

A pályázat alapvető célja az *Escherichia coli* baktérium genomjának tevszerű egyszerűsítése, egy „core-genome” *E. coli* sejt létrehozása volt. Hipotézisünk szerint a sejt genetikai állományának tekintélyes része niche-specifikus funkciókat kódol, illetve „parazita” génekként működik. Standard laboratóriumi körülmények között ezek a genomrészek nélkülözhetők, sőt hiányukban a sejt hatékonyabb metabolizmussal működhet, a genom pedig stabilabbá válik.

A pályázatban kitűzött célok nagy részét megvalósítottuk. A témavezető, két PhD hallgató, diplomadolgozók és egy asszisztens munkájából három folyóiratközlemény (összesen 55 IF) született, ehhez részünkről pályázati támogatásként egyedül az OTKA-támogatást vettük igénybe. Szintetikus biológiai/genommérnöki területen nemzetközi elismertséget szereztünk, ezt jelezte egy konferenciaelőadás-meghívás, továbbá a felkérés egy metodikai könyvfejezet (*Methods in Molecular Biology*, Humana Press) és egy genomredukciós review (*Chemical Reviews*) megírására.

A vázolt munkát amerikai partnerekkel kollaborációban végeztük. Ők bioinformatikai segítséggel (deléciók körülbelüli kijelölése), alább a jelentésben nem részletezett DNS-chip genomellenőrzésekkel és Biolog tesztekkel járultak hozzá a munkához. A deléciók pontos megtervezése, az összes genomdeléció és módosítás, a törzsjellemzések nagy része (többek között minden mutációs ráta/spektrum, genomstabilitás analízis) szegedi munka.

Eredmények:

#### 1. Genomredukció.

Az *E. coli* törzsek összehasonlító genomikai elemzése alapján 20%-os genomméret-redukciót tűztünk ki célul. A precíz, „maradványmentes” deléciók létrehozásához módszereket dolgoztunk ki, ezeket folyamatosan finomítottuk. A 42 deléciót hordozó multideléciós törzs (MDS42; 15.8% redukció) mérföldkőnek tekinthető a redukciós munkában: ebből az összes mobilis, autonóm genetikai elemet (10 profág, 49 inszerciós elem) eltávolítottuk. Ezt az eredményt publikáltuk; azóta újabb 20 deléciót hoztunk létre, a jelenlegi legkisebb genomú törzs (MDS62; 18.8% redukció; 4 639 675 bp-ról 3 768 583 bp-ra) közel van a célul kitűzött „core-genome”-hoz. Minden deléció pontosságát szekvenálással ellenőriztük. Az MDS62 által képviselt genomátalakítás pontossága, tervszerűsége, átfogó volta az irodalomból ismert, hasonló próbálkozások között is precedens nélküli.

#### 2. Egyéb módosítások.

A vad típusú, kiindulási törzs hordoz egyes metabolikus defektusokat (rph, ilvG mutációk). Ezeket kijavítva hatékonyabbá tettük az izoleucin és pirimidin bioszintézist. A laboratóriumi használatban fontos mutációk sorozatát hoztuk létre az MDS42 törzsben: recA (csökkentett rekombinációs potenciál), hsdRMS/mcrBCD/mrr (restrikció-modifikáció megszüntetése), lac (kék-fehér szelekció), msbB/eca (csökkentett antigenicitás), T7 pol inszerció (rekombináns fehérje-expresszióhoz), pir inszerció (R6K típusú plazmid replikációhoz), endA (plazmid minőség javítás), tonA (fágrezisztencia).

#### 3. Fiziológiai jellemzés.

A deléciós törzsek tulajdonságait folyamatosan ellenőriztük. Az MDS42 törzs növekedési rátája minimál médiumban megegyezik a vad törzsével, gazdag táptalajban kissé alacsonyabb. További deléciókkal, módosításokkal (MDS62) elértük, hogy a deléciós törzs növekedési rátája meghaladja a kiindulási törzs paramétereit minden vizsgált médiumban. A deléciós törzsek – feltehetően a

felszíni struktúrák eliminálása folytán - transzformációs hatékonyságban is jelentős emelkedést mutatnak. Az MDS42 törzs metabolikus képességeit részletes Biolog analízissel jellemeztük. A – még publikálatlan - eredmények összhangban voltak a tervezett változásokkal, modellezéssel. A deléciós törzsek plazmid és rekombináns fehérje-termelése eléri, esetenként meghaladja a vad típusú törzs produkcióját.

4. Mutációs ráta mérési módszer.

Egyik fő célunk a genom és klónstabilitás növelése volt. Ennek méréséhez egy különösen alkalmas, a sejt teljes mutációs spektrumát jellemző mutációs ráta mérési módszert dolgoztunk ki. Ezzel mind a vad típusú, mind az MDS42 törzs spontán mutációs rátáját és spektrumát jellemeztük.

5. Genomstabilitás.

Megvizsgáltuk a mutációs ráta/spektrum változását rekombináns fehérje termelés okozta enyhe és erős stressz körülményei között. Az erős stressz a mobilis genetikai elemek indukcióját, a mutációs eseményekben relatív súlyának megnövekedését okozta. Ezeknek az elemeknek az eliminációja jelentős genomstabilitás-növekedést okozott, s gyakorlatilag klónozhatatlan gének klónozhatóvá váltak. A jelenség felfogható egy olyan védekező rendszernek, mely stresszhatásra mind a gazdasejt, mind az „önző” mobilis genetikai elem fennmaradását szolgálja. További genomstabilitás-fokozás volt tapasztalható erős másodlagos struktúrát képező plazmidszekvenciák esetében. Még nem tisztázott, milyen gének eliminálása vezetett ehhez.

6. Hasznosítás.

A redukált genomú *Escherichia coli* törzsekre amerikai együttműködő partnereinkkel közös, elfogadott szabadalmunk van. A törzseket a Scarab Genomics LLC forgalmazza.