

DISS. ETH. NO. 29183

GENETIC DISCOVERY TOOLS AND LABORATORY EVOLUTION IN YEAST

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by
ASLI AZIZOĞLU
MSc. ETH BME
BORN ON 22.01.1993

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Jörg Stelling, examiner
Prof. Dr. Roger Brent, co-examiner
Prof. Dr. Jennifer Christina Ewald, co-examiner

2023

ABSTRACT

S. cerevisiae is an organism that has, behind the scenes, shaped our modern civilization. Beyond its culinary applications, it has contributed greatly to our understanding of eukaryotic organisms at the molecular level. Given its tractability, it has been an instrumental model organism in investigating gene function and gene-gene interactions. As it shares a large number of homologous genes with other eukaryotic cells, the knowledge gained in yeast has proven invaluable when trying to understand gene function and gene networks in higher organisms. Additionally, yeast is routinely used in laboratory evolution, whereby proteins acquire novel functions useful for basic research, and industrial and pharmaceutical applications. Yet to this day there is still a lot that is unknown about yeast genes and proteins, and we are still some ways off from harvesting the full potential of yeast as an evolution engine. In this thesis, we develop genetic tools to exploit yeast both as a genetic discovery tool and as a novel protein function evolver.

A gene's function is investigated through perturbations of its protein product. In theory, inducible systems provide the largest range of possible perturbations, from complete absence to overexpression. Yet, even in our well-studied model organism there are no inducible systems that could cover this range while also allowing precise titration at intermediate expression levels under different growth conditions. In Chapter 2, we create one such inducible system: the Well-tempered Controller 846 (WTC₈₄₆). It is based on a highly active, endogenous yeast promoter that we engineered to be fully repressed by the prokaryotic DNA binding protein TetR. Gene expression is then induced by the small molecule anhydrotetracycline. WTC₈₄₆ also contains a negative feedback loop, whereby TetR represses its own expression. We demonstrate that these components allow WTC₈₄₆ to bring about reversible knockouts, overexpression and very precise titration of any protein in yeast in any growth condition.

Yet genes and their protein products do not function in isolation. They interact with other proteins to form pathways and networks, from which emerge the complex phenotypes we see in cells, such as the precisely regulated cell cycle. Therefore, understanding gene-gene interactions is paramount to understanding how the cell functions. As with investigations of a single gene, perturbations can inform us about gene-gene interactions. But for this, orthogonal systems that can perturb interacting genes separately are required. In Chapter 3, we extend the WTC₈₄₆ system to two new repressor-inducer pairs to provide a total of three such orthogonal systems. WTC₈₄₇ is based on the repressor LexA-human estrogen receptor fusion and is induced by β -estradiol. WTC₈₄₈ is based on the prokaryotic repressor LacI and

is induced by IPTG. While the two new WTC systems do not have the range afforded to the experimenter by WTC₈₄₆, we demonstrate that they can nevertheless be useful for revealing gene-gene interactions in yeast. We use the three systems to simultaneously and orthogonally perturb genes within the anaphase signaling pathway and reveal dosage-dependent interactions.

One complex phenotype that all living organisms display is their ability to evolve and adapt. This happens through mutations and natural selection at incredibly long timescales, during which beneficial mutations give cells a growth advantage over others. We can artificially reduce this time in the laboratory by increasing mutations rates, but if the phenotype created by the mutants cannot be linked to a growth advantage, screening limits the range of solutions accessible to the experimenter. Especially in the case of binding interactions, for example between a receptor and a ligand, growth-based selection systems do not exist. In Chapter 4, we co-opt components of the WTC systems to create a closed-loop, *in vivo* evolution system in yeast, which reliably links strength of binding interactions to a growth advantage. We use this genetic circuit, called the Evolverator, to evolve both a receptor-hormone ligand interaction, and a DNA binding protein-DNA interaction, revealing thus far uncharacterized mutations.

RIASSUNTO

S. cerevisiae è un organismo che ha plasmato la nostra civiltà moderna in diversi modi. Oltre alle sue applicazioni culinarie, ha contribuito notevolmente alla nostra comprensione degli organismi eucarioti a livello molecolare. Data la sua trattabilità, è stato un modello strumentale nello studio di funzioni geniche e delle interazioni tra geni. Poiché condivide un gran numero di geni omologhi con altre cellule eucariotiche, le conoscenze acquisite nel lievito si sono rivelate preziose nella comprensione di funzioni e reti genetiche in organismi superiori. Inoltre, il lievito viene abitualmente utilizzato nell'evoluzione in laboratorio, dove le proteine acquisiscono nuove funzioni utili per la ricerca di base e per applicazioni industriali e farmaceutiche. Eppure ad oggi c'è ancora molto che non si sa sui geni e sulle proteine del lievito, e siamo ancora lontani dall'utilizzo del pieno potenziale del lievito come motore dell'evoluzione. In questa tesi, sviluppiamo strumenti genetici per sfruttare il lievito sia come strumento di scoperta genetica che come nuovo evolutore di funzioni proteiche.

La funzione di un gene viene studiata attraverso perturbazioni delle proteine che produce. In teoria, i sistemi inducibili forniscono la più ampia gamma di possibili perturbazioni, dalla completa assenza del prodotto alla sua sovraespressione. Tuttavia, anche in organismi ben studiati come *S. cerevisiae*, non esistono sistemi inducibili in grado di coprire questo intervallo e consentendo allo stesso tempo una regolazione precisa dei livelli di espressione intermedi in diverse condizioni di crescita. Nel Capitolo 2, creiamo uno di questi sistemi inducibili: il Controllore Ben Temperato 846 (WTC₈₄₆). Esso si basa su un promotore endogeno del lievito altamente attivo che abbiamo modificato per essere completamente represso da TetR, una proteina procariota che lega al DNA. L'espressione genica è quindi indotta dalla molecola anidrotetraciclina. WTC₈₄₆ contiene anche un ciclo di feedback negativo, tramite il quale TetR reprime la propria espressione. Dimostriamo che questi componenti consentono a WTC₈₄₆ di creare knockout reversibili, sovraespressione e precise titolazione di qualsiasi proteina in qualsiasi condizione di crescita.

Eppure i geni e i loro prodotti proteici non operano in isolamento. Essi interagiscono con altre proteine per formare vie e reti, da cui emergono i complessi fenotipi che vediamo nelle cellule, come il ciclo cellulare. Pertanto, la comprensione delle interazioni tra geni è fondamentale per comprendere come funziona la cellula. Come per le indagini su un singolo gene, le perturbazioni possono informarci sulle interazioni tra geni, ma per questo sono necessari sistemi ortogonali che possono perturbare indipendentemente i geni con cui interagiscono. Nel Capitolo 3, estendiamo il sistema WTC₈₄₆ a due nuove coppie repressore-induttore per fornire un totale di tre di questi sistemi ortogonali. WTC₈₄₇ si basa sulla fusione

del repressore LexA al recettore degli estrogeni umano ed è indotta dal β -estradiolo. WTC₈₄₈ si basa sul repressore procariotico LacI ed è indotto da IPTG. Sebbene i due nuovi sistemi WTC non abbiano le stesse qualità del WTC₈₄₆, dimostriamo che possono comunque essere utili per rivelare le interazioni gene-gene nel lievito. Utilizziamo i tre sistemi per perturbare simultaneamente e ortogonalmente i geni all'interno della via di segnalazione anafase e per rivelare interazioni dipendenti dal dosaggio.

Un fenotipo complesso che mostrato da tutti gli esseri viventi è la capacità di evolversi e adattarsi. Ciò avviene attraverso mutazioni e selezione naturale in tempi incredibilmente lunghi, durante i quali le mutazioni benefiche danno alle cellule un vantaggio di crescita rispetto alle altre. Possiamo ridurre artificialmente questo tempo in laboratorio aumentando il tasso di mutazione, ma se il fenotipo creato dai mutanti non può essere collegato a un vantaggio di crescita, lo screening limita la gamma di soluzioni accessibili allo sperimentatore. Soprattutto nel caso di interazioni di legame, ad esempio tra un recettore e un ligando, non esistono sistemi di selezione basati sulla crescita. Nel Capitolo 4, riutilizziamo i componenti dei sistemi WTC per creare un sistema di evoluzione *in vivo* a ciclo chiuso nel lievito, che collega in modo affidabile la forza delle interazioni di legame a un vantaggio di crescita. Usiamo questo circuito genetico, chiamato Evolverator, per evolvere sia un'interazione recettore-ligando ormonale, sia un'interazione proteina-DNA, rivelando mutazioni finora non caratterizzate.