Egy multideléciós *Escherichia coli* törzs előállítása és jellemzése

Fehér Tamás
doktori értekezési tézisei

Témavezető: Dr. Pósfai György

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központja
Biokémiai Intézete

Szeged
2006

Bevezetés

Az elmúlt évtized egyik nagy molekuláris biológiai áttörése bizonyos fajok genetikai állományának teljes feltérképezése volt. Az *Escherichia coli* K12-es és O157:H7-es törzsei az első baktériumok közt szerepeltek, melyek genomjának meghatározták a bázissorendjét. Szekvenciájuk összehasonlítása arra az érdekes megfigyelésre vezetett, hogy genomjuk hozzávetőleg 70-80%-a nagy mértékben konzervált, szinte azonos. Ezt a „gerinc" szekvenciát számos helyen specifikus, csak az adott törzsben megtalálható szigetek szakítják meg. Más *E. coli* törzsek és baktériumfajok vizsgálata is hasonló struktúráltságot tárt fel. Így alakulhatott ki az az elmélet, mely szerint a prokarióta genomok két részből állnak: egy konzervált gerincből, és egy dinamikusan változó, niche-specifikus funkciókat ellátó génkészletből. Ez utóbbiak baktériumfajok közötti cseréje, az ún. laterális géntranszfer evolúciós skálán igen gyakori jelenség. Az uropathogén *E. coli* törzsben ilyen genomi szigetek spontán elvesztését is megfigyelték. Erre, és e szigetek törzsspecifitására alapoztuk munkahipotézisünket, mely szerint e szigetek nélkülözhetőek szokványos tápfolyadékokban való növesztés során. Csoportunk célja a lehető legtöbb törzs-specifikus sziget kiejtése volt az *E. coli* K12-es törzs genomjából, két alapvető célból: (i) alapkutatási szándékkal meg kívántuk állapítani, mennyi deléció végezhető el a törzsön anélkül, hogy életképessége – laboratóriumi körülmények között – súlyosan károsodna; (ii) alkalmazott kutatási célzatunk pedig egy olyan törzs kifejlesztése volt, amely kifejezetten alkalmas DNS-klónozásra, fehérjék vagy kismolekulák termelésére, illetve egyéb, igény szerinti biotechnológiai felhasználásra.

Napjainkban számos, a bakteriális kromoszóma módosítását lehetővé tévő technika áll rendelkezésre. Ezek

működése többnyire homológ rekombináción alapul. Két nagy csoportra osztjuk őket aszerint, hogy cirkuláris vagy lineáris DNS szakasz rekombinációja megy végbe a kromoszómával. Munkánk során egy PCR-el generált lineáris DNS szakaszt rekombináltattunk a bakteriális genomba, a λ fág Red-rekombinázainak indukciója segítségével. Az így kapott kointegráns szakaszban egy extrém ritkán hasító restrikciós endonukleázzal (I-SceI) kettős szálú DNS-törést hoztunk létre, amelyet intramolekuláris rekombináció követett. E kétlépcsős folyamat eredményeként olyan deléciót alakítottunk ki, amelyhez nem társult extrakromoszómális DNS visszamaradása, és ezért tetszés szerinti számban ismételhető, ugyan abban a sejtben.

Módszerek

DNS restrikciós emésztése és ligálása
Baktériumsejtek transzformálása
Plazmid preparálás baktériumsejtekből
Polimeráz láncreakció és inverz polimeráz láncreakció
Gél elektroforézis
Bakteriális genomi szegmentek kiejtése
Bakteriális növekedési ráta mérése
Bakteriális mutációs ráta mérése

Eredmények

Az első feladat a fenti deléciós módszer optimalizálása volt, nagyszámú deléció kumulatív módon történő gyors és hatékony konstrukciója céljából. Az I-SceI precízen kontrollált expresszióját lehetővé tevő plazmidokat szerkesztettünk, melyekkel a kettősszálú DNS törés és a következményes második rekombinációs lépés megfelelően időzíthető. Kifejlesztésre került egy egyszerű, de hatékony indukciós

protokoll. Az eljárás potenciális mutagenitásának becslésére megvizsgáltam annak hatását az *rpoB* gén mutációs frekvenciájára. Megfigyeléseim szerint módszerünk egy nagyságrenddel megemeli az adott gén mutációs rátáját, ám az mindig 10^{-6} mutáció /sejt /generáció érték alatt marad, ezért ezt nem tekintjük szignifikáns hátránynak (Kolisnychenko *et al.,* 2002).

Az *E. coli* MG1655-ös törzs genomjában 42 deléciót halmoztunk fel. Ezzel kiejtettünk a sejtből minden mobilis genetikai elemet (44 IS elemet, 9 profágot, 6 rekombinációs forró pontot), több kriptikus operont és számos ismeretlen funkciójú gént. Eltávolítottunk több feltételezett virulencia-faktor gént is, mellyel a törzs esetleges pathogenitása is csökkenhetett. Ilyen a *wzxC, wzb, mviN, nfnB, YgaH, YeaJ, eaeH, borD, flu, ycgH1, ycgH2,* és a *sokD* gén, valamint a *fla, fim, fec, hok,* és *wbb* operon. Egyebeket, úgymint a *hsdRMS, mcrBCD, mrr, tonA*, és *endA* géneket azzal a kifejezett céllal ejtettük ki, hogy törzsünk hatékonyabb DNS klónozó gazdává váljék.

Noha minden ismert IS szekvenciát eltávolítottunk a genomból, a multideléciós törzs (MDS) genomján végzett DNS-mikrohibridizációs kísérletek további IS elemek jelenlétére világítottak rá. Ezek nyilvánvalóan nem voltak jelen a törzs szekvenálása idején, ami jól demonstrálja ezen elemek mozgékonyságát. Lokalizációjukat inverz PCR-el végeztük. Az így talált három IS1, egy IS2 és egy IS5 szekvencia eltávolításával az MDS mindennemű mozgékony genetikai elemtől mentessé vált, melyet DNS-csippel végzett vizsgálatok is megerősítettek.

Az MDS fenotípusát több aspektusból is összehasonlítottuk a vad típuséval. A deléciók számának növekedésévek párhuzamosan a törzs gazdag folyékony

kultúrában mért duplázódási idejének nem szignifikáns mértékű megnyúlását észleltük. Minimál tápfolyadékban nem tapasztaltunk ilyen tendenciát. Ezek ismeretében különböző biomolekulák felvételéért illetve lebontásáért felelős gének delécióját feltételezzük, amelyek hiánya gazdag táptalajon lassabb növekedéshez vezet.

Az MDS sejtjeibe tízszer nagyobb hatékonysággal elektroporálhatók kis méretű plazmidok, mint mint az MG1655-ös vagy a közkedvelt klónozó gazda, a DH10B törzsbe. Még 100 kbp nagyságú bakteriális arteficiális kromoszómák elektroporációja esetén is kimutatható kis mértékű előny a multideléciós törzs javára. Az adatok szórása miatt a növekedés szignifikanciáját nem tudtam bizonyítani. Ha a különbségek valósak, azok oka feltehetően a sejtfelszíni fimbriák mennyiségének csökkenése, amely az extracelluláris DNS számára könnyebb hozzáférést biztosít a külső membránhoz. Ezzel szemben a deléciók csökkentették a sejt kémiai transzformációjának hatékonyságát. Ez utóbbi feltehetően a Ca^{2+} ionok jelenlétében fennálló fokozott aggregációs hajlam következménye, amely jelenségre egyelőre nem találtunk magyarázatot.

PCR reakciókkal kimutattuk, hogy DNS klónozásra használt, szokványos *E. coli* törzsekből származó plazmid preparátumok IS-elemekkel szennyezettek. Ezek nemkívánatos mutációkat okozhatnak különböző génekbe való beékelődésükkel, de deléciókhoz, inverziókhoz és duplikációkhoz is vezethetnek. E folytonosan fennálló vezély csak úgy hárítható el, ha MDS-ből preparált DNS-t használunk molekuláris biológiai munkákhoz.

Számos, a mutációs ráta mérését célzó eljárást vizsgáltam. Azok a módszerek, amelyek plazmid-hordozta gének inaktivációs frekvenciáját mérték, gyenge

reprodukálhatóságuk miatt alkalmatlannak bizonyultak bakteriális törzsek összehasonlítására. Ezért egy új eljárást dolgoztam ki, amely a kromoszómális *cycA* gén inaktivációjának gyakoriságát méri. E mutánsok D-cikloszerin rezisztenciájuk révén könnyen detektálhatóak. Párhuzamos kultúrákban kapott mutáns számokat a Ma-Sandri-Sarkar féle fluktuációs analízissel feldolgozva kiszámíthatjuk az adott törzs mutációs rátáját. Ez a mérési elrendezés direkt genotípus-fenotípus összefüggésem alapul, és gyakorlatilag minden mutáció-típust (inszerciót, deléciót, báziscserét, kereteltolódást) detektálni képes. További jellemzője, hogy nem igényel speciális genetikai hátteret, és a mutánsok minimál-tápfolyadékban növesztve nem mutatnak növekedési hátrányt vad típusú társaikkal szemben. E módszerrel kapott eredmények jól reprodukálhatóak és statisztikai módszerekkel könnyen elemezhetők, ezért a D-cikloszerines szelekciót ideálisnak találtuk bakteriális törzsek mutációs rátáinak összehasonlítására. PCR reakciókkal lehetőség van a D-cikloszerin rezisztens mutánsok *cycA* génjeinek amplifikációjára, és hosszuk alapján inszerciós-, deléciós- és pontmutánsként való osztályozására (Fehér *et al.*, 2006).

A multideléciós és az anyai MG1655-ös *E. coli* törzsek összehasonlítása azt az eredményt adta, hogy az előbbi mutációs rátája 20-25%-al alacsonyabb az utóbbihoz képest. Az anyai törzs mutánsai között a PCR-el kimutatott inszerciós mutánsok aránya 24,2% volt. Ahogyan vártuk, az MDS-ben nem találtunk inszerciós mutánst. A két törzs között fennálló mutációs rátabeli különbséget tehát az IS elemek deléciójával magyarázhatjuk.

A szalicin egy β-glikozidos cukor, amely felvételéhez és lebontásához *E. coli*ban a kriptikus *bgl* operon aktivációja szükséges. Ezt leggyakrabban az operon szabályozó régiójába

beékelődő IS-elemek okozzák. Ezért a szalicin hasznosítás az IS elemek jelenlétét vagy hiányát demonstráló biológiai próbaként is felhasználható. Szalicin minimál táptaljra való kikenés után az MDS 80-90%-al alacsonyabb aktivációt mutatott, mint az anyai törzs. PCR-el igazoltam, hogy a szalicinen növekedést mutató anyai sejtek 92%-ában IS inszerció történt a *bgl* operon szabályozó régiójába. Az MDS-ben nem találtam inszerciót e régióban. A szalicinen való növekedési képesség nagymértékű különbsége, amely a két törzs között fennáll, tehát az IS elemek deléciójára vezethető vissza.

Az optimalizált, lineáris DNS fragmenseket használó deléciós módszerünkről bizonyítást nyert, hogy alkalmas bakteriális genomi szigetek sorozatos deléciójára. Megfelelő tervezés után az *E. coli* genom 14,28%-át (662606 bp-t) ejtettük ki anélkül, hogy a sejt laboratóriumi életképességét számottevően rontottuk volna. Munkák eredménye egy olyan törzs lett, amely DNS-klónozási feladatokra is alkalmas. A magas elektroporációs hatékonyság és a csökkent mutációs ráta révén rutin molekuláris biológiai munkák mellett kifejezetten előnyös lehet ipari célú fehérje vagy kismolekula túltermeltetésre is. Az adatbázisokban napjainkra egyre nagyobb mennyiségben rendelkezésre álló eukarióta genomszekvenciákban számos bakteriális IS elemet találtak. Ezek az IS elemek feltehetően a bakteriális klónozás fázisában ugrottak a adott DNS szakaszra. Ha a szekvenálandó genomi fragmenst MDS-ben klónozzuk, az efféle szekvenálási műtermékek keletkezése elkerülhető.

Az IS mentes törzs egyedülálló lehetőséget biztosíthat a transzpozíció mechanizmusának, kinetikájának és szabályozásának vizsgálatára bevitt IS elemeken, natív mobilis elemek által produkált „zajos” háttér nélkül. A defektív

profágok genomból való kiejtése révén az MDS igéretes lehet in vivo kozmid pakoló gazdaként való felhasználásra is. A rendelkezésre álló egyedi delékiókkal P1 transzdukció révén tetszőleges kombinációjú multideléciós törzsek állíthatók elő. Ezek hasznosak lehetnek különböző mutánsok vizsgálatára, illetve további genommanipulációs vizsgálatoknak szolgáltathatnak kiindulási alapot a jövőben.

Eredmények pontokba foglalva

- 14,28%-os genomcsökkentés *E. coli* K-12-ben (42 deléció, 702 gén kiejtése)
- minden mobilis genetikai elem eltávolítása (11 profág, 49 IS, 6 Rhs)
- a multideléciós törzs jellemzése:
  - -gyakorlatilag változatlan növekedési ráta
  - -csökkent kémiai kompetencia
  - -megtartott vagy növelt elektroporációs hatékonyság
  - -IS–mentes plazmid preparátum
  - -az IS–transzpozíció hiánya révén csökkent mutációs ráta
- a szekvenálás óta öt IS elem spontán transzpozíciójának igazolása a törzsben
- egy hasznos eljárás kifejlesztése bakteriális mutációs ráták mérésére és összehasonlítására

Publikációk jegyzéke

Kolisnychenko V, Plunkett G 3rd, Herring CD, **Fehér T**, Pósfai J, Blattner FR, Pósfai G. 2002. Engineering a reduced Escherichia coli genome. *Genome Res*. **12**:640-647.

Fehér T, Cseh B, Umenhoffer K, Karcagi I, Pósfai G. 2006. Characterization of cycA mutants of Escherichia coli. An assay for measuring *in vivo* mutation rates. *Mutat Res*. **595**:184-190

• • •

Nagy PV, **Fehér T**, Morga S, Matkó J. 2000. Apoptosis of murine thymocytes induced by extracellular ATP is dose- and cytosolic pH-dependent. *Immunol Lett*. **72**:23-30

Köszönetnyilvánítás

Ez a munka nem jöhetett volna létre témavezetőm, Pósfai György ötletei, vezetése és finanszírozása nélkül. Szalkanovics Gáborné, Vitaliy Kolisnychenko, Umenhoffer Kinga, Győrfy Zsuzsa, Karcagi Ildikó és Cseh Botond technikai segítsége szintén elengedhetetlen volt. A Frederick R. Blattner, Guy Plunkett III., Christopher D. Herring, David Frisch és Pósfai János által szolgáltatott információ is feltétlen szükséges volt munkánk elvégzéséhez. Hálás vagyok továbbá Kiss Antalnak, Vízler Csabának, Trevor Twosenak és Sun Chang Kimnek a hasznos konzultációkért.

Társszerzői nyilatkozat

Fehér Tamás az „Engineering a Reduced *Escherichia coli* genome" (*Genome Res*., **12**:640) című közleményben ismertetett genom-modifikációs eljárás optimalizálásával jelentős mértékben hozzájárult az említett publikáció létrejöttéhez. Mindenképpen támogatom azt, hogy e publikációt doktori fokozatszerzéséhez felhasználja.

Szeged, 2006, március16.

Dr. Pósfai György
tudományos tanácsadó,
felelős szerző