidophilum* kodon-preferenciáját figyelembe véve triplettcserékkel hajtottam végre. A *synth_gyrB* gén és a vad típusú *gyrB* gén között 65%-os totál homológia volt. A mesterséges gént az Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Németország) cég szintetizálta meg. A mesterséges gén nukleotid és aminosav szekvenciája a NCBI génbank-ban letétbe lett helyezve az alábbi azonosító számon: JX456395. A gén összevetése (alignment) a vad típusú *gyrB* génnel a 4. számú mellékletben található.

Rifampicin és marker génje

Két főtípusú rifampicin rezisztencia alakult ki: (a) az antibiotikum kötőhelyének mutációja a DNS-dependens-RNS-polimeráz β-alegységében (*rpo*B gén által kódolt régió), ezáltal nem képes az antibiotikum kötődni és gátolni a szervezet szaporodását (Williams et al., 1994), (b) az ADP-riboziláció során az *arr*2 gén termékének segítségével inaktiválódik az antibiotikum (Tribuddharat & Fennewald, 1999). Kísérleteink során egy, a *Pseudomonas aeruginosa*–ból származó (génbanki azonosító szám: AF078527), *arr*2 gént használtam, mely Gerard D. Wright (McMaster University, Kanada) nagylelkű ajándéka volt.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (II. tézis, a 4.2.1. és 4.2.2. fejezetekben 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.

4.3 Vektor konstrukciók

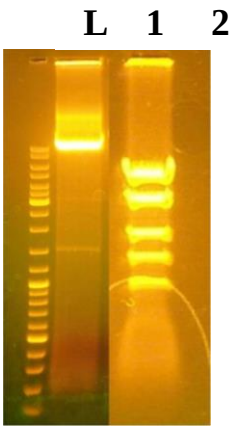
Genetikai eszközrendszer létfontosságú elemei a vektor konstrukciók, amelyekkel a célszervezetet új információval, tulajdonsággal tudjuk felruházni, továbbá genetikailag módosítani.

4.3.1 Shuttle vektorok

A shuttle (ingázó avagy bifunkcionális) vektorok képesek két különböző szervezetben a kromoszómától függetlenül, önállóan replikálódni. Ezen vektorokat a későbbi fehérje túltermeltetési célokból terveztem. Jelen esetben 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 *Nco*I DNS fragmentet a *T. acidophilum*-ból izolált egyetlen plazmidból, pTA1 (pozíció 13534 – 3916), amely 4 feltételezhető ori-régiót (Yamashiro et al., 2006) tartalmaz.

4.3.1.1 Plazmid izolálás T. acidophilum környezeti törzsekből

A shuttle vektorok fejlesztéséhez alkalmazott legcélszerűbb eljárás egy olyan vektor használata, amelyet természetes körülmények között is hordoz a szervezet. Szakirodalmi adatok alapján tudtam, hogy a Japánban izolált *T. acidophilum* törzsek közül számos hordoz plazmidot (Yasuda et al., 1995b). Vizsgálataim során megkíséreltem az összes Japánból származó *T. acidophilum* törzsből (JCM 17946–17956) plazmidot izolálni, viszont csak két törzsből, a HO-121 (JCM 17955) és a HO-122 (JCM 17956) sikerült megfelelő mennyiségű plazmidot kinyerni a későbbi munkánkhoz, a QIAGEN Plasmid Mega Kit segítségével, a gyártói instrukcióknak megfelelően. A plazmidokat restrikciós emésztéssel (*Nco*I és *Hinc*II enzimekkel) és nukleotidsorrend meghatározással vizsgáltam és megállapítottam, hogy a két plazmid azonos. A HO-122-es törzsből izolált pTA1 plazmid és a *Nco*I-gyel történt restrikciós emésztés képét a **29-es ábra** szemlélteti. A shuttle vektorok fejlesztéséhez ezt a plazmidot használtam.

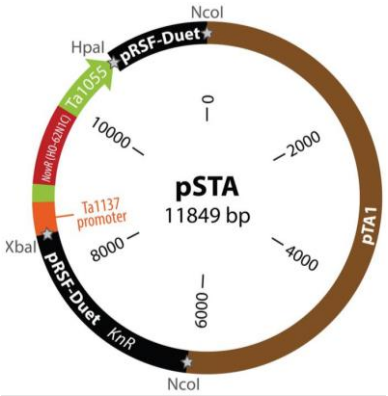


29. ÁBRA A HO-122 TÖRZSBŐL IZOLÁLT PLAZMID (1), RESTRIKCIÓS HASÍTÁSA *NCO*I-GYEL (2)

4.3.1.2 Kísérleteink során alkalmazott vektor konstrukciók – pSTA, pSTRif

A kísérletek során alkalmazott vektorokat az általuk hordozott rezisztencia marker gén alapján neveztem el: pSTA – *T. acidophilum* Nov^R *gyrB* gén (**30. ábra**) (génbanki azonosító szám: KC710297), pSTRif – Rif^R felelős *arr*2 gén (**31. ábra**).

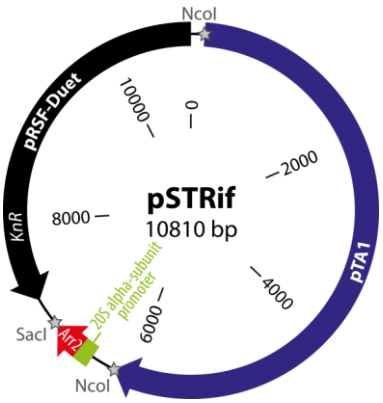
A rezisztencia gének (Nov^R *gyrB* és *arr2* gének) folyamatos vagy nagy mennyiségű átíródását elősegítendő olyan promótereket klónoztam e gének elé, melyek feltételezhetően konstitutív (Ta1137 – fehérje foldingért felelős gén) vagy nagy mennyiségben termelődő fehérje (Ta1288 – proteoszóma alfa alegységének génje) promóterei. A vektorokat a *T. acidophilum*-ba történő transzformációt megelőzően nukleotidsorrend meghatározással ellenőriztem.



30. ÁBRA A pSTA SHUTTLE VEKTOR TÉRKÉPE

A releváns restrikciós enzimek hasító helyeit az enzimek rövidített nevével jelöltem. Jelmagyarázat: a fekete nyílak az *E. coli* pRFS Duet vektort, mely a Kan^R gént és a RFS ori régiót tartalmazza, a barna szakasz a pTA1 vektorból származó 6106 bp nagyságú fragmentet (4 feltételezhető ori régió), a zöld nyíl a *T. acidophilum gyrB*

gént, benne a pirossal jelzett szakasz a Nov^{R} *gyrB* gént, a narancssárga szakasz a *gyrB* gén elé klónozott Ta1137 promótert jelöli.



31. ábra A pTSRif shuttle vektor térképe

A releváns restrikciós enzimek hasító helyeit az enzimek rövidített nevével jelöltem. Jelmagyarázat: a fekete nyílak az *E. coli* pRFS Duet vektort, amely a Kan^{R} gént és a RFS ori régiót tartalmazza, a kék nyíl a pTA1 vektorból származó 6106 bp nagyságú fragmentet (4 feltételezhető ori régió), a piros nyíl az *arr*2 gént, a zöld szakasz a gén elé klónozott 20S proteoszóma alfa alegységének (Ta1288) promóterét jelöli.

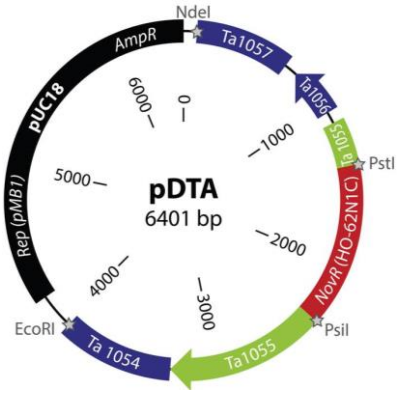
4.3.2 Integratív vektorok

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

4.3.2.1 *pDTA és pNTA vektorok – helyspecifikus mutagenezis*

Az első generációs integratív vektorok alapja a pUC18-as *E. coli* specifikus plazmid volt. *Nde*I és *Eco*RI 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) (génbanki azonosító szám: AL445066), ezáltal létrehozva a pDTA plazmidot (génbanki azonosító szám: KC710295). A vektor nem tartalmaz *T. acidophilum* specifikus ori régiót, ezáltal elméletileg nem képes önálló replikációra a célszervezetben. A vad típusú *gyrB* gént módosítottam a 4.2.3-as fejezetben leírtaknak megfelelően. Az integratív vektor sematikus térképét a **32. ábra** szemlélteti. A pNTA vektor a pDTA vektor helyspecifikus mutagenezissel módosított változata, amelyben kicseréltem a 136-os pozícióban levő arginint hisztidinre (*gyr*B_A136H). Szakirodalmi adatok alapján tudtam, hogy ezen módosítás jelentősen megnöveli (~4,6-szorosára) a tisztított enzim

novobiocin rezisztenciáját az *in vitro* kísérletek során (Yamashiro & Yamagishi, 2005). Munkám során ezt a hatást kívántam vizsgálni *in vivo* körülmények között. Mindkét vektortípust a felhasználás előtt szekvenálással ellenőriztem.

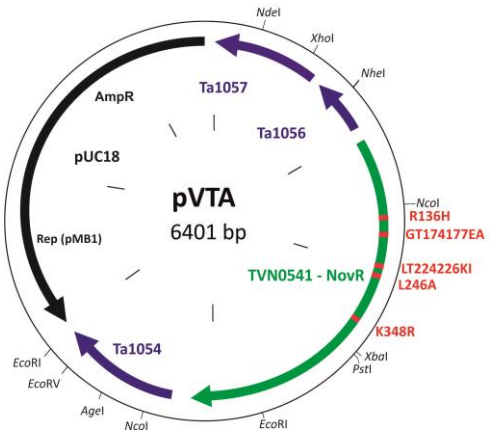


32. ÁBRA A pDTA INTEGRATÍV VEKTOR TÉRKÉPE

A releváns restrikciós enzimek hasító helyeit csillaggal és az enzimek rövidített nevével jelöltem. Jelmagyarázat: a fekete nyíl az *E. coli* pUC18 vektort, mely az Amp^R gént és a pMB1 ori régiót tartalmazza, a kék nyilak a rövidített Ta1054 (*gyrA* gén), Ta1056 és Ta1057 géneket kódoló DNS szakaszokat, a zöld nyíl a Ta1055 (*gyrB* gén) gént és benne a piros résszel a HO-62N1C törzsből származó novobiocin rezisztenciát hordozó mutáns gén darabot (mely a *Psi*I-*Pst*I klónozó helyekre lett beépítve) jelölik.

4.3.2.2 *pVTA – Thermoplasma volcanium gyrB*

A második generációs integratív vektor a kevésbé homológ *T. volcanium gyr*B-jét tartalmazta. A pVTA vektort a pDTA vektorból hoztam létre (**33. ábra**), melyben a *gyr*B gént kicseréltem a *T. volcanium* Nov^R *gyr*B génjére overlapping mega-primer alapú PCR technika segítségével. A vektort a felhasználás előtt szekvenálással ellenőriztem. A *T. volcancium* Nov^R *gyr*B génje nukleotid szinten a módosításokat követően 75%-os hasonlóságot mutatott a vad típusú *T. acidophilum gyr*B génjével. Viszont meg kell jegyezni, hogy a *T. volcancium* Nov^R *gyr*B génje és a *T. acidophilum* genom között voltak olyan szakaszok (~100 bp hosszúságúak) amelyek 100% homológiát mutattak.



33. ÁBRA A PVTA INTEGRATÍV VEKTOR TÉRKÉPE

A releváns restrikciós enzimek hasító helyeit az enzimek rövidített nevével jelöltem. Jelmagyarázat: a fekete nyíl az *E. coli* pUC18 vektort, mely az Amp^R gént és a pMB1 ori régiót tartalmazza, a kék nyilak a Ta1054 (*gyrA* gén), Ta1056 és TA1057 géneket kódoló DNS darabot, a zöld nyíl a TVN0541-et (*gyrB* gén) és benne pirossal jelölve a helyspecifikusan módosított aminosavak helyét jelölik.

4.3.2.3 *pDTA_synth és a mesterséges gyrB*

A harmadik generációs integratív vektor egy mesterséges girázB (*synth_gyr*B) gént hordoz. A pDTA vektorban a *gyr*B gént kicseréltem a *synth_gyr*B génre overlapping mega-primer alapú PCR technika segítségével, majd felhasználás előtt nukleotidsorrend meghatározással is ellenőriztem.

4.3.2.4 *pDTA_arr2 és a rifampicin rezisztencia*

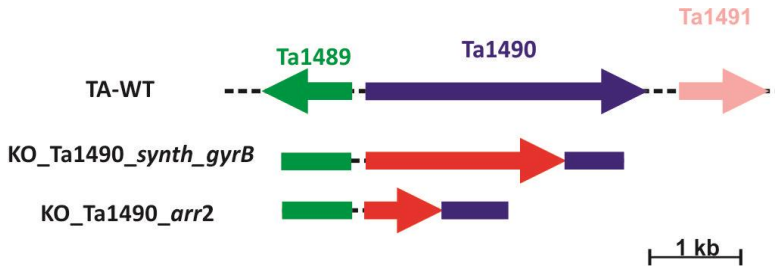
A novobiocin rezisztencia markert hordozó, csak *E. coli* ori régiót tartalmazó pDTA-vektorral transzformált *T. acidophilum* tenyészetből nem várt módon sikerült az intakt plazmidot visszaizolálnunk. Ez felvetette annak lehetőségét, hogy a *T. acidophilum* képes volt az *E. coli* ori régió felismerésére. Így adódott egy egyszerű lehetőség a rifampicin rezisztencia faktor gyors tesztelésére. A pDTA vektorba a *gyr*B gén helyére a rifampicin rezisztenciát okozó *arr*2 gént klónoztam overlapping mega-primer alapú PCR technika segítségével, ezáltal létrehozva a pDTA_*arr*2 vektort. A vektort későbbi felhasználás előtt nukleotidsorrend meghatározásnak vetettem alá.

4. 3.3 Lineáris konstrukciók

Ősbaktériumok és eukarióta sejtek esetében számos esetben értek el pozitív transzformációs eredményeket lineáris DNS konstrukciók bejuttatásával.

4.3.3.1 *KO konstrukciók*

A knock-out (gén kiütés; KO) konstrukcióimmal két gént céloztak meg. A Ta0895 és Ta1490-es géneket választottam ki, előbbi egy nem azonosított funkciójú fehérje génje, melyről úgy tartják, hogy egy ubiquitinhez hasonló ősbaktériumok által kódolt fehérje. A Ta1490-es gén pedig a tricorn proteázt kódolja. A KO konstrukciók 3 fő elemből épültek fel: a konstrukció magja a rezisztencia gén, mely esetemben a *synth_gyr*B és az *arr*2 gén volt, ettől upstream (5' irányban) és downstream (3' irányban) átfedő, homológ régiók voltak. Az upstream régió mindkét esetben a kiütendő géntől 5' irányban található ~500-600 bp-nyi szakaszt tartalmazta, amely 100%-ban homológ volt a kiütendő géntől 5' irányban levő régióra. A downstream régió a kiütendő géntől 3' irányban található ~500-600 bp-nyi szakasszal fedett át. A **34. ábra** a KO_Ta1490_*synth_gyr*B és KO_Ta1490_*arr*2 konstrukciók sematikus rajzát mutatja a cél genomi régióval. Az 5' irányban levő átfedő régiók génbank-i azonosítója az alábbi: Ta0895-ös konstrukció esetében AL445065 bázisok 281025-281643; Ta1490-es konstrukció esetében U72850 bázisok 596–1191. A 3' irányban levő átfedő régiók génbank-i azonosítója az alábbi: Ta0895-ös konstrukció esetében AL445065 bázisok 281917-282519; Ta1490-es konstrukció esetében U72850 bázisok 4404-5040.



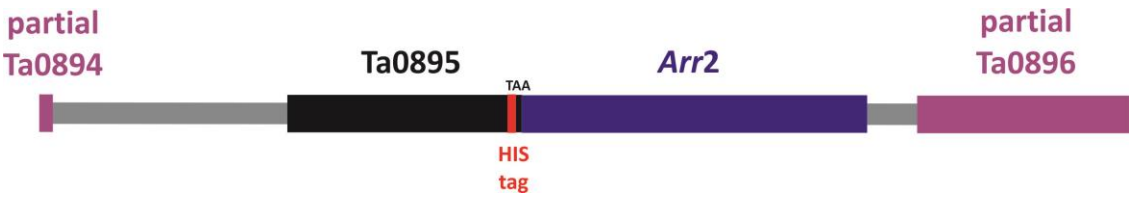
34. ábra Lineáris konstrukciók: KO_Ta1490_*synth_gyrB* és KO_Ta1490_*arr2*

A piros nyilak jelölik a rezisztencia géneket (*synth_gyr*B és *arr*2). A releváns genetikai elemeket különböző szinek (zöld és kék), a gén nevéz és irányultságát (a nyíl iránya) feltüntetve. A zöld és kék téglalapok a gének (Ta1489 és Ta1490) egy részét jelöli a KO konstrukciókban.

4.3.3.2 *HIS-tag konstrukciók*

Lineáris HIS-tag konstrukcióim lényege, hogy a célgént egy dupla homológ rekombináció (double homologous recombination) segítségével egy 6 hisztidinből (HIS-tag) álló egységgel látjuk el későbbi fehérje tisztítási célból. A 6 hisztidinből

álló egységet a célgén (Ta0895) stop kodonja (TAA) elé klónoztam overlapping mega-primer alapú PCR technika segítségével (**35. ábra**).



35. ÁBRA LINEÁRIS KONSTRUKCIÓ: HIS_TA0895_*ARR2*

A fekete szín jelöli a célgént (Ta0895), benne a pirossal jelölt 6xHIS egységgel (HIS-tag). A rezisztencia gént (*arr*2) kék szín jelöli. A konstrukcióban szereplő homológ, releváns genetikai elemek szintén jelölve vannak, lila színnel a struktúrgének, szürkével a gének közötti nemkódoló szakaszok.

Az vektor konstrukciót összefoglaló táblázat a **5. Melléklet**ben található.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (III. tézis, a 4.3.1., 4.3.2. és 4.3.3. 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*, KO_Ta1490_*arr2* és HIS_Ta0895_*arr2*) építettem a *Thermoplasma acidophilum* számára.

Az eredményeket hazai és nemzetközi publikációban adtuk közre (Baka, 2010; Baka et al., 2013)

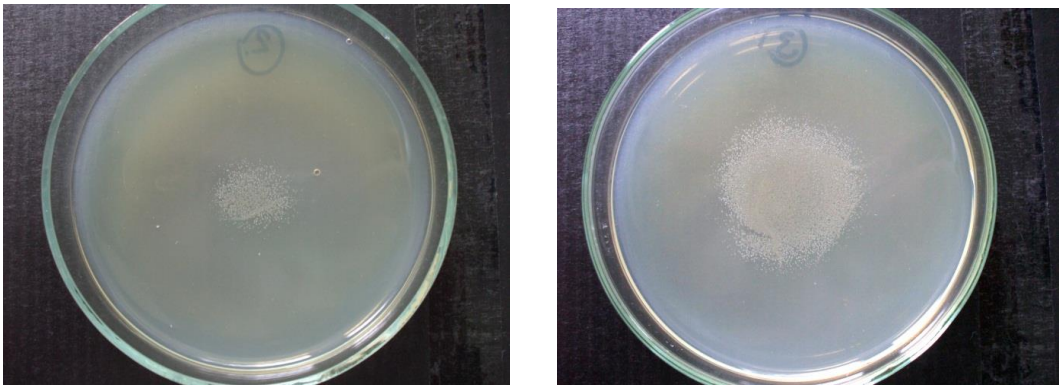
4.4 Transzformációs módszer

Egy genetikai eszközrendszer fejlesztésénél a legkritikusabb lépés a transzformációs módszer fejlesztése, mely során a célszervezetbe külső DNS-t juttattunk be. Számos módszert alkalmaztak már ősbaktériumok transzformációjára: a polietilén-glikolos (PEG) szferoplaszt transzformációt *Halobacterium* és *Haloferax* törzsek esetében 10^2 – 10^8 transzformáns/µg DNS hatékonysággal (Allers & Ngo, 2003; Cline et al., 1989); liposzóma közvetített transzformációt *Methanosarcina* fajokban (Metcalf et al., 1997); hősokk általi transzformációt *Thermus thermophilus*-nál (Koyama et al., 1986) vagy a *Sulfolobus* törzsek transzformációját elektroporációval (Schleper et al., 1992).

A doktori munkám során a fent említett módszereket teszteltem *T. acidophilum* transzformációjára, a szakirodalmi protokolloknak megfelelően, eredmény nélkül. Néhány olyan módszert is teszteltem, mely baktérium és ősbaktérium genetikában nem használatos, viszont elvileg alkalmazható a célszervezetre: a ballisztikus elven működő génpuskát és magnetofekciót.

4.4.1 Génpuska

A génpuska transzformációs módszert főként növényi és állati szövetek transzformációjára szokták használni (Klein & Fitzpatrick-McElligott, 1993). A génpuskával történő transzformáció során a DNS-sel bevont különböző átmérőjű (100 nm, 250 nm) aranyszemcséket (biológiailag inert részecskék) kíséreltem meg fizikálisan belőni a sejtekbe. A kísérleteteket a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban végeztem. Az általunk használt aranyrészecskék mérete 20–40 nm volt. Első lépésként sikeresen optimalizáltam a módszert *E. coli* sejtekre (**36. ábra**), annak érdekében, hogy teszteljem egy rutinszerűen tenyésztett labor mikroorganizmus transzformációját génpuska segítségével. Sikerült visszaigazolnom az intakt plazmid (pUC18) jelenlétét a transzformált sejtvonalakban. Ezt követően megkíséreltem *T. acidophilum* sejtek transzformációját; amellyel elvétve sikerült pozitív eredményt elérnünk, viszont a transzformációt nem tudtuk rutinszerűen megismételni, ami pedig létfontosságú lenne egy genetikai eszközrendszernél.



36. ÁBRA *E. COLI* GÉNPUSKA ÁLTALI TRANSZFORMÁCIÓ EREDMÉNYE

4.4.2 Magnetofekció

Ezt követően a magnetofekció módszert teszteltem az anyagok és módszerek fejezteben leírtaknak megfelelően. Az inkubációs idő elteltével nem tapasztaltam növekedést, a transzformáció sikertelen volt, habár az alkalmazott pozitív növekedési kontroll – azonos kezelésen átesett, de antibiotikumot nem tartalmazó táptalajra lett kiszélesztve – az inkubációs idő elteltével képes volt növekedni. Vagyis a sejtek életképesek maradtak a transzformáció során, viszont valószínűsíthetően a vektor konstrukciók nem jutottak be a célszervezetbe.

4.4.3 Liposzóma mediált transzformáció

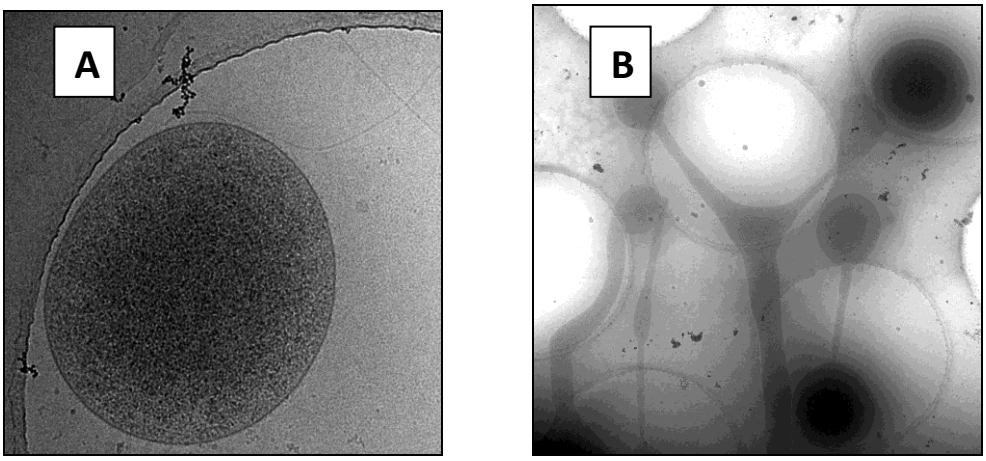
A liposzóma mediált transzformációt az anyagok és módszerek fejezteben leírtak szerint végeztem el. Az inkubációs idő elteltével nem tapasztaltam növekedést sem a transzformánsoknál, sem a pozitív növekedési kontrollnál, vagyis a transzformáció nem volt sikeres és feltételezhetően a sejtek nem voltak életképesek a transzformációt követően.

4.4.4 Dialízis

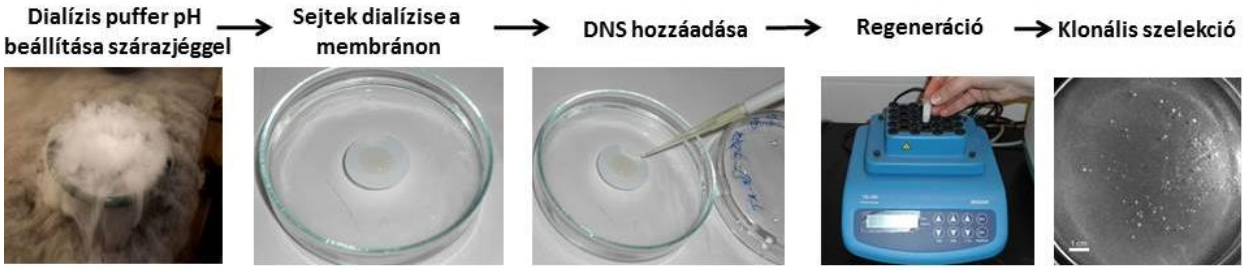
Ezen sikertelen kísérleteket követően egy teljesen új módszert próbáltam ki. Szakirodalmi adatok alapján tudtom, hogy ha a *T. acidophilum* pH-ját emeljem, a sejtek plasztikussá válnak (Kofler, 2006) (**37. ábra**). Továbbá számos mikroorganizmusról tudott, hogy képesek természetes transzformációra, vagyis spontán DNS felvételre a könyezetükből (Lorenz & Wackernagel, 1994). Ezen információkat használtam fel az általam fejlesztett új transzformációs módszerhez. Első lépésként vizsgáltam, hogy milyen pH értékeket képesek a sejtek tolerálni, továbbá, hogy milyen idős sejtkultúra képes legjobban tolerálni a tenyészkörülményekhez képest magasabb pH értéket. Ezt követően fejlesztenem

kellett egy olyan technikát, melynek segítségével változtatni tudom a transzformálni kívánt sejtek pH-ját. Ehhez egy dialízis membránt használtam, melynek pórusmérete kisebb a *T. acidophilum* sejtek méreténél. Mivel ez a dialízis membrán átjárható az oldat molekulái számára, tudtam változtatni a transzformálandó sejtek környezetének pH-ját. A dialízist követően a sejtekhez hozzámértem a DNS-t, majd újfent inkubáltam – ezt volt a transzformációs lépés. A módszer főbb lépéseit a **38. ábra** szemlélteti. A dialízis és a transzformációs inkubáció hossza kritikus volt, ha a dialízis időtartalma nem érte el a 30 percet, a sejtek membránja nem vált permeábilissá és a DNS felvétel nem történt meg. Emellett, ha a dialízis és transzformáció időtartama hosszabb volt, mint 150 perc, a sejtek életképessége jelentősen csökkent. Továbbá, a DNS koncentrációja limitáló faktor volt, nagy koncentrációjú és tisztaságú DNS-re volt szükség; a minimum DNS mennyiség, amely egy transzformációhoz szükséges, 5 µg volt. Számos optimalizációs lépést követően az alábbi módszert fejlesztettem:

58 °C-ra előmelegített 30 ml steril ultratiszta víz pH-ját 4,5-re állítottam szárazjéggel, melyet egy Petri csészébe pipettáztam, ez volt a dialízis folyadék vagy transzformációs puffer. Ezt követően 200 µl sejtkultúrát (OD_{600}: 0,8-1,0) a dialízis membrán felszínére mértem, mely a dialízis folyadék felszínén úszott. A sejtkultúrát addig inkubáltam, míg pH-ja el nem érte a 3,5-öt, ehhez nagyjából 60 percre volt szükség. Majd 5 µg DNS hozzáadását követően újabb 60 percig inkubáltam a rendszert. A transzformációt követően a sejteket 1 ml friss, antibiotikumot nem tartalmazó folyékony *Thermoplasma* médiumba helyeztem a dialízis membránnal együtt, és 12 órán keresztül 58 °C-on 700 rpm rázatás mellett Eppendorf Thermomixerben regeneráltattam. A regenerációt követően 200 µl sejtszuszpenziót szélesztettem novobiocin és rifampicin tartalmú gelrite-bázisú szilárd táptalajra. Ezzel a módszerrel sikerült 10^2-10^4 transzformáns/µg DNS transzformációs hatékonyságot elérnem.



37. ÁBRA KRIO-ELEKTRONMIKROSZKÓPOS FELVÉTEL *T. ACIDOPHILUM* SEJTEKRŐL NORMÁL ÁLLAPOTBAN (A) ÉS DIALÍZIST KÖVETŐEN (B) (KOFLER, 2006)



38. ÁBRA A DIALÍZIS-TRANSZFORMÁCIÓ FŐBB LÉPÉSEI

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (IV. tézis, a 4.4.4. fejezetben bemutatott eredmények alapján): Az új és specifikus transzformációs módszer alkalmas a idegen genetikai anyag bejutattására a a *Thermoplasma acidophilum*- ba, 10^2-10^4 transzformáns/µg DNS transzformációs hatékonysággal. Az eredményeket nemzetközi publikációban adtuk közre (Baka et al., 2013).

4. 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. A transzformáció sikerességét egyrészt az antibiotikum rezisztencia megjelenésével igazoltam. Ezzel párhuzamosan molekuláris módszerekkel analizáltam a plazmid fennmaradást vagy a genomi integrációt a vektor konstrukciónak megfelelően. Klonális szelekciót is végeztem az egyes rezisztens transzformánsokkal azok további analíziséhez, illetve a transzformációs gyakoriság meghatározásához.

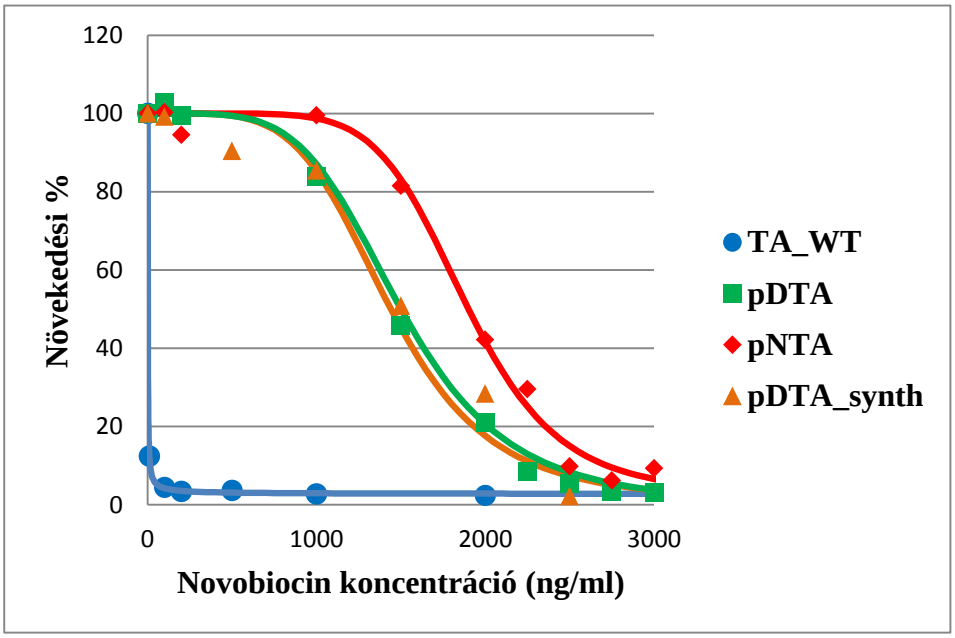
4.5.1 Novobiocin rezisztens *T. acidophilum* sejtvonalak

Novobiocin rezisztencia gént hordozó sejtvonalakat a következő vektorokkal sikerült kialakítanom: shuttle vektorok- pSTA; integratív vektorok- pDTA, pNTA, pVTA, pDTA_*synth*; lineáris KO konstrukciók– KO_Ta1490_*synth_gyr*B, KO_Ta0895_*synth_gyr*B.

4.5.1.1 *Antibiotikum érzékenységi tesztek*

Novobiocin érzékenységi tesztet végeztem el az alábbi sejtvonalakkal: TA-WT, pDTA, pNTA, pDTA_*synth*. Az eredményeket a **39. 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 (Yamashiro & Yamagishi, 2005). 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 törzzsel. A rezisztencia növekedésre magyarázat lehet, hogy a transzformáns sejtek feltételezhetően több GyrB enzimet expresszáltak, hiszen több kópiában tartalmazták a plazmid lokalizációjú mutáns *gyrB* gént, mint a vad törzs sejtjei, ahol csak genomi lokalizáció volt. A pNTA sejtvonal 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 (Yamashiro &

Yamagishi, 2005). 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, valószínűleg a ritka kodonok használata miatt alacsonyabb GyrB expresszió miatt.



39. ÁBRA NOVOBIOCIN ÉRZÉKENYSÉGI TESZTEK KÜLÖNBÖZŐ REZISZTENS SEJTVONALAKKAL

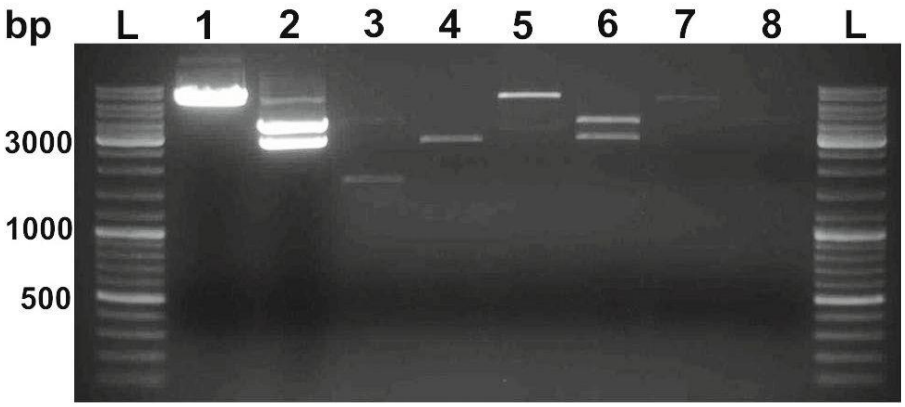
Jelölések: pDTA - narancsszínű vonal és narancsszínű négyzet; pDTA_*synth* - zöld színű vonal és zöld színű háromszög; pNTA–piros színű vonal és piros színű gyémánt, továbbá a vad típusú *T. acidophilum* sejtvonallal (kék színű vonal és kék színű kör). A különböző törzseket 0-3000 ng/ml novobiocin jelenlétében inkubálvtam 58 °C-on 72 órán keresztül. Az optikai denzitást 600 nm-en mértem, az egyes pontok három párhuzamos átlagát képezik. A novobiocin jelenléte nélküli növekedést vettem 100%-nak.

4.5.1.2 *Molekuláris biológiai analízis*

A molekuláris biológiai analízis során minden esetben, attól függetlenül, hogy integratív vektorral vagy shuttle vektorral transzformáltam a *T. acidophilum* sejteket, végeztem a plazmid fennmaradási teszteket és a genomi integráció analízist is. A lineáris konstrukciók esetében csak a genomi integráció analízisét végeztem el.

4.5.1.2.1 Plazmid fennmaradási tesztek

Első lépésként a novobiocin rezisztens sejtvonalakból (10 ml-ből) megkíséreltem plazmidot izolálni Qiaprep Spin Miniprep Kit-tel, melyet agaróz-gélelektroforézissel és nanofotométerrel vizsgáltam. Ezt követően az izolált plazmidokat visszatranszformáltam *E. coli* sejtekbe, melyeket ampicillin és kanamicin tartalmú táptalajon tenyészettem 37 °C-on egy éjszakán át. Az előzetes várakozással ellentétben a shuttle vektorral (pSTA vektor) transzformált *T. acidophilum* sejtekből nem sikerült plazmidot izolálni. Ennek oka az lehet, hogy vagy túl nagyméretű volt a plazmid vagy a pTA1-ből használt 6106 bp-nyi szakasz nem tartalmazott olyan genetikai elemet, amely a plazmid fennmaradásáért felelős; esetleg a szelekciós marker gén és a vad típusú *gyrB* gén közötti nagy homológia kedvezett a homológ rekombinációnak. 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. Meg kell jegyezni, hogy *T. acidophilum*-ból történő izolálást követően a plazmid DNS mennyiség olyan alacsony volt, hogy azt sem agaróz-gélelektroforézissel, sem nanofotométer segítségével nem sikerült kimutatni, így a kópiaszám igen alacsony volt. A pDTA vektort hordozó *T. acidophilum* sejtvonalak közül 10 klónt analizáltam, ebből a 10 klónból 3 klón esetében (Klón 1,4,7) sikerült plazmidot izolálni. A restrikciós emésztést *Xho*I enzimmel (1,3,5 és 7-es sor) vagy *Eco*RI - *Xho*I enzimkombinációval (2,4,6 és 8-as sor) végeztem, az eredményeket a **40. ábra** szemlélteti. A várt fragmentek mérete *Xho*I-gyel történő hasításnál: 6401 bp, *Eco*RI - *Xho*I hasításánál: 3644 + 2757 bp. Jól látható, hogy a Klón 4-es (5-6. sor) ez eredeti vektort hordozta, míg a másik két klónból izolált plazmidok nem egyeztek meg az eredeti vektorral. Valószínűsíthető, hogy a szervezet képes volt néhány esetben az *E. coli*-specifikus replikációs origót felismerni, és így a pDTA plazmid fenn tudott maradni a sejtekben.

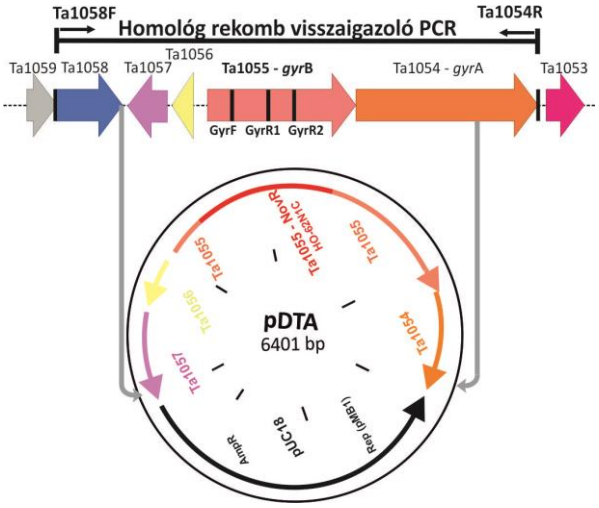


40. ÁBRA *T. ACIDOPHILUM*-BÓL IZOLÁLT, MAJD *E. COLI* SEJTEKBE TRANSZFORMÁLT ÉS ÚJRAIZOLÁLT PLAZMIDOK RESTRIKCIÓS EMÉSZTÉSE *XHO*I ÉS *ECO*RI-*XHO*I ENZIMEKKEL

Jelölések: L - GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 100-10,000 bp; 1-2, pDTA vektor (pozitív kontroll); 3-4, Klón 1; 5-6, Klón 4; 7-8, Klón 7.

4.5.1.2.2 Genomi integráció igazolása

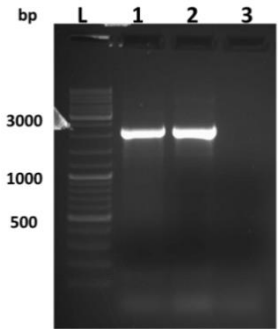
A genomi integráció vizsgálata érdekében első lépésként genomi DNS-t izoláltam a novobiocin rezisztens *T. acidophilum* sejtekből. Az integratív genomi régión kívül eső szakaszra specifikus primerek segítségével felszaporítottam első lépésként a tágabb genomi régiót, majd nested PCR reakciókkal megszekvenáltam a *gyrB* gént. A módszer sémáját pDTA vektorok esetében a **41. ábra** szemlélteti.



41. ÁBRA A HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ VISSZAIGAZOLÁSÁNAK GENOMI ALAPJAI

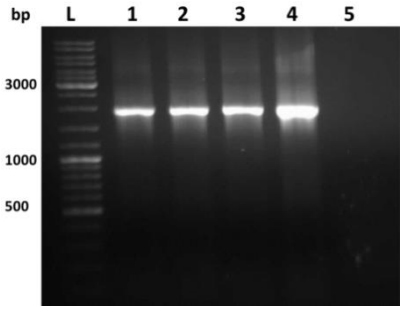
A genom specifikus primerek shuttle és integratív vektorok esetében: Ta1058F és Ta1054R, lineáris konstrukciók esetében: 895_genom_up és 895_genom_down, emellett Tricorn_genom_up és Tricorn_genom_down voltak. A rezisztencia génekre

specifikus primerekkel megkíséreltem felszaporítani a *T. acidophilum gyrB* (pSTA és pDTA vektor) és *gyrB*-A136H (pNTA vektor), *T. volcanium gyrB* (pVTA vektor) és *synth_gyrB* (pDTA_synth vektor) géneket. Az első három esetben (pSTA, pDTA és pNTA vektorok) sikerült visszaigazolnom a homológ rekombinációt. Az azonosított szekvenciák génbanki azonosító száma a pSTA vektor esetében: KC710298–KC710299; a pDTA és pNTA vektorok esetében: KC710300–KC710319. Viszont a *T. volcanium gyr*B és *synth_gyr*B géneket nem sikerült az adott régióból visszaigazolni. Mivel a novobiocin rezisztencia tesztek során ez a két sejtvonal rezisztensnek bizonyult, elvégeztem a rezisztencia génekre specifikus PCR reakciói (TVGyrBreverse és TvGyrBforward; Synth_GyrB_R és Synth_GyrB_F primerekkel) a teljes genomi izolátumra, amely pozitívnak bizonyult (**42.** és **43. ábra**), ezt nukleotidsorrend meghatározással is igazoltam. Vagyis, a rezisztencia gének jelen voltak, viszont aspecifikusan integrálódtak.



42. ÁBRA *T. VOLCANIUM* NOVR *GYR*B GÉN SPECIFIKUS PCR REAKCIÓJÁNAK EREDMÉNYEI

A PCR reakciót TVGyrBreverse és TvGyrBforward primerekkel végeztem el, a templát a pVTA vektorral transzformált genomi izolátum volt. Jelölések: L - GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 100-10.000 bp; 1 – genomi izolátum pVTA vektorral transzformált *T. acidophilum* sejtekből, 2 – pozitív kontroll, pVTA vektor, 3 – negatív kontroll.



43. ÁBRA *SYNTH_GYRB* GÉN SPECIFIKUS PCR REAKCIÓ EREDMÉNYEI

A PCR reakciót Synth_GyrB_R és Synth_GyrB_F primerekkel végeztem el, a templát a pDTA_synth vektorral transzformált genomi izolátumok voltak. Jelölések: L - GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 100-10.000 bp; 1 – 3 párhuzamos genomi minták *T. acidophilum* novobiocin rezisztens sejtvonalakból, 4 – pozitív kontroll, pDTA_synth vektor, 5 – negatív kontroll.

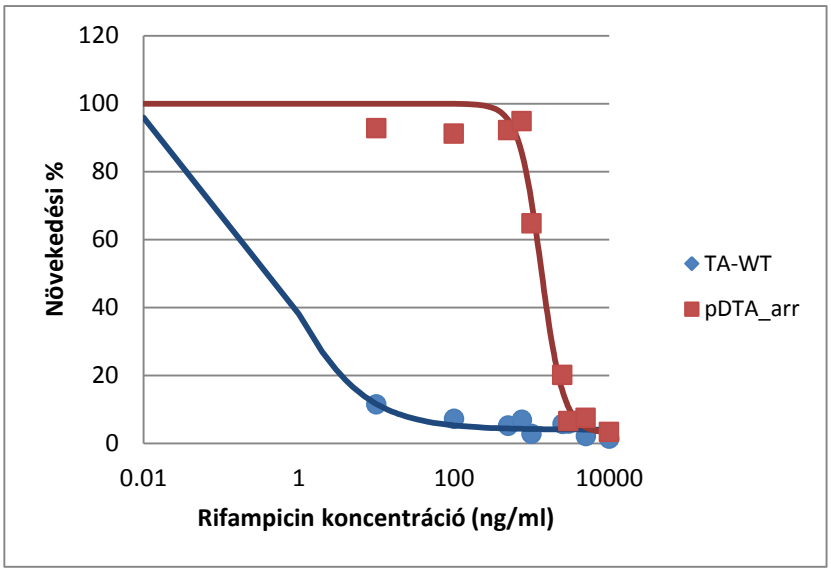
A lineáris KO konstrukciókkal elvégzett transzformációkat követően sikerült novobiocin rezisztens sejtvonalakat létrehoznom, viszont ugyanazt tapasztaltam, mint a pVTA és pDTA_*synth* vektorokkal való transzformációt követően. A lineáris konstrukciót nem tudtam a célrégióból visszaigazolni, viszont a rezisztencia gént sikerült visszaigazolnom a genomi izolátumból, tehát az aspecifikusan integrálódott a genomba.

4.5.2 Rifampicin rezisztens *T. acidophilum* sejtvonalak

A rifampicin rezisztencia gént (*arr*2 gén) hordozó sejtvonalak a következők voltak: shuttle vektor– pSTRif; integratív vektor- pDTA_*arr*2; lineáris konstrukciók– KO_Ta1490_*arr*2, KO_Ta0895_ *arr*2, HIS_Ta0895_*arr*2.

4.5.2.1 *Antibiotikum érzékenységi tesztek*

Rifampicin érzékenységi tesztet végeztünk el az alábbi sejtvonalakkal: TA-WT, pDTA_Arr2. Az eredményeket a **44. ábra** szemlélteti. Jól látható, hogy a vad típusú *T. acidophilum* sejtvonal (kék szín) nem képes tolerálni a rifampicin jelenlétét már kis koncentrációban sem, ahogy azt már korábban is igazoltam. Viszont a pDTA_*arr*2 vektort (piros szín) hordozó sejtvonal hozzávetőlegesen 2500 ng/ml rifampicin koncentrációt volt képes elviselni.



44. ÁBRA RIFAMPICIN ÉRZÉKENYSÉGI TESZT KÖLÜNBÖZŐ SEJTVONALAK ESETÉBEN

Jelölések: pDTA_*arr*2 - piros színű vonal és piros színű négyzet, a vad típusú *T. acidophilum* sejtvonallal - kék színű vonal és kék színű telt kör. A különböző törzseket 0-10000 ng/ml rifampicin jelenlétében inkubáltam 58 °C-on 72 órán keresztül. Az optikai denzitást 600 nm-en mértem, az eredmények három párhuzamos átlagát képezik. A rifampicin jelenléte nélküli növekedést vettem 100%-nak.

4.5.2.2 *Molekuláris biológiai analízis*

A molekuláris biológiai analízist ugyanolyan elvek alapján végeztem el, mint a novobiocin rezisztens sejtvonalakkal, vagyis minden rifampicin rezisztens sejtvonallal elvégeztem a plazmid fennmaradási teszteket és a genomi integráció analízist. A lineáris konstrukciók esetében szintén csak genomi integrációt vizsgáltam.

4.5 2.2.1 Plazmid fennmaradási tesztek

A korábban már leírt módszerrel vizsgáltam a plazmidok fennmaradását. Sikerült a shuttle (pSTRif) vektorral transzformált *T. acidophilum* sejtekből plazmid DNS-t visszaizolálnom. Meg kell jegyezni, hogy *T. acidophilum*-ból történő izolálást követően a plazmid DNS mennyisége olyan alacsony volt, hogy azt sem agaróz-gélelektroforézissel sem nanofotométer segítségével nem sikerült kimutatni. A korábbi, shuttle vektorral történt transzformációk során a vektor nem volt képes fennmaradni, a rifampicin rezisztencia gén alkalmazása a korábbi feltételezhető

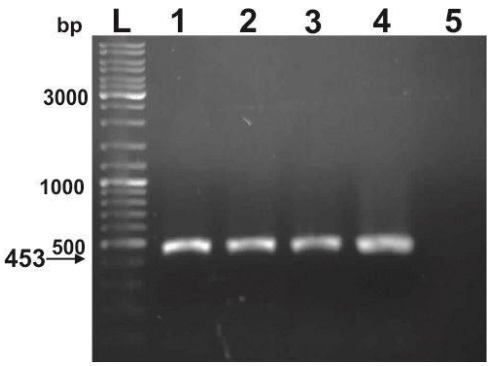
problémákra jelentett megoldást, vagyis a plazmid nagy méretére és a rezisztencia gén szekvencia hasonlóságára. A pSTRif vektor konstrukció több mint 1000 bp-ral kisebb a korábbi shuttle vektoroknál és az *arr*2 gén nem mutat szekvencia azonosságot a *T. acidophilum* genommal. A pSTRif sejtekből visszaizolált plazmidokat *Nco*I és *Sac*I restrikciós enzimekkel analizáltam először, majd nukleotidsorrend meghatározásnak is alávetettem. A várt fragmentek mérete *Nco*I-gyel történő hasításnál: 6106 + 4727 bp, míg a *Sac*I enzimmel történt hasításnál: 10810 bp. A restrikciós emésztések eredményeit a **45. ábra** szemlélteti. Jól látható, hogy néhány esetben az eredeti plazmidot sikerült visszaigazolni (Klón 3, 4), de volt olyan plazmid, amely jelentős átrendeződésen ment keresztül.

45. ÁBRA *T. ACIDOPHILUM*-BÓL (PSTRIF) IZOLÁLT, MAJD *E. COLI* SEJTEKBE TRANSZFORMÁLT ÉS ÚJRAIZOLÁLT PLAZMIDOK RESTRIKCIÓS EMÉSZTÉSE *NCO*I ÉS *SAC*I ENZIMEKKEL

Jelölések: L - GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 100-10,000 bp; 1, pSTRif vektor (pozitív kontroll); 2-4, Klónok.

4.5 2.2.2 Genomi integráció igazolása

A genomi integráció vizsgálatát a korábbiakban már leírt módon és említett primerekkel végeztem el. Kimutattam, hogy helyspecifikus homológ rekombináció nem történt egyetlen esetben sem (pSTRif, pDTA_arr2, KO_Ta0895_arr2, KO_Ta1490_arr2 és HIS_Ta0895_arr2), viszont a rezisztencia gén jelen volt a genomban (**46. ábra**).



46. ÁBRA *ARR*2 GÉN SPECIFIKUS PCR REAKCIÓ EREDMÉNYEI GENOMI DNS-RE

A PCR reakciót Arr2_forward és Arr2_reverse primerekkel végeztem el, a templát a pDTA_arr2 vektorral transzformált genomi izolátumok voltak. Jelölések: L - GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 100-10.000 bp; 1–3 párhuzamos genomi minták *T. acidophilum* rifampicin rezisztens sejtvonalakból, 4 – pozitív kontroll, pDTA_arr2 vektor, 5 – negatív kontroll.

A KO_Ta1490_arr2 konstrukcióval transzformált *T. acidophilum*-nál szerettem volna azonosítani a rezisztencia gén beépülésének helyét, hogy random beépülésről van-e szó. Ennek érdekében a teljes genomi izolátumot restrikciós analízisnek vetettem alá *Eco*RI enzimmel, mely a teljes genomot nagyjából 1000–10.000 bp nagyságú darabokra vágja, viszont a rezisztencia (*arr*2) génbe nem hasít. A hasítást követően a DNS darabokat összeligáltam, majd a rezisztencia génből kimenő primerekkel (Arr2_Nterm_out és Arr2_Cterm_out) PCR reakciót futattunk. Az így kapott PCR termékeket beklónoztam egy pUC18-as vektorba, hogy egyenként azonosítani tudtam a beépülési helyeket. Három genomi integrációt sikerült azonosítanunk: Ta0060, Ta710 és Ta1490-es gének esetében. A legutóbbi esetben, bár a célgénbe (Ta1490) történt a beépülés, de nem az eredetileg tervezett N-terminális régióba, hanem a C-terminálishoz közel. A genomi integrációk szekvenciái megtalálhatóak az alábbi génbanki azonosító számok alatt: JX890289-JX890291.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (V. tézis, a 4.5.1. fejezetben bemutatott eredmények alapján): A sikeres transzformációt antibiotikum rezisztencia tesztekkel és molekuláris módszerekkel – plazmid fennmaradási tesztekkel és a genomi integráció vizsgálatával igazoltam. Az eredményeket nemzetközi publikációban adtuk közre (Baka et al., 2013).

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Tézis: 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.

2. Tézis: 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. Tézis: A szelekciós marker gének (NovR gyrB és RifR arr2) alkalmazásával shuttle (pSTA és pSTRif), integratív (pDTA, pNTA, pVTA, pDTA_synth és pDTA_arr2) és lineáris vektor konstrukciókat (KO_Ta1490_synth_gyrB, KO_Ta1490_arr2 és HIS_Ta0895_arr2) építettem a *Thermoplasma acidophilum* számára.

4. Tézis: Az új és specifikus transzformációs módszer alkalmas a idegen genetikai anyag bejutattására a a *Thermoplasma acidophilum*- ba, 10^2-10^4 transzformáns/µg DNS transzformációs hatékonysággal.

5. Tézis: A sikeres transzformációt antibiotikum rezisztencia tesztekkel és molekuláris módszerekkel – plazmid fennmaradási tesztekkel és a genomi integráció vizsgálatával igazoltam.

6. 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. Ezen 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 sejtek. A proteomikai, struktúrbiológiai munkák kiszélesítését nagyban hátráltatja a genetikai manipulációs eszközök teljes mértékű hiánya e taxonban, így e probléma feloldása volt doktori munkám fő célja.

A feladat nehézségét az adta, hogy a területen szinte alig volt a munkámban felhasználható előzetes eredmény, és két független német kutatócsoport is munkám kezdetekor hagyott fel a terület kutatásával.

A genetikai eszközrendszer kialakításakor négy területre kellett koncentrálnom párhuzamosan, hogy működő rendszert tudjak kialakítani: 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 szilárd táptalajon történő kultivációjának optimalizációját, 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 (több mind 30 nap), hogy a rutinszerű klonális szelekció kivitelezhetetlen volt (Yasuda et al., 1995a). 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 (Smith et al., 1975). Annak érdekében, hogy növeljem a szaporodási rátát, a gyári élesztőkivonat mennyiségét kétszeresére emeltem a táptalajban. Emellett kidolgoztam egy élesztőkivonat (élesztővitamin) 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 szervezetnél. A továbbiakban tervezem az élesztő vitamin részletesebb vizsgálatát, hogy azonosíthassam a feltehetően egy rövid aminosavláncból (8-10 aminosav) álló fehérjét, amely a növekedést serkentő hatásért felelős.

A tenyésztési kísérletekkel párhuzamosan, a szelekciós markerek keresésénél, közel egy tucat antibiotikumot vizsgáltam meg annak érdekében, hogy a genetikailag módosított sejteket el tudjuk különíteni a vad típusúaktól. A *T. acidophilum* esetében csupán pár antibiotikum érzékenységet írtak le (Darland et al., 1970), a novobiocinét, amely már kis koncentrációban (10 ng/ml) képes a szervezet növekedését gátolni és az aminoglikozidok közé tartozó neomicint. Emellett az eritromicin, klóramfenikol, kumermicin, rifampicin és tiosztrepton antibiotikumokról is igazoltam, hogy az általánosan használt koncentrációban gátolják a szervezet szaporodását. A rifampicin már nagyon kis koncentrációban (1000 ng/ml) gátló hatást váltott ki. Ez meglepő volt a szakirodalmi adatok ismeretében, hiszen ez az antibiotikum az eukariótákra nem, csak a baktréiumokra hatásos szer, és a *T. acidophilum* eukarióta szerű, DNS-dependens RNS-polimerázáról *in vitro* kísérletekben igazolták, hogy nem érzékeny a rifampicinre. *In vivo* kísérleteim során ennek az ellenkezőjét tapasztaltam, ami ellentmond a legnívósabb prokarióta taxonómiai könyvekben napjainkig hivatkozott rifampicin rezisztencia bélyegnek (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Prokaryotes). A részletes antibiotikum érzékenységi vizsgálatoknak csak akkor van értelmük egy genetikai eszközrendszer 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*-ban. További lehetőségként az eritromicin, klóramfenikol és tiosztrepton esetében valószínűleg lehet majd találni marker géneket, amelynek a későbbiekben jelentősége lehet például több gén kiütése/inaktiválása esetében, a jelen munkában azonban 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 sajátságán (a sejtek a pH növelése hatására plasztikussá válnak) alapul. Az új transzformációs módszerrel 10^2–10^4 transzformáns/µg DNS hatékonyságot tudtam elérni, amely összevetve más ősbaktériumok transzformációs hatékonyságával átlagosnak mondható. Módszerem másik nagy eredménye lehet az, 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 *Pseudomonas* eredetű rifampicin-riboziláz (*arr*2) 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) (Yamashiro & Yamagishi, 2005) 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 mutáns japán *T. acidophilum* törzshöz képest, amely ugyanazt a girázt kódolja. Ennek magyarázata lehet, hogy a transzformáns sejtben több a Nov^R *gyrB* kópia száma, így az expresszált enzim mennyisége is. A helyspecifikus mutagenezissel tovább módosított Nov^R *gyrB*-A136H gént hordozó sejtvonalak novobiocin rezisztenciája 2500 ng/ml-re nőtt, ami egybevág a publikált adatokkal, mi szerint ez a kitüntetett pontja az antibiotikum-enzim kapcsolat kialakulásának. A kialakított Nov^R *gyrB*-A136H kiváló szelekciós marker jelölt.

A molekuláris biológiai vizsgálatok során tapasztaltam, hogy a novobiocin rezisztens sejtvonalakban a vektoron található Nov^R *gyrB* gén homológ rekombinációra képes a genomi *gyr*B 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. Ezen probléma feloldásaként, elsőként a közel rokon *Thermoplasma volcanium gyrB* génjét kívántam alkalmazni szelekciós marker génként, mely természetes körülmények között nem rendelkezik novobiocin rezisztenciát okozó variánssal. A Nov^R *gyrB*-A136H alapján megtervezett és helyspecifikusan módosított Nov^R *T. volcanium gyrB* gént hordozó integratív vektornál azt tapasztaltam, hogy e gén is képes rekombinációra, amire magyarázat lehet, hogy a *T. acidophilum* és *T. volcanium gyrB* génje között 75% homológia van. 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, viszont az integráció vizsgálatánál szintén nem-specifikus integrációt tapasztaltam. Ezek eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy a *T. acidophilum*-ban a homológ rekombináció mellett egy illegitim rekombinációs mechanizmus is működik, melynek feltárása túlmutatott a jelen disszertáción.

A Nov^R *gyrB* génnel elvégzett vizsgálatokkal 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 sejtvonalakat létrehoznom, melyek 2500 ng/ml rifampicint is toleráltak. Az *arr2* gén alapú integratív vektornál is tapasztaltam a random integráció jelenségét. Ezen eredmények alapján kijelenthetem, hogy a *T. acidophilum* DSM1728-as törzse genomi rekombinációra képes, viszont a DNS beépülésének módja vagy specificitása ismeretlen terület, ennek a mechanizmus feltárása nem szerepelt a célkitűzéseim között.

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. Ennek magyarázata talán a plazmid méretében keresendő, mivel a pSTRif plazmid ezer bázisnyival kisebb volt mint a *gyrB* gén alapú plazmid. Az eredetileg fehérje expressziós célra készült plazmid ugyan fennmaradt, de olyan alacsony kópiaszámmal sikerült visszaigazolni, ami a későbbiekben fehérje overexpressziós (túltermeltetési) céloknak nem felel meg. A kópiaszám növelésére a *T. acidopilum*-ban a továbblépést az jelentheti, ha sikerül feltárni a pTA1 plazmidon kódolt gének szerepét, mivel az ori régión kívül ezek funkciója teljesen ismeretlen. Ehhez egy EZ-transzpozon alapú random mutagenezis látszik a leggyorsabb megoldásnak, ahol a pTA1 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 a keretrendszer, vagy annak elemei, egy sor, a *Thermoplasmatales* rendbe tartozó, jelenleg genetikailag nem manipulálható fajnál is jó eséllyel alkalmazható lesz. Egy praktikusan 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 nehézzé teszik a célzott feladatok végrehajtását. Talán megoldást jelenthet a problémára más *T. acidophilum* törzsek használata, amelyek már egy éve elérhetőek a japán nemzeti törzsgyűjteményben. A vizsgálatokhoz használt DSM1728 típustörzs ugyanis a müncheni Max Planck Intézetből származik, ahol mintegy harminc éve, klonális szelekció nélkül, egyszerűen folyékony táptalajból passzálták a törzset havi rendszerességgel, így ez a törzs egy sor alapvető információ vesztésen, mutáción mehetett keresztül az elmúlt évtizedek alatt.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A termoacidofil ősbaktérium, *Thermoplasma acidophilum* felfedezése óta különleges szerepet tölt be a mikrobiológiai, biokémiai és proteomikai vizsgálatokban A szervezet eukarióta sejthez közeli tulajdonságai, egyszerű genom és proteom felépítése, egyszerű DNS és fehérje izolálása miatt kiemelkedő fontosságú proteomika modellszervezetté vált az elmúlt évtizedben. Az intenzív kutatások ellenére a szervezet genetikai manipulációja ez idáig nem megoldott, mely nagyban hátráltatja a további munkát. Munkám célkitűzése egy hatékony genetikai eszközrendszer létrehozása volt a *T. acidophilum* modellszervezet számára. Ez az eszközrendszer négy pilléren áll: (a) rutin szilárd táptalajon történő tenyésztés, hogy genetikailag homogén sejtvonalakat lehessen létrehozni; (b) a vad típusú sejtek elválasztása, szelekciója a transzformáltaktól antibiotikum rezisztencia markerek segítségével; (c) vektor konstrukciók, melyek hordozzák a kívánt információt; (d) és végül egy hatékony transzformációs módszer az idegen genetikai anyag bejuttatására a célszervezetbe.

A *T. acidophilum*–ot japán kutatók tudták sikeresen tenyészteni először egy Gelrite-bázisú szilárd médiumon (Yasuda et al., 1995a), viszont az inkubációs idő hosszúsága miatt – 30 nap – ez nem volt alkalmazható rutinszerű munkára. Annak érdekében, hogy növeljem a sejtek szaporodási sebességét, egy speciális élesztő hidrolizátumot állítottam elő, mivel szakirodalmi adatok alapján tudható volt, hogy a szervezet csak egy komplex médiumon képes növekedni, mely rendszerint élesztőkivonatot tartalmaz és a kivonat előállításának módja meghatározó a növekedést serkentő hatás szempontjából (Smith et al., 1975). Ezen módosítás segítségével sikeresen csökkentettem az inkubációs időt 12 napra, melynek végén 1-3 mm átmérőjű sárgás-barnás telepek jelentek meg a táptalaj felszínén. A *T. acidophilum* esetében néhány antibiotikummal, a novobiocinnal és neomycinnel szembeni érzékenységről volt elérhető publikáció ezidáig. Több gén kiütésénél, előnyös, ha több szelekciós markert és marker gént tudunk alkalmazni a célszervezetnél. Ennek érdekében elvégeztem számos antibiotikum érzékenységi vizsgálatot és igazoltam, hogy a novobiocin mellett a szervezet érzékeny többek között eritromicinre, klóramfenikolra, kumermicinre, rifampicinre és tiosztreponra. A rifampicin esetében az eredmények kimondottan váratlanok voltak, mivel korábbi *in vitro* vizsgálatok szerint a szervezet DNS-

dependens-RNS-polimeráza nem érzékeny erre az antibiotikumra. Ennek ellenére a teljes sejten elvégzett *in vivo* vizsgálatok azt mutatták, hogy a rifampicin képes gátolni a *T. acidophilum* növekedését viszonylag alacsony koncentrációban (1000 ng/ml) is. Ezen antibiotikumok közül a novobiocin és rifampicin antibiotikumokra fellelhető rezisztencia markereket használtam kísérleteimben és a plazmid konstrukciók kialakításához. Számos ősbaktérium és extermofil genetikában általánosan alkalmazott transzformációs módszert teszteltem, de egyik sem bizonyult hatékonynak a thermoplasma esetében. Ezért egy teljesen új és egyedi transzformációs módszert fejlesztettem ki, mely kihasználja a szervezet egyedi morfológiai tulajdonságát (nem rendelkezik sejtfallal) és azt a megfigyelést, hogy a sejt plasztikussá válik a pH növelés hatására (Kofler, 2006), ezáltal feltételezhető hogy a sejtmembrán átjárhatósága megnövekszik és a szervezet képes a spontán DNS felvételre is. Az általam fejlesztett transzformációs módszerrel sikerült 10^2–10^4 transzformáns/µg DNS transzformációs hatékonyságot elérnem, elsőként genetikai anyagot bejutattnom a szervezetbe.

A genetikai elemek transzportjára két fő típusú plazmid konstrukciót terveztem és építettem: egy shuttle és egy integratív vektort, emellett teszteltem a lineáris PCR-konstrukciókat is. Novobiocin esetében kezdetben egy mutáns környezeti törzsből származó Nov^R *gyrB* (pDTA plazmid) és annak általam helyspecifikusan módosított (Nov^R *gyrB*–A136H; pNTA plazmid) változatát alkalmaztam. Transzformációt és szelekciót követően analizáltam a sejtvonalak novobiocin toleranciáját, a Nov^R *gyrB*-t hordozó sejtvonalak 1500 ng/ml novobiocint voltak képesek tolerálni, mely 150-szeres rezisztencia növekedés. Továbbá a Nov^R *gyrB*–A136H hordozó sejtvonalak 2500 ng/ml antibiotikum koncentrációt voltak képesek tolerálni, ami további 1,6-szoros rezisztencia növekedést jelent. A rezisztens sejtvonalak molekulás biológiai vizsgálata során azt tapasztaltam, hogy a szelekciós marker gén képes genomi integrációra. A szervezet esetében korábban nem számoltak be homológ rekombinációról. A két gén (vad típusú és Nov^R *gyrB*) jelentős homológiája adhat magyarázatot erre az eredményre. Annak érdekében, hogy a homológ rekombinációt elkerüljem a *gyrB* szelekciós marker génnél, először a közel rokon *T. volcanium gyrB* génjét adaptáltam kísérletemhez, melyet úgy módosítottam, hogy novobiocin rezisztenciát okozzon a célszervezetben. A transzformáció után sikerült novobiocin rezisztens sejteket szelektálnom, viszont a szelekciós marker gén random módon

integrálódott a genomba valószínűsíthetően rövid homológ régióknak (~100 bp). Ezt követően megterveztem és megszintetizáltattam egy mesterséges *gyrB* gént, mely aminosav szinten teljesen homológ volt a *T. acidophilum* Nov^R *gyrB*-A136H génnel, viszont nukleotid szinten ki tudtam kerülni az öt bázisnál nagyobb homológiákat. Sikerült novobiocin rezisztens sejteket szelektálnom a mesterséges *gyrB* génnel, viszont azt tapasztaltam, hogy a marker gén nem specifikusan integrálódott a genomba. Ezen illegitim rekombinációs események hátterének azonosítása további munkát igényel. A novobiocin rezisztencia génekkel párhuzamosan elvégeztem a rifampicin rezisztenciát okozó *Pseudomonas aeruginosa* eredetű *arr2* gén tesztelését *T. acidophilum*-ban. A pSTRif shuttle vektor esetében sikerült igazolnom, hogy a vektor képes volt fennmaradni és replikálódni a célszervezetben, azonban a kópia szám nagyon alacsony volt. A továbbiakban lineáris KO konstrukciókat hoztam létre az *arr2* gén alkalmazásával, melyeknél nem specifikus rekombinációt tapasztaltam. Ezen transzformánsokat további analízisnek vettettem alá, hogy lokalizáljam a genomi integráció pontos helyét. Eredményeim szerint a *T. acidophilum* esetében a rekombináció random volt.

Ezen eredmények igazolják, hogy a világon elsőként sikerült létrehoznom egy genetikai eszközrendszert a *T. acidophilum* modellszervezet számára, mely a jövőben lehetővé teszi majd e szervezet rutinszerű genetikai manipulálását.

8. SUMMARY

Since its discovery the thermo-acidophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum* gained a special role in microbiological, biochemical, and proteomics research. The organism became an important model organism of proteomic studies due to its resemblance to eukaryotic cells, its low genome and proteome complexity, and simple DNA and protein isolation from the organism. Despite intensive research, genetic manipulation of *T. acidophilum* has not been solved, which hampered the further work. The main aim of my work was to develop genetic tools for the model organism *T. acidophilum*. Genetic manipulation is based on four major elements: (a) cultivation on solid medium in order to obtain genetically homogeneous cell lines; (b) separation or selection of the genetically modified cells from wild-type cells by antibiotic resistance markers; (c) creation of vectors carrying the genetic information; and (d) a transformation method to introduce the vectors into the target organism.

T. acidophilum was for the first time successfully cultivated on a Gelrite-based solid medium by Japanese researchers (Yasuda et al., 1995a). Incubation time until visible colonies formed was 30 days, thus not optimal for routine work. In order to increase the growth speed of the organism I prepared a special yeast hydrolysate, since according to the literature it is known that a complex medium containing yeast extract is the essential nutrient for the organism and the way of preparation of the extract is determinative regarding the growth promoting effect (Smith et al., 1975). With this modification the incubation time decreased to 12 days, after which 1–3 mm in diameter yellowish-brownish colonies were obtained. The organism has been reported to have sensitivity against few antibiotics: novobiocin, neomycin. To perform multiple gene knock-outs simultaneously it is advisable to use more than one selection agent and marker genes. Several antibiotics were tested and I could demonstrate that *T. acidophilum* exhibits sensitivity to erythromycin, chloramphenicol, coumermycin, rifampicin, and thiostrepton. Finding sensitivity against rifampicin was unexpected, because DNA-dependent-RNA-polymerase of *T. acidophilum* was reported to be insensitive to rifampicin based on *in vitro* experiments (Sturm et al., 1980). However, my *in vivo* investigations clearly indicated, that rifampicin concentrations as low as 1000 ng/ml effectively inhibit growth of the organism. For this reason, I generated plasmid vectors bearing selection marker genes for novobiocin and rifampicin.

Several transformation techniques routinely applied for Archaea and other extremophilic organisms were tested, but none of these seemed to be effective in case of *T. acidophilum*. For this reason, I developed a novel transformation method, taking advantage of the unique morphology of the organism (cell wall-less) and the observation that *T. acidophilum* cells become plastic at elevated pH (Kofler, 2006). This presumably increases the cell membrane permeability, thus facilitating spontaneous DNA-uptake. With this established transformation method, I could obtain between 10^2–10^4 transformants per µg DNA so I was able to introduce genetic material into the organism for the first time.

I designed and built two types of plasmid constructs for transporting the genetic material: shuttle and integrative vectors, beside these also linear PCR-constructs were tested. A mutant Nov^R *gyrB* gene (pDTA and pSTA plasmids) isolated from an environmental strain and its site-specific modified version (Nov^R *gyrB*-A136H; pNTA plasmid) were applied as novobiocin resistance marker to my experiments. After transformation and selection, novobiocin tolerance of resistant cell lines was analyzed; cell line carrying the Nov^R *gyrB* gene tolerated 1500 ng/ml novobiocin; a 150-fold increase in resistance compared with wild-type cells. Nov^R *gyrB*-A136H-harbouring cell lines tolerated up to 2500 ng/ml novobiocin, an additional 1.6-fold increase. During molecular biological analyses, I could verify that the selection marker gene was able to integrate into the genome. Though surprising initially, as no homologous recombination has been reported previously in this organism, high sequence homology between the wild type and the Nov^R *gyrB* gene provided an explanation of these findings. In order to avoid homologous recombination, first *gyrB* of the close relative *Thermoplasma volcanium* was adapted to my experiments. Its *gyrB* gene was modified by side-directed mutagenesis to provide the relevant novobiocin resistance in the target organism. After transformation I could select novobiocin resistant cells, but the *T. volcanium* Nov^R *gyrB* selection marker gene still integrated into the genome, though this time at random genomic locations probably due to the short homolog regions (~100 bp). Therefore, I designed a synthetic *gyrB* gene by codon degeneration in a way that maximum 5 base pair long DNA stretches were identical with the nucleotide sequence and on amino acid level it was completely homologous with *T. acidophilum* Nov^R *gyrB*-A136H. I was able to obtain novobiocin resistant cells with the artificial *gyrB* but still observed non-specific integration of the

marker gene into the genome. For elucidating these illegitimate recombination events further experimental work is needed. Parallel to the experiments applying the novobiocin resistance marker, I developed a rifampicin resistance cassette using the *arr2* gene from *Pseudomonas aeruginosa.* By creating the pSTRif shuttle vector, I could prove that this vector was conferring the desired resistance, and was maintained and replicated in the target organism, albeit in considerably low concentrations. Furthermore, linear KO constructs were built and tested using the rifampicin resistance cassette. Here non-specific recombination was also observed. These transformants were further analyzed to identify the precise location of the genomic integration, but according to my results, the recombination was random.

In summary, my results prove that I developed the first effective set of genetic tools for the model organism *T. acidophilum,* which paves the way for routine genetic manipulations of this organism in the future.

1. MELLÉKLET: IRODALOMJEGYZÉK

Aagaard, C., Leviev, I., Aravalli, R.N., Forterre, P., Prieur, D., Garrett, R. a, (1996). General vectors for archaeal hyperthermophiles: strategies based on a mobile intron and a plasmid. *FEMS microbiology reviews* 18, 93–104 p.

Albers, S.-V., Driessen, A.J.M., (2008). Conditions for gene disruption by homologous recombination of exogenous DNA into the *Sulfolobus solfataricus* genome. *Archaea* 2, 145–149 p.

Allers, T., Mevarech, M., (2005). Archaeal genetics - the third way. *Nature Reviews. Genetics* 6, 58–73 p.

Allers, T., Ngo, H., Mevarech, M., Lloyd, R.G., (2004). Development of additional selectable markers for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* based on the leuB and trpA genes. *Applied and environmental microbiology* 70, 943–953 p.

Allers, T., Ngo, H.-P., (2003). Genetic analysis of homologous recombination in *Archaea*: *Haloferax volcanii* as a model organism. *Biochemical Society Transactions* 31, 706–710 p.

Aravalli, R.N., Garrett, R. a, (1997). Shuttle vectors for hyperthermophilic archaea. *Extremophiles : life under extreme conditions* 1, 183–91 p.

Aravind, L., Koonin, E. V, (1999). DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucleic acids research* 27, 4658–4670 p.

Argyle, J.L., Tumbula, D.L., Leigh, J.A., (1996). Neomycin resistance as a selectable marker in *Methanococcus maripaludis*. *Applied and environmental microbiology* 62, 4233 – 4237 p.

Atomi, H., Imanaka, T., Fukui, T., (2012). Overview of the genetic tools in the Archaea. *Frontiers in Microbiology* 3, 337 p.

Aucelli, T., Contursi, P., Girfoglio, M., Rossi, M., Cannio, R., (2006). A spreadable, non-integrative and high copy number shuttle vector for *Sulfolobus solfataricus*

based on the genetic element pSSVx from *Sulfolobus islandicus*. *Nucleic acids research* 34, e114 p.

Baka, E., (2010). Developing genetic tools for molecular biology analysis of the archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *In: TUDOC*. pp. 1–12 p.

Baka, E., Varga, S., Hobel, C., Knispel, R.W., Fekete, C., 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, 145–148 p.

Baross, J.A., (1995). Isolation, growth and maintenance of hyperthermophiles. *In: Robb, F.T., Place, A.R. (Eds.), Archaea: A Laboratory Manual. Thermophiles*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 15 – 23 p.

Bell, S.D., Jackson, S.P., (2001). Mechanism and regulation of transcription in archaea. *Current opinion in microbiology* 4, 208–213 p.

Belly, R.T., Bohlool, B.B., Brock, T.D., (1973). THE GENUS THERMOPLASMA. *Annals of the New York Academy of Sciences* 225, 94–107 p.

Berkner, S., Lipps, G., (2008). Genetic tools for *Sulfolobus* spp.: vectors and first applications. *Archives of microbiology* 190, 217–230 p.

Berkner, S., Wlodkowski, A., Albers, S.-V., Lipps, G., (2010). Inducible and constitutive promoters for genetic systems in *Sulfolobus acidocaldarius*. *Extremophiles : life under extreme conditions* 14, 249–259 p.

Bertani, G., Baresi, L., (1987). Genetic transformation in the methanogen *Methanococcus voltae* PS. *Journal of bacteriology* 169, 2730–2738 p.

Black, F., Freundt, E., (1979). Flagellation and swimming motility of *Thermoplasma acidophilum*. *Journal of bacteriology* 137, 456–460 p.

Blum, P., (2008). *Archaea*: New Models for Prokaryotic Biology. Caister Scientific Press p.

Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J.F., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghagen, N.S., Weidman, F.J., Fuhrmann, J.L., Nguyen, D., Utterback, T.R., Kelley, J.M., Peterson, J.D., Sadow, P.W., Hanna, M.C., Matthew, D.C., Roberts, K.M., Hurst, M.A., Kaine, B.P., Borodovsky, M., Klenk, H.P., Fraser, C.M., Smith, H.O., Woese, C.R., Venter, J.C., (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science (New York, N.Y.)* 273, 1058–1073 p.

Cannio, R., Contursi, P., Rossi, M., Bartolucci, S., (1998). An autonomously replicating transforming vector for *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of bacteriology* 180, 3237–3240 p.

Charlebois, R.L., Lam, W.L., Cline, S.W., Doolittle, W.F., (1987). Characterization of pHV2 from *Halobacterium volcanii* and its use in demonstrating transformation of an archaebacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 8530–8534 p.

Choosakoonkriang, S., Wiethoff, C.M., Anchordoquy, T.J., Koe, G.S., Smith, J.G., Middaugh, C.R., (2001). Infrared spectroscopic characterization of the interaction of cationic lipids with plasmid DNA. *The Journal of biological chemistry* 276, 8037–43 p.

Christiansen, C., Freundt, E.A., Black, F.T., (1975). Genome size and deoxyribonucleic acid base composition of *Thermoplasma acidophilum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 25, 99–101 p.

Cline, S.W., Doolittle, W.F., (1987). Efficient transfection of the archaebacterium *Halobacterium halobium*. *Journal of bacteriology* 169, 1341–1344 p.

Cline, S.W., Schalkwyk, L.C., Doolittle, W.F., (1989). Transformation of the archaebacterium *Halobacterium volcanii* with genomic DNA. *Journal of Bacteriology* 171, 498749–91 p.

Cosloy, S., Oishi, M., (1973). Genetic transformation in *Escherichia coli* K12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70, 84–87 p.

Daniel, R.M., Peterson, M.E., Danson, M.J., Price, N.C., Kelly, S.M., Monk, C.R., Weinberg, C.S., Oudshoorn, M.L., Lee, C.K., (2010). The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. *The Biochemical journal* 425, 353–360 p.

Darland, G., Brock, T.D., Samsonoff, W., Conti, S.F., (1970). A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile. *Science* 170, 1416–1418 p.

DeLange, R.J., Williams, L.C., Searcy, D.G., (1981). A Histon-like protein (HTa) from *Thermoplasma acidophilum*. *Journal of Biological Chemistry* 256, 905–911 p.

DeLong, E.F., Pace, N.R., (2001). Environmental diversity of bacteria and archaea. *Systematic biology* 50, 470–478 p.

Deng, L., Zhu, H., Chen, Z., Liang, Y.X., She, Q., (2009). Unmarked gene deletion and host-vector system for the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus islandicus*. *Extremophiles : life under extreme conditions* 13, 735–746 p.

Duggin, I.G., McCallum, S. a, Bell, S.D., (2008). Chromosome replication dynamics in the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 16737–16742 p.

Fani, R., Fondi, M., (2009). Origin and evolution of metabolic pathways. *Physics of life reviews* 6, 23–52 p.

Garrett, R., Klenk, H., (2007). *Archaea*: evolution, physiology, and molecular biology, *Recherche*. Blackwell Publishing Ltd p.

Geiduschek, E.P., Ouhammouch, M., (2005). Archaeal transcription and its regulators. *Molecular microbiology* 56, 1397–1407 p.

Giraldo, R., (2003). Common domains in the initiators of DNA replication in *Bacteria* , *Archaea* and *Eukarya* : combined structural, functional and phylogenetic perspectives. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 533–554 p.

Golyshina, O. V, Pivovarova, T.A., Karavaiko, G.I., Kondrat, T.F., Moore, E.R.B., Abraham, W., Timmis, K.N., Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., (2000). *Ferroplasma acidiphilum* gen . nov ., sp . nov ., an cell-wall-lacking , mesophilic member of the Ferroplasmaceae fam . nov ., comprising a distinct lineage of the Archaea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 50, 997–1006 p.

Golyshina, O. V, Timmis, K.N., (2005). *Ferroplasma* and relatives, recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments. *Environmental microbiology* 7, 1277–1288 p.

Hirata, A., Kanai, T., Santangelo, T.J., Tajiri, M., Manabe, K., Reeve, J.N., Imanaka, T., Murakami, K.S., (2008). Archaeal RNA polymerase subunits E and F are not required for transcription in vitro, but a *Thermococcus kodakarensis* mutant lacking subunit F is temperature-sensitive. *Molecular microbiology* 70, 623–633 p.

Holmes, M.L., Dyall-Smith, M.L., (1990). A plasmid vector with a selectable marker for halophilic archaebacteria. *Journal of bacteriology* 172, 756–761 p.

Holmes, M.L., Dyall-Smith, M.L., (1991). Mutations in DNA gyrase result in novobiocin resistance in halophilic archaebacteria. *Journal of bacteriology* 173, 642–648 p.

Huber, H., Stetter, K.O., (2006). The Prokaryotes, *Thermoplasmatales. In: Prokaryotes*. Springer, New York, pp. 101–112 p.

Huet, J., Schnabell, R., Sentenac, A., (1983). Archaebacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. *EMBO Journal* 2, 1291–1294 p.

Itoh, T., Yoshikawa, N., Takashina, T., (2007). *Thermogymnomonas acidicola* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic, cell wall-less archaeon in the order *Thermoplasmatales*, isolated from a solfataric soil in Hakone, Japan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 57, 2557–2561 p.

Jonuscheit, M., Martusewitsch, E., Stedman, K.M., Schleper, C., (2003). A reporter gene system for the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* based on a selectable and integrative shuttle vector. *Molecular Microbiology* 48, 1241–1252 p.

Kanoksilapatham, W., Gonzalez, J., (2007). Directed-mutagenesis and deletion generated through an improved overlapping-extension PCR based procedure. *Silpakorn U Science & Tech Journal;* 1, 7–12 p.

Kasting, J.F., Siefert, J.L., (2002). Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science (New York, N.Y.)* 296, 1066–1068 p.

Klein, T.M., Fitzpatrick-McElligott, S., (1993). Particle bombardment: a universal approach for gene transfer to cells and tissues. *Current opinion in biotechnology* 4, 583–590 p.

Knispel, R.W., Kofler, C., Boicu, M., Baumeister, W., Nickell, S., (2012). Blotting protein complexes from native gels to electron microscopy grids. *Nature methods* 9, 182–184 p.

Kofler, C., (2006). Ph.D. thesis. Technische Universität Munchin, Munich, Germany. Strukturelle Charakterisierung von *Thermoplasma acidophilum* mittels Kryo-Elektronentomographie.

Koyama, Y., Hoshino, T., Tomizuka, N., Furukawa, K., (1986). Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. *Journal of Bacteriology* 166, 338–340 p.

Kurosawa, N., Grogan, D.W., (2005). Homologous recombination of exogenous DNA with the *Sulfolobus acidocaldarius* genome: properties and uses. *FEMS Microbiology Letters* 253, 141–149 p.

Lam, W.L., Doolittle, W.F., (1989). Shuttle vectors for the archaebacterium *Halobacterium volcanii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 5478–5482 p.

Leigh, J. a, Albers, S.-V., Atomi, H., Allers, T., (2011). Model organisms for genetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, *Thermococcales* and *Sulfolobales*. *FEMS microbiology reviews* 35, 577–608 p.

Lipscomb, G.L., Stirrett, K., Schut, G.J., Yang, F., Jenney, F.E., Scott, R. a, Adams, M.W.W., Westpheling, J., (2011). Natural competence in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* facilitates genetic manipulation: construction of markerless deletions of genes encoding the two cytoplasmic hydrogenases. *Applied and environmental microbiology* 77, 2232–8 p.

Londei, P., Altamura, S., Sanz, J.L., Amils, R., (1988). Aminoglycoside-induced mistranslation in thermophilic archaebacteria. *Molecular & general genetics : MGG* 214, 48–54 p.

Lorenz, M.G., Wackernagel, W., (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews* 58, 563–602 p.

Lucas, S., Toffin, L., Zivanovic, Y., (2002). Construction of a shuttle vector for, and spheroplast transformation of, the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5528 – 5536 p.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P. V., Clark, D.P., (2008). Brock Biology of Microorganisms (12th Edition). Benjamin Cummings p.

Mankin, A.S., Zyrianova, I.M., Kagramanova, V.K., Garrett, R.A., (1992). Introducing mutations into the single-copy chromosomal 23S rRNA gene of the archaeon *Halobacterium halobium* by using an rRNA operon-based

transformation system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6535–6539 p.

Mayanagi, K., Kiyonari, S., (2009). Mechanism of replication machinery assembly as revealed by the DNA ligase–PCNA–DNA complex architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 4647–4652 p.

Mayr, J., Wang, H.R., Nederlof, P., Baumeister, W., (1999). The import pathway of human and *Thermoplasma* 20S proteasomes into HeLa cell nuclei is different from that of classical NLS-bearing proteins. *Biological chemistry* 380, 1183–1192 p.

Mehier-Humbert, S., Guy, R.H., (2005). Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Advanced drug delivery reviews* 57, 733–753 p.

Metcalf, W.W., Zhang, J.K., Apolinario, E., Sowers, K.R., Wolfe, R.S., (1997). A genetic system for *Archaea* of the genus *Methanosarcina*: liposome-mediated transformation and construction of shuttle vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2626–2631 p.

Nickell, S., Kofler, C., Leis, A., (2006). A visual approach to proteomics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 225–230 p.

Oren, A., (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 334–348 p.

Oren, A., (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline systems* 4, 1–13 p.

Oren, A., Heldal, M., Norland, S., Galinski, E.A., (2002). Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles : life under extreme conditions* 6, 491–498 p.

Patel, G.B., Nash, J.H., Agnew, B.J., Sprott, G.D., (1994). Natural and electroporation-mediated transformation of *Methanococcus voltae* protoplasts. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 903–907 p.

Pritchett, M., Zhang, J., Metcalf, W., (2004). Development of a markerless genetic exchange method for *Methanosarcina acetivorans* C2A and its use in construction of new genetic tools for methanogenic. *Applied and environmental microbiology* 70, 1425 – 1433 p.

Ruepp, A., Graml, W., Santos-Martinez, M., (2000). The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature* 407, 508–513 p.

Sambrook, J., Russel, D.W., (2001). Molecular cloning: a laboratory manual 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York p.

Sandbeck, K.A., Leigh, J.A., (1991). Recovery of an integration shuttle vector from tandem repeats in *Methanococcus maripaludis*. *Applied and environmental microbiology* 57, 2762–2764 p.

Sato, T., Atomi, H., (2011). Novel metabolic pathways in *Archaea*. *Current opinion in microbiology* 14, 307–314 p.

Sato, T., Fukui, T., Atomi, H., Imanaka, T., (2003). Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal of bacteriology* 185, 210–220 p.

Sawahel, W.A., Cove, D.J., (1992). Gene transfer strategies in plants. *Biotechnology Advances* 10, 393 – 412 p.

Schleper, C, Puehler, G, Holz, I, Gambacorta, A, Janekovic, D., Klenk, H.P., Zillig, W., Schleper, Christa, Puehler, Gabriela, Holz, Ingelore, Gambacorta, Agata, (1995). *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic , heterotrophic , thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. *Journal of bacteriology* 177, 7050 – 7059 p.

Schleper, C., Kubo, K., Zillig, W., (1992). The particle SSV1 from the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus* is a virus: demonstration of infectivity and of transfection with viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 7645–7649 p.

Searcy, D.G., Stein, D.B., Green, G.R., (1978). Phylogenetic affinities between eukaryotic cells and a thermophilic mycoplasma. *Biosystems* 10, 19–28 p.

Segerer, A., Langworthy, T. a., Stetter, K.O., (1988). *Thermoplasma acidophilum* and *Thermoplasma volcanium* sp. nov. from Solfatara Fields. *Systematic and Applied Microbiology* 10, 161–171 p.

Shark, K.B., Smith, F.D., Harpending, P.R., Rasmussen, J.L., Sanford, J.C., (1991). Biolistic transformation of a procaryote, *Bacillus megaterium*. *Applied and environmental microbiology* 57, 480–485 p.

Siebers, B., Schönheit, P., (2005). Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in *Archaea*. *Current opinion in microbiology* 8, 695–705 p.

Smith, P.F., Langworthy, T.A., Smith, M.R., (1975). Polypeptide nature of growth requirement in yeast extract for *Thermoplasma acidophilum*. *Journal of Bacteriology* 124, 884–892 p.

Spanheimer, R., Müller, V., (2008). The molecular basis of salt adaptation in *Methanosarcina mazei* Gö1. *Archives of microbiology* 190, 271–279 p.

Sturm, S., Schönefeld, U., Zillig, W., Janekovic, D., Stetter, K.O., (1980). Structure and function of the DNA dependent RNA polymerase of the Archaebacterium *Thermoplasma acidophilum. Zentralblatt für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie* 1, 12–25 p.

Sun, N., Beck, F., Knispel, R.W., Siedler, F., Scheffer, B., Nickell, S., Baumeister, W., Nagy, I., (2007). Proteomics analysis of *Thermoplasma acidophilum* with a focus on protein complexes. *Molecular & Cellular Proteomics* 6, 492–502 p.

Sun, N., Tamura, N., Tamura, T., Knispel, R.W., Hrabe, T., Kofler, C., Nickell, S., Nagy, I., (2009). Size distribution of native cytosolic proteins of *Thermoplasma acidophilum*. *Proteomics* 9, 3783–3786 p.

Takai, K., Komatsu, T., (2001). Distribution of archaea in a black smoker chimney structure. *Applied and environmental microbiology* 67, 3618 – 3629 p.

Thomm, M., (1996). Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation. *FEMS Microbiology Reviews* 18, 159–171 p.

Tribuddharat, C., Fennewald, M., (1999). Integron-mediated rifampin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 960–962 p.

Tumbula, D., Bowen, T., Whitman, W., (1997). Characterization of pURB500 from the archaeon *Methanococcus maripaludis* and construction of a shuttle vector. *Journal of bacteriology* 179, 2976 – 2986 p.

Verhees, C.H., Kengen, S.W.M., Tuininga, J.E., Schut, G.J., Adams, M.W.W., De Vos, W.M., Van Der Oost, J., (2003). The unique features of glycolytic pathways in *Archaea*. *The Biochemical journal* 375, 231–46 p.

Waege, I., Schmid, G., Thumann, S., Thomm, M., Hausner, W., (2010). Shuttle vector-based transformation system for *Pyrococcus furiosus*. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 3308–3313 p.

Walters, A.D., Chong, J.P.J., (2009). *Methanococcus maripaludis*: an archaeon with multiple functional MCM proteins? *Biochemical Society transactions* 37, 1–6 p.

Wenzel, T., Baumeister, W., (1993). *Thermoplasma acidophilum* proteasomes degrade partially unfolded and ubiquitin-associated proteins. *FEBS letters* 326, 215–218 p.

White, M.F., Bell, S.D., (2002). Holding it together : chromatin in the *Archaea*. *Trends in Genetics* 18, 621–626 p.

Williams, D., Waguespack, C., Eisenach, K., Crawford, J.T., Portaels, F., Salfinger, M., Nolan, C.M., Abe, C., Sticht-Groh, V., Gillis, T.P., (1994). Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38, 2380–2386 p.

Woese, C.R., Fox, G.E., (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5088–5090 p.

Woese, C.R., Kandlert, O., Wheelis, M.L., (1990). Towards a natural system of organisms : Proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 4576–4579 p.

Woese, C.R., Maniloff, J., Zablen, L.B., (1980). Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 494–498 p.

Wolf, S., Lottspeich, F., Baumeister, W., (1993). Ubiquitin found in the archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS letters* 326, 42–44 p.

Yamashiro, K., Yamagishi, A., (2005). Characterization of the DNA gyrase from the thermoacidophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *Journal of Bacteriology* 187, 8531–8536 p.

Yamashiro, K., Yokobori, S.-I., Oshima, T., Yamagishi, A., (2006). Structural analysis of the plasmid pTA1 isolated from the thermoacidophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *Extremophiles* 10, 327–335 p.

Yasuda, M., Oyaizu, H., Yamagishi, A., Oshima, T., (1995a). Morphological variation of new *Thermoplasma acidophilum* isolates from Japanese hot springs. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3482–3485 p.

Yasuda, M., Yamagishi, A., Oshima, T., (1995b). The plasmids found in isolates of the acidothermophilic archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. *FEMS Microbiology Letters* 128, 157–162 p.

Yoshimochi, T., Fujikane, R., Kawanami, M., Matsunaga, F., Ishino, Y., (2008). The GINS complex from *Pyrococcus furiosus* stimulates the MCM helicase activity. *The Journal of biological chemistry* 283, 1601–1609 p.

Zhang, C., Whitaker, R.J., (2012). A broadly applicable gene knockout system for the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus islandicus* based on simvastatin selection. *Microbiology* 158, 1513–1522 p.

Zheng, T., Huang, Q., Zhang, C., Ni, J., She, Q., Shen, Y., (2012). Development of a simvastatin selection marker for a hyperthermophilic acidophile, *Sulfolobus islandicus. Applied and environmental microbiology* 78, 568–574 p.

Zillig, W., (1991). Comparative biochemistry of *Archaea* and *Bacteria*. *Current opinion in genetics & development* 544, 544–551 p.

HTTP1 http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2004/ - letöltés ideje: 2012. március 23.

HTTP2 http://www.chemicell.com/products/Magnetofection/Magnetofection_separation.html - letöltési 2012. október 4.

HTTP3 http://www.chemicell.com/products/ferrofluid/ferrofluids.html - letöltés 2012. október 4.

HTTP4 http://www.muszeroldal.hu/MMK/nr65/jenei.html - letöltés ideje: 2012. október 4.

2. MELLÉKLET

4. táblázat Alkalmazott vegyszerek és reagensek

Név	**Gyártó - forgalmazó**
Agar, bakteriológiai	Reanal Finomvegyszergyár Zrt, Budapest, Magyarország
Agaróz, ultra-tiszta gélelektroforézishez	Lonza Ltd, Budapest, Magyarország
Agaróz, Seakem	Lonza Ltd, Budapest, Magyarország
Ammónium-szulfát	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Ampicillin	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Anizomicin	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Apramicin	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Ásványi olaj	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Bórsav	Reanal Finomvegyszergyár Zrt, Budapest, Magyarország
Brómfenolkék	Reanal Finomvegyszergyár Zrt, Budapest, Magyarország
Cink-szulfát-7 hidrát	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Dimetil-szulfoxid (DMSO)	Reanal Finomvegyszergyár Zrt, Budapest, Magyarország
Dinátrium-tetraborát-10 hidrát	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
dNTP	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Gelrite	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Glükóz	BioLab Inc, Budapest, Magyarország
Glicerin (87%)	Reanal Finomvegyszergyár Zrt, Budapest, Magyarország
EDTA	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Élesztőkivonat	Merck Kft, Budapest, Magyarország
Eritromicin	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Etanol	Reanal Finomvegyszergyár Zrt, Budapest, Magyarország
Etidium-bromid	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Fenol	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország

Hi-Di formamid	Life Technologies Magyarország Kft, Budapest Magyarország
IPTG	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Izoamil-alkohol	Reanal Finomvegyszergyár Zrt, Budapest, Magyarország
Izopropanol	Reanal Finomvegyszergyár Zrt, Budapest, Magyarország
Kálcium-klorid	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Kálium-dihidrogén-foszfát	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Kanamicin	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Kénsav (96%)	Reanal Finomvegyszergyár Zrt, Budapest, Magyarország
Klóramfenikol	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Kloroform	Reanal Finomvegyszergyár Zrt, Budapest, Magyarország
Kobalt(II)szulfát-7 hidrát	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Kumermicin (Coumermycin A1)	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Magnézium-szulfát	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Mangán-klorid-4 hidrát	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Nátrium-acetát	Reanal Finomvegyszergyár Zrt, Budapest, Magyarország
Nátrium-hidroxid	Reanal Finomvegyszergyár Zrt, Budapest, Magyarország
Nátrium klorid	BioLab Inc, Budapest, Magyarország
Nátrium-metaszilikát -5 hidrát - Szilika	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Nátrium-molibdát-2 hidrát	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Nátrium-perklorát-1 hidrát	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Noble-agar	Becton Dickinson Hungary Kft, Budapest, Magyarország
Novobiocin	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Phytagel	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Primerek → 3. Melléklet	Integrated DNA Technologies, USA
Réz-klorid-2 hidrát	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Rifampicin	Sigma-Aldrich Kft, Budapest,

	Magyarország
Sósav	Reanal Finomvegyszergyár Zrt, Budapest, Magyarország
Szaharóz	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Tetraciklin	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Tiosztrepton	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
TRIS	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Tripton	Reanal Finomvegyszergyár Zrt, Budapest, Magyarország
Vas-klorid-6 hidrát	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
Vanadil-szulfát-5 hidrát	Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország
X-Gal	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA

5. táblázat Pufferek és oldatok összetétele

Név	**Összetétel**
Töltő puffer	30 v/v % glicerin 0,25 mM brómfenolkék
TBE – agaróz gélelektroforézishez	10,78 g TRIS-bázis 5,5 g bórsav 0,74 g EDTA pH 8,3
TE puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8.0

6. táblázat Felhasznált kitek és enzimek

Név	**Gyártó - forgalmazó**
Pfu és *Taq* polimeráz	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies Inc, Santa Clara, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	BioMarker Kft, Gödöllő, Magyarország
QIAprep Spin Miniprep Kit	BioMarker Kft, Gödöllő, Magyarország
QIAGEN Plasmid Mega Kit	BioMarker Kft, Gödöllő, Magyarország
Restrikciós enzimek	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham,

	USA
RNáz	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany
TOPO TA cloning® kit	Life Technologies Magyarország Kft, Budapest Magyarország
UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit	ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o., Brno, Czech Republic
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega GmbH, Mannheim, Németország

3. MELLÉKLET

Az alkalmazott primerek listája, feltüntetve az annelációs hőmérsékletet

	PRIMER	SZEKVENCIA	Hossz (bp)	Tm (°C)
pDTA vektor és *T.acidophilum* specifikus primerek	Ta1057_forw_pdta	CGAATTCCATATGGCACGGGGTCGGAAGTTTAATTGCT	38	66
	Ta1054_rev_pdta	GGTGGTGAATTCCTTTGGCTGGTTACCCACAAGCACC	37	68
	Ta1054F	ATGGAGAAAAGAGCAGTTGAAGTT	24	54.8
	Ta1056_1055_noncod_R	TTCCAGTCCCTATTTGTTGTTTACATATTAAT	32	55.2
	GyrF	CTCCACAGCGGTGCGAAG	18	59.1
	GyrR1	ACC ATG TGG CTG TCT ACC TC	20	56.6
	GyrR2	GAT TCG TCT CCA TGA ACG TC	20	53.2
pDTA vektor - rekombináció visszaigazolás	Ta1054R	ACTCTGCCCTCTATGACC	18	53.2
	Ta1058F	TTGGGAGACCATGGGGATGCG	21	62
***T. volcanium* specifikus primerek**	TVGyrBreverse	TTACAGATCTATGTTCTCAGC	21	55
	TvGyrBforward	CTTCAAAGTACTCTTCAAATAATTG	25	58
***T. volcanium gyr*B helyspecifikus mutagenezis primerek**	TVgyrf1 R/H136	AAACTGATCGCAGTAGTGAAGCATGATGGGCACATATACTACGAAG	46	79
	Tvgyrrr2 R/H136	CTTCGTAGTATATGTGCCCATCATGCTTCACTACTGCGATCAGTTT	46	79
	Tvgyrf 3 GT/EA 174177	GGAATAGATATTAAATATCCAGAGCACGGTGCAATAATAAAATTTTATCCTGATC	55	79
	Tvgyrr4 GT/EA 174177	GATCAGGATAAAATTTTATTATTGCACCGTGCTCTGGATATTTAATATCTATTCC	55	79
	Tvgyrf5 LT/KI 224226	AAGATGAAAGGACAGGATCTAAGGAGATACTGCATTACGAAGGTGGCATCG	51	84
	Tvgyrr6 LT/KI224226	CGATGCCACCTTCGTAATGCAGTATCTCCTTAGATCCTGTCCTTTCATCTT	51	84
	Tvgyrf7 L/A 246	CATCTTTCCGAAGGGAAGAACGCAATAGTTGACCCTCTGTATTGGAG	47	81
	Tvgyrr8 L/A 246	CTCCAATACAGAGGGTCAACTATTGCGTTCTTCCCTTCGGAAAGATG	47	81
	Tvgyrf 9 K/R 348	TTCGAGGGTCAAACTAAAGCTAGGCTTGGCAACAGCAAGGTTAGAG	46	81
	Tvgyrr10 K/R 348	CTCTAACCTTGATGTTGCCAAGCCTAGCTTTAGTTTGACCCTCGAA	46	81
***T. acidophilum gyr*B**	SITF1	GCTTATAGCCGTGGTGAAGCATGACGGCAAGATATACTACG	41	65.7

helyspecifikus mutagenezis primerek	SITR1	CGTAGTATATCTTGCCGTCATGCTTCACCACGGCTATAAGC	41	65.7
***Synth_gyr*B specifikus primerek**	Synth_GyrB_R	TCACAGATCGATATTTTCTGCGTA	24	53.9
	Synth_GyrB_F	ATGACGGAGGATAACTATGATAGC	24	53.7
***Arr*2 specifikus primerek**	Arr2_forward	ATGGTAAAAGATTGGATTCCCATC	24	53.2
	Arr2_reverse	CTAGTCTTCAATGACGTGTAAACC	24	53.4
	Arr2_Nterm_out	AGTCACCAATCGCCAAATTG	20	53.8
	Arr2_Cterm_out	TGT TGA AGA CTG GGA GGG	18	54
Lineáris KO konstrukció primerek *synth_gyr*B és *arr*2	Ta0895Prof	AGCTAAGCTTGACAATGCCATATCTATCGG	30	59.9
	Ta0895Pror	CATAGTTATCCTCCGTCATAAATAAACGATTAATG	35	55.9
	Ta0895Dowf	CAGAAAATATCGATCTGTGATCAGGGGATCGCAGCGAC	38	65.4
	Ta0895Dowr	CAGTGGATCCGCACTTACGCATACTGGA	28	53.5
	Ta0895_Pror_Arr2_forw	GAATCCAATCTTTTACCATAAATAAACGATTAATG	35	54.4
	Ta0895_Dowf_arr2_rev	TTACACGTCATTGAAGACTAGTCAGGGGATCGCAGC	34	65.4
	TricornProf	AGCTGTCGACTATCTCCACATTCCTGC	27	61.7
	TricornPror_Synth_GyrB	GTCTTTTCATTCATTATGAATGACGGAGGATAACTATG	38	58.6
	TricornDowf_Synth GyrB	CAGAAAATATCGATCTGTGAAAATATATTATAACAGCATCTG	42	57.7
	TricornDowr	CAGTGGATCCATGGCATTTTTTCGGGTGG	29	63.4
	Tricorn_Pror_Arr2_fowr	GAATCCAATCTTTTACCATTCATAATGAATGAAAAGAC	38	57.2
	Tricorn_Dowf_Arr2_rev	GGTTTACACGTCATTGAAGACTAGAAATATATTATAACAGCATCTG	46	60.4
Lineáris konstrukció - rekombináció visszaigazolás	895_genom_up	GCAACTGAGGACACAGTGGT	20	57.5
	895_genom_down	GTGGAGGACAAGGTGTCGT	19	57
	Tricorn_genom_up	GGATGTAGACGTCTGCGTTGA	21	56.8
	Tricorn_genom_down	GCCTATGCAGAGCGTTTCTGA	21	57.4
Lineáris HIS konstrukció primerek *arr*2	Ta0895_His_arr2_rev	GCTGCGATCCCCTGACTAGTCTTCAATGACGTGTAA	36	65.4
	Ta0895_His_895_rev	ATTTAATGATGATGATGATGATGTCCGCCGGCCACAGGCGGGAAC	45	69.4
	Ta0895_His_arr2_forw	TGGCCGGCGGACATCATCATCATCATCATTAAATGGTAAAAGATTGGATTCC	52	67.2

4. MELLÉKLET

A vad típusú *gyr*B gén (TA-WT *gyr*B) és a mesterséges *gyr*B gén (synth_*gyr*B) összevetése (alignment), a csillagok (*) által jelölt szakaszokon a két gén azonos:

```
TA-WT gyr       ATGACCGAAGACAATTACGACTCTTCACAGATACAGATACTTGAAGGGT-TGAAGGCTGT 59
synth_gyrB      ATGACGGAGGATAACTATGATAGCAGCCAAATCCAAAT-CTTGGAGGGCCTCAAAGCCGT 59
                ***** ** ** ** ** **       ** ** ** ** **** ****  * ** ** **

TA-WT gyrB      TAGAAAAGTACCGGGCATGTACATAGGCTCCACCGATACAAGGGGCCTGCACCACCTGGT 119
synth_gyrB      GCGCAAGGTTCCGGGAATGTATATCGGAAGCACGGACACGCGCGGATTACACCATCTCGT 119
                  * ** ** ***** ***** ** **   *** ** **  * **  * ***** ** **

TA-WT gyrB      CTATGAGGTTGTGGACAACAGCGTTGATGAATCAGTTGCGGGATACTGCAGCAGGATATA 179
synth_gyrB      GTACGAAGTGGTCGACAATTCGGTGGACGAGAGCGTGGCCGGCTATTGCTCGCGCATCTA 179
                 ** ** ** ** *****    ** ** **    ** ** ** ** ***    * ** **

TA-WT gyrB      CGTTGTCATGGGGAGCGATGGTTCCATAACTGTGGAGGATGACGGCAGAGGTATACCTGT 239
synth_gyrB      TGTGGTTATGGGCTCGGACGGCAGCATCACGGTCGAAGACGATGGCCGCGGAATCCCAGT 239
                 ** ** *****    ** **   *** ** ** ** ** ** *** * ** ** ** **

TA-WT gyrB      CGATATACATCCCAAGTACAACAGGCCAGGACTGGAGATCGTTCTTACGGAGCTCCACAG 299
synth_gyrB      GGACATCCACCCGAAATATAATAGACCGGGCTTAGAAATAGTGCTGACCGAGCTGCATTC 299
                 ** ** ** ** ** ** ** ** ** **  * ** ** ** ** ** ***** **

TA-WT gyrB      CGGTGCGAAGTTTGATAAAAAGGTTTACAAGATAACCGGAGGCCTGCACGGGGTGGGCGT 359
synth_gyrB      CGGAGCCAAATTCGACAAGAAAGTGTATAAACTAACGGGCGGACTCCACGGCGTTGGACT 359
                *** ** ** ** ** ** ** ** ** **  **** ** ** ** ***** ** **  *

TA-WT gyrB      TCATGTCGTGAACGCGCTTTCAAAAAAGCTTATAGCAGTGGTGAAGAGAGACGGCAAGAT 419
synth_gyrB      TCACGTGGTCAATGCATTGAGCAAGAAACTGATCGCAGTTGTTAAACATGATGGAAAAAT 419
                *** ** ** ** **  *    ** ** ** ** ***** ** **    ** ** ** **

TA-WT gyrB      ATACTACGACATATTTGAACAGGGTATACCGGTGTCTGGCCTGAAAACTGCCAGCGATGT 479
synth_gyrB      CTATTATGATATCTTTGAGCAAGGAATCCCAGTTAGCGGACTTAAGACAGCATCGGACGT 479
                 ** ** ** ** ***** ** ** ** ** **    ** ** ** ** **    ** **

TA-WT gyrB      CTCTGAGATTGAAAAACTTGGAATAAAGATTCAGTTCCCAGATCACGGTACCATAATAAA 539
synth_gyrB      GAGCGAGATAGAGAAGCTGGGCATCAAAATACAATTCCCGGAGCATGGCGCCATCATCAA 539
                    ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ***** ** ** **  **** ** **

TA-WT gyrB      ATTCTATCCAGATCCTGACATATTTGAGACGACCGAATTTTCATACGAAACCATACTGGC 599
synth_gyrB      GTTTTACCCAGACCCGGATATCTTCGAAACCACAGAGTTCAGCTATGAGACGATCCTCGC 599
                 ** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** **    ** ** ** ** ** **

TA-WT gyrB      AAGGTTGACCGATCTCTCGTATCTGAATCCACAGCTCACGATAACATTCTTGGACGAAGC 659
synth_gyrB      CCGCCTCACGGACTTGAGCTACCTTAACCCACAATTGACCATCACGTTTCTCGATGAAGC 659
                  *  * ** **  *    ** ** ** *****  * ** ** ** **  * ** *****

TA-WT gyrB      ATCTGGAAGGGAGGATGTACTCCATCATGAGGGCGGTCTGATAGAGCTGGTCAGGCACCT 719
synth_gyrB      AAGCGGCAGAAAGGACATACTGCACCACGAAGGAGGCTTGATAGAACTTGTGAGACATCT 719
                *   ** **  ****  **** ** ** ** ** **  ******* ** ** ** ** **

TA-WT gyrB      GTCCGAGGGAAAGGAGGTGTTGATGGATCCGCTGTACCTCAAGGAAGAGGTAGACAGCCA 779
synth_gyrB      TAGCGAAGGCAAAGAGGCGCTCATGGAACCATTGTATCTGAAAGAGGAAGTTGATTCGCA 779
                   *** ** ** **** * * ***** **  **** ** ** ** ** ** **    **

TA-WT gyrB      CATGGTAGAATTTTCGCTATTATACACAACGGATGTTCAGGAAACGCTCATGTCATTCGT 839
synth_gyrB      TATGGTGGAATTTAGCCTGCTCTATACGACAGACGTGCAAGAGACCTTGATGAGCTTTGT 839
                 ***** ******   **  * ** ** ** ** ** ** ** **  * ***   ** **

TA-WT gyrB      GAACAACATAAGCACGCCGGAAGGAGGTACCCATGTGGCGGGCTTTCACCAGGGCCTTTC 899
synth_gyrB      CAATAATATCTCTACACCAGAAGGTGGCACACACGTTGCAGGATTCCATCAAGGACTGAG 899
                 ** ** **    ** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
TA-WT gyrB      GCGTGCAATACAGGACTACGC-CAGATCGAACAACAAGATAAAGGGTGTTGAGGACATAA 958
synth_gyrB      CAGAGCCATCCAAGACTATGCGCGCAGC-AATAATAAAATCAAAGGAGTGGAAGATATCA 958
                  * ** ** ** ***** ** *  * * ** ** ** ** ** ** ** ** ** * *

TA-WT gyrB      CTGGCGACGATGTGAAGGAAGGGGTCATTGCAGTGCTTCACGTTAAGATGCAGAATCCCC 1018
```

```
synth_gyrB      CAGGAGACGACGTCAAAGAGGGAGTGATAGCGGTACTGCATGTGAAAATGCAAAACCCAC 1018
                * ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ***** ** ** *

TA-WT gyrB      AGTTCGAAGGCCAGACAAAATCAAAGCTTGGAAA--CAGCAGCGTGAGGGGCATCGTCCA 1076
synth_gyrB      AATTTGAGGGACAGACGAAGAGCAAACTGGGCAATTCATCAG--TTAGAGGAATAGTGCA 1076
                * ** ** ** ***** **    ** ** ** **  ** ***  * ** ** ** ** **

TA-WT gyrB      GTCCGTAACATCAAAGTTCATGAAGACGTTCATGGAGACGAATCCGCACGTTGCAGATGT 1136
synth_gyrB      AAGCGTTACGGCGAAATTTATGAAAACCTTTATGGAAACCAACCCACATGTGGCCGACGT 1136
                   *** **  * ** ** ***** ** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** **

TA-WT gyrB      TATAATAGGAAGGGTTCTATCCGCTGCGGCTGCCAGGGAGGCGTCAAGGAAGGCCAAGGA 1196
synth_gyrB      AATCATTGGCCGCGTGCTGAGCGCAGCTGCGGCACGCGAAGCAAGCAGAAAAGCTAAAGA 1196
                 ** ** **  * ** **   *** ** ** **  * ** **    ** ** ** ** **

TA-WT gyrB      GCTTGTGAGGAGAAAATCTGCTCTTGAGGGCGGCGGTCTTCCAGGAAAGCTTGCCGACTG 1256
synth_gyrB      ATTGGTGAGAAGGAAGAGCGCACTGGAAGGCGGAGGCTTGCCGGGCAAACTGGCAGATTG 1256
                  * ***** ** **    ** ** ** ***** **  * ** ** ** ** ** ** **

TA-WT gyrB      TT-CATCGAACGATCCGTCAAACAGCGAGCTTTACATAGTTGAGGGAGACTCTGCTGGAG 1315
synth_gyrB      CAGCAGC-AATGACCCATCCAATTCAGAACTGTATATCGTGGAAGGCGATAGCGCAGGCG 1315
                   ** * ** ** ** ** **    ** ** ** ** ** ** ** **    ** ** *

TA-WT gyrB      GATCGGCCAAACAGGCGAGGAACAGGCAGTATCAGGCTGTACTTCCTCTCAGAGGAAAGA 1375
synth_gyrB      GTAGCGCTAAACAAGCACGCAATAGACAGTACCAAGCAGTGTTGCCACTGAGGGGCAAAA 1375
                *    ** ***** **  * ** ** ***** ** ** **  * ** ** ** ** ** *

TA-WT gyrB      TACTCAACGTTGAGAAAGCTTCGGACATGAAGGTTGTGGAGAACGAGATCATTCATGACC 1435
synth_gyrB      TCCTGAATGTGGAAAAGGCAAGCGATATGAAAGTAGTTGAAAATGAAATAATCCATGATT 1435
                * ** ** ** ** ** **    ** ***** ** ** ** ** ** ** ** *****

TA-WT gyrB      TCGTTGTCGCCATAGGTACAGGCGTCAAGGAAGACCTGAATCCGAAGAAGCTCAGGTACG 1495
synth_gyrB      TGGTGGTAGCAATCGGCACAGGCGTTAAAGAGGATCTTAACCCTAAAAAGTTGCGCTATG 1495
                * ** ** ** ** ** ******** ** ** ** ** ** ** ** *** *  * ** *

TA-WT gyrB      GGAAGATAATAATCATGACCGATGCCGATGTGGACGGCGCACATATAAGAACGCTGCTGT 1555
synth_gyrB      GCAAAATCATTATAATGACGGACGCTGACGTTGATGGAGCCCACATCCGCACACTCCTCC 1555
                * ** ** ** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** **  * ** ** **

TA-WT gyrB      TGACATTCTTCTTCAGGTACGCAAGATCGCTGATAGAGAACGGAAACGTGTTCTTTGCAG 1615
synth_gyrB      TGACCTTTTTCTTTCGCTACGCAAGGAGCCTCATCGAAAATGGCAATGTGTTTTTCGCAG 1615
                **** ** *****  * ********    ** ** ** ** ** ** ***** ** ****

TA-WT gyrB      AACCACCGCTGTACAGGATACAGAAGGGGCAGAACGTCAGATACGTTTACTCCGATGAGG 1675
synth_gyrB      AGCCTCCACTCTATCGCATCCAAAAAGGCCAGAATGTTAGGTATGTGTATAGCGACGAAG 1675
                * ** ** ** **  * ** ** ** ** ***** ** ** ** ** **   *** ** *

TA-WT gyrB      AGAAGGAACAGGTAAGCCGTGAGTTCGGACCGAATGCAATAATACAGAGGTTCAAGGGTC 1735
synth_gyrB      AAAAAGAGCGGGTTTCCAGGGAATTTGGACCTAATGCCATCATCCAGCGCTTTAAAGGCC 1735
                * ** ** * ***   * * ** ** ***** ***** ** ** *** * ** ** ** *

TA-WT gyrB      TTGGCGAAATGAATCCCGAGCAGCTGTGGGAGACGACCATGAATCCCAAGACTAGGAAGC 1795
synth_gyrB      TGGGCGAGATGAACCCAGAACAGTTATGGGAAACCACGATGAACCCGAAAACGCGCAAAC 1795
                * ***** ***** ** ** *** * ***** ** ** ***** ** ** **  * ** *

TA-WT gyrB      TCGTTCAGGTAACAATAGAGGACGCTGAGGAGGCGGAGCGCATATTCACAATACTCATGG 1855
synth_gyrB      TGGTGCAAGTGACCATCGAAGATGCAGAAGAAGCCGAAAGGATCTTTACGATCCTGATGG 1855
                * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **  * ** ** ** ** ** ****

TA-WT gyrB      GAGAGAAGGTTGAACCAAGGAGGAAGTTCATCGAAGAAAACGCGGTTTATGCTGAGAACA 1915
synth_gyrB      GCGAAAAAGTGGAGCCGAGGAGAAAATTTATAGAGGAGAACGCAGTGTACGCAGAAAATA 1915
                * ** ** ** ** ** ***** ** ** ** ** ** ***** ** ** ** ** ** *

TA-WT gyrB      TAGACCTCTGA 1926
synth_gyrB      TCGATCTGTGA 1926
                * ** ** ***
```

5. MELLÉKLET

A doktori munka során épített vektor konstrukciók.

	Vektor neve	***E. coli* rész**		***T. acidophilum* rész**			
		Alap vektor	**Szelekciós marker gén**	**Plazmid rész**	**Genomi homológ rész**	**Marker gén promótere**	**Szelekciós marker gén**
Shuttle vektorok	**pSTA**	pRSF_ Duet	Kan^R	6106 bp pTA1	-	Ta1137	*T. acidophilum* HO-122 Nov^R *gyrB*
	pSTRif	pRSF_ Duet	Kan^R	6106 bp pTA1	-	Ta1288	*P. aeruginosa* Rif^R *arr2*
Integratív vektorok	**pDTA**	pUC18	Amp^R	-	rövidítettt giráz operon	*gyrB* (Ta1055)	*T. acidophilum* HO-122 Nov^R *gyrB*
	pNTA	pUC18	Amp^R	-	rövidítettt giráz operon	*gyrB* (Ta1055)	*T. acidophilum* HO-122 Nov^R *gyrB*_A136H
	pVTA	pUC18	Amp^R	-	rövidítettt giráz operon	*gyrB* (Ta1055)	*T. volcanium* Nov^R *gyrB*
	pDTA_*synth*	pUC18	Amp^R	-	rövidítettt giráz operon	*gyrB* (Ta1055)	mesterséges Nov^R *gyrB*
	pDTA_*arr2*	pUC18	Amp^R	-	rövidítettt giráz operon	*gyrB* (Ta1055)	*P. aeruginosa* Rif^R *arr2*
Lineáris konstrukciók	**KO_Ta1490 _*synth_gyrB***	-	-	-	részleges Ta1489; részleges Ta1490	Tricorn proteáz (Ta1490)	mesterséges Nov^R *gyrB*
	KO_Ta1490 _*arr2*	-	-	-	részleges Ta1489; részleges Ta1490	Tricorn proteáz (Ta1490)	*P. aeruginosa* Rif^R *arr2*
	HIS_Ta0895 _*arr2*	-	-	-	részleges Ta0894; teljes Ta0895; részleges Ta0896	Ta0895	*P. aeruginosa* Rif^R *arr2*

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, *Dr. Kukolya Józsefnek* hasznos tanácsait, útmutatását, tanítását és ösztönzését, őnélküle ez a munka nem készült volna el.

Köszönetem szeretném kifejezni *Dr. Kriszt Balázsnak*, témavezetőmnek és tanszékvezetőmnek, támogatásáért, bátorításáért, és hogy lehetőséget adott a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszéken végezzem doktori munkám, továbbá hogy részt vegyek a folyó kutatásokban.

Köszönetet mondok *Dr. Nagy Istvánnak* (Max Planck Insitute of Biochemistry, Martinsried), amiért lehetőséget teremtett a német tanulmányutamra, segített eligazodni a publikálás rejtelmes világában és szélesítette szakmai látókörömet.

Köszönöm a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék, valamint a Környezetipari Regionális Egyetemi Tudásközpont minden munkatársának, amiért segítették, támogatták munkámat. Külön köszönöm *Dr. Krifaton Csillának* barátságát, támogatását, és önzetlen segítségét az elmúlt években. Továbbá hálával tartozom *Varga Sándor* kollegámnak segítségért a kísérletes munkában.

I would like to acknowledge to *Prof. Dr. Wolfgang Baumeister* and the members of Department of Molecular Structural Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried for the support and the opportunity to work in the institute.

Köszönöm korábbi főnökömnek *Dr. Fekete Csabának*, hogy támogatta doktori munkám folytatását, példamutatását és segítségét az első szerzős cikkem megírásában.

Köszönettel tartozom egykori tanáraimnak, *Dr. Márialigeti Károly* és *Dr. Táncsics András*, akik már szakdolgozó és diákkörös koromban megismertettek a természettudományos gondolkodás alapjaival és kutatás örömével.

Köszönöm jelenlegi munkaadóimnak, *Dr. Székács Andrásnak* és *Dr. Darvas Bélának*, hogy támogatták a doktori munkám befejezését.

Köszönöm jelenlegi munkatársaimnak, *Batáné Dr. Vidács Ildikónak, Dr. Beczner Juditnak* és *Csernus Olíviának* türelmüket és a disszertáció javításában nyújtott segítségüket.

Köszönöm *Dr. Jenes Barnabásnak* és *Ivanics Milánnak* a lehetőséget és segítséget a génpuskás kísérletekben.

Köszönöm *Dr. Csenki Zsoltnak* és *Kovács Róbertnek* a *Thermoplasma* telepek mikroszkópos vizsgálatában és fotózásában nyújtott elengedhetetlen segítséget.

Köszönöm barátaimnak megértéstésüket a sok elmulasztott közös programért a doktori évek alatt, és hogy türelmesen hallgatták a tudományos okfejtéseimet. Külön köszönet *Pechál Nikolettnek*.

I also would like to thank to *Dr. Roland Knispel*, my partner, for his continuous and endless support, patience, help in scientific and non-scientific matters, in writing my paper and dissertation and that he always helped me to keep my head above the water.

Teljes szívből köszönöm továbbá *Édesanyámnak*, *Édesapámnak* és szeretteimnek, hogy támogattak tanulmányaimban és az élet minden területén, nélkülük nem jutottam volna el idáig.

A doktori munka megvalósulásához az alábbi projektek nyújtottak támogatást:

Az oktatás és kutatás színvonalának emelését célzó (TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003) projekt.

A Dél-Dunántúli régió egyetemi versenyképességének fejlesztését célzó (TÁMOP 4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0002) projekt.