

Ph.D. értekezés tézisei

**A fenotípusos heterogenitás szerepe és
jelentősége az adaptív folyamatokban**

Bódi Zoltán

Témavezető: Dr. Pál Csaba

**Biológia Doktori Iskola
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Biokémia Intézet
SZTE-TTIK
Szeged
2017**

Bevezetés

Egyes hipotézisek - amelyek főleg elméleti munkákból származnak - azt feltételezik, hogy a heterogenitás által generált fenotípus változatok megelőzik és táptalajául szolgálnak ritka genetikai variánsok megjelenésének. Bizonyos vélekedés szerint a heterogenitás azonban az evolúció mellékterméke és jelentősége kimerül a szélsőséges fenotípusú egyedek generálásából, amelyekben magas illetve alacsony az adott, akár túlélést biztosító, jelleg kifejeződése. Ebből adódik a kérdés, hogy vajon egy populáció, amely csak az egyik szélsőséget képviselő egyedekből áll (pl. csak magas intenzitással kifejezőkből) nagyobb túlélő potenciállal rendelkezik-e egy heterogén populációhoz képest olyan körülmények között, ahol az adott jelleg a túlélést biztosítaná? Képes a heterogenitás alakítani az adaptációt és segíteni komplex fenotípusok kialakulását?

Célkitűzés

Doktori munkám során a fő célom volt azt bebizonyítani, hogy a fenotípusos heterogenitás nemcsak egy fluktuáló környezetekben befolyásolja a túlélést, hanem hosszú távon is hatással van az adaptációra. A célunk elérése érdekében integráltuk a szintetikus biológia, a kísérleti evolúció és a genomikai analízisek eszköztárát. Az általunk használt kísérleti rendszerben a sejttájak véletlenszerű változásából származó fenotípusos heterogenitást és az így létrejött fenotípus változatoknak a túlélésre gyakorolt hatását vizsgáltuk káros illetve optimális környezetben.

Módszerek:

Klasszikus mikrobiológiai módszerek:

- Élesztő törzsek fenntartása
- Laboratóriumi evolúció a sejtpopulációk sorozatos átoltásával (kihalási ráta és adaptációs ráta mérése)

Molekuláris módszerek:

- Klónozás
- Totál nukleinsav izolálás élesztő sejtekből
- Plazmid DNS izolálás baktérium sejtekből
- Baktérium sejtek elektroporálása
- Élesztő törzsek transzformálása allél kicserélődéssel
- Promóter csere double-joint PCR technikával
- Élesztő törzsek genetikai módosítása CRISPR-Cas9 által szabályozott protokoll segítségével
- Kapilláris és teljes genom szekvenálás (Illumina platform)

Élesztő törzsek karakterizálása:

- sztenderd áramlási citometria az élesztő populációk Pdr5p-GFP fluoreszcencia eloszlásának mérésére
- populáció méret meghatározás
- mutációs ráta becslés sztenderd fluktuációs teszt alapján (spontán kialakuló kanavanin rezisztencia mérése)

- flukonazol minimum gátlási koncentráció (MIC) érték meghatározása sztenderd lineáris hígítási sor segítségével 96-lyukú lemezen
- élesztő törzsek nagy átteresztőképességű rátermettség becslése 384-lyukú lemezen a folyadéktenyészetek 600 nm-en mért optikai denzitásának nyomonkövetésével

Eredmények

1. A fenotípusos heterogenitás kialakításáért felelős modell rendszer létrehozása

Egy antifungális szerrel szembeni rezisztencia kialakulásában szerepet játszó gén (*PDR5*) által kódolt pumpafehérje mennyiségének és populáción belüli eloszlásának a pontos szabályozásához két szintetikus genetikai szabályozókört juttattunk be az alap élesztő törzsbe. A két konstrukció között a fő különbséget egy pozitív visszacsatolási kör megléte jelentette, amely a Pdr5p-GFP fúziós fehérje mennyiségének populáción belüli eloszlására volt hatással. A pozitív visszacsatolási

kört nem tartalmazó (NPV) törzs populációjában a legtöbb sejt hasonló mennyiségű pumpafehérjét termelt, amely homogén eloszláshoz vezetett. Ezzel szemben a pozitív visszacsatolási kört (PV) hordozó törzs esetén bizonyos sejtek kisebb, míg más sejtek nagyobb mennyiségben termelték meg a pumpafehérjét, amely egy heterogén eloszláshoz vezetett a populációban. Ez a kísérleti felálláslehetővé tette a heterogenitás evolúcióban betöltött szerepének és a háttérben álló mechanizmusoknak a vizsgálatát.

2. A fenotípusos heterogenitás hozzájárul az adaptáció sikeréhez

A fenotípusos heterogenitás flukonazolhoz történő adaptáció során betöltött szerepét két hosszú távú evolúcióban vizsgáltuk két olyan alap törzset felhasználva, amelyekben eltérő volt a pumpafehérje mennyiségének heterogenitása. Az első kísérleti evolúcióban a kihalási rátát vizsgáltuk: a flukonazol lépcsőzetesen emelkedő dózisa mellett a heterogén populációk túlélési aránya nagyobb volt, mint a kis

heterogenitású populációké, amelyek közül szignifikánsan több haltak ki. A második kísérleti evolúcióban az egységnyi idő alatt elért rezisztencia szintet hasonlítottuk össze: az evolúció végére a heterogén populációk szignifikánsan magasabb rezisztencia-szintet értek el, mint a kis heterogenitású populációk. Ezen eredmények fényében kijelenthetjük, hogy a fenotípusos heterogenitás valóban képes az adaptáció kimenetelét és sikerét befolyásolni. A továbbiakban célunk volt, hogy a háttérben álló mechanizmusokat felderítsük.

3. A fenotípusos heterogenitás nem befolyásolja a mutációs készletet

Általánosságban véve az adaptáció sikere a szerzett mutációk számától, illetve azok előnyös hatásának mértékétől függhet. Egy adott populáción belül az előnyös mutációk megjelenését a mutációk kialakulásának frekvenciája és a populáció méret együtt határozza meg. Ennek értelmében az egyik lehetséges mód, amelyen keresztül a fenotípusos heterogenitás

hatással lehet az adaptáció kimenetelére, az a mutációs készlet nagyságának befolyásolása a populáció méret vagy a mutációs ráta mértékének megváltoztatásán keresztül.

A két eltérő heterogenitású törzs populáció mérete között nem volt szignifikáns eltérés. Ezen kívül bebizonyosodott, hogy a heterogén populáció sikerének hátterében nem a mutációs ráta lokális vagy globális emelkedése áll. A kísérleti evolúciót mutátor fenotípusú törzsekkel is elvégezve az volt megfigyelhető, hogy a 10-szeresen megemelt mutációs rátával rendelkező alacsony heterogenitású populáció nem érte el a nagyságrendekkel kisebb mutációs rátával rendelkező, de magas heterogenitású törzs rezisztencia szintjét. Ezen eredmények alapján kijelenthető, hogy az evolúció folyamata során a mutációk számának pusztán növelése nem feltétlen biztosít magasabb adaptációs képességet, a mutációk számánál ugyanis jóval fontosabb a szerzett mutációk hatása a törzsek rátermettségére.

4. A fenotípusos heterogenitás befolyásolja a szerzett mutációk hatásait

A Pdr5p-GFP mennyiségi eloszlásának módosításával megvizsgáltuk, hogy a fenotípusos heterogenitás a szerzett mutációk előnyös hatásainak befolyásolásával biztosítja-e az adaptáció sikerességét. Első körben a kiindulási (ős) törzsekben a szintetikus konstrukciók központi elemének számító *PDR5* génbe egy véletlenszerűen kiválasztott, az adaptáció során megjelent aminosav cserével járó mutációt (His595Asp) építettünk be és vizsgáltuk meg annak hatását. Az elvártaknak megfelelően a mutáció bevitele mindkét genetikai háttérben növelte a flukonazol toleranciát, viszont a rezisztencia növekedésének mértéke a két háttéren szignifikáns eltérést mutatott a heterogén törzs javára.

A következő lépésben a genomban felhalmozódott mutációk hatását vizsgáltuk meg kis heterogenitású *PDR5* génkifejeződés mellett. Az evolált törzsekben a heterogenitás lecsökkentésének a legegyszerűbb módja az annak a kialakulásáért felelős

szintetikus konstrukció módosítása volt a pozitív visszacsatolási kör megszüntetésével. Ennek következtében az evolvált vonalakban a pumpafehérje mennyiségének populáció-szintű átlaga nem változott, azonban annak széles eloszlása jelentős mértékben lecsökkent, és hasonló képet mutatott, mint az eredeti, kis heterogenitású törzsben. Az evolvált vonalak rezisztencia-szintje a heterogenitás lecsökkentése után jelentősen visszaesett, ami arra enged következtetni, hogy a fenotípusos heterogenitás valóban képes befolyásolni az evolúció során felhalmozódott adaptív mutációk hatását. Ezt követően megvizsgáltuk azt, hogy a pumpafehérje mennyiségének a növelése a heterogenitás csökkentése mellett hogyan befolyásolja a szerzett rezisztenciát. Mind az emelt pumpafehérje mennyiség, mind annak túltermelése alacsonyabb rezisztencia-szintet eredményezett az adaptív mutációkat hordozó törzsekben, mint amit a törzsek az eredeti heterogén állapotban értek.

5. A fenotípusos heterogenitás a szerzett rezisztencia költségét képes csökkenteni

Milyen mechanizmuson keresztül képes a fenotípusos heterogenitás a mutációk előnyös hatását fokozni? A rezisztencia mechanizmusok magas intenzitású génkifejeződése a stressz faktor jelenlétében ugyan növeli a túlélés esélyét, azonban zavartalan környezetben költséges a fenntartásuk. Az adaptáció során ezért fontos szerep juthat egy mechanizmusnak, amely képes lehet csökkenteni a magas rezisztenciával járó költségeket anélkül, hogy megzavarná a túlélést biztosító mechanizmus működését. Feltételezésünk szerint a fenotípusos heterogenitás egy ehhez hasonló rendszert képez, amely egy optimális állapot létrehozásával képes a túlélés biztosítására és a vele járó többlet költség kezelésére. Ezáltal előnyben lehet egy olyan rendszerrel szemben, amely folyamatosan magas intenzitású génkifejeződést biztosít a vele járó költség kezelése nélkül. Valóban, a kísérleteink során létrehozott három Pdr5p-GFP termelő állapot közül az eredeti heterogén állapotban lévő populáció rátermettsége bizonyult a

legnagyobbak az alkalmazott flukonazol széles koncentráció-skálája mellett. A Pdr5p túltermelése az eredeti (ős) törzsekben ugyan az elvártaknak megfelelően növelte a rezisztencia szintet, azonban a rezisztencia mutáció(ka)t hordozó törzsekben a pumpa túltermelése a heterogén állapothoz képest számos flukonazol koncentráció mellett is alacsonyabb rátermettséget eredményezett, valószínűsíthetően a magas intenzitású génkifejeződés fokozott költsége miatt.

Összefoglalás

Eredményeink alapján a fenotípusos heterogenitás valóban befolyásolni tudja az evolúció irányát és ezzel képes gyorsítani az adaptációs folyamatokat káros környezetben. Képes egy egyensúlyt kialakítani a szerzett mutációk előnyös és káros hatásai között, ezáltal létrehozva egy speciális állapotot, ahol ezen hatások eredője a legkedvezőbb. Az eredmények tükrében a bizonyos jellegek nagyobb heterogenitása felé irányuló szelekciós nyomás akár komplex fenotípus jellegek kialakulását is lehetővé teheti, amelyekhez gyakran csak

több, kevésbé előnyös vagy akár káros átmeneti lépés vezetne. A heterogenitás ezen lépések számának csökkentésével, illetve azok életképességre gyakorolt negatív hatásának tompításával lehet képes felgyorsítani az adaptációt.

Referált folyóiratban megjelent közlemények:

MTMT azonosító: 10052465

1.1 A disszertáció témájához kapcsolódó közlemény:

Bódi Z, Farkas Z, Nevozhay D, Kalapis D, Lázár V, Csörgő B, Nyerges A, Szamecz B, Fekete G, Papp B, Araujo H, Oliveira JL, Moura G, Santos MAS, Székely T, Balácsi G, Pál Cs. **Phenotypic heterogeneity promotes adaptive evolution** PLOS BIOLOGY 15:(5) Paper e2000644. 26 p. (2017)
IF: 9,797

1.2 Egyéb közlemények:

1. Diao JC, Charlebois DA, Nevozhay D, Bódi Z, Pál Cs, Balácsi G. **Efflux Pump Control Alters Synthetic Gene Circuit Function** ACS SYNTHETIC BIOLOGY 5:(7) pp. 619-631. (2016)
IF: 5,382
2. Kalapis D, Bezerra AR, Farkas Z, Horváth P, Bódi Z, Daraba A, Szamecz B, Gut I, Bayes M, Santos MAS, Pál Cs. **Evolution of Robustness to Protein Mistranslation by Accelerated Protein Turnover** PLOS BIOLOGY 13:(11) Paper e1002291. 28 p. (2015)
IF: 8,66