

***Az Escherichia coli K-12* inszerciós elemeinek hatása a genom  
stabilitására**

Ph.D. értekezés tézisei

Umenhoffer Kinga

Témavezető: Dr. Pósfai György

Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézet

SZTE TTIK

2010

Szeged

## Bevezetés

Az *Escherichia coli* baktérium az egyik legalaposabban tanulmányozott és megismert élőlény. Napjainkra számos törzsének ismertté vált a teljes genomszekvenciája; ez is hozzájárul ahhoz, hogy kiváló modellorganizmusként szolgáljon a baktériumok genomi szintű evolúciójának tanulmányozásához.

Az Enterobaktériumok, és köztük is különösen az *Escherichia coli* törzsek genomja mozaikos szerkezetet mutat. Az alapvető, minden törzsben megtalálható gének sorát törzsspecifikus, horizontálisan transzfer révén szerzett génszigetek szakítják meg. Csoportunk korábbi munkája során egy már ismert genomú K-12 törzs, az MG1655 genomredukciójával létrehoztunk egy módosított törzset, melynek csökkentett méretű genomja közelít az *E. coli* törzsekre jellemző alapgénkészlettel leírhatóhoz.

Az *E. coli* kromoszómáján szétszórva található, horizontális géntranszfer által szerzett genomszakaszok jellemzően tartalmazhatnak inszerciós szekvenciákat (IS), transzpozázokat, hibás fágokat, integrázokat és helyspecifikus rekombinázoikat. Az IS-ek olyan kisméretű, genetikailag kompakt elemek, melyek általánosságban csak a saját áthelyeződésükért felelős faktorokat hordoznak. Ezek az “önző” DNS szakaszok képesek az autonóm áthelyeződésre, valamint replikatív duplikációra. Egy átlagos bakteriális sejtben az IS elemek a genetikai változások szignifikáns részéért felelősek. Ha több kópiában megtalálhatóak a genomban, az általuk képzett szekvenciaismétlődések révén inverziókat, duplikációkat, valamint homológ rekombinációval kisebb-nagyobb deléciókat is okozhatnak. Az IS-ek okozta genomi változások meglepően gyakoriak, emiatt akár a laboratóriumokban általánosan használatos, elvileg azonos identitású törzsek is eltérő genotípusúak lehetnek. Az IS-ek molekuláris biológiai munkák során is problémákat okozhatnak. Klónozáskor vagy expressziós könyvtár létrehozáskor a genomi IS elemek plazmidokba helyeződhetnek át. Nemcsak természetes közegükben, hanem a laboratóriumi munka során is átfertőzödhettek *E. coli* törzsek egymás IS elemeivel.

A csoportunk által kifejlesztett egyedi, IS-mentes MDS42-es törzs egyedülálló lehetőséget kínált az IS elemek szerepének tanulmányozására mind a genom evolúciós folyamataiban, mind a különféle szintetikus-biológiai/biotechnológiai alkalmazásokban.

Kísérleteinkhez rendelkezésünkre állt egy IS transzpozíciót kiváltani, és IS elemeket igen hatékonyan begyűjteni látszó, extrém változékonyságot mutató pCTXVP60 plazmid („IS csapat”). Ez a konstrukció növényekben történő vakcina előállítására céljából készült a nyúl hemorrhágiás vírus (VP60) kapszidfehérjéjét és a koleratoxin (CTX) B alegységét kódoló gének fúzionálásával. Habár külön-külön mindkét gén tartósan fenntartható volt, kiméra változatuk minden hagyományos (IS elemeket tartalmazó) *E. coli* törzsből instabillnak mutatkozott. Kísérleteinkben részletesen megvizsgáltuk, mi az oka a plazmid IS elemek okozta változékonyságának, majd génkönyvár-adatbázisok segítségével annak jártunk utána, mennyire gyakoriak az ilyen természetű IS transzpozíciós események. A munka elemzi az IS elemek és a gazda genom közötti dinamikus kapcsolatot, és rávilágít a csökkentett evolválódási képességű, redukált genomú gazdatörzsek használatának biotechnológiai előnyeire.

## Célkitűzés

Munkánk során a következőket kívántuk vizsgálni:

- Mekkora az IS-ek átlagos transzpozíciós gyakorisága *E. coli*-ban?
- Történik-e stresszre transzpozíció-indukció, hasonlóan a pontmutációkhoz?
- Hogyan működik az extrém instabil plazmidban talált „IS-csapat”?
- Hogyan lehetséges, hogy a ritka eseménynek számító IS inszerció eredményeként létrejött mutáns plazmid rövid idő alatt domináns lesz a populációban?
- Az „IS-csapatként” működő plazmidnál tapasztaltak mennyire általánosíthatók? Milyen gyakori probléma a klónozási munkák során az IS-transzpozíció miatt bekövetkező klónozhatatlanság? Találunk-e analóg eseteket nyers, „shotgun” genomszekvenálási adatbankokban?

## **Alkalmazott módszerek:**

Kompetens sejtek és transzformáció

Növekedési görbék automatizált meghatározása

Indukálható toxikus és kontroll plazmid konstrukciók növekedésgátló hatásának vizsgálata folyadékkultúrában

Mutációs ráta vizsgálatok

Mutációk típusainak vizsgálata

Plazmid konstrukciók létrehozása

Reverz-transzkripcióhoz kapcsolt, szemikvantitatív PCR (RT-PCR)

Mikroszkópos sejtanalízis

Az *E. coli* IS elemek előfordulásának bioinformatikai analízise a shotgun szekvenálási adatbázisokban

## Eredmények

Előzetes kísérletek alapján a fentebb ismertetett, kiméra gént (nyúl hemorrhágiás vírus kapszid fehérje gén /VP60/ és koleratoxin B alegység /CTX/) hordozó pCTXVP60 plazmid instabilnak bizonyult különböző hagyományosan használt *E. coli* törzsekben (HB101, C600, DH10B és MG1655). A pCTXVP60 plazmiddal történő transzformálás után a kapott kolóniák változékony morfológiát mutattak LB-agar lemezeken (apró, lassú növekedésű és nagyobb, normális fenotípusú). Restriktációs enzimes emésztési mintázat és PCR ellenőrzések alapján az egészséges telepek 92 %-a inszerciót, 8 %-a deléciót hordozott a plazmidon lévő kiméra génben. Az IS inszerciók esetében specifikus primerekkel IS1, IS3 és IS5 elemeket mutattunk ki a *ctxvp60* gén 5' végén. Az IS-mentes MDS42 törzsben viszont tartósan fenntartható volt a plazmid. Transzformánsai egynemű kolóniákat adtak, a kinyert pCTXVP60 plazmid a normál restriktációs mintázatot mutatta.

Annak eldöntésére, hogy a toxikus gén okozta stressz megnöveli-e a transzpozíciós gyakoriságot, és ez hozzájárul-e a magas IS inszerciós gyakorisághoz, megvizsgáltuk a pCTXVP60 és a pCTX (kontroll, nem toxikus) plazmidot tartalmazó MG1655 gazdasejtek *cycA* génen mért mutációs spektrumát. A pCTXVP60-at tartalmazó sejtek magasabb mutációs rátát mutattak: az IS transzpozíció ráta négyszeresére emelkedett (4 különböző IS elem közreműködésével), míg a pontmutációk gyakorisága 1,5-szeresre növekedett. Továbbá, a sejtek 32 százaléka tartalmazott együttesen a plazmidon is és a kromoszómán is IS inszerciót. A kettős mutánsok ilyen magas aránya nem magyarázható csupán az IS transzpozíciós események gyakoriságának emelkedésével, hanem az IS mutánsok erős szelekciós előnyét is feltételezi.

Vizsgáltuk, hogy a fehérje túltermelés önmagában hogyan hat a mutációs rátára, ezen belül az IS transzpozícióra. pPROEX HT-CAT (a sejt által jól tolerált kloramfenikol-acetiltranszferázt /CAT/ termelő) plazmidot tartalmazó MG1655 sejteken mutációs ráta mérést végeztünk a CAT fehérje indukciója során, illetve indukció nélkül. Az IS transzpozíció gyakorisága a *cycA* génen mérve 136 %-ra emelkedett az indukció hatására, ugyanakkor a pontmutációs ráta nem változott. A mért adatok arra utalnak, hogy még jól tolerált fehérje túltermeltetésekor is jelentős szerepe van az IS elemeknek az

adott populáció mutációs változékonyságában.

A kiméra gén toxikus hatásának pontosabb vizsgálatához a *ctxvp60* gént indukálható konstrukcióban, a pSG1144 plazmidba klónoztuk. Indukció során kimutatható volt a kiméragén erős növekedésgátló hatása. Maga a *ctxvp60* gén igen nagy számban tartalmaz ritka Arg kodonokat. Feltételeztük, hogy a CTXVP60 transzlációja kimeríti a sejt ritka Arg tRNS készletét, ezzel okozva toxikus hatást. Ennek vizsgálatára két eltérő kodonhasználatú változatát hoztunk létre. Az eredeti *ctxvp60* konstrukcióval szemben egyik sem okozott növekedésgátlást. Ez arra utalt, hogy nem a ritka kodonok nagymértékű használata okozza a toxikus hatást. Elkészítettünk továbbá egy „frameshift” mutációt hordozó *ctxvp60* változatot is, de a leolvasási keret eltolása – a várakozással ellentétben - sem szüntette meg a toxikus hatást. Mindezek az adatok arra utaltak, hogy nem a *ctxvp60* gén/CTXVP60 fehérje okozza a sejtekre gyakorolt negatív hatást.

Az eredeti *ctxvp60* gén szekvenciájának *in silico* vizsgálata feltárta egy nem a tervezett leolvasási keretben található ORF jelenlétét (ORF238). Transzlációja során egy olyan 238 aminosavat tartalmazó, extrém módon leucin gazdag fehérje (102) képződik, mely szerkezeti modellje alapján 4 transzmembrán, hidrofób doménnel rendelkezik. Annak eldöntésére, hogy ez a mesterségesen létrejött ORF felelős-e a rendellenes növekedési fenotípus kialakulásáért, kiemeltük és indukálható konstrukcióként klónoztuk. Indukált expressziója során az eredeti pCTXVP60 plazmidéval azonos hatást mutattunk ki. A hatás vizuális detektálásához CTXVP60- és ORF238-expresszázó sejteket konfokális lézer pásztázó mikroszkópos vizsgálatnak vetettünk alá. Mindkét konstrukció expressziójának eredményeként a sejtek rendellenes hosszúságúak, lassú növekedésűek és sejtosztódásukban gátoltak lettek. Megállapítható tehát, hogy a toxikus hatásért maga az ORF238 a felelős.

Az általunk megszekvenált 12 IS-mutáns pCTXVP60 plazmid segítségével meghatároztuk az inszerciók pontos pozícióit. Az inszerciós esemény szinte kivétel nélkül a fúziós gén 5' végén, a *ctx* régióban vagy a *vp60* 5' végénél következett be. Mivel az ORF238 a két gén kapcsolódási pontján helyezkedik el, valószínűsíthető, hogy az IS elemek a toxikus *orf238* 5' régiójába ugorva annak transzkripcióját blokkolják, megszüntetve ezzel a plazmid toxikus hatását. Az eredeti pCTXVP60 és annak IS mutáns változatai transzkripciójának RT-PCR-rel történő ellenőrzésével ezt igazolni is tudtuk.

A pCTXVP60 plazmidot tartalmazó törzsek növekedési/szelekciós dinamikáját különféle gazdasejt-plazmid kombinációk növekedési görbéjének kimérésével vizsgáltuk. Ezeknek a folyadékultúrák kísérleteknek az eredményei összhangban vannak az agar lemezeken megfigyeltekkel. Az eredeti pCTXVP60 i) növekedésgátlást okoz, ii) a sejtek egy része véletlenszerű módon IS-inszerciót szenved a *ctxvp60* génben a genomi IS-ek (fokozott) mobilitásának köszönhetően, iii) az IS-ek által inaktivált toxikus gént hordozó sejtek visszanyerik normális növekedési ütemüket és dominánssá válnak a kultúrában. A különböző számú és összetételű IS elemeket tartalmazó törzsek (MDS sorozat) vizsgálata azt sugallja, hogy a nem toxikus plazmid kialakulásához szükséges idő fordítottan arányos az adott törzs IS elem tartalmával. Megállapítottuk, hogy akár egyetlen IS-kópia jelenléte is jelentős hatással van a plazmid stabilitására, ezzel a sejt evolúciójára.

A hozzáférhető „shotgun” szekvenálásokat adatbázisainak bioinformatikai tanulmányozása alátámasztotta elképzelésünket, miszerint az általunk megfigyelt *ctxvp60* esete nem egyedi. Sokkal inkább egy feltehetően széles körben előforduló, automatikus folyamat, amelynek eredményeként a sejtekben a nem tolerált, külső, rekombináns gének inaktiválódnak. Szigorú szekvenciakritériumok alkalmazásával 295 „shotgun” klónkönyvtárból 14 esetében 109 olyan esetet találtunk, ahol a klónozott darabba *E. coli* gazda IS épült (8 különböző fajtájú IS-t azonosítottunk). Ez a magas arány nem magyarázható az IS-ek normál transzpozíciós gyakoriságával, hanem a *ctxvp60* klónozása során megfigyelt folyamatokat is feltételez.

Az eredmények demonstrálják, hogy az *E. coli* gazdasejtben expresszált, toxikus termékekben igen gyorsan, általános laboratóriumi körülmények között is felhalmozódhatnak IS okozta neutralizált, mutáns változatok, és ezek rövid idő alatt dominánssá válhatnak a kultúrákban. Ez a folyamat biotechnológiai szempontból előnytelen genotípusos és fenotípusos változatok felhalmozódásához vezethet. Az összes IS elem eltávolítása a bakteriális genomból szignifikánsan növeli a genom állandóságát, fenotípusos egységességét, és csökkenti az evolúciós potenciált.

## Eredmények pontokba foglalva

- Egy, a sejtek növekedését jelentős mértékben gátló plazmid (pCTXVP60) szekvenciájában olyan mutációkat azonosítottunk, melyek képesek a plazmid gátló hatását megszüntetni.
- Megállapítottuk, hogy ezeknek a mutációknak egy jelentős részét IS elemek beépülése okozta. Meghatároztuk ezek típusát, beépülési gyakoriságát.
- Bebizonyítottuk, hogy a plazmid toxicitásáért egy, a konstruktnban nem tervezett módon kifejeződő és vélhetőleg mérgező hatású ORF a felelős, melynek működését az IS beépülések megakadályozhatják.
- Kimutattuk, hogy az IS-ek a toxikus gén transzkripciójának blokkolásával szüntetik meg a növekedésgátló hatást.
- Kimutattuk, hogy az IS-inszertált mutánsok szelekciójuk révén gyorsan dominánssá válhatnak a populációban.
- Kimutattuk, hogy az IS elemek mozgékonyágát a sejteket ért stresszhatás jelentős mértékben fokozza.
- Szekvencia-adatbázisok vizsgálatával megállapítottuk, hogy az IS beépülések gyakran okoznak szekvencia-műtermékeket klóntárakban.
- Igazoltuk, hogy az IS elemektől megtisztított genomú MDS42 törzs esetében a vizsgált plazmid (és a kontroll gén) szekvenciájának stabilitása sokkal nagyobb mértékű. Ez azt mutatja, hogy az IS elemektől mentesített baktériumtörzsek jól használhatók olyan kísérleti-biotechnológiai (szintetikus biológiai) alkalmazásokban, ahol a genom stabilitása különösen fontos tényező.

## Saját publikációk jegyzéke

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 9: 10.1186/1475-2859-9-38- p. (2010)  
IF: 3.432

Feher T, Karcagi I, Gyorfy Z, Umenhoffer K, Csorgo B, Posfai G  
Scarless engineering of the Escherichia coli genome  
In: Gerdes S, Osterman AL (szerk.)  
Microbial Gene Essentiality: Protocols and Bioinformatics: Methods in Molecular  
Biology series. Vol. 416..  
TOTOWA, USA: HUMANA PRESS INC., 2008. pp. 251-259.

Posfai G, Plunkett G, Feher T, Frisch D, Keil GM, Umenhoffer K, Kolisnychenko V,  
Stahl B, Sharma SS, de Arruda M, Burland V, Harcum SW, Blattner FR  
Emergent properties of reduced-genome Escherichia coli  
SCIENCE 312: 1044-1046 (2006)  
IF: 30.927

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-FUND MOL M 595: 184-190 (2006)  
IF: 3.340

## Társszerzői nyilatkozat

Umenhoffer Kinga az „Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*” (SCIENCE 312: 1044-1046 (2006)) című közleményben ismertett, normál és fehérjetermelés okozta stresszkörülmények közötti transzpozíciós gyakoriság összehasonlításával hozzájárult az említett publikáció létrejöttéhez. Mindenképpen támogatom azt, hogy e publikációt doktori fokozatszerzéséhez felhasználja.

2010-08-29

Dr Pósfai György  
tudományos tanácsadó  
felelős szerkesztő