

A fitness-maximalizáló genomredukció lehetőségei *Escherichia coli* baktériumban

PhD értekezés tézisei

Vernyik Viktor

Témavezető:

Dr. Pósfai György

tudományos tanácsadó



Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet

Eötvös Loránd Kutatási Hálózat (ELKH)

2022

Szeged

Bevezetés

A genomredukció, vagyis az ősi génkészlet csökkenése egy természetes evolúciós folyamat. Jellemzően endoszimbionta és intracelluláris parazita baktériumok mutatják ezt a jelenséget, de szabadon élő tengeri mikroorganizmusok között is előfordulnak redukált genomú szervezetek. A genomcsökkenéshez neutrális és adaptív folyamatok is hozzájárulhatnak. Kisméretű populációkban a genetikai sodródás lehet a meghatározó tényező, a tengervizekben nagy tömegben jelen lévő mikrobákban viszont szerepe lehet a szelekciónak, amely valószínűleg közvetlenül a genom csökkentésére hat. A jelenség mögött a replikációs költségminimalizálás vagy a DNS mennyiségének csökkenésével járó felszín-térfogat arány növekedése állhat, ami a tápanyagok hatékonyabb transzportjához járulhat hozzá. Mindemellett bizonyos génszakaszok elvesztése bizonyos körülmények között növekedési előnyhöz juttathatja a baktériumot. Továbbá fitnesselőnyt jelenthet a csökkent fehérjeszintézis-igényből eredő energetikai nyereség.

A természetben megfigyelhető folyamatok mintául szolgálnak a mesterséges, laboratóriumi körülmények között történő genomredukciós törekvések számára. A csoportunk úttörő munkáját követően számos genomcsökkentéssel foglalkozó tanulmány született *E. coli*, de más mikroorganizmusok felhasználásával is. A genomcsökkentéssel foglalkozó projekteket alapkutatói és biotechnológiai célok motiválják. Alapfeltevésük, hogy laboratóriumi és ipari körülmények mellett sürgősen azok a gének, amelyek csak bizonyos, a természetben előforduló körülmények közötti túlélést szolgálják. Így eltávolításuk csökkent komplexitású, magasabb genetikai stabilitású és gazdaságosabb működésű sejtek létrejöttét eredményezheti. Az említett előnyök közül a gazdaságosabb növekedésre nem találunk meggyőző

irodalmi példát, sőt, esetenként a redukciós folyamatot követő fitnesscsökkenés figyelhető meg. Ennek hátterében valószínűleg az áll, hogy az eddigi munkák főként célzott redukciós megközelítést alkalmaztak, amelynek során a génfunkciók és kölcsönhatások korlátozott ismeretére támaszkodva jelölték ki az eltávolítandó genomi szakaszokat. Ezenfelül célzott módszerekkel csak kisszámú deléció-kombináció hozható létre, tehát a lehetséges redukciós útvonalak száma is limitált.

Célkitűzések

Munkánk alapvető célja a lehető legnagyobb fitnessszel rendelkező, redukált genomú *E. coli* törzsek előállítása.

Ehhez kapcsolódóan a következő kérdésekre szeretnénk választ kapni:

- Vannak-e olyan deléciók, melyek adott körülmények között növelik a fitnesszt, illetve elősegítik a hatékonyabb tápanyag-felhasználást, azaz gyorsabb növekedést és nagyobb biomassza termelést okoznak?
- Ha igen, konkrétan melyek ezek a deléciók?
- Létrejönnek-e párhuzamos, különböző redukciós útvonalak? Van-e jelentősége a deléciók sorrendiségének?
- Szelektálódnak-e a genomredukció közben kompenzáló mutációk?

Mindezen kérdések megválaszolásához célul tűztük egy olyan módszer kidolgozását, mely véletlenszerűen generál deléciókat, és szelekciós lépéseket tartalmaz a legjobb fitnessű sejtek kiválogatására.

Alkalmazott módszerek

- Módosított transzpozon készítése molekuláris klónozási technikák felhasználásával, transzposzómák előállítása
- Random genomi deléciós ciklusok végrehajtása
- Célzott genomi deléciók előállítása „öngyilkos” plazmid alapú módszer segítségével
- Genomi pontmutáció létrehozása homológ rekombináción alapuló allélcseréléssel
- Teljes genom szekvenálás
- Növekedési paraméterek meghatározása
- Kompetíciós kísérletek relatív fitness meghatározáshoz
- Baktériumsejtek mozgásképességének vizsgálata
- Biomassa hozam meghatározása
- A deletálódott genomi régiók bioinformatikai elemzése

Eredmények

- **Kifejlesztettünk egy szelekción alapuló, iteratív random genomredukciós módszert (RANDEL) *E. coli*-ban.**

A kidolgozott eljárás segítségével véletlenszerű deléciók generálhatók nagy *E. coli* sejtpopulációkban, ahol az előnyös deléció-kombinációk automatikusan szelektálódnak. A módszer lehetővé teszi számos előnyös genomredukciós pálya felderítését a génfunkciók és kölcsönhatások előzetes ismerete nélkül.

A módszerünk egy szelekciós marker random inszercióján és stimulált elvesztésén alapul, ami a sejt saját hibajavító mechanizmusainak közreműködésével deléció képződéséhez vezet idegen szekvenciák

visszamaradása nélkül. A ciklikus folyamat első lépése egy módosított Tn5 transzpozon random inszerciója, amely egy antibiotikum rezisztencia gént, egy ellenszelekciós markert és az *E. coli* genomban nem előforduló I-SceI nukleáz felismerő helyeket tartalmaz. A második lépés során kettős szálú DNS-töréseket generálunk az I-SceI enzim indukciójával. A túlélő sejtekben a DNS-törés mikro- és makrohomológiák mentén javítódik, ami az inszertált markerek elvesztésével és deléció képződésével jár. A *Herpes simplex* vírus timidin-kináz és a dP nevű nukleozid analóg alkotta hsvTK-dP ellenszelekciós rendszer biztosítja, hogy a ciklus végén olyan sejteket kapjunk, amelyekben deléció alakult ki. A módszer minden lépése kontrollálható, nagy sejtpopuláción használható, és egy ciklus során sejtenként általában egy új deléciót eredményez. A folyamat során növekedési periódusok biztosítják a legfittebb variánsok szelekcióját.

- **Az eljárás *E. coli*-ban történő alkalmazásával és a redukált genomok elemzésével igazoltuk a módszer használhatóságát.**

Az új módszer teszteléséhez 5 egymást követő random deléciós ciklust hajtottunk végre vad típusú *E. coli* MG1655 sejteken, gazdag táptalajban. A kapott deléciók átlagos hossza 24 kbp volt. A leginkább redukált törzs 5 ciklus után 6 deléciót tartalmazott, ami 2,5%-os genomcsökkenést jelent. A kapott genomok szekvenálása során fény derült arra, hogy a deléciók csupán néhány genomi régióra korlátozódnak. Mindössze 12 különböző deléciót figyeltünk meg 60 szekvenált genomban. Bizonyos esetekben eltérő számú deléciót kaptunk, mint amennyit a deléciós ciklusok alapján vártunk. Néhány deléció több törzsben is szerepelt, különösen felülreprezentáltak voltak a flagelláris apparátus elvesztésével járó deléciók. Szintén gyakori volt a horizontális géntranszferrel szerzett kriptikus profágok deléciója. Létrejöttük mechanizmusát tekintve a deléciók változatos méretű genomi ismétlődések mentén alakultak ki: gén-

pszeudogén párok, inszerciós szekvenciák homológ régiói, ún. REP elemek vagy mikrohomológiák között.

- **Megmutattuk, hogy bizonyos előnyös deléciós változatok szelektálódhatnak, ugyanakkor egymástól függetlenül is kialakulhatnak. Emellett rámutattunk arra is, hogy a genomredukció során a deléciók mellett kompenzáló, fitnesznövelő pontmutáció is fixálódhat.**

Az eljárásban használt hsvTK-dP ellenszelekciós rendszer alkalmazásának mellékhatásként nagyszámú pontmutációt figyeltünk meg a szekvenált törzsekben. Később, a protokoll módosításával a mutációs rátát sikerült a háttér szintjére csökkentenünk. A pontmutációk eloszlásának elemzése megmutatta, hogy bizonyos előnyös deléciós vonalak szelektálódhatnak, ugyanakkor egymással párhuzamosan is kialakulhatnak. Egyes pontmutációk előnyt biztosító hatására is találtunk példákat (pl. fitneszcsökkenést kompenzáló pontmutáció a *yehB* géneben).

- **Bizonyítottuk, hogy bizonyos genomi szegmensek eliminációja valóban képes megnövelni mind a kompetitív fitneszt, mind a biomassza hozamot, ugyanakkor az igazán előnyös deléciók csak néhány genomi régióra korlátozódnak.**

A deléciók és pontmutációk fenotipikus hatásának elkülönítéséhez vad típusú, háttérmutációktól mentes háttéren rekonstruáltuk az egyedi deléciókat, illetve azok kombinációit. A deléciók egy része nem befolyásolta a növekedési paramétereket. Bizonyos deléciók – amelyek lényegében három különböző típust képviselnek (flagelláris apparátus, Rac profág, D12 deléció) – viszont a növekedési ráta emelkedését okozták. A legkifejezettebb hatása a flagelláris régió kiesésének volt. Abban az esetben is magasabb növekedési rátát és optikai denzitás növekményt (a biomassza hozam mérőszáma) mértünk, amikor a

flagelláris deléciót 5 másik delécióval kombináltuk. A 6-deléciós törzs előnyét kompetíciós kísérletek és biomassza hozam mérések is megerősítették.

Summary

Artificial genome reduction efforts are inspired by natural evolutionary processes. Their basic assumption is that many genes are unnecessary under laboratory or industrial conditions, because they are needed only for the survival in their natural environment. Consequently, the removal of this genetic material would result in cells with reduced complexity, higher genetic stability and better utilization of nutrients. Of these goals, improved economy have not yet been convincingly achieved. The possible reason might stem from limitations of the targeted genome reduction approach, where the basis of individual deletion target selection, gene functions and interactions, is often not well known, and the number of possible reduction pathways is also limited.

The main goal of our work was to generate reduced genome *E. coli* strains with the highest possible fitness. The main related question is whether there are deletions, or combinations of deletions that increase fitness under certain conditions. To answer the questions we aimed to develop a genome reduction method that generates successive random deletions in *E. coli* cell populations, where the beneficial deletion-combinations are automatically selected.

We developed the proposed random deletion scheme (RANDEL) based on random insertion and stimulated loss of a modified transposon, which leads to formation of a deletion due to intrinsic DNA repair mechanisms. In this process, every step is controllable, can be used on large population of cells, and generally results in one deletion per cycle per cell. The growth periods inherent in the procedure allow the selection of the fittest variants. The process allows the

exploration of large number of advantageous genome streamlining trajectories without prior knowledge of gene functions and interactions.

To test the new method, we performed five consecutive random deletion cycles on wild-type *E. coli* MG1655 cells in rich medium. By generating single- and multiple-deletion strains and reconstructing the deletions in the parental genetic background, we showed that favourable deletions can be obtained and accumulated by the procedure. The most reduced multiple-deletion strain obtained in five deletion cycles (6 deletions, 2.5% genome reduction), showed improved competitive fitness and biomass yield. The choice of the beneficial deletions, however, are limited to a few genomic regions.

Saját közlemények jegyzéke

MTMT azonosító: 10048443

Összesített impakt faktor (I.F.): 18,77

Tudományos folyóiratcikkek

Vernyik V, Karcagi I, Tímár E, Nagy I, Györkei Á, Papp B, Gyorfy Z, Posfai G. Exploring the fitness benefits of genome reduction in *Escherichia coli* by a selection-driven approach. *Scientific Reports*. 2020 Apr 30;10(1):7345. (I.F.: 3,998)*

Lipinszki Z, Vernyik V, Farago N, Sari T, Puskas LG, Blattner FR, Posfai G, Gyorfy Z. Enhancing the Translational Capacity of *E. coli* by Resolving the Codon Bias. *ACS Synth Biol*. 2018 Nov 16;7(11):2656–64. (I.F.: 5,571)

Gyorfy Z, Draskovits G, Vernyik V, Blattner FF, Gaal T, Posfai G. Engineered ribosomal RNA operon copy-number variants of *E. coli* reveal the evolutionary trade-offs shaping rRNA operon number. *Nucleic Acids Res*. 2015 Feb 18;43(3):1783–94. (I.F.: 9,202)

*a disszertáció alapját képező publikáció

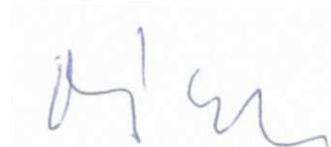
Könyvfejezet

Balikó G, Vernyik V, Karcagi I, Gyorfy Z, Draskovits G, Fehér T, Posfai G. Rational Efforts to Streamline the *Escherichia coli* Genome. In: *Synthetic Biology*. John Wiley & Sons, Ltd; 2018. p. 49–80.

NYILATKOZAT

Alulírott Dr. Pósfai György mint Vernyik Viktor doktorjelölt témavezetője és az értekezéshez kapcsolódó közlemény felelős szerzője nyilatkozom, hogy a jelölt jelentős mértékben hozzájárult a disszertáció alapját képező **„Exploring the fitness benefits of genome reduction in *Escherichia coli* by a selection-driven approach. *Scientific Reports*. 2020 Apr 30;10(1):7345”** című tudományos publikáció létrehozásához, és az értekezésben felhasznált eredmények tükrözik a jelölt önálló hozzájárulását. Ezen felül nyilatkozom, hogy a tézisében közölt eredményeket eddig nem használtuk fel tudományos fokozat megszerzésekor, és ezt a jövőben sem tesszük.

Szeged, 2022. 11. 15.



Dr. Pósfai György

tudományos tanácsadó