

**Redukált genomú *Escherichia coli* törzs genetikai  
stabilitásának növelése az indukálható DNS-  
polimerázok kiiktatásával**

**Ph. D. értekezés**

**Csörgő Bálint**

**Témavezető: Dr. Pósfai György**

**Biológiai Doktori Iskola  
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézet  
SZTE TTIK  
2012  
Szeged**

# Tartalomjegyzék:

1. Bevezetés .....	4
2. Szakirodalmi áttekintés .....	6
2. 1. Az <i>Escherichia coli</i> baktérium .....	6
2. 2. Az <i>E. coli</i> mint szintetikus biológiai eszköz .....	7
2. 3. Az <i>E. coli</i> mutációs mechanizmusai .....	8
2. 4. Az <i>E. coli</i> IS elemei okozta klónozási nehézségek .....	10
2. 5. Az <i>E. coli</i> pontmutációs mechanizmusai okozta klónozási nehézségek .....	12
2. 6. Stratégia a pontmutációs események mértékének csökkentésére .....	13
3. Célkitűzések.....	16
4. Anyagok és módszerek .....	17
4. 1. Genommódosítási módszerek .....	17
4. 2. Felhasznált törzsek, plazmidok, táptalajok és oligonukleotid primerek .....	19
4. 3. Kompetens sejt készítés és transzformáció.....	23
4. 4. Sejtkultúrák növekedésének mérése .....	24
4. 5. Mutációs ráta mérések .....	24
4. 6. Mutációk típusainak meghatározása .....	26
4. 7. A <i>sinIM</i> gén mutációinak detektálása .....	26
5. Eredmények.....	28
5. 1. Az indukálható DNS-polimerázok kiejtése csökkenti a spontán mutációs rátát .....	28
5. 2. Az SOS-válasz szabályozó fehérjéinek inaktiválása nem csökkenti a spontán mutációs rátát.....	31
5. 3. Az MDS42pdu törzs stresszkörülmények között is jelentős genetikai stabilitást mutat.....	32
5. 4. Az MDS42pdu törzs fokozott stabilitást biztosít egy toxikus fehérjét expresszáló plazmid klónnak. ....	37
6. Az eredmények megvitatása.....	45

<b>6. 1. Az indukálható DNS-polimerázok hiányának hatása a spontán mutációs rátára.....</b>	<b>45</b>
<b>6. 2. Stresszkörülmények mutációs rátára gyakorolt hatása .....</b>	<b>47</b>
<b>6. 3. Az indukálható DNS-polimerázok hiányának hatása a fehérje túltermelésre .....</b>	<b>47</b>
<b>6. 4. Az MDS42pdu törzs előnyeinek számszerűsítése.....</b>	<b>48</b>
<b>6. 5. Gyakorlati következtetések .....</b>	<b>50</b>
<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>51</b>
<b>Szakirodalmi hivatkozások: .....</b>	<b>52</b>
<b>Saját publikációk jegyzéke: .....</b>	<b>61</b>
<b>Összefoglalás.....</b>	<b>62</b>
<b>Summary.....</b>	<b>66</b>

# 1. Bevezetés

Doktori munkámat a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézet Genommérnöki Csoportjában végeztem. Csoportunk munkájának fókuszában az *Escherichia coli* baktérium genomjának célzott, nagyléptékű átalakítása áll. Célunk egy leegyszerűsített modellszerkezet és egyben javított biotechnológiai eszköz létrehozása.

A különböző *E. coli* törzsek szekvenált genomjainak összehasonlítása azt mutatja, hogy a baktérium kromoszómája egy közös génkészletből (ún. „mag” genomból) és szigetyszerűen beékelődő, horizontális transzferrel szerzett „járulékos” génekből áll. Hipotézisünk szerint ez utóbbi, általában speciális körülményekhez való adaptálódást szolgáló törzs-specifikus gének stabil laboratóriumi körülmények között nélkülözhetők, eltávolításukkal „áramvonalasítani”, metabolikusan egyszerűbbé és hatékonyabbá lehet tenni a sejteket.

Munkánk során megállapítottuk, hogy az ún. „járulékos” genomi elemek (profágok, inszerciós elemek) eltávolításával a baktérium laboratóriumi körülmények között genetikailag stabilabban viselkedik. A genetikai variációt generáló molekuláris mechanizmusok változó körülmények között az evolvási képesség alapjait jelentik a baktérium számára, ezek teszik lehetővé a populáció hosszú távú túlélését. Stabil, laboratóriumi körülmények között azonban a sejt számára nem létszükséglet a nagyfokú változatosság. Mi több, az újonnan létrejövő, evolvált tulajdonságok kifejezetten hátrányosak lehetnek, ha egy precíz molekuláris és szintetikus biológiai eljárással a sejtbe „szerelt” genetikai konstrukció működéséről, stabilitásáról van szó.

Doktori értekezésem azt a munkát mutatja be, mely során a genetikailag lehető legstabilabb *E. coli* törzset próbáltuk létrehozni. Korábbi munkáinkban bemutattuk a mobilis genetikai elemek hiányának szerepét a genetikai stabilizálásban. A jelen munka a korábban elért stabilizációt tovább fokozza az ún. nagy hibaszázalékú DNS-polimeráz enzimek kiejtésével. A létrehozott stabilizált törzs egyik fő gyakorlati előnyét bemutatjuk egy toxikus fehérje túltermelési kísérlet segítségével. Az általunk létrehozott genetikailag stabilizált *E. coli* törzs segítségével lehetővé válik a növekedést gátló biomolekulák stabilabb termelése. A gyakorlati haszon mellett a kísérletek elméleti jelentőséggel is

bírnak a DNS-károsodásra indukálódó, ún. minor DNS-polimerázok élettani szerepét illetően. Az adatok arra utalnak, hogy ezeknek az enzimeknek nem a hibajavítás az elsődleges szerepe, hanem a genetikai változatosság generálása.

## 2. Szakirodalmi áttekintés

### 2.1. Az *Escherichia coli* baktérium

Az *Escherichia coli* az Enterobacteriaceae családba tartozó, Gram-negatív, nem spórázó, fakultatív anaerob baktérium [1]. Sejtjei tipikusan pálcika alakúak, átlagosan 2 µm hosszúak és 0,5 µm átmérőjűek. Általában endoterm organizmusok alsó béltraktusában élnek, az emberi normál bélfloórát hozzávetőlegesen 0,1 %-ban az *E. coli* alkotja [2]. Az *E. coli* hasznos lehet a gazdaszervezet számára, képes a K<sub>2</sub> vitamin produkálására [3], valamint képes megakadályozni patogén törzsek kolonizációját a bélben [4]. Létezik azonban számos patogén változata is az *E. coli*-nak, ezeket a sejtfelszínen található antigének alapján négy különböző szerotípusba lehet sorolni: H-, K-, O- és R [5]. A baktérium a szervezetekből kikerülve a változatos külső körülmények között is képes túlélni, ezáltal képes széles körben elterjedni. A fajt először 1885-ben írta le Theodor Escherich német orvos [6], azóta már a prokarióta élővilág legrészletesebben leírt, legjobban ismert fajává vált.

A ma széles körben elterjedt vad típusú laboratóriumi törzsnek számító *E. coli* K-12-t 1922-ben izolálták egy diftériás beteg székletmintájából [7]. Ennek közvetlen leszármazottja a K-12 MG1655 törzs, mely a legtöbb laboratóriumban használt törzs őse. Nem véletlen, hogy az *E. coli* K-12 MG1655 volt az egyik legelső organizmus, melynek genomját megszekvenálták [8]. Ma már több mint 150 különböző *E. coli* törzs teljes szekvenciája található meg a GenBank adatbázisban. A különböző törzsek genomjainak összehasonlításával megállapítható, hogy a különböző genomok mozaik szerkezetet mutatnak [9, 10]. A fajra jellemző, erősen konzervált „váz” gének sorát (ún. „mag” genom) változatos géntartalmú, az adott törzsre specifikus genomi-szigetek (ún. „járulékos” genom) szakítják meg [11]. Megállapítható, hogy a mag genom általában az alapvető anyagcsere-folyamatokban résztvevő géneket tartalmazza, míg a járulékos genom többnyire mobilis genetikai elemeket, virulencia faktorokat hordoz, illetve olyan géneket, melyek a törzsre specifikus különleges életkörülményekhez való alkalmazkodást teszik lehetővé [12, 13]. A különböző *E. coli* genomok összehasonlítása rendkívül nagy diverzitást jelez. Minden genomnak hozzávetőlegesen csupán 20 %-a található meg az

összes többi *E. coli* törzsben, a maradék 80 % a törzsek között variábilis [14]. Az *E. coli* fajon belül előforduló, de nem minden törzsben (esetenként csak egyben) jelenlévő gének összessége (az ún. „pán” genom) a mai ismeretek alapján megközelíti a 14000 gént. Ezzel szemben a mag genom mérete 53 különböző *E. coli* törzsre nézve mindössze 1472 gén. További törzsek összehasonlításával ez az érték vélhetően tovább fog csökkenni [15].

Az *E. coli* részletes tanulmányozása főként annak köszönhető, hogy az 1970-es években elindult rekombináns DNS technológiák elsődlegesen ezt a gazdaorganizmust használják a mindennapi laboratóriumi feladatok ellátására. Elsősorban könnyű, gyors és olcsó tenyésztetősége miatt lett közkedvelt a kutatók körében. Számos molekuláris biológiai jelenséget, mint például a bakteriális konjugációnak a folyamatát [16] vagy a gének szabályozásának alapvető tulajdonságait [17] az *E. coli*-ban írtak le először. Amellett, hogy jól ismert modellorganizmus, az *E. coli* alkalmas biotechnológiai, ipari feladatok ellátására is, például rekombináns fehérjék, különböző metabolitok, gyógyszeralapanyagok, bioüzemanyagok termelésére.

## **2. 2. Az *E. coli* mint szintetikus biológiai eszköz**

A dinamikusan változó környezeti tényezők mellett a baktériumpopulációk túléléséhez nélkülözhetetlenek a belső genetikai változékonyságot létrehozó folyamatok. A populációk különböző környezetekhez való adaptálódásának képessége nagyrészt a mutációs ráta folyamatos finomhangolásának köszönhető [18]. Azonban ami természetes környezetekben előnyös tulajdonság, viszonylagosan stabil, kontrolált körülmények között - mint amilyenek a laboratóriumi vagy ipari felhasználások során alkalmazottak - nem feltétlen kívánatosak. Mi több, az újonnan létrejött, evolválta tulajdonságok egy gondosan, precízen megtervezett részekből álló biológiai rendszerben nemkívánatos genotípusos és fenotípusos elváltozásokhoz vezethet [19]. Továbbá, egy klónkönyvtárban, vagy termelő baktériumsejtben bekövetkezett spontán genetikai elváltozás a kívánt munka szempontjából jelentős problémát okozhat [20-22]. Ebből kifolyólag egy fokozott genetikai stabilitású baktériumsejt - akár túltermelésre, akár klónozó gazdaként, akár egy ún. szintetikus biológiai „váz”ként használva - nagy jelentőségű lehet [23-25].

Azon felül, hogy egy univerzális klónozási gazdasejt, az *Escherichia coli* baktérium a leggyakrabban használt organizmus fehérjék, metabolitok és másodlagos metabolitok kutatási és ipari célú termelésére [26-32]. Hogy ezeknek az ún. „igásló” törzseknek a termelését fokozzák, genommérnöki eljárásokat felhasználva számos nagyszabású változtatást végeztek különböző *E. coli* törzseken [33-37]. Ezek a munkák mind követik azt az alapvető stratégiát, hogy a metabolikus útvonalakat módosítják az adott biotermék szintjének növelése irányában, ezzel egy időben pedig a nemkívánt melléktermékek szintjét próbálják csökkenteni. Ebben a szellemben laboratóriumunkban egy csökkentett-genomú *E. coli* törzset, az ún. MDS42-t hoztunk létre (a szülői vad típusú K-12 MG1655 törzshöz képest 42 deléciót hordozó multiple-deletion series törzs). A legtöbb laboratóriumi körülmények között nélkülözhető gén, valamint az összes ismert mobilis genetikai elem és számos kriptikus virulencia gén precízen el lett távolítva a genomról. A keletkezett, genetikailag stabilizált törzs számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik [38]. A multi-deléciós háttér előnyeit ipari célú felhasználásokban egy modifikált MDS42 törzs fokozott L-treonin termelésével sikerült kimutatni [39]. Egy másik munkában kimutatták, hogy instabil genetikai konstrukciók fenntartásában előnyt jelent az IS elem mentes MDS42 használata: lehetővé tette egy toxikus gén stabil klónozását [40].

### **2.3. Az *E. coli* mutációs mechanizmusai**

Az élőlények evolúciójában a mutációknak alapvető, de ugyanakkor ellentmondásos szerepük van. A mutációk okozta variációkra feltétlen szükség van az adaptáció folyamatában, viszont egy adott mutáció sokkal nagyobb valószínűséggel ártalmas az organizmus számára, mint hogy valamilyen előnyhöz vezetne [41]. Ebből kifolyólag az organizmusok összetett, változatos és több szintű molekuláris mechanizmussal rendelkeznek a mutációs események szabályozására [42]. Érdekes módon a különböző baktériumok teljes genomra vonatkoztatott mutációs rátája egy meglehetősen állandó érték körül mozog, hozzávetőlegesen 0,0033 mutáció/genom/DNS replikáció [43]. Ez az ún. Drake-törvény azt jelenti, hogy az egy bázispárra vonatkoztatott mutációs ráta fordítottan arányos a genom méretével. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a baktériumok



spontán mutációs rátáját egy általános, a káros mutációk hatásának és a hibajavítási mechanizmusok metabolikus költségeinek egyensúlyából adódó hatás határozza meg [44].

A megemelkedett mutációs rátával rendelkező egyedek (ún. mutátorok) nagyobb gyakorisággal képeznek káros mutációkat, így fitnesz értékük is várhatóan alacsonyabb lesz. Ennek ellenére a mutátorok előfordulása a természetes baktériumpopulációkban mégis számottevő [45-47], ami arra utal, hogy bizonyos körülmények között mégis szelekciós előnyt jelent a mutátor fenotípus [48]. A mutátor fenotípusok általában a DNS replikációját végrehajtó, illetve a DNS hibajavításában résztvevő enzimeket kódoló gének mutációjából erednek. A legerősebb ismert mutátor *E. coli* törzs az általános DNS-polimeráz enzim (Pol III) 3'-5' exonukleáz aktivitással rendelkező  $\epsilon$  alegységét kódoló *dnaQ* gén pontmutációjából ered [49]. Az *E. coli*-ban több mechanizmus létezik a DNS hibajavítására: a DNS-polimeráz enzim saját hibaellenőrző funkciója exonukleáz aktivitása révén [50] a metilirányított hibás párosodás kijavítás (methyl-directed mismatch repair) [51], a nukleotid kivágásos hibajavítás (nucleotide excision repair) [52], a bázis kivágásos hibajavítás (base excision repair) [53], a nagyon rövid szakasz kijavítás (very short patch repair) [54], illetve a homológ rekombináció által irányított hibajavítás [55]. A természetben izolált mutátor törzsek fenotípusát döntő többségben a metilirányított hibajavítás egyik kulcsenzimét kódoló génben található mutáció okozza [56].

A mutátor törzsek gyakori előfordulása mutatja, hogy adott körülmények között előnyös lehet a baktériumok számára a megemelkedett mutációs ráta [57]. A mutátor fenotípusok mellett a baktériumokban kialakultak jobban szabályozható módjai a mutációs ráta megemelésének, ezek az ún. stresszindukált mutagenézises folyamatok [58]. Ezekben a folyamatokban bizonyos külső stresszhatásokra (pl. éhezés, DNS károsodás, hőmérsékletváltozás, antibiotikummal vagy kémiai mutagénnel való kezelés) központi szabályozó elemek változásokat idéznek elő a génexpresszióban és a sejt metabolizmusban. A ma ismert stresszindukált mutagenézis útvonalak *E. coli*-ban a következők: a RecA rekombinááz és LexA represszor fehérjék által irányított SOS-válasz [59, 60], az RpoS ( $\sigma^{38}$ ) alternatív szigma faktor által irányított általános stresszválasz [61], az RpoH ( $\sigma^{32}$ ) alternatív szigma faktor által irányított hőshock válasz [62], a

guanozin-tetra-foszfát (ppGpp) szignál molekula által szabályozott stringens válasz [63], illetve a polifoszfát közvetítette tápanyaghiány válasz [64].

A felsorolt mutagenézis útvonalak a mutációkat különböző módokon idézhetik elő. A leggyakoribb módja ennek az ún. nagy hibaszázalékú DNS-polimeráz enzimek aktiválása [65] (lásd 2. 6. fejezet). Az indukált nagy hibaszázalékú DNS-polimeráz enzimek hatására pontmutációk vagy leolvasási keret eltolódást (frame-shift) okozó, rövid deléciók keletkeznek. Ezek az enzimek a károsodott DNS-en átmenetileg átveszik a Pol III általános DNS-polimeráz helyét, és képesek a DNS replikációt akadályozó törések áthidalására. Ugyanakkor ezek az enzimek a DNS replikációját nagyobb hibaszázalékkal végzik, mint az általános polimeráz (Pol III) enzim. Jelenleg is vita tárgya, hogy ezeknek az indukálható DNS-polimerázoknak a kisebb fidelitása egy evolvált tulajdonság, mely stressz hatására nagyobb változatosságot hoz létre [66], vagy a DNS hibajavításnak egy másodlagos, velejáró hatása [67]. A nagy hibaszázalékú DNS-polimeráz enzimek indukálásán kívül a stresszindukált mutagenézises folyamatok a metilirányított hibajavítás enzimeinek gátlásával is kifejthetik hatásukat [68]. Említésre méltó, hogy bizonyos stresszhatásokra az *E. coli* IS elemei is képesek a genomon belüli helyváltoztatásra, ezáltal növelve a genetikai variációt [69].

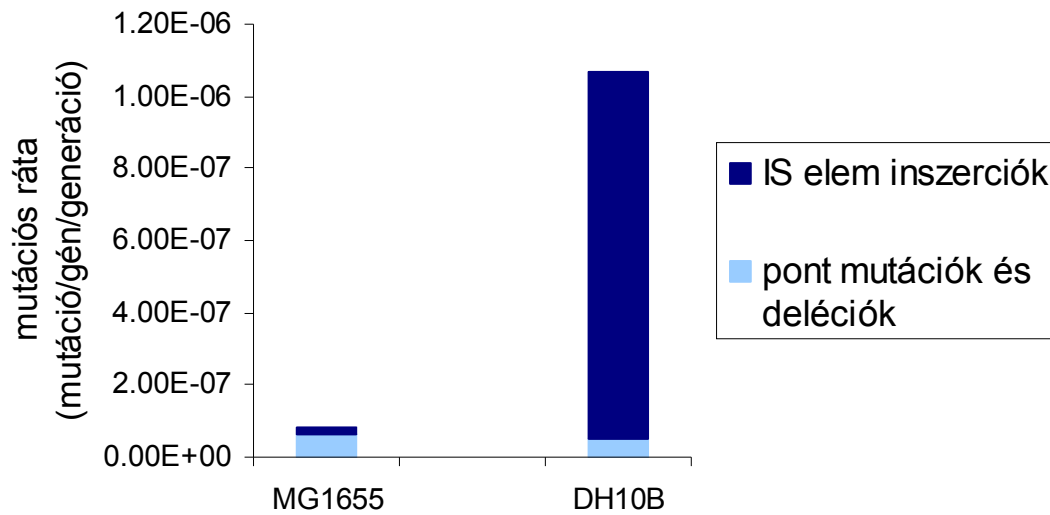
Számos módszer létezik a baktériumok mutációinak detektálására, mutációs rátájuk mérésére [70]. Ideális esetben ezek a módszerek bármilyen típusú mutáció detektálására alkalmasak, a sejt növekedésére nézve semleges hatásúak, nem szükséges hozzájuk egy speciális genetikai háttér, egy egyszerű genotípus-fenotípus kapcsolaton alapulnak, továbbá könnyen és reprodukálhatóan számolhatóak. Laboratóriumunkban előszeretettel használjuk a D-cikloszerin rezisztencián alapuló mutációs ráta mérési módszert [71] (4. 5. fejezet), mely a felsorolt elvárásoknak mind eleget tesz. A kiértékelés során fluktuációs analízist alkalmazva [72] pontos képet kapunk az adott törzs adott körülmények között mért mutációs rátájáról.

## **2. 4. Az *E. coli* IS elemei okozta klónozási nehézségek**

Számos adat van arra, hogy bizonyos géneket - funkcióképes állapotukban - különösen nehéz bakteriális plazmidokba klónozni, továbbá sok esetben helytelen, rendellenes

klónok keletkeznek [73-76]. Normál esetben a gazdasejt általános mutációs rátája annyira alacsony ( $\sim 10^{-7}$  mutáció/gén/generáció) [44], hogy a klónozott DNS fragmentumokban keletkezett spontán változás nagyon ritka, így az észlelt klónozási hibákért egyedül nem felelhet. Viszont ha a klónozott DNS fragmentum valamilyen módon megzavarja a sejt normál fiziológiás állapotát, és csökkenti a növekedést, akkor a klón ritka mutánsai pozitív szelekció alá eshetnek, és gyorsan dominánssá válhatnak a kultúrában. Ezt a jelenséget korábban laboratóriumunkban is tapasztalták, amikor a nyúl haemorrhagiás vírus VP60 fehérje génjét próbálták klónozni [38]. A kolera toxin egyik komponensével fuzionáltatott VP60 a sejt számára toxikusnak bizonyult. A normál *E. coli* klónozó törzsekből kizárólagosan csak IS elem transzpozíciója által inaktivált rekombináns terméket sikerült izolálni. Ezzel szemben a mobilis elemektől mentesített MDS42 gazda sejtet használva a rekombináns génkonstrukciót sikerült sértetlen állapotban klónozni.

Az IS elemek klónozási eljárásokban kifejtett hátrányos hatására rámutatott egy korábbi kollaborációs munkánk, mely a gyakran használt *E. coli* DH10B klónozó törzs genomjának szekvenálásával és egyéb jellemzésével foglalkozott [77]. A vizsgálat során kollaborációs partnereink a szarvasmarha genomszekvenálás melléktermékeként a munkában köztes klónozó gazdának használt DH10B törzs teljes genomi szekvenciáját állították össze a „szennyező” *E. coli* szekvenciadarabokból. A szarvasmarha szekvenálási projekt során közel 4 millió leolvasást végeztek egy DH10B gazda vektorban fenntartott szarvasmarha BAC könyvtáron. Meglepő módon, a különböző BAC konstrukciók oly mértékben tartalmaztak nem kívánatos, baktérium eredetű DNS-t, hogy a klónozó gazdasejt teljes genomját össze lehetett állítani a szarvasmarha könyvtárból. Részletesebb vizsgálataink kimutatták, hogy az általánosan használt klónozó DH10B törzs különösen hajlamos a klónozási műtermékek létrehozására. Az IS elemek klónozási alkalmazásokban kifejtett hátrányos hatását már korábban is leírták [78], meglepő módon a direkt ilyen célokra használt DH10B törzsben a jelenség különösen jelentős. Rámutattunk, hogy a DH10B törzs spontán mutációs rátája több mint egy nagyságrenddel nagyobb, mint a vad típusú K-12 MG1655 törzsé, és ez javarészt a fokozott IS aktivációnak köszönhető (**1. ábra**).



**1. ábra.** Az MG1655 és DH10B törzsek spontán mutációs spektrumának összehasonlítása. A mutációs rátákat a cikloszerin rezisztencián alapuló fluktuációs analízissel határoztuk meg. Az MG1655 törzsben a mutációk 24 %-a köszönhető inszerciós eseménynek, míg a DH10B törzs esetén ez az érték 95 %.

## 2. 5. Az *E. coli* pontmutációs mechanizmusai okozta klónozási nehézségek

A DH10B-vel foglalkozó vizsgálatunk rámutatott, hogy mennyire számottevő lehet a különböző *E. coli* törzsek instabilitásából eredő hibalehetőség klónozási munkák során. A mobilis genetikai elemektől mentesített MDS42 törzs létrehozásával a problémák egy részét sikeresen kiküszöböltük, hiszen a mutációk létrejöttek egy alapvető, néha domináns [79] típusát, az IS elem inszerciót sikerült eliminálni. Sok esetben azonban a toxikus klónokat pontmutációk vagy deléciók inaktíválják. Korábban, a hepatitis C vírus génjeinek *E. coli*-ba való klónozásakor azt tapasztalták, hogy a pontmutációk (frameshift- ill. nonszensz-mutációk) szelekciója miatt kizárólagosan csak hibás, nem expresszálandó klónokat tudtak izolálni [76]. A mutáns klónok olyan szelekciós előnyt élvezhetnek, hogy ezt szándékosan is lehet használni pontmutációk izolálására, ahogyan ezt tették mutáns humán immunodeficiencia vírus proteáz fehérje [80], vagy a PvuII DNS

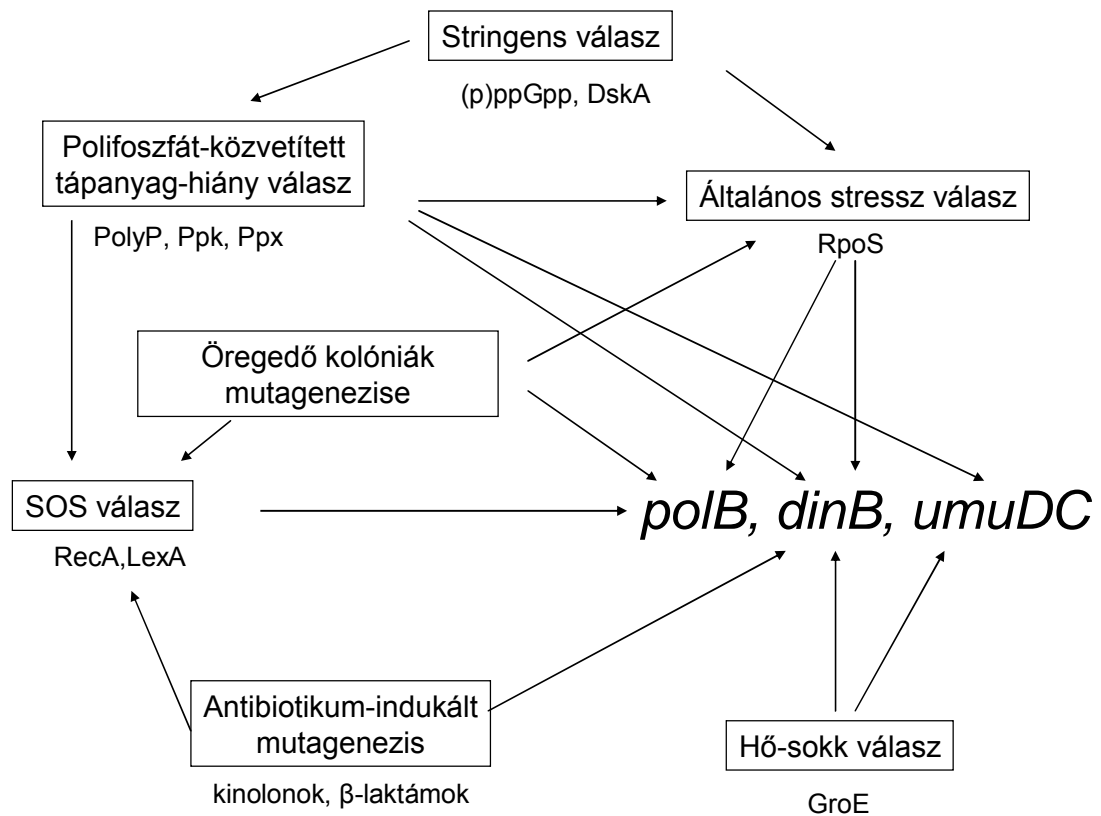
metiltranszferáz enzim esetében [81]. Szemben az IS elemek által generált inszerciós mutagenezissel, a pontmutációkat képtelenség teljesen kiiktatni. A mutációs ráta csökkentése azonban javíthat a sejt klónozási gazdaként, vagy szintetikus biológiai eszközként való alkalmazhatóságán.

## **2. 6. Stratégia a pontmutációs események mértékének csökkentésére**

Az *E. coli* pontmutációs rátájának csökkentésére az alapvető stratégiánk a sejt SOS-válaszának részeként indukálódó, hatékony mutációgeneráló mechanizmusok kiiktatása volt. Stressz körülmények között (mint például a sejtben termelődő toxikus fehérje esetén) a sejt DNS-e sérüléseket szenvedhet, ez közvetlenül beindítja a sejt SOS-válaszát, melynek során közel 40 gén aktiválódik, felszabadulva a LexA represszor fehérje gátlása alól [59, 82-84]. Az *E. coli* SOS-válasza során indukált gének közül három is DNS-polimeráz enzimet kódol (Pol II, Pol IV, Pol V); ezek képesek a DNS-sérülések helyén kialakult különböző replikációs akadályokat és elakadt replikációs villákat megkerülni [85-88]. Az indukált mutagenezis folyamatában mind a három SOS-indukált DNS-polimeráz szerepe bizonyított [89]. A Pol IV és Pol V enzimek DNS-szintézisben mutatott hibaszázaléka 2-3 nagyságrenddel nagyobb, mint az általános polimeráz Pol III enzimé [65]. A harmadik indukálódó polimeráz, a Pol II - bár sértetlen DNS templátokon magas pontosságot mutat - bizonyos stresszindukált mutagenezises folyamatokban szintén kulcsfontosságú szerepet játszik [89-91]. Az SOS-rendszer által szabályozott DNS-polimeráz enzimek a sejt számára nélkülözhetők [92], elsődleges szerepük vélhetően a túlélés elősegítése és genetikai változékonyság generálása stressz körülmények alatt [93]. A polimerázok DNS hibajavítási működése mellett a javításnak alternatív módjai is vannak, elsősorban a rekombináció általi korrekció, amely nagyobb pontossággal képes a megakadt replikációs villák kijavítására [94].

Az *E. coli* baktériumban a pontmutációk létrejöttében elsődleges szerepet töltenek be az SOS-rendszer által indukált, nagy hibaszázalékkal működő DNS-polimeráz enzimek. Egy korábbi munkában az SOS-rendszer szabályozása alatt álló gének folyamatos gátlását tudták előidézni a LexA központi szabályozó fehérje pontmutáció általi inaktiválásával [95]. Egy ilyen LexA variáns mutációs ráta csökkentő hatásáról

kimutatták, hogy képes volt megakadályozni az *E. coli* sejtekben az antibiotikum-rezisztenciát eredményező, topoizomeráz génekben történő pontmutációk kialakulását [96]. Az SOS-választ szabályozó LexA fehérje inaktiválásával tehát csökkenteni lehet az általános pontmutációs rátát. Ez a megoldás azonban nem kielégítő. Egyrészt a minor DNS-polimerázok előidézhetnek pontmutációkat stresszmentes (SOS-válasz nélküli) körülmények között is, másrészt az SOS-válaszon kívül más stresszindukált regulációs útvonalak is aktiválhatják őket [58] (**2. ábra**). Munkánk elején azt feltételeztük, hogy nagyobb mértékű és stabilabb pontmutációs ráta csökkenést eredményez, ha a Pol II (*polB*), Pol IV (*dinB*), valamint a Pol V (*umuDC*) DNS-polimeráz enzimeket – génjeik deléciójával - elimináljuk a sejtől. Így – szemben az SOS-rendszer általános gátlásával – az alternatív, hibamentesen javító rekombinációs mechanizmusok működőképesek maradnak.



**2. ábra.** A nagy hibaszázalékú szintézist folytató DNS-polimerázok különböző útvonalakon aktiválódnak. A részletesen leírt SOS-válaszon kívül más stresszválasz útvonalak is képesek aktiválni a polimeráz géneket. A különféle útvonalak bekeretezve láthatók, míg az adott útvonal fő szabályozó faktorai a bekeretezett szövegek alatt vannak feltüntetve.

### 3. Célkitűzések

Munkánk alapvető célja egy csökkentett mutációs rátájú, nagyfokú genetikai stabilitással rendelkező *Escherichia coli* törzs előállítása. A gazdasejt genetikai változékonyságát növelő különböző mechanizmusok kiiktatásával egy laboratóriumi és ipari célokra egyaránt hasznosítható törzset kívántunk előállítani. A gyakorlati cél mellett a sejtműködés egyes, mutációgenerálással összefüggő kérdéseit is tanulmányozni szándékoztunk.

Az *E. coli* SOS-rendszere által indukált, nagy szintézishibával működő, ún. minor DNS-polimerázok génjeinek kiejtésével konkrétan a következőket kívántuk vizsgálni:

- Milyen mértékben vesznek részt az indukálható DNS-polimerázok az *E. coli* spontán mutációs rátájának kialakításában?
- Különböző stressz körülmények alatt fokozódik-e a mutációs ráta, és hogyan befolyásolja ezt az indukálható DNS-polimerázok jelenléte?
- Mi az egyes minor DNS-polimerázok hozzájárulási aránya a mutációs folyamatokhoz?
- Az SOS-rendszer kiiktatásával ugyanazt a hatást érzük-e el, mint az indukálható DNS-polimerázok génjeinek direkt kiejtésével?
- Hogyan változik a sejtek túlélési képessége a minor DNS-polimeráz gének kiejtése következtében?
- Segít-e növekedést gátló fehérjék expressziójának fenntartásában az indukálható DNS-polimerázok hiánya?



## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Genommódosítási módszerek

A különböző genommódosításokat (géndelécio, illetve allélmódosítás) a laborunkban korábban kifejlesztett eljárás alapján végeztük [97]. A módszer alapvetően három lépésből tevődik össze: (1) egy adott genomi lókuszt specifikus szekvenciát tartalmazó mesterséges DNS *in vitro* szintézise és plazmidba építése, (2) a plazmid beépítése a genom kiválasztott lókuszába a DNS konstrukció és a genom homológ rekombinációja révén, (3) végül a beépített szakasszal részben átfedő genomdarab kivágása szintén a rekombináció felhasználásával. Mindez egy „hegmentes”, idegen szekvencia visszamaradása nélküli genommódosítást eredményez.

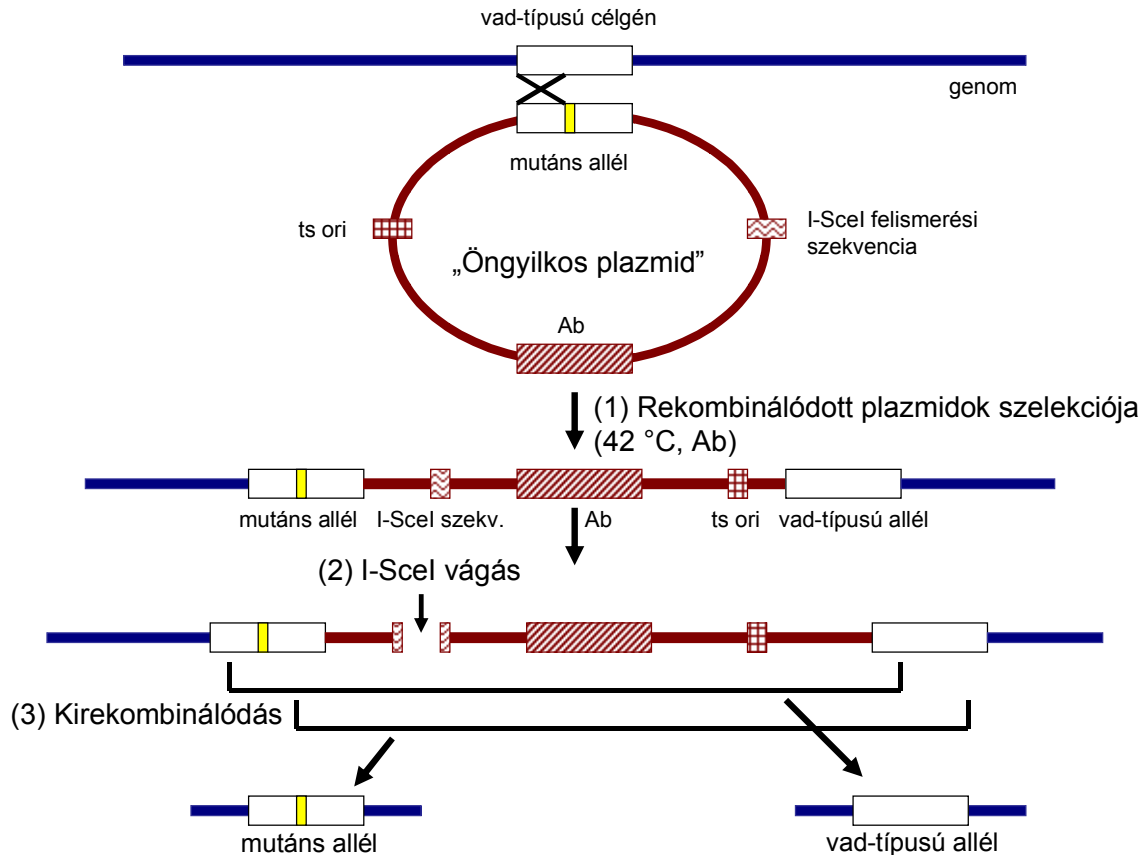
A rekombinációs lépéseknél a sejt saját genomján kódolt RecA fehérje játssza a döntő szerepet. Szintén alapvető vonása a módszernek, hogy a mesterséges DNS konstrukciót egy ún. „öngyilkos” plazmidon készítjük el. A RecA-függő, „öngyilkos” plazmidon alapuló genommanipulációs eljárás főbb lépései a **3. ábrán** láthatók. Először *in vitro* rekombináns DNS technikákkal egy ~500-1000 bp hosszú mutáns allélt szintetizálunk, amelyet egy plazmid vektorba klónozzunk [98-100]. Az „öngyilkos” plazmidokra jellemző, hogy replikációs rendszerük a körülmények változtatásával (pl. a hőmérséklet emelésével) leállítható, így a nem replikálódó plazmid az osztódó sejtekből gyorsan eliminálódik. A leggyakrabban használt ilyen plazmidok a pSC101 replikon egy hőérzékeny mutánsát használják [101-103]. Ezek a plazmidok 30 °C-on képesek replikálódni, de 37-42 °C-on már nem. A hőmérséklet növelésével a plazmidok által kódolt antibiotikum-rezisztenciára szelektálva kiszűrhetjük azokat a sejteket, melyekben a plazmid – a benne klónozott homológ szakasz segítségével – a kromoszómába rekombinálódott. Ezt a rekombinációs lépést a sejt saját genomján kódolt RecA enzime irányítja.

Az antibiotikum-rezisztens, szelektált sejtekben a genomba épült plazmid DNS-darabot mindkét oldalról azonos szekvencia határolja (az egyik a plazmid eredetű mutáns homológ szakasz, a másik a kromoszomális eredetű vad típusú homológ szakasz). A duplikált szakasz révén történő spontán homológ rekombináció a plazmid kivágódását eredményezi. Ez kétféle módon történhet: vagy visszaáll az eredeti vad típusú szakasz,

vagy a plazmidról származó mutáns szakasz marad meg a sejtben. Szekvensspecifikus PCR segítségével megkülönböztethető a kétféle termék, így kiválogathatók a módosított genomú sejtek. A plazmid kivágódását eredményező spontán homológ rekombináció ritka eseménynek számít, ezért szükség van egy rekombinációt serkentő tényezőre, amely eliminálja a rendszerünkben azon sejteket, amelyekben megmaradt a plazmid.

Ez a serkentő tényező az ún. I-SceI meganukleáz enzim. Az I-SceI enzim egy szekvensspecifikus endonukleáz, amely a *Saccharomyces cerevisiae* egy mitokondriális intronán van kódolva, és amelynek segítségével az intron mobilizálható [104]. Az endonukleáz a specifikus felismerési helyén egy ún. dupla szálú hasítást (DSB) hoz létre. Mivel a felismerőszekvensz hossza (18 bp), az enzim specificitása igen nagy, így a genommanipulációs eljárásokban jól alkalmazható eszköz [105].

A módszer sajátossága, hogy az „öngyilkos” plazmidok tartalmazzák az I-SceI 18 bp hosszúságú felismerési szekvenszét. Az „öngyilkos” plazmid genomba való integrálódását követően egy második plazmidot juttatunk a rendszerbe, amely az I-SceI meganukleáz génjét tartalmazza. A gén expressziója indukálható egy derepresszálló anyaggal, amely a gén promóterének represszorán fejt ki hatását (pl. a pSTKST plazmid esetében a Tet represszor inaktiválása klór-tetraciklin (cTc) hozzáadásával). A termelt enzim felismeri az integrálódott plazmidon lévő szubsztráthelyet, ahol dupla szálú genomtörést idéz elő. A felismerőszekvensz – nagy mérete miatt – az *E. coli* genomon egyszer sem fordul elő, így kizárólag az integrált szakaszon történik a DSB. A DSB szabad DNS végeket eredményez, ez stimulálja a törés rekombináción keresztül történő kijavítását. A rekombináció nagy valószínűséggel a vad típusú és a mutáns homológ szakaszok között történik, így a plazmid szakasz kivágódik, és vagy az eredeti, vagy a mutáns allél marad meg a genomon. Amellett, hogy az I-SceI vágás szabad DNS végeket teremtve növeli a rekombináció gyakoriságát, DSB létrehozásával szelektál a plazmid szekvenszok elvesztésére is.



**3. ábra.** A RecA-függő, „öngyilkos” plazmidon alapuló, I-SceI meganukleázt felhasználó módszer általános vázлата. A plazmidon hőérzékeny replikációs origó (ts ori), antibiotikum rezisztencia gén (Ab) és I-SceI vágóhely található. A genomba rekombinálódott plazmidokat hordozó sejteket nem-permisszív hőmérsékleten, antibiotikum alkalmazásával szelektáljuk. A segédszekvenciák kirekombinálódását az I-SceI enzim alkalmazása segíti elő.

## 4. 2. Felhasznált törzsek, plazmidok, táptalajok és oligonukleotid primerek

A kísérletekhez használt törzsek többsége a csoportunkban korábban létrehozott *E. coli* MDS42 vonal [38] módosításával jött létre (MDS = multiple-deletion series). Az MDS42 a vad típusú K-12 MG1655 törzs csökkentett genom méretű változata [8], melyben

összesen 42 különböző deléció található. Az MDS42 alapú törzseken kívül a munka során két, a molekuláris biológiai eljárásokban gyakran használt törzset használtunk összehasonlításként, a jól transzformálható DH10B [106] és a fehérjetúltermeléshez leggyakrabban használt BL21(DE3) [107] törzset.

Az MDS42-T7, valamint az MDS42pdu-T7 olyan T7 polimerázt expresszáló törzsek, melyek tartalmazzak egy izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranoziddal (IPTG) indukálható, *lac* operátor/T7 polimeráz kazettát az eredeti törzs *yahA-yaiL* genomi régiójában.

Az egyenkénti „hegmeses”, vagyis bevitt, exogén DNS-szekvenciát nem tartalmazó deléciókat (*polB*, *dinB*, *umuDC*, *mcrBC*), illetve allélmódosítást (*lexA*) az előző részben tárgyalt „öngyilkos” plazmid alapú módszerrel végeztük el. A módszerhez két plazmid használata szükséges, a hőérzékeny replikációs origót tartalmazó pST76-A, és az I-SceI meganukleáz enzimet indukálhatóan termelő pSTKST [108]. A *recA* gén deléciója egy hasonló módszerrel készült, annyi különbséggel, hogy a hőérzékeny pST76-A plazmid helyett egy *sacB* kontraszelektálható gént [109] tartalmazó plazmidot, a pSG2857-t (Scarab Genomics, Madison, Wisconsin, USA) használtuk. Az egyéni deléciók kombinálásához P1 fág-transzdukciós eljárást használtunk [110], mely során a jelölt, integrált öngyilkos plazmidot tartalmazó köztes állapotú sejtből transzdukáltuk az egyes genomszakaszokat a célsejtbe, majd az I-SceI endonukleáz segítségével értük el a plazmid kirekombinálódását. Az egyes deléciók genomi koordinátái az **1. táblázatban** találhatóak. Az összes deléciót, illetve allélmódosítást ellenőriztük PCR segítségével, majd a kérdéses DNS szakasz szekvenciájának meghatározásával.

A fehérje túltermelési kísérletekhez különböző plazmidkonstrukciókat használtunk. A pSG-ORF238 egy pSG1144 plazmidon alapuló (Scarab Genomics, Madison, Wisconsin, USA), IPTG-vel indukálható plazmid, mely képes túltermelni a kis méretű, ORF238 elnevezésű hidrofób toxikus fehérjét [40]. A pET-GFP egy IPTG-vel indukálható, pET-alapú plazmid, mely tartalmazza a zöld fluoreszcens fehérje (*gfp*) génjét [111, 112]. A pSin32 plazmid egy pET3-His plazmidon [113] alapuló konstrukció, mely tartalmaz egy indukálható, N-terminálisán His jelölőszekvenciát hordozó DNS-metiltranszferáz gént (*sinIM*) [114]. A munkához felhasznált valamennyi plazmidot

kizárólag IS-mentes (MDS42) gazdatörzsből, hagyományos alkáli-lízis módszerével tisztítottuk [115].

<b>Törzs</b>	<b>Deléció koordináták</b>
MDS42 <i>recA</i>	2820783-2821861
MDS42 <i>polB</i>	63505-65764
MDS42 <i>dinB</i>	250904-251966
MDS42 <i>umuDC</i>	1230261-1231298
BL21(DE3) <i>mcrBC</i>	4408095-4515388

**1. táblázat.** A „hegmentes” deléciók genomi koordinátái. Az MDS42 alapú törzsek adatai a K-12 MG1655 vad típusú genomra vonatkozó koordináták.

A kísérletek során általános gazdag táptalajt, folyékony és szilárd Luria-Bertani (LB) mediumot használtunk [115]. Mutációs ráta méréseknél, a *cycA* fluktuációs próba alkalmazásakor MS minimál táptalajt használtunk [79]. A növekedési méréseket MOPS minimál médiumban végeztük (Scarab Genomics, Madison, Wisconsin, USA). A munka során felhasznált antibiotikumokat a következő végkoncentrációban alkalmaztuk: 100 µg/ml ampicillin (Ap), 25 µg/ml kanamycin (Kan), 25 µg/ml kloramfenikol (Cm), 100 µg/ml rifampicin (Rp) és 4 µg/ml D-cikloszerin (Cyc). A D-cikloszerin törzsoldata (4 mg/ml) mindig frissen, használat előtt készült.

A munka során használt oligonukleotidok szekvenciája és rövid leírása a **2. táblázatban** található.

Oligonukleotid neve	Szekvencia (5'-3')	Felhasználás
polB-A	ccgaattcagtatccaggcgagt	<i>polB</i> deléciója
polB-BR	caggcaggtgtggcggaggggaataact	<i>polB</i> deléciója
polB-BF	tccgccacacctgctcgcgccacgct	<i>polB</i> deléciója
polB-C	ccggatccattggcggcattgt	<i>polB</i> deléciója
polB-D	tgtgaacaccagtttgct	<i>polB</i> deléciója
polB-E	aaccggtgaagtgggtga	<i>polB</i> deléciója
dinB-A	ccggtaccggcataccgatgcga	<i>dinB</i> deléciója
dinB-BR	cagaatatacattgctcacctctcaacact	<i>dinB</i> deléciója
dinB-BF	gaggtgagcaatgtatattctggtgtgca	<i>dinB</i> deléciója
dinB-C	ccggatccgccgtaacgcatcaa	<i>dinB</i> deléciója
dinB-D	gtgttcgactcgctcgat	<i>dinB</i> deléciója
dinB-E	gagtcgtcgtagagtgc	<i>dinB</i> deléciója
umuDC-A	ggaattcggatgagcgtcgtcgcca	<i>umuDC</i> deléciója
umuDC-BR	ttgagcgcacaacagcagcagtgacaa	<i>umuDC</i> deléciója
umuDC-BF	gctgctgttgttcgctcaatgaacctt	<i>umuDC</i> deléciója
umuDC-C	gctgcagatcgcttacctgattgtc	<i>umuDC</i> deléciója
umuDC-D	aatgctccatctgcgggt	<i>umuDC</i> deléciója
umuDC-E	gctctatccttcgccgtt	<i>umuDC</i> deléciója
lexA-A	gttatggtcgcattttggata	<i>lexA</i> pontmutáció előállítás
lexA-BR	gatatctttcatcgCcatcccgtgacgcgca	<i>lexA</i> pontmutáció előállítás
lexA-BF	ggatgGcgatgaaagatatcggca	<i>lexA</i> pontmutáció előállítás
lexA-C	ccggatcccagcaacggaacggt	<i>lexA</i> pontmutáció előállítás
lexA-D	cggtgctgattgccatta	<i>lexA</i> pontmutáció előállítás
lexA-E	gggctatcaagatgacca	<i>lexA</i> pontmutáció előállítás
recA-D	cggctagcgcgggatgttgattc	<i>recA</i> deléciója
recA-E	gtgctgattatgccgtgt	<i>recA</i> deléciója
BMD30-A	ccgaattcagtcgcacgcaactt	<i>mcrBC</i> deléciója
BMD30-BR	ctgccttaattacatacttttggtgc	<i>mcrBC</i> deléciója
BMD-30BF	tatgtaattaaggcagattattaaa	<i>mcrBC</i> deléciója
BMD30-C	ccggatccacatggcgcggttaca	<i>mcrBC</i> deléciója
BMD30-D	tgataccgccgcacaaca	<i>mcrBC</i> deléciója
BMD30-E	actggtgtgtctcgaag	<i>mcrBC</i> deléciója
cycA-D	ctgatgccggttaggttct	<i>cycA</i> mutáció analízise
cycA-E	gcgcatccagcatgata	<i>cycA</i> mutáció analízise
AK54-D	atgataatgaatgacatca	<i>sinI</i> szekvenálása
AK55-E	ctcagttagaccaactctccaaa	<i>sinI</i> szekvenálása
Sce2	attaccctgttatcceta	pST76-specifikus primer
T7	taatacgaactcactataggg	pST76-specifikus primer

**2. táblázat.** A munka során felhasznált oligonukleotidok szekvenciái. Az A, C, BF és BR jelölésű primereket olyan homológ genomszakaszok szintetizálására használtuk, melyek lehetővé teszik az öngyilkos plazmidok genomba való beépülését [108]. A D és E jelölésű primerek közvetlen a homológ régiók mellé hibridizálnak, így a segítségükkel - PCR technika alkalmazásával ill. szekvenálással - ellenőrizni tudtuk a deléciókat és allélcicserélődéseket. A *lexA* primerekben található nagybetűk a génbe beépített pontmutációt jelölik.

### **4. 3. Kompetens sejt készítés és transzformáció**

Elektroporáláshoz a kompetens sejteket standard protokoll alapján készítettünk [115]. 100 ml, megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB-tápoldatba 1 ml starter kultúrát oltottunk, majd a tenyészetet  $OD_{590}=0,6-0,7$  értékig növesztettük, ezt követően 20 percig állni hagytuk jégen. A sejtszuszpenziót háromszor centrifugáltuk le (3 x 10 perc, 4000 rpm), eltávolítottuk a felülúszót és hideg, kétszeresen desztillált vízben szuszpendálva a sejteket. Ezek után 4 ml 20%-os glicerinben szuszpendáltuk a sejteket, majd újból centrifugáltunk (10 perc, 5000 rpm). Végül a felülúszót leöntve, 0,2 ml 20%-os glicerinben szuszpendáltuk a sejteket, majd 40  $\mu$ l-enként Eppendorf csövekbe osztottuk szét a szuszpenziót. Az így elkészített sejtek azonnal használhatók elektroporálásra, vagy  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolhatók.

A plazmid DNS hozzáadása után a sejtek elektrosokkolása az Electroporator II (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornia, USA) műszer segítségével, 1,8 kV maximális feszültség és 150  $\Omega$  maximális ellenállás alkalmazása mellett történt. A sejteket ezek után 1 ml LB tápoldatban szuszpendáltuk, majd egy órán keresztül folyadékrázóban inkubáltuk a megfelelő hőmérsékleten. Végezetül az adott kultúra egy részét megfelelő antibiotikumot tartalmazó agar lemezre szélesztettük.

#### 4. 4. Sejtkultúrák növekedésének mérése

Az egyes törzsek növekedési sebességét folyékony tápoldatban, 100 lyukú Honeycomb 2 mikrotiter lemezekben (Oy Growth Curves Ab, Helsinki, Finnország) vizsgáltuk. A törzsek növekedési görbéit az egyes minták 540 nm-en mért optikai denzitásának követésével határoztuk meg a Bioscreen C Automated Microbiology Growth Analysis System (Oy Growth Curves Ab, Helsinki, Finnország) automatizált műszer segítségével. A vizsgált törzsekből 14 kolóniát szuszpendáltunk 200  $\mu$ l tápfolyadékban, majd a párhuzamos mintákat 37 °C-on telítésig növesztettük. A felnőtt kultúrákból 2  $\mu$ l-t oltottunk át 198  $\mu$ l friss tápfolyadékba, majd újból telítettséig növesztettük 37 °C-on, folyamatos rázatás mellett. Az egyes törzsek 14 párhuzamos mintáiból számolt átlag O.D.<sub>540</sub> értékét ábrázoltuk az adott időpontokban (5 percenként történt O.D.<sub>540</sub> érték meghatározás a növesztés során). A növekedési görbékből számolt duplázódási időket egy korábban leírt algoritmus alapján határoztuk meg [116].

Az MDS42-T7 és MDS42pdu-T7 törzsek esetén SinI metiltranszferáz fehérje túltermelése mellett is vizsgáltuk a növekedési tulajdonságokat. A mérések során törzsenként 50, pSin32 plazmidot hordozó kolóniát szuszpendáltunk 200-200  $\mu$ l 50  $\mu$ g/ml ampicillint tartalmazó LB tápoldatban, majd 37 °C-on telítésig növesztettük őket. A telített mintákból 2  $\mu$ l-t átoltottunk 198  $\mu$ l friss, ampicillint tartalmazó LB tápfolyadékba, majd O.D.<sub>540</sub> = 0,2 értékig növesztettünk. Ekkor 1 mM végkoncentrációjú IPTG-vel indukáltuk a mintákat, majd folytattuk a növesztést folyamatos rázatás mellett. A SinI fehérje toxikus hatása okozta növekedési gátlás mértékét úgy határoztuk meg, hogy megállapítottuk, a kultúrák mikor érik el az O.D.<sub>540</sub> = 0,7 küszöbértéket. A növekedés gátlás hosszát az 50 független minta átlagában adtuk meg.

Az egyes törzsek hosszú távú túlélésének vizsgálatánál 5 ml-es LB tápoldatba 5  $\mu$ l friss starter kultúrákat oltottunk le. Az élő sejtszámot a 37 °C-on nöövő kultúrák hígításaiból határoztuk meg.

#### 4. 5. Mutációs ráta mérések

A különböző törzsek mutációs rátáját D-cikloszerin rezisztens [117, 118] sejtek megjelenésének gyakorisága alapján, fluktuációs analízis segítségével határoztuk meg



[71]. A mérések során törzsenként 20 különböző, 0,2 % glükózzal kiegészített, 1-1 ml MS minimál tápfolyadékot tartalmazó csőbe hozzávetőlegesen  $10^4$  sejtet oltottunk át frissen felnőtt starter kultúrából. A kultúrákat korai stacioner fázisig növesztettük fel, majd minden csőből 50  $\mu$ l sejt kultúrát szélesztettünk 0,04 mM D-cikloszerint tartalmazó MS táplemezre. A lemezeken felnövő telepszámból a mutáció per cső számot (m) Ma-Sandri-Sarkar maximum-likelihood (MSS-MLL) eljárással [119] határoztuk meg. Az 50 $\mu$ l-re vonatkozó m számból a teljes 1 ml-es kultúrára vonatkozatható m számot Stewart munkája alapján számoltuk ki [120]. Kizárólag azokat a kísérleteket vettük figyelembe, ahol az összehasonlítani kívánt kultúrák teljes sejtszámainak eltérése elhanyagolható volt ( $<3\%$ ,  $p \geq 0.6$  nem párosított, kétmintás t-tesztel). A csőenkénti teljes sejtszámot a törzsenként 20 kultúrából véletlenszerűen kiválasztott 3 kultúra hígításainak nem szelektív agar lemezre való szélesztésével határoztuk meg. A mutációs rátát (mutáció/gén/generáció) a mutáció per cső (m) és az átlag teljes sejtszám per cső hányadosából számoltuk. Abban az esetben, mikor a mitomycin-C antibiotikum mutációs rátára gyakorolt hatását vizsgáltuk, a kultúrák növesztése során 0,1  $\mu$ g/ml mitomycin-C-vel egészítettük ki a tápfolyadékot tartalmazó csöveket. Amikor a fehérje túltermelés mutációs rátára gyakorolt hatását vizsgáltuk, az adott túltermelő plazmidot tartalmazó sejteket  $O.D._{540} = 0,2$  értéknél 1 mM IPTG-vel indukáltuk. Ezekben az esetekben az MS tápfolyadék tartalmazta az adott plazmidra specifikus szelektációs antibiotikumot is. Minden *cycA* alapú mutációs ráta mérést minimum háromszor végeztünk el.

A *cycA* mutációs mérések megerősítése érdekében rifampicin rezisztencián alapuló mutációs ráta méréseket is végeztünk. A mérések során a rifampicin antibiotikummal szembeni rezisztenciát kialakító *rpoB* sejteket [121] szelektáltuk és számoltuk. A mérések során törzsenként 20, 1 ml LB tápfolyadékot tartalmazó csőbe hozzávetőlegesen  $10^4$  sejtet oltottunk át frissen felnőtt starter kultúrából. A sejt kultúrákat korai stacioner fázisig növesztettük, majd megfelelő hígításokat szélesztettünk nem-szelektív LB agar lemezre, illetve 100  $\mu$ g/ml rifampicint tartalmazó LB agar lemezre. A kolóniákat 24, illetve a rifampicint tartalmazó lemezek esetében 48 óra 37 °C-os inkubálás után számoltuk. A számolt kolóniák alapján következtettünk a mutációs frekvenciára: az értéket a teljes élő sejtszámhoz viszonyított rifampicin rezisztens sejtek számából kaptuk meg.

#### 4. 6. Mutációk típusainak meghatározása

A D-cikloszerin rezisztenciáért felelős *cycA* gén mutációs spektrumának meghatározását PCR technika segítségével végeztük [71]. A teljes *cycA* gént tartalmazó 1877 bázispáros genomi szakaszt amplifikáltuk cikloszerin-rezisztens sejtekből a *cycA*-D/*cycA*-E primer pár segítségével. Reprezentatív mintaként 4-5 kolóniát elemeztünk minden párhuzamos lemezről, így kísérletenként 96 mintát vizsgáltunk. Az amplifikált DNS-szakaszokat agaróz gél-elektroforézissel elválasztottuk, méretét a vad típusú fragmentével vetettük össze. A vad típusúval azonos méretű fragment egy vagy néhány nukleotid változását jelzi, a csökkent méret vagy a fragment hiánya deléciót mutat, a megnövekedett méret pedig IS elem beépülésére utal.

#### 4. 7. A *sinIM* gén mutációinak detektálása

A pSin32 plazmid hordozza a *Salmonella enterica* serovar Infantis-ból származó, SinI metiltranszferázt kódoló *sinIM* gént, mely a pET3-His plazmid XhoI restrikciós helyére van klónozva [113, 114]. A plazmidot MDS42-T7, MDS42pdu-T7 és BL21(DE3)*mcrBC* törzsekbe elektroporáltuk. Egy óra, 37 °C-on történő, 1 ml LB tápfolyadékban végzett inkubálást követően 100 µl-t átoltottunk ampicillinnel kiegészített 100 ml LB tápfolyadékba, majd tovább inkubáltuk 37 °C-on a sejteket. A maradék 900 µl-ből standard eljárás szerint plazmid DNS-t izoláltunk [115]. Hét óra inkubálást követően a kultúrák hozzávetőlegesen O.D.<sub>540</sub>=0,2 értéket értek el, ekkor a kultúrákat 1mM végkoncentrációjú IPTG-vel indukáltuk. Ebben az időpontban a kultúrákból 1 ml-es mintákat vettünk, ezekből ismét plazmid DNS-t izoláltunk (8-órás minták). A mintavételt és plazmidtisztítást ezt követően 2 óránként, 18 óráig megismételtük. Végül a transzformációt követő 24. és 36. órákban is készítettünk plazmid mintákat, így törzsenként 9 plazmid mintát kaptunk. A tisztított pSin32 plazmid mintákat ezek után MDS42 (McrBC<sup>-</sup>) és MG1655 (McrBC<sup>+</sup>) törzsekbe transzformáltuk, majd ampicillint tartalmazó agar lemezekre szélesztettük. A transzformált MG1655 és MDS42 telepek aránya megadja a mutált plazmidok arányát. (Az arány megállapításánál figyelembe

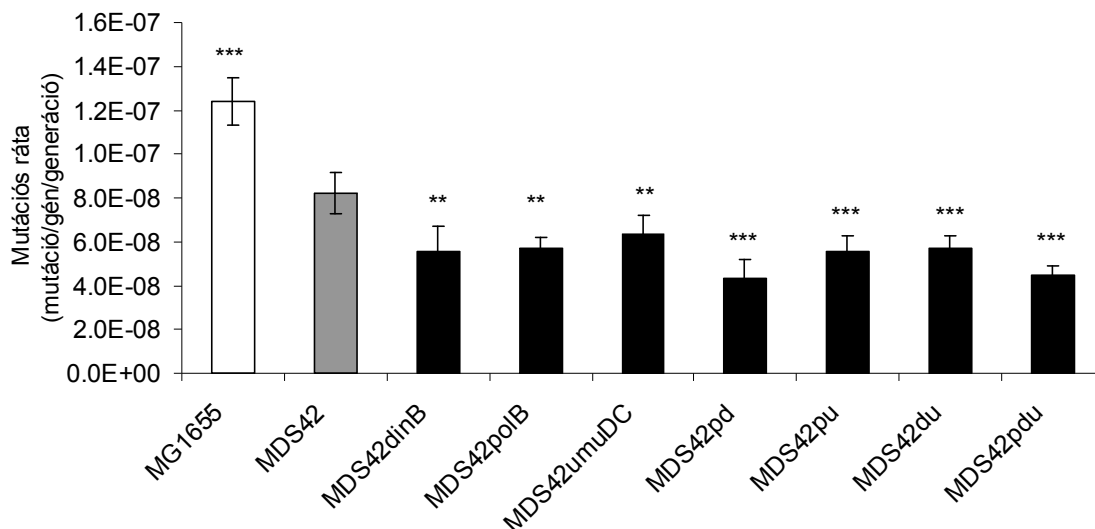
vettük a két törzs esetleges – a pST76-A kontroll plazmid segítségével megállapított –  
transzformálhatósági különbségét.)

## 5. Eredmények

### 5.1. Az indukálható DNS-polimerázok kiejtése csökkenti a spontán mutációs rátát

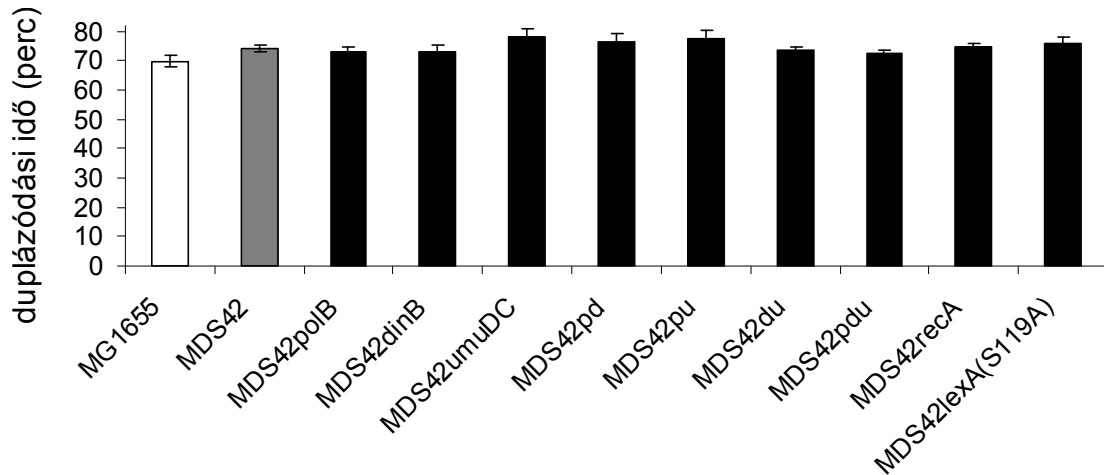
Az MDS42 törzsből a három, nagy hibaszázalékú DNS-polimeráz génjének (*polB*, *dinB*, *umuDC*) delécióját egyenként elvégeztük, majd minden lehetséges kombinációban egyesítettük is őket. Összehasonlítás céljából előállítottunk az SOS-útvonal beindítására képtelen LexA és RecA mutánsokat is. A törzsek spontán mutációs rátáját a teljes mutációs spektrum kimutatására alkalmas, D-cikloszerin-rezisztencián alapuló módszerrel mértük meg [71].

Korábbi megállapításunk szerint a vad típusú MG1655 és az MDS42 mutációs rátája közötti különbségért az IS elemek hiánya felelős [38]. A polimeráz gének egyenkénti deléciója a spontán mutációs ráta további, legalább 20 %-os csökkenéséhez vezetett (**4. ábra**). A különböző deléciókat kombinálva a mutációs ráta még tovább csökkent, a legalacsonyabb értékeket az MDS42*polBdinB* (MDS42pd) és a tripla deléziós MDS42*polBdinBumuDC* (MDS42pdu) törzseknél kaptuk. A szülői MDS42-hez képest ezek a törzsek közel 50 %-os spontán mutációs ráta csökkenést mutattak (a  $8,2 \cdot 10^{-8}$  mutáció/gén/generáció ráta  $4,34 \cdot 10^{-8}$ , illetve  $4,45 \cdot 10^{-8}$  értékre csökkent).



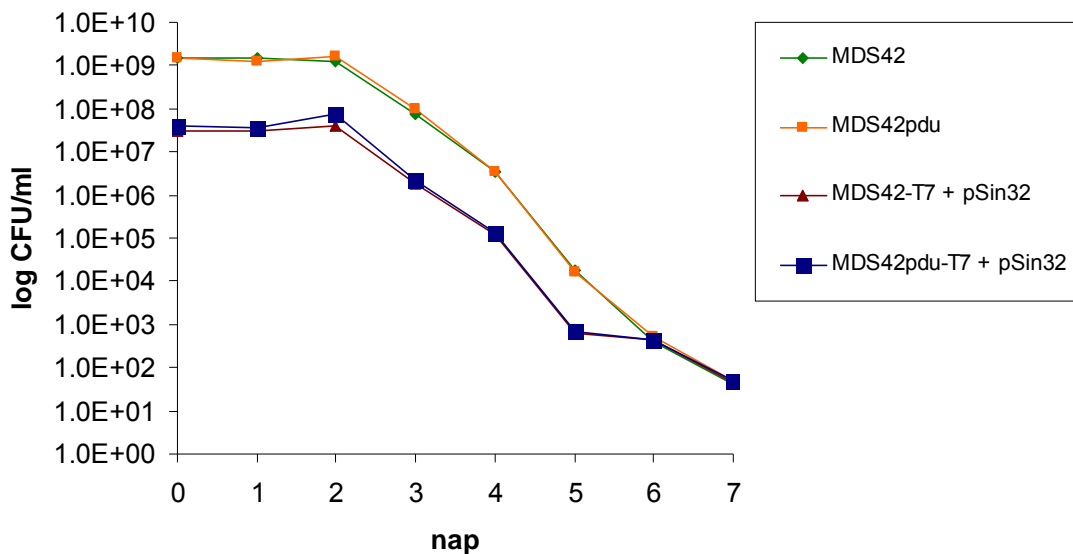
**4. ábra.** Indukálható DNS-polimerázoktól mentes, illetve a szülői törzsek spontán mutációs rátája. Az értékeket a D-cikloszerin rezisztencián alapuló módszerrel mértük [71]. Az egy deléciót tartalmazó törzseknél fel van tüntetve az adott gén neve, az MDS42pd az *MDS42polBdinB*, az MDS42pu az *MDS42polBumuDC*, az MDS42du az *MDS42dinBumuDC*, és végül az MDS42pdu az *MDS42polBdinBumuDC* törzset jelöli. A hibavonalak négy független mérés átlagának 95 %-os konfidencia-intervallumát jelölik. Varianciaanalízissel  $p < 0,005$  szintű szignifikanciát határoztunk meg. Minden törzssel páros t-próbát végeztünk az MDS42 törzssel összehasonlítva, \*\*  $p < 0,01$ , míg \*\*\*  $p < 0,001$  szignifikanciaszintet jelöl.

Ahhoz, hogy megbizonyosodjunk, hogy a nagy hibaszázalékú DNS-polimerázoknak a hiánya nem okoz növekedésbeli hátrányt, megmértük a különböző polimerázmentes törzsek növekedési rátáját MOPS minimál tápfolyadékban. Minden egyes törzsből 14 független telepől növesztettünk párhuzamos folyadék kultúrát (**5. ábra**). Egyik DNS-polimerázhiányos sejt sem mutatott szignifikáns növekedési defektust. A további vizsgálatokhoz a tripla deléciós MDS42pdu törzset használtuk.



**5. ábra.** Polimerázdeléciós és kontroll törzsek duplázódási ideje. A méréseket 37 °C-on, MOPS minimál tápfolyadékban végeztük. A hibavonalak 14 független mérés átlagának 95 %-os konfidencia-intervallumát jelölik. Varianciaanalízissel  $p < 0,005$  szintű szignifikanciát határoztunk meg. Minden törzssel páros t-próbát végeztünk az MDS42 törzssel összehasonlítva, a különbség egyik esetben sem volt szignifikáns.

Hogy a törzsek általános életképességéről teljesebb képet kapjunk, megvizsgáltuk az MDS42 és MDS42pdu törzsek túlélési képességeit tartós stacioner fázisban (**6. ábra**). Hét nap alatt nem találtunk szignifikáns különbséget a két törzs túlélési rátája között. A stacioner fázisban való túlélés akkor sem különbözött a törzsek között, ha a sejteket egy mérsékelten toxikus hatású fehérje stresszhatásának tettük ki (**6. ábra**). (A SinI metiltranszferáz expresszióról és a pSin32 plazmidról lásd később részletesen.)



**6. ábra.** Különböző törzsek túlélése tartós stacioner fázisban. A törzseket folyadékkultúrákban növesztettük, és naponta meghatároztuk az élősejtszámot. Az első leoltást követően a pSin32 plazmidot hordozó törzseket  $O.D._{540} = 0,2$  értéknél 1 mM IPTG-vel indukáltuk (CFU: colony forming units).

## 5. 2. Az SOS-válasz szabályozó fehérjéinek inaktiválása nem csökkenti a spontán mutációs rátát

A spontán mutációs ráta csökkentésének alternatív módja lehet az SOS-válasz kikapcsolása a szabályozó fehérjék inaktiválása révén. Előállítottunk két mutánst, az MDS42*recA* és MDS42*lexA*(S119A) törzseket. A RecA fehérje a különféle stresszhatásra kialakuló egyes szálú DNS molekulákhoz kapcsolódva, koproteáz aktivitása révén elősegíti a LexA represszor autoproteolízisét [123-125], beindítva az SOS-választ. A LexA represszor S119A mutációja megakadályozza a fehérje autoproteolízisét, így az SOS-válasz nem indukálható, a LexA-represszált SOS génekről az átíródás folyamatosan gátolva lesz [95]. A két SOS-gátolt törzs növekedési rátája nem különbözik lényegesen az MDS42 kiindulási törzsétől (**5. ábra**). A két SOS-gátolt törzs mutációs rátáját

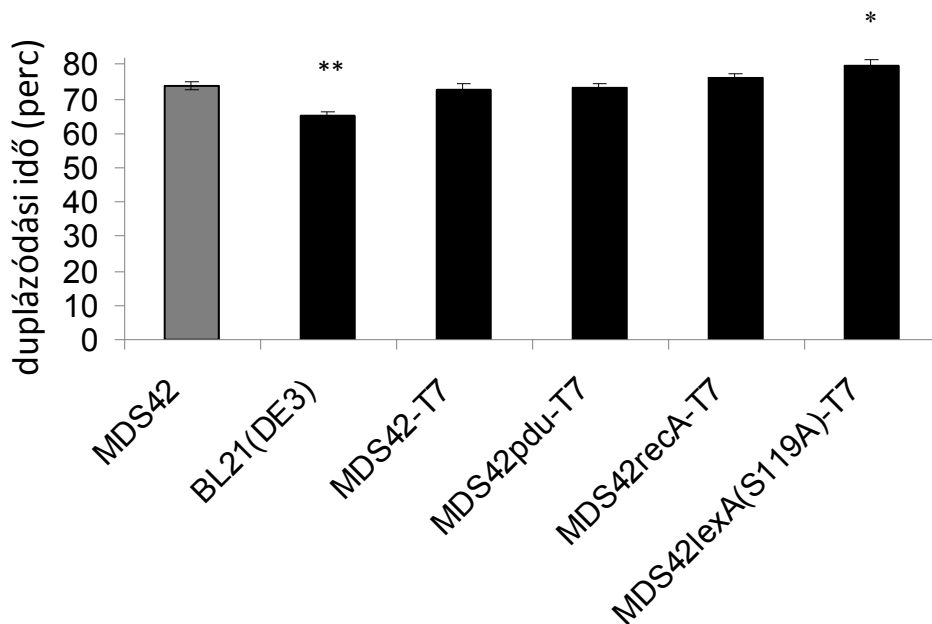
megmértük a D-cikloszerin rezisztencián alapuló fluktuációs analízissel: egyik törzs sem mutatott szignifikáns csökkenést az MDS42 törzshöz képest (**8. ábra** sárga oszlopok).

### **5. 3. Az MDS42pdu törzs stresszkörülmények között is jelentős genetikai stabilitást mutat**

A nagy hibaszázalékú DNS-polimerázok transzkripciója stresszhatásra indukálódik, így feltételezhető volt, hogy stresszkörülmények között a szülői és a polimerázmentes törzsek mutációs rátájának különbsége fokozódik. A törzsek mutációs rátáit különféle stresszhatások mellett vizsgáltuk: antibiotikum (mitomycin-C), nem toxikus GFP túltermelése [111, 112], toxikus fehérje (ORF238) túltermelése [40].

A mitomycin-C DNS-keresztkötések, kettős szálú töréseket létrehozó ágens [126]. A genom sérülése direkt módon aktiválja a sejt SOS-válaszát, ez a nagy hibaszázalékú DNS-polimeráz gének fokozott átíródásához vezet. A mitomycin-C szubinhíbiós koncentrációját (0,1 µg/ml) alkalmazva vizsgáltuk a különböző törzsek mutációs rátáját. A fehérjetúltermelés, mint stresszhatás [127, 128] következményeinek vizsgálatához a nem toxikus GFP génjét, illetve a kisméretű, leucingazdag, hidrofób ORF238 toxikus fehérje génjét egy T7 promótert tartalmazó, indukálható plazmidba klónoztuk. Az indukálható expresszióhoz a vizsgált törzseknek egy, a T7 RNS-polimerázt kódoló változatát is előállítottuk. A T7 RNS-polimeráz génjének jelenléte nem okozott szignifikáns fitneszbeli különbséget az MDS42 törzshöz képest (**7. ábra**).





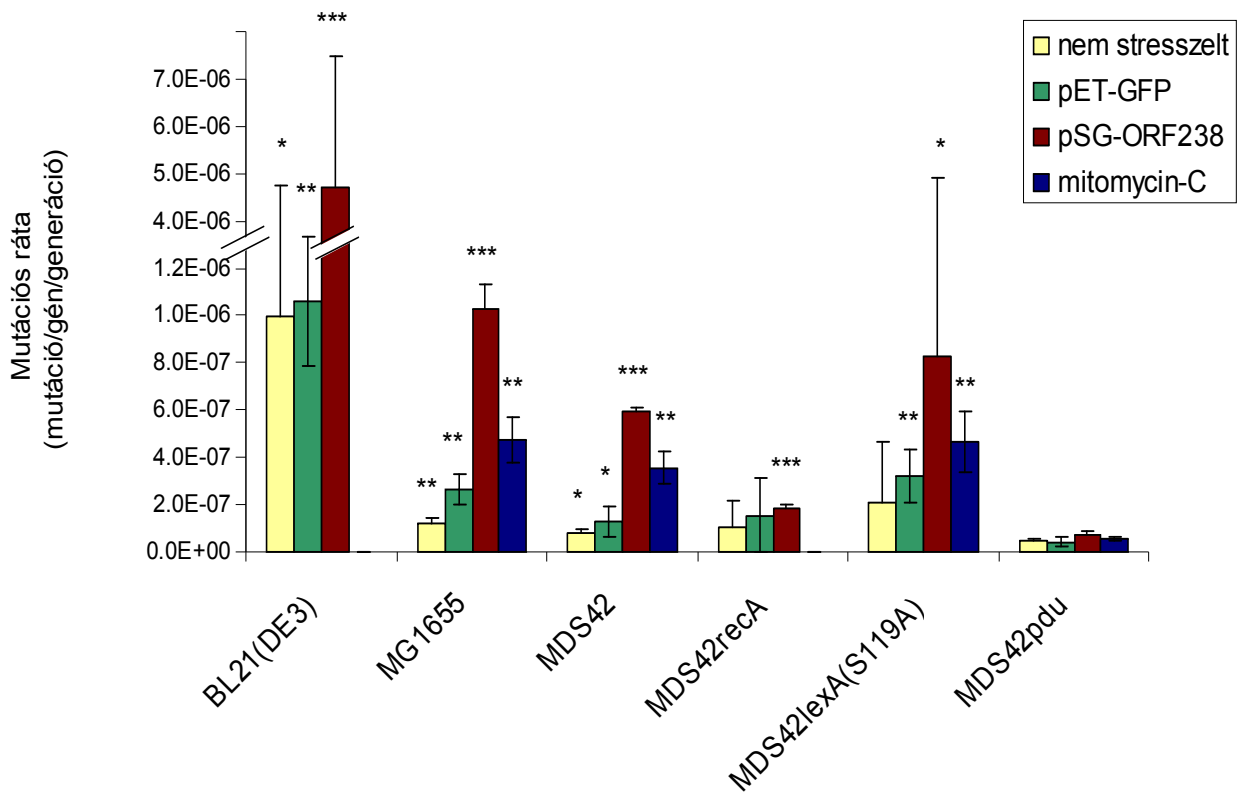
**7. ábra.** A fehérje túltermelő törzsek duplázódási ideje. A méréseket mikrotiter lemezekben, MOPS minimál tápfolyadékban, 37 °C-on végeztük. A hibavonalak 14 független mérés átlagának 95 %-os konfidencia-intervallumát jelölik. Varianciaanalízissel  $p < 0,001$  szintű szignifikanciát határoztunk meg. Minden törzssel páros t-próbát végeztünk az MDS42 törzssel összehasonlítva; \*  $p < 0,05$ , míg \*\*  $p < 0,01$  szignifikancia szintet jelöl.

A mutációs ráta méréseket az MDS42pdu és a szülői MDS42 törzseken kívül a fehérje túltermeléshez leggyakrabban használt BL21(DE3), a vad típusú MG1655 és a két különböző SOS-inaktivált MDS42 variáns, az MDS42*recA* és MDS42*lexA*(S119A) törzseken végeztünk (**8. ábra**).

A kísérlet szerint a különböző stresszhatások általában növelték a törzsek mutációs rátáját (kivétel az MDS42*recA* és MDS42pdu). A toxikus ORF238 fehérje túltermelésének volt a leglátványosabb a hatása: egyes törzseknél több mint ötszörösére növekedett a mutációs ráta. A mitomycin-C szubinhibíciós koncentrációban való alkalmazása 2-3-szoros mutációs ráta növekedéshez vezetett (a BL21(DE3) és a MDS42*recA* törzsek képtelenek voltak az adott körülmények között növekedni). A GFP túltermelés hatása mérsékeltebb volt, általában 1,5-2-szeres növekedést okozott.

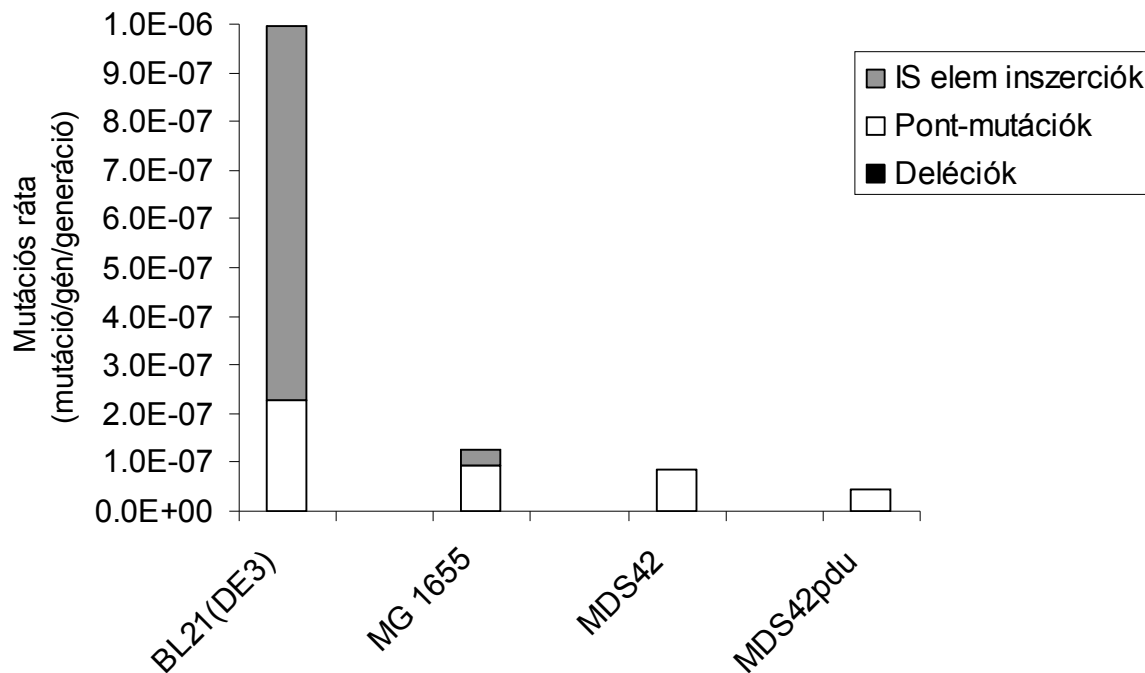
Az MDS42*recA* és az MDS42pdu mutációs rátája egyik stresszhatásra sem mutatott szignifikáns növekedést. Érdekes módon az MDS42*lexA*(S119A) nem követte

ezt a viselkedést, a törzs mindhárom stresszhatásra megnövekedett mutációs rátával válaszolt. A vizsgált törzsek közül genetikailag legstabilabb az MDS42pdu: a legalacsonyabb spontán mutációs rátát mutatta, és ez a különféle stresszhatásokra sem nőtt meg szignifikánsan.



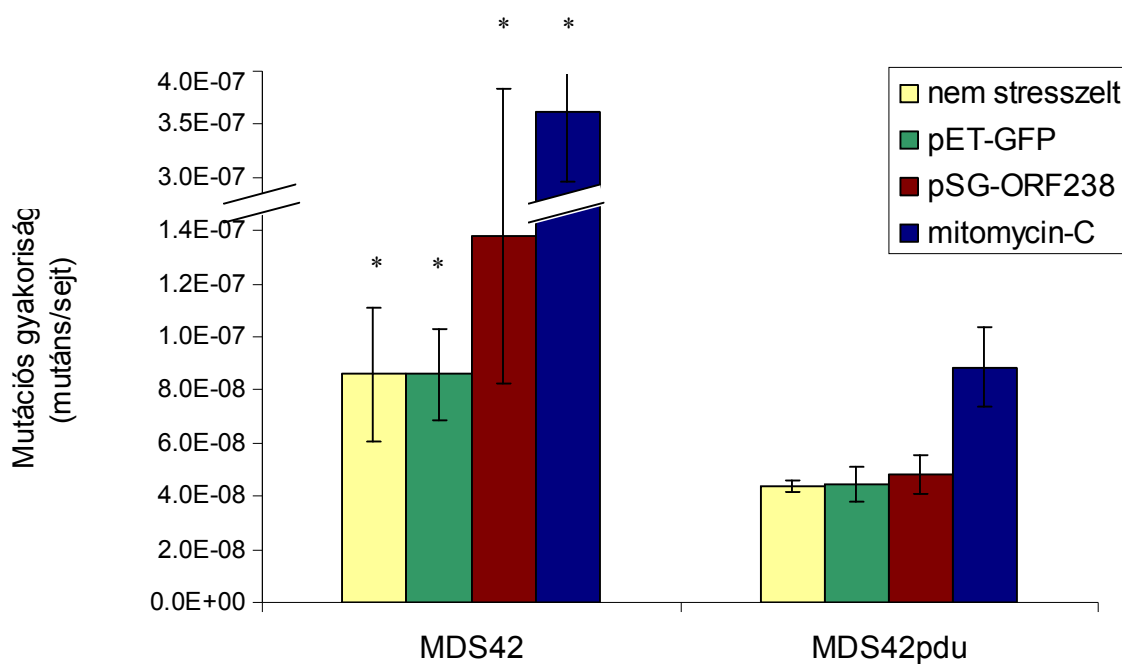
**8. ábra.** Különböző törzsek mutációs rátája normál, illetve stresszkörülmények között. Háromféle stresszhatást alkalmaztunk: GFP túltermelése a pET-GFP plazmidról, a toxikus ORF238 peptid túltermelése a pSG-ORF238 plazmidról, valamint a mitomycin-C antibiotikum szubinhíciós koncentrációjával történő kezelés. A méréseket a cikloszerin-D rezisztencián alapuló fluktuációs teszttel végeztük, a hibavonalak három független mérés átlagának 95 %-os konfidencia-intervallumát jelölik. A BL21(DE3) és MDS42recA törzsek 0,1 µg/ml mitomycin-C jelenlétében nem nőttek fel. Varianciaanalízissel  $p < 0,0001$  szintű szignifikanciát határoztunk meg. Minden törzsszel páros t-próbát végeztünk a megfelelő MDS42pdu törzsszel összehasonlítva, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , míg \*\*\*  $p < 0,001$  szignifikancia szintet jelöl.

Szembetűnő, hogy a legelterjedtebben használt BL21(DE3) törzs mutációs rátája hozzávetőlegesen két nagyságrenddel magasabb, mint az MDS42pdu törzsé. A különbség okának vizsgálatához meghatároztuk a BL21(DE3), MG1655, MDS42 és MDS42pdu törzsek mutációs spektrumát cikloszerin-D rezisztens mutáns sejtek *cycA* génjének PCR analízisével (**9. ábra**). A vad típusú MG1655 törzsben a mutációk 74 %-a pontmutáció, 24 %-a IS elem inszerció, 2 %-a deléció. A BL21(DE3) törzsben a *cycA* mutációk 77 %-át IS elem inszerció okozta. Továbbá, annak ellenére, hogy a BL21(DE3) törzsben arányaiban sokkal kevesebb volt a pontmutáció, abszolút értékben a pontmutációs ráta több mint kétszerese ( $2,28 \cdot 10^{-7}$  mutáció/gén/generáció) az MG1655 törzsben mért értéknek ( $9,2 \cdot 10^{-8}$  mutáció/gén/generáció).



**9. ábra.** A vizsgált *E. coli* törzsek spontán mutációs spektruma. Az oszlopok a PCR analízissel vizsgált *cycA* mutánsok fajtánkénti (IS inszerció, pontmutáció, deléció) eloszlását mutatják. A deléciók aránya (mely túl alacsony, hogy látszódjon) MG1655-ben 1,6 %, MDS42-ben 2,4 % és MDS42pdu-ban 4,3 %. A BL21(DE3) vizsgált *cycA* mutánsai között deléciót nem találtunk.

A *cycA* fluktuációs analízissel mért mutációs ráta különbségeket egy másik mutációs ráta mérési módszerrel is kimutattuk: az MDS42 és MDS42pdu törzsek mutációs rátáját rifampicin rezisztencián alapuló módszerrel is megmértük. A rifampicin rezisztencián alapuló módszer az esszenciális *rpoB* gén mutációit detektálja [121]. A kapott értékek egybevágnak a *cycA* fluktuációs mérésekkel (**10. ábra**). Az MDS42pdu törzs spontán mutációs rátája hozzávetőlegesen kétszer alacsonyabb volt, mint az MDS42-é. A toxikus ORF238 peptid túltermelése, illetve a mitomycin-C antibiotikum jelenléte az MDS42 mutációs rátáját szignifikánsan megnövelte, míg az MDS42pdu törzs válasza sokkal mérsékeltebb volt.

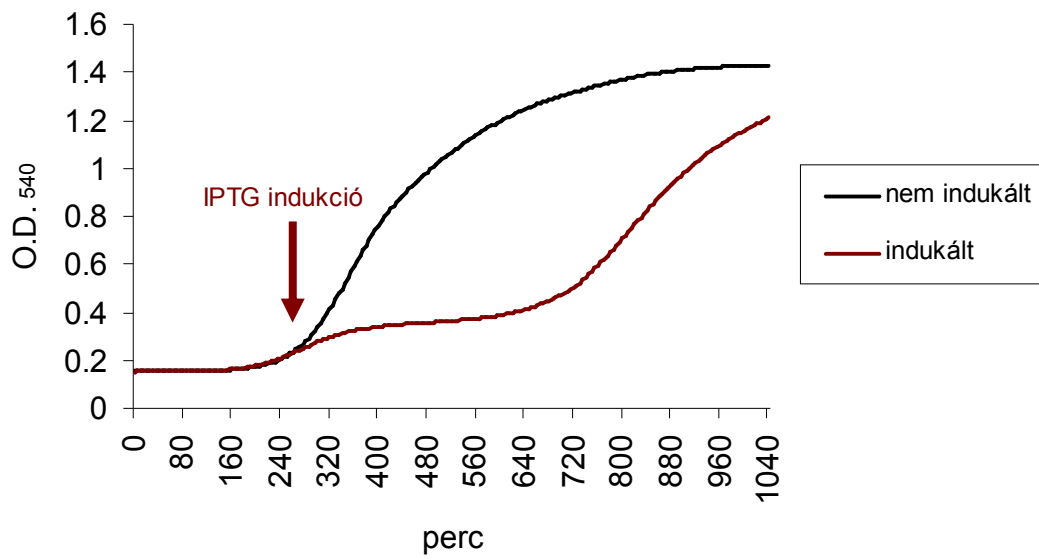


**10. ábra.** MDS42 és MDSpdu törzsek mutációs rátája normál, illetve különféle stressz körülmények között, rifampicin rezisztencián alapuló módszerrel mérve. A hibavonalak három független mérés átlagának 95 %-os konfidencia-intervallumát jelölik. Varianciaanalízissel  $p < 0,0001$  szintű szignifikanciát határoztunk meg. Minden törzssel páros t-próbát végeztünk a megfelelő MDS42pdu törzssel összehasonlítva, \*  $p < 0,05$  szignifikancia szintet jelöl.

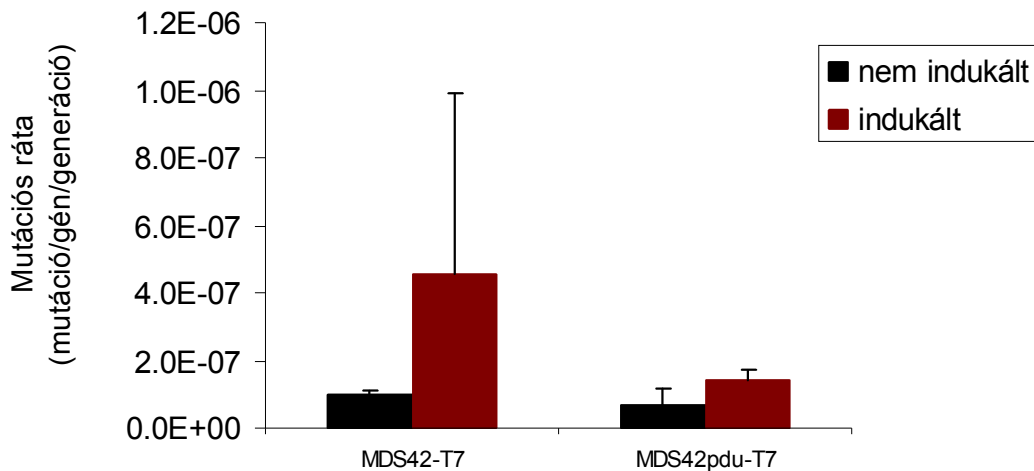
#### 5. 4. Az MDS42pdu törzs fokozott stabilitást biztosít egy toxikus fehérjét expresszáló plazmid klónnak.

A genetikailag stabilizált baktérium gazdasejt gyakorlati előnyeinek demonstrálására egy plazmid alapú mutációdetektálási eljárást alkalmaztunk. A pSin32 plazmid a *Salmonella enterica* serovar Infantis SinI metiltranszferáz enzimét kódoló *sinIM* gént indukálható formában hordozza. Az M.SinI enzim a GG(A/T)CC DNS-szekvenciák belső citozinját metilálja az 5-ös pozícióban. Az így módosított DNS az R<sup>m</sup>C szekvenciákat felismerő McrBC endonukleáz enzim számára hasítási szekvenciát jelent. Az M.SinI enzimet expresszáló plazmid képtelen fennmaradni egy *mcrBC*<sup>+</sup> törzsben, mivel az *E. coli* kromoszómáján bőven elég SinI hely található (2874 darab), hogy azok egy része metilálódjon, majd az McrBC által a kromoszóma fel is hasítódjon. A jelenség alkalmas arra, hogy a *sinIM* gén funkcióképes és mutáns változatait egyszerű szelekcióval elkülönítsük. A pSin32 plazmidot az MDS42 (McrBC<sup>-</sup>), illetve az MG1655 (McrBC<sup>+</sup>) törzsbe juttatjuk. Előbbi az összes (funkcióképes *sinIM* és mutáns *sinIM* gént hordozó plazmidoktól származó) transzformáns számát adja meg, utóbbi a mutáns (funkcióképtelen *sinIM* gént hordozó plazmidoktól származó) gént hordozó transzformánsokét.

A pSin32 plazmidot transzformáltuk a BL21(DE3)*mcrBC*, az MDS42-T7, illetve az MDS42pdu-T7 törzsekbe. Amíg az MDS42-T7 és MDS42pdu-T7 törzsek eleve McrBC<sup>-</sup> törzsek, addig a BL21(DE3) törzsből ki kellett ejteni az *mcrBC* gént, hogy az képes legyen fenntartani a plazmidot. Érdekes módon az IPTG-vel indukált M.SinI termelésnek mérsékelt növekedésgátló hatása volt még McrBC<sup>-</sup> törzsekben is (**11. ábra**). Amíg ez a mérsékelt toxicitás az MDS42-T7 mutációs rátáját megnövelte, addig ez a hatás az MDS42pdu törzs esetén jóval gyengébb volt (**12. ábra**). Mindez alátámasztja a korábbi eredményeket: az MDS42pdu alacsony mutációs rátája stresszhatásra sem mutat szignifikáns növekedést.

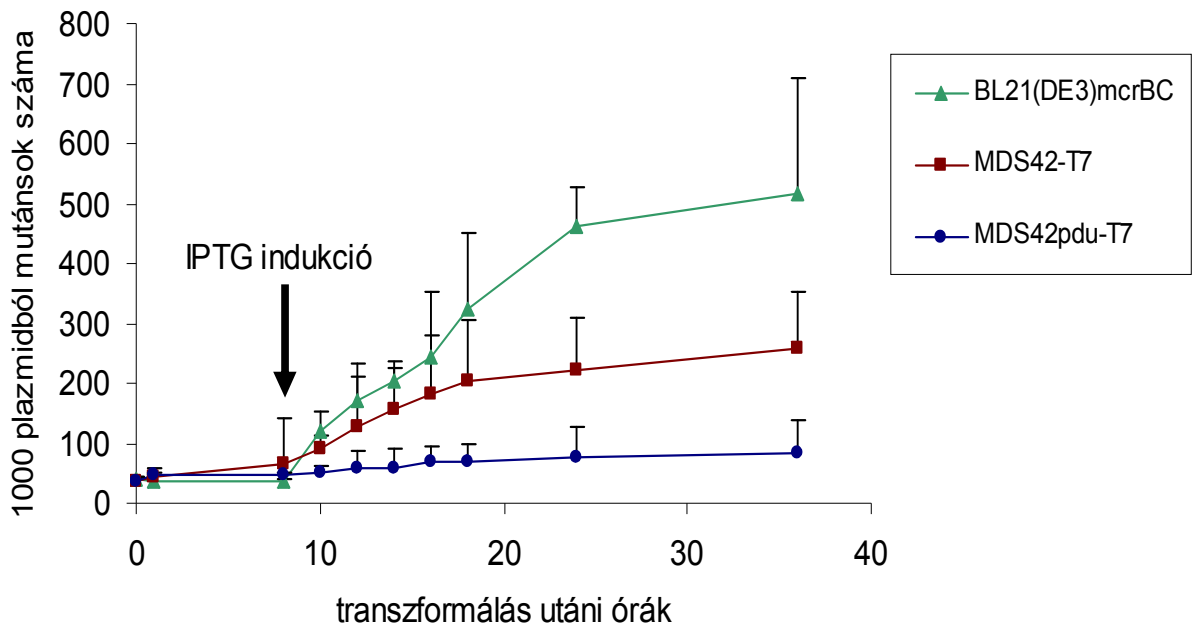


**11. ábra.** Az M.SinI termelés toxikus hatása. A pSin32 plazmidot hordozó MDS42-T7 (McrBC-) növekedési görbéje IPTG-indukció mellett és nélkül. Az adatok 25-25 független kultúra átlagolt O. D.<sub>540</sub> értékei (5 percenkénti mérés Bioscreen C automata segítségével).



**12. ábra.** Nem indukált és indukált, M.SinI fehérjét termelő sejtek mutációs rátája. A méréseket *cycA* fluktuációs teszttel végeztük. A hibavonalak három független mérés átlagának 95 %-os konfidencia-intervallumát jelölik. Varianciaanalízissel  $p < 0,01$  szintű szignifikanciát határoztunk meg. A nem indukált minták közötti páros t-próba  $p = 0,077$  szignifikancia szintet eredményezett, ugyanez az érték az indukált minták között  $p = 0,067$  volt.

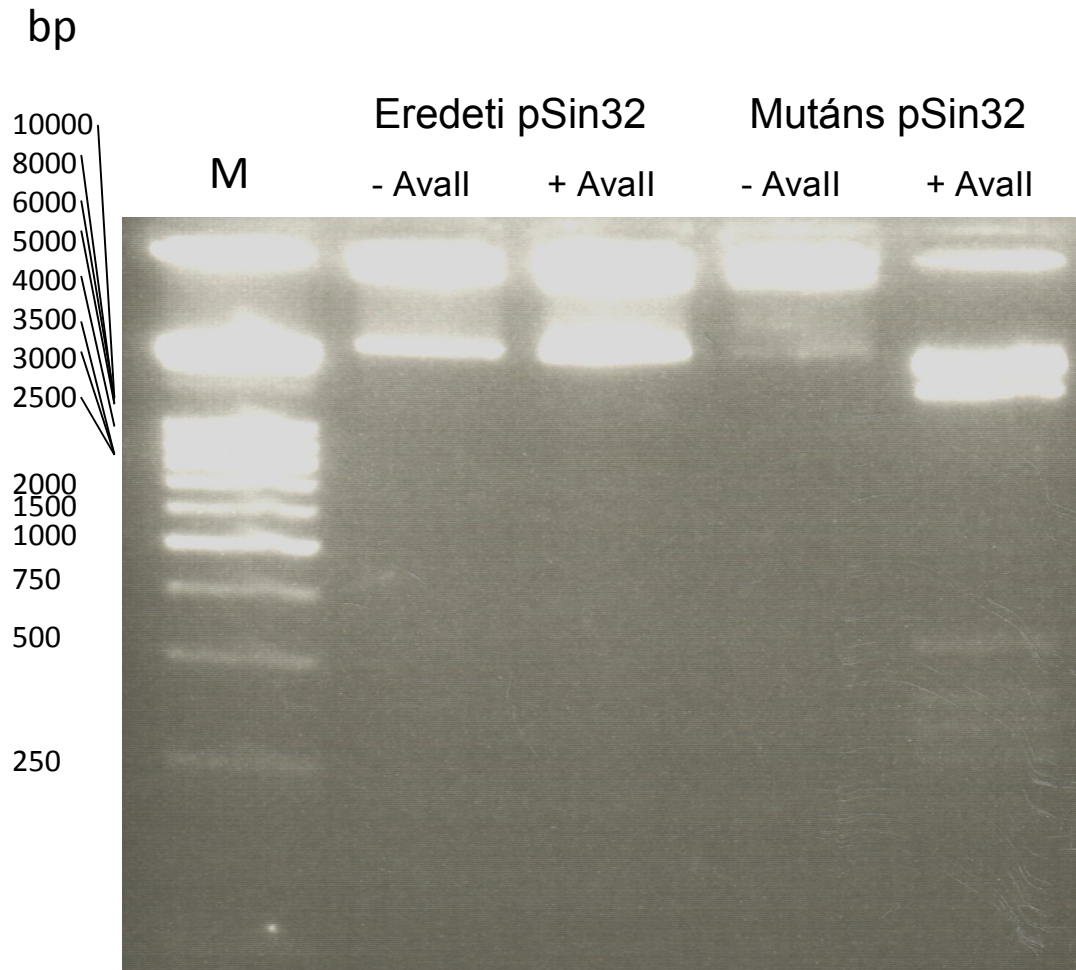
Az IPTG indukciót követően meghatározott időközönként plazmid mintákat vettünk a gazdasejtekből. Az M.SinI-inaktiváló mutációt szenvedett (metilátlan) plazmidok arányát úgy állapítottuk meg, hogy a mintákat mind MG1655 (McrBC+), mind MDS42 (McrBC-) törzsbe transzformáltuk. A kétféle akceptor sejt esetleges elektroporálhatósági különbségét úgy korrigáltuk, hogy párhuzamosan egy kontroll plazmidot is transzformáltunk. A mutáns *sinI* gént hordozó plazmidok aránya a BL21(DE3) törzsben meredek emelkedést mutat, ugyanakkor az MDS42pdu-ban gyakorlatilag változatlan maradt a vizsgált 36 órás intervallumban (**13. ábra**).



**13. ábra.** A mutáns pSin32 plazmidok felhalmozódása különféle gazdasejtekben. A SinI metiltranszferázt a pSin32 plazmidról expresszáztattuk. Meghatározott időközönként plazmid mintákat vettünk az indukált kultúrákból, majd a mintákban meghatároztuk a mutált plazmidok arányát. A hibavonalak három független mérés átlagának 95 %-os konfidencia-intervallumát jelölik. Varianciaanalízissel  $p < 0,005$  szintű szignifikanciát határoztunk meg. Minden MDS42pdu-T7 mintához viszonyítva páros t-próbát végeztünk a megfelelő MDS42-T7 és BL21(DE3)*mcrBC* mintákkal. A 10 órás mintáktól kezdve az összes MDS42pdu-T7 minta szignifikánsan különbözött a megfelelő MDS42-T7 ( $p < 0,01$ ) és BL21(DE3)*mcrBC* mintákhoz képest ( $p < 0,005$ ).

Meglepő módon a kiindulási (0 órás) plazmid minta (mely eredetileg MDS42 törzsben volt fenntartva) 96,7 %-a nem transzformálta az MG1655 törzset. Ez arra utal, hogy még egy T7 RNS-polimerázt nem kódoló törzsben is történik némi átíródás a *sinIM* génről, mely SinI expresszióhoz, így a SinI helyek metilációjához vezet. Az eredeti plazmidminta SinI helyeinek metilált állapotát az AvaII endonukleáz (SinI isoschizomer) enzimmel szembeni védettsége bizonyítja (**14. ábra**).





**14. ábra.** Az eredeti (kiindulási) pSin32 plazmid és egy MG1655 gazdát transzformáló minta emésztése *AvaII* restrikciós endonukleáz enzimmal. Az eredeti plazmid esetén az *AvaII* (*SinI* isoschizomer) nem képes hasítani a 8 *SinI* helyet tartalmazó plazmidot - ez a felismerési helyek metilált állapotára, funkcióképes *M.SinI* jelenlétére utal. A mutáns plazmidot az *AvaII* hasítja – ez a *SinI* helyek metilálatlan állapotára, funkcióképtelen *M.SinI* enzimre utal.

A különböző törzsek klónstabilitásban mutatott különbsége az IPTG-indukált *SinI* expressziót követően vált kimutathatóvá. A transzformálást követő 36. órában (28 órával az IPTG indukció után), a BL21(DE3)*mcrBC* törzsből izolált pSin32 plazmidok 51,7 %-a hordozott olyan mutációt, mely megakadályozta a funkcióképes *SinI* enzim termelődését.

Ez az arány szignifikánsan alacsonyabb volt az MDS42-T7-ből izolált mintában (25,8 %). Az MDS42pdu-T7 törzsben a mutációt szenvedett plazmidok aránya még kisebb volt (8,2 %) (**13. ábra**).

Hogy az MG1655 törzset transzformáló plazmidok valóban mutáns *sinIM* gént hordoznak (metilálatlanok), egy plazmid *AvaII* endonukleáz (FastDigest, Fermentas, Vilnius, Litvánia) enzimmel történt emésztésével is bizonyítottuk (**14. ábra**). További bizonyítékot szolgáltatott 8 különböző (pSin32-vel transzformált MG1655 kolóniából izolált) plazmid *sinI* régiójának szekvenálása (**3. táblázat**). A nyolcból hét esetben a *sinI* génen belül egy új stop kodon kialakulásához vezető frameshift mutáció mutatkozott. A nyolcadik esetben egy, a fehérje N255T misszensz mutációjához vezető A-C transzverzió alakult ki. A hét frameshift mutáció közül hat esetben a gén első 125 bázispárján belül alakult ki az új stop kodon.

Szekvenált plasmid mintaszáma	DNS szekvencia mutáció	Fehérjében történő változás
1	leolvasási keret eltolódás (-1) a 81-es pozícióban	stop kodon a 94-es pozícióban
2	leolvasási keret eltolódás (+1) a 68-as pozícióban	stop kodon a 74-es pozícióban
3	leolvasási keret eltolódás (-1) a 82-es pozícióban	stop kodon a 94-es pozícióban
4	A-C transzverzió a 766-os pozícióban	N255T misszensz mutáció
5	leolvasási keret eltolódás (+1) a 69-es pozícióban	stop kodon a 74-es pozícióban
6	leolvasási keret eltolódás (+1) a 748-as pozícióban	stop kodon a 755-ös pozícióban
7	leolvasási keret eltolódás (-1) a 80-as pozícióban	stop kodon a 94-es pozícióban
8	leolvasási keret eltolódás (+1) a 94-es pozícióban	stop kodon a 125-ös pozícióban

**3. táblázat.** Különböző pSin32 mintákban azonosított M.SinI funkcióvesztéses mutációk. Összesen nyolc olyan pSin32 plazmid mintát szekvenáltattunk, mely képes volt MG1655 törzset (McrBC+) transzformálni. Hét mintában egy olyan leolvasási keret eltolódásos mutációt találtunk, mely új stop kodont hoz létre a *sinIM* génen belül. A maradék mintában egy N→T aminosav cserét okozó A→C transzverziót detektáltunk. A feltüntetett nukleotid pozíciókat az 1413 bp hosszúságú *sinIM* kódoló régió első nukleotidjához viszonyítottuk.

A BL21(DE3)*mcrBC* és MDS42-T7 törzsekben a mutáns plazmidok felhalmozódásának kézenfekvő magyarázata az SinI metiltranszferázt expresszáló plazmid stresszindukált mutagenézist és növekedésgátlást okozó kettős hatása. Az enzim termelődése egyszerre növelte a mutációs rátát, és csökkentette a növekedési ütemét. Ezekben a lassan növekvő kultúrákban idővel M.SinI-inaktiváló mutációk keletkeztek, melyek - visszanyerve korábbi növekedési rátájukat - gyorsan túlnőtték a kultúra többi sejtjét. Az alacsony mutációs rátájú MDS42pdu-T7 törzsben az M.SinI-inaktiváló mutációk kialakulásához átlagosan több időre volt szükség. A pSin32 plazmidot hordozó MDS42-T7 és MDS42pdu-T7 törzsek 50-50 független kolóniájának növekedési paraméterei alátámasztják ezt a megállapítást. A célszerűen választott  $O.D._{540} = 0,7$  értéket az MDS42pdu-T7 törzs szignifikánsan hosszabb idő alatt érte el, mint az MDS42-T7 (727,8, illetve 571,8 perc;  $p < 0,005$ , kétmintás t-próba).

## 6. Az eredmények megvitatása

A szintetikus biológia egyik alapvető kihívása a mesterséges genetikai konstrukciókat nem tervezett módon megváltoztató, az élő organizmusokra jellemző belső változékonyság és genetikai instabilitás [129]. Ahogy egyre összetettebb és bonyolultabb szintetikus rendszereket hoznak létre, egyre nagyobb akadályt jelent a rendszerekben újonnan létrejövő tulajdonságok megjelenése és szelektálódása. Ebből a megfontolásból a gazdaszerkezet vagy szintetikus biológiai váz genetikai stabilitásának javítása egy indokolt célkitűzés.

### 6. 1. Az indukálható DNS-polimerázok hiányának hatása a spontán mutációs rátára

Csoportunk korábban bemutatta a mobilis genetikai elemek eliminálásából származó genomstabilizáció néhány előnyös tulajdonságát bizonyos klónozási alkalmazásokban [38, 40]. Céljaink között szerepelt, hogy ezt a stabilizációs hatást fokozzuk. A mutációs ráta csökkentésének lehetséges módja lehetne a *dnaE* (Pol III alegységet kódoló) gén egy ún. antimutátor alléljának bevitele. Korábbi munkák 5-30-szoros mutációs ráta csökkenést jeleztek antimutátor törzsekben [130]. Később kimutatták, hogy ezekben a DnaE antimutátorokban a sejt általános (Pol III) DNS-polimeráz enzime hatékonyabban zárja ki a nagy hibaszázalékú DNS-polimerázokat a DNS szintézis helyeiről a kettős szálú genomtöréshez kapcsolt, stressz-indukált mutagenezis során [131]. Ez azt sugallja, hogy az indukálható DNS-polimerázok eliminálása reprodukálná az antimutátor hatást.

Egy másik megközelítése a genomstabilizálásnak az SOS-válasz teljes kiiktatása. Ezt az alternatívát is megvizsgáltuk kísérleteink során, létrehoztuk az MDS42*recA* és MDS42*lexA*(S119A) törzseket, azonban a spontán mutációs ráta legfeljebb kismértékű csökkenést mutatott. Ennek a megközelítésnek egy további hátránya, hogy a RecA enzim sejtфизиologiában betöltött központi szerepe miatt [132] nem kívánt pleiotróp hatások is kialakulhatnak a RecA-hiányos sejtben. Erre példa lehet, hogy az MDS42*recA* törzs megnövekedett érzékenységet mutat a mitomycin-C antibiotikummal szemben, feltehetőleg az elégtelen hibajavítási aktivitás miatt. Az MDS42*lexA*(S119A) törzs, amely

a LexA represszor fehérjének egy nem hasítható változatát hordozza, szignifikánsan nem csökkentette a mutációs rátát a vizsgált körülmények között. A *recA* és *lexA* mutációk elhanyagolható hatását az indukálható DNS-polimeráz enzimek viszonylagos SOS-függetlenségével lehet magyarázni: egyrészt az enzimek stresszmentes sejtekben is jelen vannak, másrészt a szintjüket nem kizárólagosan az SOS-válasz, hanem számos stresszhatás is fokozhatja (**2. ábra**) [58].

Az említett megközelítések elvetése, illetve kipróbálása után a sejt indukálható DNS-polimeráz enzimeit (Pol II, Pol IV, Pol V) kódoló gének delécióját választottuk stratégiánknak. Az indukálható DNS-polimeráz enzimek mutációs rátára gyakorolt hatását több munkacsoport is kutatta már különböző *E. coli* törzsekben, különböző mutációs ráta mérési módszerekkel. Eredményeinket alátámasztja egy korábbi munka, ahol kimutatták, hogy a *dinB* gén deléciója szignifikánsan csökkenti a frameshift és szubsztitúciós mutációkat egy Lac<sup>+</sup> reverziós, valamint egy rifampicin rezisztencia tesztben [133]. Egy másik tanulmányban a Pol V deléciója növekedésfüggő Arg<sup>+</sup> revertánsok számának csökkenéséhez vezetett [134]. Egy későbbi munkában kimutatták, hogy ciprofloxacín jelenlétében a posztexpozíciós mutánsok száma látványosan csökkent, amikor mindhárom indukálható polimerázt kiejtettek [96].

Kísérleteink során a D-cikloszerin rezisztencián alapuló fluktuációs analízissel [71], melyet néhány esetben rifampicin rezisztencián alapuló méréssel támasztottunk alá, részletesen számszerűsítettük az indukálható DNS-polimerázok egyenkénti és együttes hatását a mutációs rátára normál (stresszmentes) állapotban, valamint különféle stressz körülmények között. Kimutattuk, hogy stresszmentes körülmények között mind a három indukálható DNS-polimeráz egyenkénti kiejtése szignifikánsan csökkenti a spontán mutációs rátát. A  $\Delta polB$  és  $\Delta dinB$  deléciók kombinálásával a hatás additív volt - ez a két polimeráz egymástól független működésére utal. Ezzel szemben, amikor a  $\Delta umuDC$  deléciót kombináltuk bármelyik másik polimeráz delécióval, nem tapasztaltunk további csökkenést a mutációs rátában. Ez az eredmény az *umuDC* és a másik két DNS-polimeráz gén, illetve azok produktumainak kölcsönhatására utal. Ezt a jelenséget korábban is tapasztalták már  $\Delta dinB$  és  $\Delta umuDC$  esetén, azonban a feltételezett kölcsönhatás részleteiben még nem ismert [135].

## 6. 2. Stresszkörülmények mutációs rátára gyakorolt hatása

A legnagyobb mértékű mutációs rátabeli különbség az MDS42 és MDS42pdu törzsek között különböző stresszkörülmények között volt kimutatható. Az SOS-választ beindító mitomycin-C szubinhibíciós koncentrációja, a nem toxikus GFP fehérje, illetve az erősen toxikus ORF238 hidrofób fehérje túltermelése mind szignifikánsan növelte az MDS42 törzs mutációs rátáját. Hasonló körülmények között az MDS42pdu törzs mutációs rátája stabil volt, szignifikánsan nem változott. Figyelemre méltó, hogy az összes vizsgált törzs közül a leggyakrabban használt fehérjetúltermelő törzs, a BL21(DE3) spontán mutációs rátája volt a legmagasabb, ráadásul a különböző stresszhatásokra is ennek a törzsnek emelkedett a legnagyobb mértékben a mutagenitása. A toxikus ORF238 fehérje túltermelésekor a BL21(DE3) és MDS42pdu törzsek mutációs rátája között majdnem két nagyságrendbeli különbség volt. A BL21(DE3) törzs emelkedett mutációs rátája főként a fokozott mértékű IS elem inszerciónak tulajdonítható.

## 6. 3. Az indukálható DNS-polimerázok hiányának hatása a fehérje túltermelésre

Az MDS42pdu törzs gyakorlati alkalmazási előnyét sikerült kimutatnunk egy fehérjetermelési kísérletben. Ennek során a SinI metiltranszferáz enzimet egy indukálható plazmid konstrukcióról expresszáztattuk. Az M.SinI enzim felismerőhelyén 5-metilcitozinokat alakít ki a DNS-ben, így hasítóhelyeket hoz létre az McrBC endonukleáz számára, emiatt az McrBC<sup>+</sup> sejtek életképtelenek lesznek. McrBC<sup>-</sup> sejtekben a metiláció nem letális, azonban ilyenkor is a növekedés gátlását tapasztaltuk. Amikor különféle McrBC<sup>-</sup> törzsekben expresszáztattuk a metiltranszferázt, azt tapasztaltuk, hogy a plazmidon hordozott *sinIM* gén háromszor kisebb frekvenciával szenvedett funkcióvesztéses mutációt, mint az MDS42 törzsben, és ötször kisebb frekvenciával, mint a BL21(DE3)*mcrBC* törzsben. Figyelemre méltó, hogy a BL21(DE3) törzsben mindössze 16 óra expressziót követően a plazmidokon kódolt *sinIM* gének közel fele funkcióvesztéses mutációt hordozott.

Az M.SinI enzimet expresszáló kultúrákban kialakuló mutált klónok meglepően magas arányát kizárólagosan nem magyarázza a stresszindukált mutagenézis folyamata.

A gazdasejt mutációs ráta értéke (nagyságrendben  $10^{-6}$  mutáció/gén/generáció) nem elég magas, hogy ilyen drámai hatása legyen. A tapasztalt jelenség sokkal inkább a toxikus gént hordozó plazmid növekedésgátló hatásának köszönhető. Az események sorrendje vélhetően a következő: amikor a toxikus gén expresszióját indukáljuk, a sejt növekedés lelassul. Ezzel egy időben, a stressz hatására a mutációs ráta megemelkedik. Mihelyst keletkezik egy olyan mutáns a plazmid populációban, amely nem képes a toxikus fehérjét termelni, a gazdasejt képes lesz folytatni a normál növekedést, és így a kultúrában dominánssá válik. Az alacsony mutációs rátájú MDS42pdu-ban az inaktíváló mutánsok megjelenése hosszabb időt vesz igénybe, így a sejtek tovább képesek produkálni a funkcióképes toxikus fehérjét.

#### **6. 4. Az MDS42pdu törzs előnyeinek számszerűsítése**

Az MDS42pdu törzs előnyét a szülői MDS42 vagy a BL21(DE3) törzssel szemben nehéz pontosan számszerűsíteni, mivel egyrészt a mutagenézis folyamata sztochasztikus, másrészt a túltermelés fitness költségéről nehéz pontos adatokat nyerni. Mindenesetre a toxikus ORF238 termelése során mért adatok segítségével egy megközelítő becslést lehet adni az előnyről. Először feltételezzük, hogy a növekedés elején a populációban nincsen inaktívált mutáns. Ebben a korai fázisban, ha a populáció exponenciális fázisba kerül, csak idő kérdése, hogy létrejöttön egy inaktíváló mutáns. Ez az időpont az ún. mutációs készlettől függ - ez a populáció méretének és mutációs rátájának szorzata. Habár ez az érték biztosan alacsonyabb az MDS42pdu törzs esetén bármennyi generációt követően, a mutagenézis sztochasztikus mivolta miatt biztosan csak annyit állíthatunk, hogy a törzsnek 25-ször kisebb esélye van elszenvedni az első inaktíváló mutációt, mint a BL21(DE3) törzsnek. Adataink alapján az MDS42pdu-nak 4,64-el több generációra van szüksége ( $\log_2 25$ ) a növekedés során, mint a BL21(DE3)-nak, hogy egy ilyen mutáció bekövetkezzen. Természetesen ezek az értékek fluktuációnak vannak kitéve. Az első inaktíváló mutáns kialakulását követően a kultúra egy következő fázisba lép, amikor a mutánsok aránya a populáción belül lineárisan növekedni kezd. Ennek a növekedésnek a meredeksége arányos a mutációs rátával, amely még mindig 25-ször kisebb az MDS42pdu esetében. Az inducer (IPTG) hozzáadásával termelődni kezd a fehérje és



megkezdődik az utolsó fázis, amikor az inaktivált mutánsok szubpopulációja exponenciálisan terjed. Ha feltételezzük, hogy a fehérjetúltermelés mindkét törzs esetén ugyanolyan fitness költséggel jár, akkor nyilvánvaló, hogy a mutáns sejtek kisebb aránya az MDS42pdu kultúrában a növesztés végéig megmarad, illetve maga a helyes fehérjeexpresszió is később áll le.

Abban az esetben, amikor az inducert (IPTG) hamarabb adjuk a kultúrákhoz, mint mielőtt a kultúrákban megjelenének az inaktiváló mutánsok, az MDS42pdu törzs előnye még jelentősebb lesz. Ebben az esetben mind a fehérjetúltermelés okozta stresszhatás, mind a folyamatos sejtszámgyarapodás növeli a mutációs készletet, amíg meg nem jelenik az első, termelésben gátolt sejt. Ekkor a populációban a nemtermelő sejtek exponenciális módon terjedni kezdenek. Mivel - adataink alapján - a toxikus ORF238 fehérje túltermelésekor az MDS42pdu a BL21(DE3)-hoz képest 59-szer alacsonyabb mutációs rátát mutat, az első inaktiváló mutáció megjelenése várhatóan 5,88 generációval később ( $\log_2 59$ ) következik be. Ahogyan az első esetben, ekkor is hosszabb ideig termelődik a helyes fehérje az expresszió, illetve a növekedés leállásáig.

A bemutatott példa alapján az MDS42pdu sejtek korai, az első inaktiváló mutáció előtti indukálása jelenti a legnagyobb előnyt a helyes fehérje túltermelése szempontjából. Ez annak köszönhető, hogy a két törzs fehérjetúltermelés által előidézett mutációs rátabeli különbsége nagyobb, mint a két törzs spontán mutációs rátája közötti különbség. Mivel azonban az ipari fermentorokban az indukció idején meglehetősen magas már a sejtszám, ezért ez a fajta indukció nagy valószínűséggel ipari méretekben technikailag kivitelezhetetlen. Hangsúlyozandó továbbá, hogy ez a leegyszerűsített modell több tényezőt nem vesz figyelembe. Ilyen például az indukátlan promóter ún. szivárgása, amely egy enyhébb stresszindukált mutagenézist okozhat, ezáltal plusz előnyben részesítve az MDS42pdu-t még az indukció előtt. Másfelől nem egyértelmű, hogy egy specifikus terméknek a túltermelése ugyanolyan fitness költséget jelent minden törzs számára. Ebből kifolyólag, habár nagy valószínűséggel szignifikánsan növelhető a helyes fehérjetermelés mértéke az MDS42pdu segítségével, az előny mértéke a konkrét terméktől függően változó lehet.

## 6. 5. Gyakorlati következtetések

Az élő gazdasejtben fenntartott szintetikus genetikai konstrukciók mutációja és inaktivációja egy olyan, gyakran mellőzött probléma, mely súlyos problémákat okozhat különféle szintetikus biológiai, molekuláris biológiai vagy biotechnológiai feladatok elvégzése során. Egy génproduktum, amely toxikus vagy metabolikus terhet jelent a gazdasejt számára, olyan evolúciós erőt idéz elő, amely a növekedésgátló hatás alól felszabadító mutánsok szelekciójára irányul. Egy megnövelt genetikai stabilitású gazdasejt (szintetikus biológiai váz = chassis) előnyös lehet az ilyen konstrukciók stabil fenntartásában. Azáltal, hogy a nagy hibaszázalékú DNS-polimerázokat kiejtettük a mobilis genetikai elemektől mentes MDS42 törzsből, egy klónozásos feladatokban eleve előnyös törzs stabilitását sikerült tovább javítani. Az így létrejövő MDS42pdu törzsnek szignifikánsan stabilizáló hatása volt egy toxikus fehérjét expresszáló klónra. Ez a nagy fidelitású, kisebb genetikai variabilitást engedő törzs széleskörű felhasználást nyerhet a terápiás DNS-termeléstől a hosszú távú, folyamatos fermentációs eljárásokig.

## **Köszönetnyilvánítás**

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Pósfai Györgynek a problémakör felvetését, több évre visszanyúló szakmai irányítását és tanítását, számtalan ötletét és hasznos tanácsait, a kézirat megírásában nyújtott segítségét, valamint a nyugodt és stabil munkakörnyezet megteremtését.

Hálás köszönettel tartozom a Genommérnöki Csoport összes jelenlegi és volt tagjának: Dr. Balikó Gabriella, Dr. Cseh Botond, Draskovits Gábor, Dr. Fehér Tamás, Dr. Gyórfy Zsuzsanna, Karcagi Ildikó, Nyerges Ákos, Szalkanovics Gáborné, Tímár Edit, Tuboly Csaba, Dr. Umenhoffer Kinga, Vágvölgyi Anna, VERNYIK Viktor. A csoport bármely tagjához mindig fordulhattam kérdéssel, kéréssel. Mindig számíthattam rá, hogy kiveszik a lemezeimet ha elutaztam. Külön köszönöm Dr. Fehér Tamásnak a számtalan kérdésemre adott választ, nagyon sokat tanultam tőle.

Köszönettel tartozom Dr. Kiss Antalnak a pSin32 plazmida kapcsolatos kísérletek során nyújtott segítségéért, hasznos tanácsaiért.

Köszönöm Dr. Frederick R. Blattnernek és Dr. John W. Campbellnek a munkám során nyújtott segítséget.

Végül köszönöm családomnak a példamutatást és támogatást.

## Szakirodalmi hivatkozások:

1. Neidhardt FC, Eick R, Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (eds.): **Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology** Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1996.
2. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA: **Diversity of the human intestinal microbial flora.** *Science* 2005, **308**(5728):1635-1638.
3. Bentley R, Meganathan R: **Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria.** *Microbiol Rev* 1982, **46**(3):241-280.
4. Hudault S, Guignot J, Servin AL: **Escherichia coli strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against Salmonella typhimurium infection.** *Gut* 2001, **49**(1):47-55.
5. Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K: **Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of Escherichia coli.** *Bacteriol Rev* 1977, **41**(3):667-710.
6. Escherich T: **The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1884.** *Rev Infect Dis* 1988, **10**(6):1220-1225.
7. Bachmann BJ: **Pedigrees of some mutant strains of Escherichia coli K-12.** *Bacteriol Rev* 1972, **36**(4):525-557.
8. Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF *et al*: **The complete genome sequence of Escherichia coli K-12.** *Science* 1997, **277**(5331):1453-1462.
9. Perna NT, Plunkett G, 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA *et al*: **Genome sequence of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7.** *Nature* 2001, **409**(6819):529-533.
10. Welch RA, Burland V, Plunkett G, 3rd, Redford P, Roesch P, Rasko D, Buckles EL, Liou SR, Boutin A, Hackett J *et al*: **Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic Escherichia coli.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(26):17020-17024.
11. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GS, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, Crabtree J, Sebahia M, Thomson NR, Chaudhuri R *et al*: **The pangenome structure of Escherichia coli: comparative genomic analysis of E. coli commensal and pathogenic isolates.** *J Bacteriol* 2008, **190**(20):6881-6893.
12. Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW: **Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution.** *FEMS Microbiol Rev* 2009, **33**(2):376-393.
13. Touchon M, Hoede C, Tenailon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, Bingen E, Bonacorsi S, Bouchier C, Bouvet O *et al*: **Organised genome dynamics in the Escherichia coli species results in highly diverse adaptive paths.** *PLoS Genet* 2009, **5**(1):e1000344.
14. Lukjancenko O, Wassenaar TM, Ussery DW: **Comparison of 61 sequenced Escherichia coli genomes.** *Microb Ecol* 2010, **60**(4):708-720.

15. Willenbrock H, Hallin PF, Wassenaar TM, Ussery DW: **Characterization of probiotic Escherichia coli isolates with a novel pan-genome microarray.** *Genome Biol* 2007, **8**(12):R267.
16. Lederberg J, Tatum EL: **Gene recombination in Escherichia coli.** *Nature* 1946, **158**(4016):558.
17. Jacob F, Monod J: **Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins.** *J Mol Biol* 1961, **3**:318-356.
18. Denamur E, Matic I: **Evolution of mutation rates in bacteria.** *Mol Microbiol* 2006, **60**(4):820-827.
19. Endy D: **Foundations for engineering biology.** *Nature* 2005, **438**(7067):449-453.
20. Prather KL, Edmonds MC, Herod JW: **Identification and characterization of IS1 transposition in plasmid amplification mutants of E. coli clones producing DNA vaccines.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, **73**(4):815-826.
21. Binns M: **Contamination of DNA database sequence entries with Escherichia coli insertion sequences.** *Nucleic Acids Res* 1993, **21**(3):779.
22. Astua-Monge G, Lyznik A, Jones V, Mackenzie SA, Vallejos CE: **Evidence for a prokaryotic insertion-sequence contamination in eukaryotic sequences registered in different databases.** *Theor Appl Genet* 2002, **104**(1):48-53.
23. Chou CP: **Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in Escherichia coli.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, **76**(3):521-532.
24. Gao H, Zhuo Y, Ashforth E, Zhang L: **Engineering of a genome-reduced host: practical application of synthetic biology in the overproduction of desired secondary metabolites.** *Protein Cell* 2010, **1**(7):621-626.
25. Andrianantoandro E, Basu S, Karig DK, Weiss R: **Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline.** *Mol Syst Biol* 2006, **2**:2006 0028.
26. Arbabi-Ghahroudi M, Tanha J, MacKenzie R: **Prokaryotic expression of antibodies.** *Cancer Metastasis Rev* 2005, **24**(4):501-519.
27. Baneyx F: **Recombinant protein expression in Escherichia coli.** *Curr Opin Biotechnol* 1999, **10**(5):411-421.
28. Jana S, Deb JK: **Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia coli.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2005, **67**(3):289-298.
29. Jarboe LR, Zhang X, Wang X, Moore JC, Shanmugam KT, Ingram LO: **Metabolic engineering for production of biorenewable fuels and chemicals: contributions of synthetic biology.** *J Biomed Biotechnol* 2010, **2010**:761042.
30. Meagher RB, Tait RC, Betlach M, Boyer HW: **Protein expression in E. coli minicells by recombinant plasmids.** *Cell* 1977, **10**(3):521-536.
31. Sorensen HP, Mortensen KK: **Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli.** *J Biotechnol* 2005, **115**(2):113-128.
32. Terpe K: **Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, **72**(2):211-222.
33. Cebolla A, Royo JL, De Lorenzo V, Santero E: **Improvement of recombinant protein yield by a combination of transcriptional amplification and stabilization of gene expression.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**(10):5034-5041.

34. Chevalet L, Robert A, Gueneau F, Bonnefoy JY, Nguyen T: **Recombinant protein production driven by the tryptophan promoter is tightly controlled in ICONE 200, a new genetically engineered E. coli mutant.** *Biotechnol Bioeng* 2000, **69**(4):351-358.
35. Ferrer-Miralles N, Domingo-Espin J, Corchero JL, Vazquez E, Villaverde A: **Microbial factories for recombinant pharmaceuticals.** *Microb Cell Fact* 2009, **8**:17.
36. Chou CH, Bennett GN, San KY: **Genetic manipulation of stationary-phase genes to enhance recombinant protein production in Escherichia coli.** *Biotechnol Bioeng* 1996, **50**(6):636-642.
37. Mizoguchi H, Mori H, Fujio T: **Escherichia coli minimum genome factory.** *Biotechnol Appl Biochem* 2007, **46**(Pt 3):157-167.
38. Posfai G, Plunkett G, 3rd, Feher T, Frisch D, Keil GM, Umenhoffer K, Kolisnychenko V, Stahl B, Sharma SS, de Arruda M *et al*: **Emergent properties of reduced-genome Escherichia coli.** *Science* 2006, **312**(5776):1044-1046.
39. Lee JH, Sung BH, Kim MS, Blattner FR, Yoon BH, Kim JH, Kim SC: **Metabolic engineering of a reduced-genome strain of Escherichia coli for L-threonine production.** *Microb Cell Fact* 2009, **8**:2.
40. Umenhoffer K, Feher T, Baliko G, Ayaydin F, Posfai J, Blattner FR, Posfai G: **Reduced evolvability of Escherichia coli MDS42, an IS-less cellular chassis for molecular and synthetic biology applications.** *Microb Cell Fact* 2010, **9**:38.
41. Sniegowski P: **Evolution: constantly avoiding mutation.** *Curr Biol* 2001, **11**(22):R929-931.
42. Aravind L, Walker DR, Koonin EV: **Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems.** *Nucleic Acids Res* 1999, **27**(5):1223-1242.
43. Drake JW: **A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**(16):7160-7164.
44. Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF: **Rates of spontaneous mutation.** *Genetics* 1998, **148**(4):1667-1686.
45. Matic I, Radman M, Taddei F, Picard B, Doit C, Bingen E, Denamur E, Elion J: **Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic Escherichia coli.** *Science* 1997, **277**(5333):1833-1834.
46. LeClerc JE, Li B, Payne WL, Cebula TA: **High mutation frequencies among Escherichia coli and Salmonella pathogens.** *Science* 1996, **274**(5290):1208-1211.
47. Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J: **High frequency of hypermutable Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis lung infection.** *Science* 2000, **288**(5469):1251-1254.
48. Taddei F, Radman M, Maynard-Smith J, Toupance B, Gouyon PH, Godelle B: **Role of mutator alleles in adaptive evolution.** *Nature* 1997, **387**(6634):700-702.
49. Cox EC, Horner DL: **DNA sequence and coding properties of mutD(dnaQ) a dominant Escherichia coli mutator gene.** *J Mol Biol* 1986, **190**(1):113-117.
50. Kornberg T, Gefter ML: **Deoxyribonucleic acid synthesis in cell-free extracts. IV. Purification and catalytic properties of deoxyribonucleic acid polymerase III.** *J Biol Chem* 1972, **247**(17):5369-5375.

51. Hsieh P: **Molecular mechanisms of DNA mismatch repair.** *Mutat Res* 2001, **486**(2):71-87.
52. Van Houten B, Croteau DL, DellaVecchia MJ, Wang H, Kisker C: **'Close-fitting sleeves': DNA damage recognition by the UvrABC nuclease system.** *Mutat Res* 2005, **577**(1-2):92-117.
53. Tsai-Wu JJ, Liu HF, Lu AL: **Escherichia coli MutY protein has both N-glycosylase and apurinic/apyrimidinic endonuclease activities on A.C and A.G mispairs.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**(18):8779-8783.
54. Bhagwat AS, Lieb M: **Cooperation and competition in mismatch repair: very short-patch repair and methyl-directed mismatch repair in Escherichia coli.** *Mol Microbiol* 2002, **44**(6):1421-1428.
55. Nowosielska A: **Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 5. The role of recombination in DNA repair and genome stability.** *Acta Biochim Pol* 2007, **54**(3):483-494.
56. Schofield MJ, Hsieh P: **DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function.** *Annu Rev Microbiol* 2003, **57**:579-608.
57. Giraud A, Matic I, Tenailon O, Clara A, Radman M, Fons M, Taddei F: **Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut.** *Science* 2001, **291**(5513):2606-2608.
58. Foster PL: **Stress-induced mutagenesis in bacteria.** *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007, **42**(5):373-397.
59. Radman M: **SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis.** *Basic Life Sci* 1975, **5A**:355-367.
60. Janion C: **Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in Escherichia coli.** *Int J Biol Sci* 2008, **4**(6):338-344.
61. Hengge-Aronis R: **Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2002, **66**(3):373-395, table of contents.
62. Rosen R, Ron EZ: **Proteome analysis in the study of the bacterial heat-shock response.** *Mass Spectrom Rev* 2002, **21**(4):244-265.
63. Magnusson LU, Farewell A, Nystrom T: **ppGpp: a global regulator in Escherichia coli.** *Trends Microbiol* 2005, **13**(5):236-242.
64. Kornberg A, Rao NN, Ault-Riche D: **Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions.** *Annu Rev Biochem* 1999, **68**:89-125.
65. Tippin B, Pham P, Goodman MF: **Error-prone replication for better or worse.** *Trends Microbiol* 2004, **12**(6):288-295.
66. Shee C, Gibson JL, Darrow MC, Gonzalez C, Rosenberg SM: **Impact of a stress-inducible switch to mutagenic repair of DNA breaks on mutation in Escherichia coli.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(33):13659-13664.
67. Andersson DI, Koskiniemi S, Hughes D: **Biological roles of translesion synthesis DNA polymerases in eubacteria.** *Mol Microbiol* 2010, **77**(3):540-548.
68. Tsui HC, Feng G, Winkler ME: **Negative regulation of mutS and mutH repair gene expression by the Hfq and RpoS global regulators of Escherichia coli K-12.** *J Bacteriol* 1997, **179**(23):7476-7487.
69. Naas T, Blot M, Fitch WM, Arber W: **Insertion sequence-related genetic variation in resting Escherichia coli K-12.** *Genetics* 1994, **136**(3):721-730.

70. LaRossa RA: **Mutant selections linking physiology, inhibitors, and genotypes.** In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Edited by Neidhardt FCEiC, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (eds), vol. 2. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1996: 2527-2587.
71. Feher T, Cseh B, Umenhoffer K, Karcagi I, Posfai G: **Characterization of cycA mutants of Escherichia coli. An assay for measuring in vivo mutation rates.** *Mutat Res* 2006, **595**(1-2):184-190.
72. Luria SE, Delbruck M: **Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance.** *Genetics* 1943, **28**(6):491-511.
73. Rood JI, Sneddon MK, Morrison JF: **Instability in tyrR strains of plasmids carrying the tyrosine operon: isolation and characterization of plasmid derivatives with insertions or deletions.** *J Bacteriol* 1980, **144**(2):552-559.
74. Kumar PK, Maschke HE, Friehs K, Schugerl K: **Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors.** *Trends Biotechnol* 1991, **9**(8):279-284.
75. Amster O, Salomon D, Zamir A: **A cloned immunoglobulin cDNA fragment enhances transposition of IS elements into recombinant plasmids.** *Nucleic Acids Res* 1982, **10**(15):4525-4542.
76. Forns X, Bukh J, Purcell RH, Emerson SU: **How Escherichia coli can bias the results of molecular cloning: preferential selection of defective genomes of hepatitis C virus during the cloning procedure.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(25):13909-13914.
77. Durfee T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G, 3rd, Burland V, Mau B, Petrosino JF, Qin X, Muzny DM, Ayele M *et al*: **The complete genome sequence of Escherichia coli DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse.** *J Bacteriol* 2008, **190**(7):2597-2606.
78. Kovarik A, Matzke MA, Matzke AJ, Koulakova B: **Transposition of IS10 from the host Escherichia coli genome to a plasmid may lead to cloning artefacts.** *Mol Genet Genomics* 2001, **266**(2):216-222.
79. Hall BG: **Activation of the bgl operon by adaptive mutation.** *Mol Biol Evol* 1998, **15**(1):1-5.
80. Baum EZ, Bebernitz GA, Gluzman Y: **Isolation of mutants of human immunodeficiency virus protease based on the toxicity of the enzyme in Escherichia coli.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**(14):5573-5577.
81. Blumenthal RM, Cotterman MM: **Isolation of mutants in a DNA methyltransferase through mcrB-mediated restriction.** *Gene* 1988, **74**(1):271-273.
82. Quillardet P, Rouffaud MA, Bouige P: **DNA array analysis of gene expression in response to UV irradiation in Escherichia coli.** *Res Microbiol* 2003, **154**(8):559-572.
83. Fernandez De Henestrosa AR, Ogi T, Aoyagi S, Chafin D, Hayes JJ, Ohmori H, Woodgate R: **Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in Escherichia coli.** *Mol Microbiol* 2000, **35**(6):1560-1572.



84. Wade JT, Reppas NB, Church GM, Struhl K: **Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the Escherichia coli genome and identifies unconventional target sites.** *Genes Dev* 2005, **19**(21):2619-2630.
85. Reuven NB, Arad G, Maor-Shoshani A, Livneh Z: **The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA, and SSB and is specialized for translesion replication.** *J Biol Chem* 1999, **274**(45):31763-31766.
86. Bonner CA, Randall SK, Rayssiguier C, Radman M, Eritja R, Kaplan BE, McEntee K, Goodman MF: **Purification and characterization of an inducible Escherichia coli DNA polymerase capable of insertion and bypass at abasic lesions in DNA.** *J Biol Chem* 1988, **263**(35):18946-18952.
87. Tang M, Pham P, Shen X, Taylor JS, O'Donnell M, Woodgate R, Goodman MF: **Roles of E. coli DNA polymerases IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis.** *Nature* 2000, **404**(6781):1014-1018.
88. Wagner J, Gruz P, Kim SR, Yamada M, Matsui K, Fuchs RP, Nohmi T: **The dinB gene encodes a novel E. coli DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis.** *Mol Cell* 1999, **4**(2):281-286.
89. Napolitano R, Janel-Bintz R, Wagner J, Fuchs RP: **All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis.** *EMBO J* 2000, **19**(22):6259-6265.
90. Frisch RL, Su Y, Thornton PC, Gibson JL, Rosenberg SM, Hastings PJ: **Separate DNA Pol II- and Pol IV-dependent pathways of stress-induced mutation during double-strand-break repair in Escherichia coli are controlled by RpoS.** *J Bacteriol* 2010, **192**(18):4694-4700.
91. Wagner J, Etienne H, Janel-Bintz R, Fuchs RP: **Genetics of mutagenesis in E. coli: various combinations of translesion polymerases (Pol II, IV and V) deal with lesion/sequence context diversity.** *DNA Repair (Amst)* 2002, **1**(2):159-167.
92. Gerdes SY, Scholle MD, Campbell JW, Balazsi G, Ravasz E, Daugherty MD, Somera AL, Kyrpides NC, Anderson I, Gelfand MS *et al*: **Experimental determination and system level analysis of essential genes in Escherichia coli MG1655.** *J Bacteriol* 2003, **185**(19):5673-5684.
93. Yeiser B, Pepper ED, Goodman MF, Finkel SE: **SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(13):8737-8741.
94. Berdichevsky A, Izhar L, Livneh Z: **Error-free recombinational repair predominates over mutagenic translesion replication in E. coli.** *Mol Cell* 2002, **10**(4):917-924.
95. Lin LL, Little JW: **Isolation and characterization of noncleavable (Ind-) mutants of the LexA repressor of Escherichia coli K-12.** *J Bacteriol* 1988, **170**(5):2163-2173.
96. Cirz RT, Chin JK, Andes DR, de Crecy-Lagard V, Craig WA, Romesberg FE: **Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance.** *PLoS Biol* 2005, **3**(6):e176.
97. Posfai G, Kolisnychenko V, Bereczki Z, Blattner FR: **Markerless gene replacement in Escherichia coli stimulated by a double-strand break in the chromosome.** *Nucleic Acids Res* 1999, **27**(22):4409-4415.

98. Hamilton CM, Aldea M, Washburn BK, Babitzke P, Kushner SR: **New method for generating deletions and gene replacements in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 1989, **171**(9):4617-4622.
99. Blomfield IC, Vaughn V, Rest RF, Eisenstein BI: **Allelic exchange in Escherichia coli using the Bacillus subtilis sacB gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon.** *Mol Microbiol* 1991, **5**(6):1447-1457.
100. Link AJ, Phillips D, Church GM: **Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type Escherichia coli: application to open reading frame characterization.** *J Bacteriol* 1997, **179**(20):6228-6237.
101. Frey J, Chandler M, Caro L: **The effects of an Escherichia coli dnaA mutation on the replication of the plasmids colE1 pSC101, R100.1 and RTF-TC.** *Mol Gen Genet* 1979, **174**(2):117-126.
102. Hasunuma K, Sekiguchi M: **Replication of plasmid pSC101 in Escherichia coli K12: requirement for dnaA function.** *Mol Gen Genet* 1977, **154**(3):225-230.
103. Hasunuma K, Sekiguchi M: **Effect of dna mutations on the replication of plasmid pSC101 in Escherichia coli K-12.** *J Bacteriol* 1979, **137**(3):1095-1099.
104. Monteilhet C, Perrin A, Thierry A, Colleaux L, Dujon B: **Purification and characterization of the in vitro activity of I-Sce I, a novel and highly specific endonuclease encoded by a group I intron.** *Nucleic Acids Res* 1990, **18**(6):1407-1413.
105. Dujon B: **Group I introns as mobile genetic elements: facts and mechanistic speculations--a review.** *Gene* 1989, **82**(1):91-114.
106. Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D: **Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**(12):4645-4649.
107. Studier FW, Moffatt BA: **Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.** *J Mol Biol* 1986, **189**(1):113-130.
108. Feher T, Karcagi I, Gyorfy Z, Umenhoffer K, Csorgo B, Posfai G: **Scarless engineering of the Escherichia coli genome.** *Methods Mol Biol* 2008, **416**:251-259.
109. Gay P, Le Coq D, Steinmetz M, Berkelman T, Kado CI: **Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria.** *J Bacteriol* 1985, **164**(2):918-921.
110. Miller JH: **Experiments in Molecular Genetics.** Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1972.
111. Deschamps JR, Miller CE, Ward KB: **Rapid purification of recombinant green fluorescent protein using the hydrophobic properties of an HPLC size-exclusion column.** *Protein Expr Purif* 1995, **6**(4):555-558.
112. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y: **Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea.** *J Cell Comp Physiol* 1962, **59**:223-239.
113. Chen BP, Hai T: **Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using Escherichia coli as host.** *Gene* 1994, **139**(1):73-75.
114. Timar E, Venetianer P, Kiss A: **In vivo DNA protection by relaxed-specificity SinI DNA methyltransferase variants.** *J Bacteriol* 2008, **190**(24):8003-8008.

115. Sambrook J, Fritsch, E.F., Maniatis, T.: **Molecular Cloning. A laboratory manual.** Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1987.
116. Warringer J, Ericson E, Fernandez L, Nerman O, Blomberg A: **High-resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(26):15724-15729.
117. Wargel RJ, Hadur CA, Neuhaus FC: **Mechanism of D-cycloserine action: transport mutants for D-alanine, D-cycloserine, and glycine.** *J Bacteriol* 1971, **105**(3):1028-1035.
118. Holmes RP, Russell RR: **Mutations affecting amino sugar metabolism in Escherichia coli K-12.** *J Bacteriol* 1972, **111**(1):290-291.
119. Sarkar S, Ma WT, Sandri GH: **On fluctuation analysis: a new, simple and efficient method for computing the expected number of mutants.** *Genetica* 1992, **85**(2):173-179.
120. Stewart FM, Gordon DM, Levin BR: **Fluctuation analysis: the probability distribution of the number of mutants under different conditions.** *Genetics* 1990, **124**(1):175-185.
121. Jin DJ, Gross CA: **Mapping and sequencing of mutations in the Escherichia coli rpoB gene that lead to rifampicin resistance.** *J Mol Biol* 1988, **202**(1):45-58.
122. Posfai G, Koob MD, Kirkpatrick HA, Blattner FR: **Versatile insertion plasmids for targeted genome manipulations in bacteria: isolation, deletion, and rescue of the pathogenicity island LEE of the Escherichia coli O157:H7 genome.** *J Bacteriol* 1997, **179**(13):4426-4428.
123. Little JW, Edmiston SH, Pacelli LZ, Mount DW: **Cleavage of the Escherichia coli lexA protein by the recA protease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980, **77**(6):3225-3229.
124. Horii T, Ogawa T, Nakatani T, Hase T, Matsubara H, Ogawa H: **Regulation of SOS functions: purification of E. coli LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein.** *Cell* 1981, **27**(3 Pt 2):515-522.
125. Little JW, Mount DW: **The SOS regulatory system of Escherichia coli.** *Cell* 1982, **29**(1):11-22.
126. Tomasz M, Palom Y: **The mitomycin bio-reductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity.** *Pharmacol Ther* 1997, **76**(1-3):73-87.
127. Hoffmann F, Rinas U: **Stress induced by recombinant protein production in Escherichia coli.** *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2004, **89**:73-92.
128. Gasser B, Saloheimo M, Rinas U, Dragosits M, Rodriguez-Carmona E, Baumann K, Giuliani M, Parrilli E, Branduardi P, Lang C *et al*: **Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview.** *Microb Cell Fact* 2008, **7**:11.
129. Kwok R: **Five hard truths for synthetic biology.** *Nature* 2010, **463**(7279):288-290.
130. Fijalkowska IJ, Dunn RL, Schaaper RM: **Mutants of Escherichia coli with increased fidelity of DNA replication.** *Genetics* 1993, **134**(4):1023-1030.
131. Hastings PJ, Hersh MN, Thornton PC, Fonville NC, Slack A, Frisch RL, Ray MP, Harris RS, Leal SM, Rosenberg SM: **Competition of Escherichia coli DNA**

- polymerases I, II and III with DNA Pol IV in stressed cells.** *PLoS One* 2010, **5**(5):e10862.
132. Lusetti SL, Cox MM: **The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks.** *Annu Rev Biochem* 2002, **71**:71-100.
133. Strauss BS, Roberts R, Francis L, Pouryazdanparast P: **Role of the dinB gene product in spontaneous mutation in Escherichia coli with an impaired replicative polymerase.** *J Bacteriol* 2000, **182**(23):6742-6750.
134. Nowosielska A, Janion C, Grzesiuk E: **Effect of deletion of SOS-induced polymerases, pol II, IV, and V, on spontaneous mutagenesis in Escherichia coli mutD5.** *Environ Mol Mutagen* 2004, **43**(4):226-234.
135. Yamada M, Nunoshiba T, Shimizu M, Gruz P, Kamiya H, Harashima H, Nohmi T: **Involvement of Y-family DNA polymerases in mutagenesis caused by oxidized nucleotides in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 2006, **188**(13):4992-4995.

## Saját publikációk jegyzéke:

1. Csörgő B, Pósfai G: **Directed homologous recombination for genome engineering in Escherichia coli**. *Acta Biol Hung* 2007, **58 Suppl**:1-10.  
I.F.: 0.447
2. Fehér T, Karcagi I, Györfy Z, Umenhoffer K, Csörgő B, Pósfai G: **Scarless engineering of the Escherichia coli genome**. *Methods Mol Biol* 2008, **416**:251-259.
3. Durfee T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G, 3rd, Burland V, Mau B, Petrosino JF, Qin X, Muzny DM, Ayele M, Gibbs RA, Csörgő B, Pósfai G, Weinstock GM, Blattner FR: **The complete genome sequence of Escherichia coli DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse**. *J Bacteriol* 2008, **190**(7):2597-2606.  
I.F.: 4.013
4. Csörgő B, Fehér T, Tímár E, Blattner FR, Pósfai G: **Low-mutation-rate, reduced-genome Escherichia coli: an improved host for faithful maintenance of engineered genetic constructs**. *Microb Cell Fact* 2012, **11**:11.  
I.F.: 4.544
5. Fehér T, Bogos B, Méhi O, Fekete G, Csörgő B, Kovács K, Pósfai G, Papp B, Hurst LD, Pál C: **Competition between transposable elements and mutator genes in bacteria**. *Mol Biol Evol* 2012, Elfogadva.  
I.F.: 5.510

## Összefoglalás

A munkacsoportunkban zajló kutatások az *Escherichia coli* baktérium genomjának precízen megtervezett, nagyléptékű átalakítására irányulnak. Mára számos különböző *E. coli* törzs teljes genomiális DNS-szekvenciája ismert, ezek összehasonlítása azt mutatja, hogy a baktérium kromoszómája egy közös génhalmazból (ún. „mag” genomból) és szigetszerűen beékelődő, horizontális transzferrel szerzett „járulékos” genomból áll. Hipotézisünk szerint ez utóbbi, általában speciális körülményekhez való adaptálódást szolgáló törzsspecifikus gének stabil laboratóriumi körülmények között nélkülözhetők, eltávolításukkal „áramvonalasítani”, metabolikusan egyszerűbbé és hatékonyabbá lehet tenni a sejteket.

Munkánk során megállapítottuk, hogy az ún. „járulékos” genomi elemek (profágok, inszerciós elemek) eltávolításával a baktérium laboratóriumi körülmények között genetikailag stabilabban viselkedik. A genetikai variációt generáló molekuláris mechanizmusok változó körülmények között az alkalmazkodóképesség alapjait jelentik a baktérium számára, ezek teszik lehetővé a populáció hosszú távú túlélését. Stabil, laboratóriumi körülmények között azonban a sejt számára nem létszükséglet a nagyfokú változatosság. Mi több, az újonnan létrejövő, evolvált tulajdonságok kifejezetten hátrányosak lehetnek, ha egy precíz molekuláris és szintetikus biológiai eljárással a sejtbe „szerelt” genetikai konstrukció működéséről, stabilitásáról van szó. A csoportunkban zajló korábbi kutatások során a vad típusú K-12 MG1655 laboratóriumi *E. coli* törzs összes mobilis genetikai elemét sikerült eltávolítani, létrehozva az MDS42 törzset (a szülői vad típusú K-12 MG1655 törzshöz képest 42 deléciót hordozó Multiple-Deletion Series törzs). A mobilis genetikai elemek kiiktatása a sejtben történő mutációgeneráló folyamatok egyik típusát, az IS-elemek okozta inszerciós eseményeket teljesen megszüntette. Az ilyen folyamatoknál azonban jóval gyakoribbak a pontmutációs események. A pontmutációk létrejötte teljes mértékben nem szüntethető meg, azonban bármilyen mértékű csökkentése igen hasznos lehet a sejt különféle felhasználásai során. Kérdés azonban, hogy a sejt nem szenved-e növekedési hátrányt, ha az evolúciósan kialakult, a DNS-hibajavításban is résztvevő pontmutáció-generáló mechanizmusokat kiiktatjuk.

Az *E. coli* pontmutációs rátájának csökkentésére alapvető stratégiánk a sejt SOS-válasza során indukálódó, hatékony mutációgeneráló mechanizmusainak kiiktatása volt. Stressz körülmények között (mint például a sejtben fenntartott toxikus klón esetén) a sejt DNS-e sérüléseket szenvedhet, ez közvetlenül beindítja a sejt SOS-válaszát, melynek során közel 40 gén aktiválódik, felszabadulva a LexA represszor fehérje gátlása alól. Az *E. coli* SOS-válasza során indukált gének közül három is DNS-polimeráz enzimet kódol (Pol II, Pol IV, Pol V); ezek képesek a DNS-sérülések helyén kialakult különböző replikációs akadályokat és elakadt replikációs villákat megkerülni. A Pol IV és Pol V enzimek DNS-szintézisben mutatott hibaszázaléka 2-3 nagyságrenddel nagyobb, mint az általános polimeráz Pol III enzimé, míg a Pol II bizonyos fajta stresszindukált mutagenézises folyamatokban kulcsfontosságú szerepet játszik. Az indukált mutagenézises folyamatában mind a három SOS-indukált DNS-polimeráz szerepe bizonyított, elsődleges szerepük vélhetően a túlélés elősegítése és genetikai változékonyság generálása stressz körülmények alatt.

Az MDS42 törzsből a három, indukálható DNS-polimeráz génjét (*polB*, *dinB*, *umuDC*) egyenként, majd minden lehetséges kombinációban kiejtettük. A polimeráz gének egyenkénti deléciója minden esetben a spontán mutációs ráta legalább 20 %-os csökkenéséhez vezetett. A különböző deléciókat kombinálva a spontán mutációs ráta még tovább csökkent, a tripla deléciós MDS42*polBdinBumuDC* (MDS42pdu) törzs esetén a szülői MDS42-hez képest közel 50 %-os csökkenést mutatott. További vizsgálatainkban elsősorban a mindhárom indukálható DNS-polimeráz nélküli MDS42pdu törzssel foglalkoztunk. A későbbi felhasználások miatt fontos volt meggyőződni arról, hogy az indukálható DNS-polimeráz mentes törzsek alapvető életképességi tulajdonságai szignifikánsan nem romlanak. Az MDS42pdu törzs növekedési rátája és hosszútávú stationer fázisban való túlélése szignifikánsan nem különbözött az MDS42 szülői törzsetől.

A nagy hibaszázalékú DNS-polimerázok transzkripciója stressz hatásra indukálódik, így feltételezhető volt, hogy stressz körülmények között a szülői és a polimerázmentes törzsek mutációs rátájának különbsége fokozódik. A törzsek mutációs rátáit különféle stressz hatások mellett vizsgáltuk: DNS-keresztkötéseket létrehozó antibiotikummal (mitomycin-C) való kezelés, a sejt számára nem toxikus GFP

túltermelése, illetve a sejt számára nagymértékben toxikus fehérje (ORF238) túltermelése. A vad típusú és az indukálható polimerázoktól mentes törzsek mutációs rátája közötti különbségek a stresszhatásokra látványosan fokozódtak. Az összehasonlításként használt laboratóriumi, vad típusú *E. coli* törzsek, illetve az MDS42 törzs mutációs rátája a különböző stresszhatásokra szignifikánsan megnőtt. Hasonló körülmények között az MDS42pdu törzs mutációs rátája stabil volt, szignifikánsan nem változott. Figyelemre méltó, hogy az összes vizsgált törzs közül a leggyakrabban használt fehérjetermelő törzs, a BL21(DE3) spontán mutációs rátája volt a legmagasabb, ráadásul a különböző stresszhatásokra is ennek a törzsnek emelkedett a legnagyobb mértékben a mutagenitása. A toxikus ORF238 fehérje túltermelésekor a BL21(DE3) és MDS42pdu törzsek mutációs rátája között majdnem két nagyságrendbeli különbség volt. Vizsgálatainkból kiderült, hogy a BL21(DE3) törzs emelkedett mutációs rátája főként a fokozott mértékű IS-elem inszerciónak tulajdonítható.

Az MDS42pdu törzs gyakorlati alkalmazási előnyét sikerült kimutatnunk egy fehérjetermelési kísérletben. Ennek során a SinI metiltranszferáz enzimet egy indukálható plazmid konstrukcióról expresszáltattuk. Az M.SinI enzim expresszáltatása növekedésgátlást okoz a gazdasejtben. Egyúttal az enzimet kódoló génben inaktiváló mutációk felszaporodása figyelhető meg. Amikor az MDS42pdu törzsben termeltettük a metiltranszferázt, azt tapasztaltuk, hogy a plazmidon hordozott *sinIM* gén háromszor kisebb frekvenciával szenvedett funkcióvesztéses mutációt, mint az MDS42 törzsben, és ötször kisebb frekvenciával, mint a BL21(DE3)*mcrBC* törzsben. Figyelemre méltó, hogy a BL21(DE3)*mcrBC* törzsben mindössze 16 óra expressziót követően a plazmidokon kódolt *sinIM* gének közel fele funkcióvesztéses mutációt hordozott.

Az M.SinI enzimet expresszáló kultúrákban kialakuló mutált klónok váratlanul magas arányát kizárólagosan nem magyarázza a stresszindukált mutagenézis folyamata. A gazdasejt mutációs ráta értéke (nagyságrendben  $10^{-6}$  mutáció/gén/generáció) nem elég magas, hogy ilyen drámai hatása legyen. A tapasztalt jelenség sokkal inkább a toxikus gént hordozó plazmid növekedésgátló hatásának köszönhető. Az események sorrendje vélhetően a következő: amikor a toxikus gén expresszióját indukáljuk, a sejt növekedése lelassul. Ezzel egy időben, a stressz hatására a mutációs ráta megemelkedik. Mielőtt keletkezik egy olyan mutáns a plazmid populációban, amely nem képes a toxikus fehérjét



termelni, a gazdasejt képes lesz folytatni a normál növekedést, és így a kultúrában dominánssá válik. Az alacsony mutációs rátájú MDS42pdu-ban az inaktiváló mutánsok megjelenése hosszabb időt vesz igénybe, így a sejtek tovább képesek produkálni a funkcióképes toxikus fehérjét.

Az élő gazdasejtben fenntartott szintetikus genetikai konstrukciók mutációja és inaktivációja egy olyan, gyakran figyelmen kívül hagyott probléma, mely gátolhatja különféle komplex biológiai rendszerek létrehozását és fenntartását. Egy génproduktum, amely toxikus vagy metabolikus terhet jelent a gazdasejt számára, olyan evolúciós erőt idéz elő, amely a növekedésgátló hatás alól felszabadító mutánsok szelekciójára irányul. Egy megnövelt genetikai stabilitású gazdasejt (szintetikus biológiai váz = chassis) előnyös lehet az ilyen konstrukciók stabil fenntartásában. Azáltal, hogy az SOS-indukált nagy hibaszázalékú DNS-polimerázokat kiejtettük a mobilis genetikai elemektől mentes MDS42 törzsből, egy klónozási feladatokra eleve előnyös törzs stabilitását sikerült tovább javítani. Az így létrehozott MDS42pdu törzsben egy toxikus fehérjét szignifikánsan stabilabban lehetett expresszálni. Ez a nagy fidelitású, kisebb genetikai variabilitást engedő törzs széleskörű felhasználást nyerhet a terápiás DNS-termeléstől a hosszútávú, folyamatos fermentációs eljárásokig.

## Summary

The focus of our group for the past several years has been the precisely planned, gradual reduction of the genome of the bacteria *Escherichia coli*. Today, the genomes of over one hundred different strains of *E. coli* have been sequenced. Comparison of the genomes revealed that the genome consists of a set of genes common to all of the strains (the so-called “core” genome) and a set of strain-specific genomic islands acquired mainly by horizontal gene transfer (the so-called “peripheral” genome). Our hypothesis was that the elimination of this latter set of strain-specific genes, mainly needed for the niche-specific adaptation of the different strains, was dispensable under stable, laboratory conditions. In fact, the elimination of these peripheral genomic segments could “streamline” the cells in regards to their metabolic simplicity and efficiency.

We have determined through our work that the elimination of these peripheral genomic elements significantly stabilizes the genome of *E. coli* under laboratory conditions. Molecular mechanisms generating genetic diversity are the foundations for evolution under changing conditions, these provide the basis for the survival of the bacterial population. However, under stable, laboratory conditions, the ability to generate large genetic diversity is not a necessity. In fact, novel, evolved features arising in a carefully designed and fabricated system of biological parts can lead to unwanted genotypic and phenotypic alterations, and the spontaneous genetic modification of an established production strain or a clone library is usually highly undesirable. Consequently, whether used as a production strain, a cloning host, or as a synthetic biological chassis, a bacterial cell with increased genetic stability is of great importance. With this goal in mind, the reduced-genome *E. coli* strain MDS42 (Multiple-Deletion Series strain carrying 42 deletions compared to the wild-type K-12 MG1655 parental strain) was constructed in our laboratories. Most genes irrelevant for laboratory applications, as well as all known mobile DNA sequences and cryptic virulence genes were precisely deleted, resulting in a genetically stabilized strain that displays several advantageous properties. By deleting all mobile genetic elements, the entire insertion class of mutations could be eliminated from the cells. However, point mutations represent a much more common source of genetic diversity in bacterial cells. Unlike insertional

events, all point mutations within the cell cannot entirely be eliminated. Nonetheless, any reduction in the rate of point mutations would still be advantageous for the various applications of the cell.

Our strategy for reducing point mutation rate in *E. coli* involved disabling the effective mutation generating enzymes of the SOS response. Under stressful conditions (e.g., toxic clones harbored in the cell), DNA damage may occur, activating the SOS response, inducing approximately 40 members of the SOS regulon. Three of the genes induced during the SOS response of *E. coli* encode DNA polymerases (Pol II, Pol IV, Pol V) that are able to bypass replication barriers at damaged sites and stalled replication forks. All three of the SOS-inducible polymerases have been implicated in induced mutagenesis, with Pol IV and Pol V having error-rates approximately 2 to 3 orders of magnitude higher than the high-fidelity replicative polymerase (Pol III). Pol II, while showing high fidelity on undamaged templates, was shown to take part in certain types of stress-induced mutagenesis. The SOS-regulated, pointmutation-generating polymerases are dispensable; their primary role seems to be the generation of genetic diversity under stressful conditions. However, it was unclear whether elimination of these polymerases, components of the DNA repair mechanisms, results in growth defects, particularly under stress.

The genes coding for the three inducible DNA polymerases (*polB*, *dinB*, *umuDC*) were deleted from the genome of MDS42 in a scarless manner using a suicide plasmid-based method. Gene deletions were made individually and also in all possible combinations. The deletion of each error-prone polymerase gene by itself resulted in at least a 20 % decrease in spontaneous mutation rate. When combining the different deletions, the mutation rate decreased even further, the spontaneous mutation rate of the triple deletion strain *MDS42polBdinBumuDC* (MDS42pdu) was approximately 50 % lower than that of the parental MDS42 strain. It is important to note that the basic fitness properties of the MDS42pdu strain, such as growth rate and survival during long-term stationary phase were not significantly different from those of its parental MDS42 strain.

Due to the stress-induced nature of the error-prone DNA polymerases, it was expected that the difference in mutation rates of the polymerase-free and the parent strain would be even more pronounced under stressful conditions. A sub-inhibitory

concentration of the SOS response-activating mitomycin-C, overproduction of either the non-toxic GFP protein or of the highly toxic ORF238 hydrophobic protein all significantly increased the mutation rate of MDS42. The values for MDS42pdu remained stable under the same conditions. It is also noteworthy, that among the strains tested, the commonly used production strain BL21(DE3) showed not just the highest spontaneous mutation rate, but also the highest increase in mutation rates in response to the various stresses. A difference of almost two orders of magnitude was observed between the mutation rate of BL21(DE3) and MDS42pdu when overproducing the toxic ORF238 protein. This elevated rate of mutation in BL21(DE3) can be mostly attributed to an increased rate of IS insertions.

A clear practical advantage of working with MDS42pdu was demonstrated in a protein production experiment, where the SinI methyltransferase was expressed from an inducible plasmid construct. M.SinI, producing 5-methylcytosines is toxic to cells that carry the McrBC endonuclease. Even in cells lacking McrBC, we observed a negative effect on cell fitness. When M.SinI was produced, we found that the *sinIM* gene, carried on a plasmid, acquired loss-of-function mutations approximately three times less frequently in MDS42pdu than in MDS42, and over five times less frequently than in BL21(DE3)*mcrBC*. Remarkably, after only 16 hours of production in BL21(DE3)*mcrBC*, almost half of all *sinIM* genes encoded on the plasmids had suffered a disabling mutation.

Clearly, the unexpectedly high ratio of mutated clones in the M.SinI-expressing culture cannot be explained solely by the stress-induced mutagenesis, the overall mutation rate of which being too low in absolute values (in the order of  $10^{-6}$  mutations/gene/generation) to cause such a dramatic effect. Rather, the phenomenon is in large part due to the growth inhibitory effect of the plasmid carrying the toxic gene. The chain of events could be the following: Upon induction of expression of the toxic gene, growth rate of the cell is reduced. At the same time, mutation rate is increased by the stress. Once a mutant, not producing the toxic protein, arises in the plasmid population, the cell harboring it can resume normal growth and become dominant in the culture. In low-mutation-rate MDS42pdu, appearance of such mutants is delayed, and the cells can produce the functional toxic protein for an extended period of time.

The mutation and inactivation of engineered genetic constructs within a host cell is an overlooked problem that may have serious detrimental effects on the success of any synthetic biological, molecular biological or biotechnological process. A gene product imposing a metabolic burden or being toxic to the host drives an evolutionary force that selects for any mutants that alleviate the growth-inhibiting effect. A host cell or chassis with enhanced genetic stability is advantageous in the stable maintenance of these constructs. By eliminating the inducible DNA polymerase enzymes from the reduced-genome MDS42 strain lacking all genomic IS elements, we have further stabilized a strain that already showed clear advantages in cloning applications. The resulting MDS42pdu strain had a significant stabilizing effect on a toxic protein expression clone. This high-fidelity strain, producing decreased genetic variation in the culture, might also prove useful in applications ranging from the production of DNA therapeutics to long-term continuous fermentation processes.