

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Kompenzáló evolúció, a morfológiai újítások hajtóereje

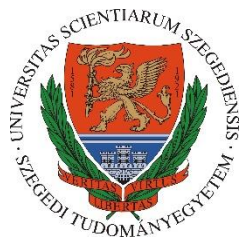
A Ph.D. disszertáció tézisei

Sarkadi Zsuzsa

Témavezető:

Papp Balázs PhD

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet
Szintetikus és Rendszerbiológiai Egység



Szeged

2022

Publikációk és konferencia részvételek

A disszertációhoz kapcsolódó publikáció:

Farkas, Z. †, Kovács, K. †, **Sarkadi, Z.** †, Kalapis, D., Fekete, G., Birtyik, F., Ayaydin, F., Molnár, C., Horváth, P., Pál, C. and Papp, B. (2022). Gene loss and compensatory evolution promotes the emergence of morphological novelties in budding yeast. *Nat. Ecol. Evol.* 1–11.

<https://doi.org/10.1038/s41559-022-01730-1>.

† A szerzők azonos mértékben járultak a munkához

Konferencia részvétel:

Z. Sarkadi*, Z. Farkas, K. Kovács, G. Fekete, C. Molnár, P. Horváth, D. Kalapis, Z. Bódi, C. Pál, B. Papp, Compensatory Mutations Drive Morphological Evolution, SMBE (Society for Molecular Biology and Evolution) in Manchester, UK, 23 July 2019.

Zsuzsa Sarkadi, Zoltán Farkas, Károly Kovács, Gergely Fekete, Dorottya Kalapis, Fanni Birtyik, Csaba Molnár, Péter Horváth, Ferhan Ayaydin, Csaba Pál, Balázs Papp, Deleterious mutations as drivers of morphological evolution, EMBL Conference: Molecular Mechanisms in Evolution and Ecology, 30 Sep - 2 Oct 2020.

A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk:

E. T. S. van, M. Forn, I. Forne, **Z. Sarkadi**, M. Capella, L. M. Caballero, S. Fischer-Burkart, C. Broenner, M. Simonetta, D. Toczyski, M. Halic, A. Imhof, and S. Braun, “Shelterin and subtelomeric DNA sequences control nucleosome maintenance and genome stability,” *EMBO REPORTS*, vol. 20, no. 1, 2019.

R. R. Barrales, M. Forn, P. R. Georgescu, **Z. Sarkadi**, and S. Braun, “Control of heterochromatin localization and silencing by the nuclear membrane protein Lem2,” *GENES & DEVELOPMENT*, vol. 30, no. 2, pp. 133–148, 2016.

Z. Sarkadi and M. Babits, “A megtermékenyülés és a spermiumalagút,” *TERMÉSZET VILÁGA*, vol. 135, no. 6, pp. 259–262, 2004.

Bevezetés

Közismert, hogy a mikróbák változatos morfológiával rendelkeznek, azonban az ezt kialakító evolúciós folyamatok még kevésbé ismertek. A hagyományos nézet szerint a morfológia a változó környezethez igazodik. Nemrég azonban olyan tanulmányok jelentek meg, amik azt sejtetik, hogy nem csak a környezet, hanem más szelekciós nyomások is alakítják a morfológiát. Ebben a munkában egy olyan alternatív hipotézist állítottunk fel, amikor a szelekciós nyomás azáltal jelenik meg, hogy egy káros mutáció lecsökkenti a rátermettséget. A káros mutációk hatását specifikus kompenzáló mutációk ellensúlyozhatják, amelyek a genom más pontjain jelennek meg. Ezt a jelenséget kompenzáló evolúciónak nevezzük. Ezek a kompenzáló mutációk morfológiai változásokhoz vezethetnek, amelyek anélkül jelennek meg, hogy közvetlen szelekció történt volna rájuk.

Hipotézisünk teszteléséhez egy olyan haploid izogenikus *Saccharomyces cerevisiae* törzsszettet használtunk, amely kompenzáló evolúción ment keresztül a laboratóriumban ¹. Minden egyes törzs kezdetben egy-egy olyan géndeléciót hordozott, amely lelassította a növekedést. Ezek a gének eredetileg változatos biológiai folyamatokban vettek részt. A jelen munkában 86 lassú növekedésű géndeléciós törzs, és a hozzájuk tartozó 142 parallel evolvált vonal (kompenzált törzsek) morfológiáját vizsgáltuk. Először az egysejtes morfológiát mértük, amely számos olyan sejtbiológiai folyamatot tükröz, mint például a sejtméret szabályozása, sejtciklus lefolyása és a sejtpolaritás kialakulása ². Továbbá, olyan többsejtű morfológia típusokat is vizsgáltunk, mint az invazív növekedés, a biofilm képződés és a fűtösödés. Klinikailag fontos többsejtű formák az invazív növekedés és a biofilm, mert ezek virulencia faktorok számos patogén gombában.

Célkitűzések

1. Nagy áteresztő-képességű mikroszkópiát és automatikus képelemzést felhasználva, egysejt-morfológiai méréseket végeztünk, amivel szisztematikusan teszteltük, hogy a kompenzáló evolúció létrehoz-e új morfológiákat (morfotípusokat).
2. A géndeléciós és kompenzált törzsek sejtciklusát flow citometriával mérve vizsgáltuk, hogy a sejtciklus fázis változások összefüggnek-e olyan egysejt-morfológiai jegyekkel, mint a sejt méret és a sejt-megnyúltság.
3. Három ökológiailag jelentős többsejtű formát kiválasztva teszteltük, hogy a kompenzáló evolúció hozzájárul-e az invazív növekedés, a fűtösödés és a biofilm képződés megjelenéséhez.
4. Természetből származó *S. cerevisiae* törzsek egysejtes és többsejtes morfológiáját mérve azt vizsgáltuk, hogy vajon a természetes törzsek morfológiája összehasonlítható-e a laboratóriumban evolváló törzsekével.
5. Végül két példán keresztül, genetikai interakciót mérve teszteltük, hogy van-e episztázis a géndeléción és a kompenzáló mutáció között a morfológia szintjén.

Módszerek, amiket használtam

1. **Nagy áteresztőképességű DNS tartalom mérése.** Annak érdekében, hogy kizárjuk az elemzésekből azokat a törzseket, amelyek diploiddá váltak az evolúciós kísérlet során, lemértük a törzsszett ploiditását SYTOX™ Green festést követően flow citometriát alkalmazva.
2. **Sejtciklus analízis flow citometriával.** A kompenzáló evolúció során bekövetkezett sejtciklus fázis változásokat úgy határoztuk meg, hogy a fent említett SYTOX™ Green festés és flow citometria után a sejteket G1, S és G2/M fázisokba soroltuk, majd megállapítottuk a sejtek relatív mennyiségét a fázisok között.
3. **Géndeléción és specifikus pontmutáció létrehozása.** Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a genetikai interakciót a $\Delta rpb9$ és a $\Delta whi2$ között a sejt megnyúltság tekintetében, deletáltuk a *WHI2* gént a vad típusú és a $\Delta rpb9$ háttéren. A *whi2::NatMX* deléciós kazetta homológ recombinációval integrálódott a vad típusú *WHI2* gén helyére. Abból a célból, hogy megvizsgáljuk a genetikai interakciót a $\Delta bub3$ és a *SWE1(Y332S)* kompenzáló mutáció között az invazív növekedést tekintve, létrehoztuk a *SWE1(Y332S)*

pontmutációt a vad típusú és a *Δbub3* háttéren. A pontmutáció létrehozásához a *delitto perfetto* módszert használtuk.

4. **Invazív növekedés kvantitatív vizsgálata.** Egy nagy-áteresztőképességű módszert fejlesztettünk ki az invazív növekedés vizsgálatára. A módszer során az agar felszínén nőtt telepeket lemostuk, majd a mosás után megmaradt, agarba ágyazódott sejtek arányát megbecsültük. Ehhez egy erre a célra kifejlesztett képelemző programot használtunk.
5. **A többsejtes aggregátumok detektálása kvantitatív ülepedési vizsgálattal.** A törzsek ülepedését abból a célból vizsgáltuk, hogy megállapítsuk, hogy képesek-e többsejtű struktúrákat (sejt-aggregátumokat vagy fűrtöket) létrehozni. A leülepedett sejtek arányát egy képelemző módszer segítségével becsültük meg, majd az aggregátumok jelenlétét mikroszkópiával ellenőriztük. Annak eldöntésére, hogy az aggregátumok flokkuláció (kálcium függő folyamat) útján jönnek-e létre, vagy inkább a sarjsejt befejezetlen leválása által, egy ún. deflokkulációs vizsgálatot végeztünk. A módszer során EDTA oldatot adtunk a sejtekhez, amely megköti a kalciumot.
6. **Biofilm képződés kvantitatív vizsgálata.** Abból a célból, hogy megbecsüljük a kiinduló deléciós és a kompenzált vonalak biofilm képző képességét, a törzseket lágyagar (0.3%) lemezeken növesztettük. Ezután fotót készítettünk a lemezekről, és a biofilm területét egy képelemző software segítségével megbecsültük.

Eredmények

1. A sejt morfológia gyors evolúciója a laboratóriumban

A kompenzált törzsek egysejt-morfológiáját mérve, azt találtuk, hogy a vad típusú morfológia csak ritkán állt vissza (15%), amíg az esetek 46%-ban a kompenzált törzsek egysejt-morfológiája jelentősen eltért a vad típusától és a kezdeti deléciós törzsétől. A sejt méret és a sejt megnyúltsága különösen nagymértékben változott. Továbbá, a kompenzált törzsek egy bizonyos csoportjánál a sarjsejt által bezárt szög nagymértékben lecsökkent, ami arra utal, hogy a sarjadzás pozíciója megváltozott az anyasejten. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a génvesztést követő kompenzáló evolúció elősegíti a morfológiai jegyek változását, megtartva a vad típusú fitnesszt.

2. A kompenzáló evolúció sejtciklus változáshoz vezethet

A kompenzált törzsek sejtciklus fázis vizsgálata során azt találtuk, hogy a törzsek 32%-ában jelentősen megváltozott a G1 fázisban tartózkodó sejtek aránya. A törzsek 42%-ában pedig a G2 fázisban lévő sejtek aránya változott meg. Továbbá, korábban kimutatták, hogy a G2 fázis relatív hossza befolyásolja a sarjsejt megnyúltságát ³. Ezzel megegyezően azt tapasztaltuk, hogy pozitív korreláció van a G2 arány és a sejt-megnyúltság illetve a sarjsejt-megnyúltság között.

3. Többsejtes formák gyors evolúciója

Három többsejtes formát vizsgátunk: invazív növekedést, biofilm képződést és fűtösödést. A laboratóriumi vad típusú törzsünk nem képes invazív növekedésre vagy fűtösödésre, és 50%-kal kisebb biofilmet képez, mint a pozitív kontrol törzs. Ezért ez a laboratóriumi törzs ideális modell arra, hogy ezen többsejtű formák megjelenését tanulmányozzuk. Összességében, a kompenzált törzsek 23.4%-a mutatott legalább egy többsejtes fenotípusban megnövekedett képességet. Ezen felül, természetes izolátumok invazív növekedését vizsgálva, azt tapasztaltuk, hogy a kompenzált törzseknél az invazivitás mértéke eléri a természetes törzsekben mért tartomány 50%-át. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a kompenzáló evolúciónak meghatározó szerepe van a többsejtes morfológiák kialakulásában.

4. Összehasonlítható morfológiai változatosság a kompenzált és természetes törzsekben

Három morfológiai jegyet kiválasztva – sejt méret, sejt megnyúltság és sarjsejt pozíciója – összehasonlítottuk 29 természetes *S. cerevisiae* törzs morfológiáját a kompenzált törzsekével. Azt találtuk, hogy a morfológiai diverzitás mértéke a laboratóriumban evolváló törzseknél hasonló volt ahhoz, mint amit a természetes törzseknél tapasztaltunk. Ez az eredmény elég meglepő, mert a természetes izolátumok $\sim 10^2$ - 10^5 mutációban térnek el egymástól, amíg a kompenzált törzsek csak ~ 6 mutációban különböznek. Tehát úgy látjuk, hogy a kompenzáló evolúció rendkívül gyorsan eredményez morfológiai diverzitást a laboratóriumban.

5. Szinergisztikus episztázis a morfológia szintjén

A gendeláció és a kompenzáló mutáció közötti genetikai interakciót mérve azt találtuk, hogy szinergisztikus interakció van mind a két vizsgált esetben. Az egyik kompenzált törzs esetében a megnyúlt sejt morfológiát az *RPB9* RNS polimeráz alegységet kódoló gén deléciója és a *WHI2* génben (TOR útvonal negatív regulátora) történt kompenzáló mutáció szinergisztikus

kölcsönhatása eredményezi. Egy másik kompenzált törzsnél pedig az invazív növekedést vizsgálva azt találtuk, hogy a *BUB3* mitotikus checkpoint fehérjét kódoló gén deléciója szintén szinergisztikus kölcsönhatást mutat a *SWE1* génben (morfogenezis checkpoint fehérje) történt kompenzáló mutációval.

Összefoglalva, azt találtuk, hogy a káros génvesztések új egysejtes és többsejtes morfológiák megjelenését indukálják, és hogy ezek a kompenzáló evolúció melléktermékeként jelennek meg. A munkánk megmutatja, hogy a káros mutációknak konstruktív szerepe van a morfológia evolúciójában, mégpedig olyan evolúciós útvonalakat nyitnak meg, amelyek más módon nem lennének hozzáférhetőek.

Referencia

1. Szamecz, B., Boross, G., Kalapis, D., Kovács, K., Fekete, G., Farkas, Z., Lázár, V., Hrtyan, M., Kemmeren, P., Koerkamp, M.J.A.G., et al. (2014). The Genomic Landscape of Compensatory Evolution. *PLOS Biology* 12, e1001935. 10.1371/journal.pbio.1001935.
2. Ohya, Y., Sese, J., Yukawa, M., Sano, F., Nakatani, Y., Saito, T.L., Saka, A., Fukuda, T., Ishihara, S., Oka, S., et al. (2005). High-dimensional and large-scale phenotyping of yeast mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 19015–19020. 10.1073/pnas.0509436102.
3. Watanabe, M., Watanabe, D., Nogami, S., Morishita, S., and Ohya, Y. (2009). Comprehensive and quantitative analysis of yeast deletion mutants defective in apical and isotropic bud growth. *Curr Genet* 55, 365–380. 10.1007/s00294-009-0251-0.