

An empirical ranking of plasmid stability mechanisms via *in cellulo* competition experiments

Dissertation

Submitted in fulfillment of the requirements for the degree
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
in the Faculty of Mathematics and Natural Sciences
of the Christian-Albrechts University Kiel

Submitted by
Johannes Effe

Kiel, May 2024

First referee: Prof. Dr. Tal Dagan

Second referee: Prof. Dr. Ute Hentschel Humeida

Date of Examination: 24.05.2024

Summary

Plasmids are extrachromosomal genetic elements that initiate their own replication while making use of their hosts replication machinery. They are ubiquitously found amongst bacteria and are seen as a major component of lateral gene transfer. Therefore, they are considered as vector for the spread of antibiotic resistances. The persistence of plasmids within their host population depends on the ability of the plasmid to properly replicate and segregate to daughter cells of the host. Indeed, several systems have been recognized as beneficial for plasmid persistence. This includes active partitioning systems or addiction mechanisms (toxin-antitoxin systems). While such systems are frequently found on plasmids, many plasmids are lacking recognizable stability systems beyond their own replication initiation. The question of this thesis is whether it is more beneficial for a plasmid to be inherently stable or to be unstable but contain a stability mechanism. Answering this question required us to shift our perspective to view plasmids as Darwinian entities; within the Darwinian framework, plasmid genotypes are associated with an individual fitness where plasmid populations within cells experience natural selection (or drift) leading to the survival of plasmids with the highest fitness. Using an experimental evolution approach I simulate competitions amongst plasmid genotypes. The model plasmids used in this thesis are either inherently unstable, inherently unstable and containing a stability mechanism or inherently stable. The model plasmids are put into competitions with each other and the winners of those competitions are identified by a quantification of the proportions of hosts at the end of the experiment. These competitions reveal that the fitness of an unstable plasmid can be increased through addition of plasmid stability mechanisms. The results allowed me to establish a ranking amongst the systems in terms of fitness benefit. A partitioning system is conferring a higher fitness benefit than a toxin-antitoxin system, however when put into a direct competition, the plasmid containing the toxin-antitoxin system prevails. Containing both systems is ideal for an inherently unstable plasmid. However, the fitness increase conferred by a stability system is not as advantageous as stability based on proper replication. Further it is shown that plasmid heterogeneity can be maintained over a longer period of time under non-selective conditions. This leads me to theorize that multimerization amongst different plasmid allele-variants may be a driver for plasmid evolution.

Zusammenfassung

Plasmide sind extrachromosomalen genetischen Elementen, die ihre eigene Replikation initiieren, während sie die Replikationsmaschinerie ihres Wirts nutzen. Sie sind in Bakterien allgegenwärtig und gelten als ein Hauptbestandteil des lateralen Gentransfers und damit als Vektor für die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen. Die Persistenz von Plasmiden innerhalb ihrer Wirtspopulation hängt von der Fähigkeit des Plasmids ab, sich ordnungsgemäß zu replizieren und in Tochterzellen des Wirts zu segregieren. Es wurden bereits einige Systeme entdeckt, die als vorteilhaft für die Plasmid-Persistenz gelten. Dazu gehören aktive Partitionierungssysteme oder Abhängigkeitsmechanismen (Toxin-Antitoxin-Systeme). Während solche Systeme regelmäßig auf Plasmiden zu finden sind, fehlt es vielen Plasmiden an erkennbaren Stabilitätssystemen jenseits ihrer eigenen Replikationsinitiierung. Diese Arbeit befasst sich mit der Frage, ob eine inhärente Stabilität vorteilhafter für ein Plasmid ist, als die Kompensation der von Instabilität durch Stabilitätsmechanismen. Zur Beantwortung dieser Frage mussten wir unsere Perspektive ändern und Plasmide als darwinistische Einheiten betrachten. Im darwinistischen Rahmen sind Plasmid-Genotypen mit einer individuellen Fitness verbunden, wobei Plasmid-Populationen in Zellen einer natürlichen Selektion (oder Drift) unterliegen, die zum Überleben der Plasmide mit der höchsten Fitness führt. Mit Hilfe eines experimentellen Evolutionsansatzes simuliere ich den Wettkampf zwischen Plasmid-Genotypen. Die in dieser Arbeit verwendeten Modell-Plasmide sind entweder von Natur aus instabil, von Natur aus instabil und kodieren einen Stabilitätsmechanismus oder von Natur aus stabil. Die Modell-Plasmide werden in einen Wettkampf miteinander gebracht, wobei die Gewinner durch eine Quantifizierung der Wirtsanteile am Ende des Experiments ermittelt werden. Diese Wettkämpfe zeigen, dass die Fitness eines instabilen Plasmids durch Hinzufügen von Plasmid-Stabilitätsmechanismen erhöht werden kann. Anhand der Ergebnisse konnte ich eine Rangfolge der Systeme in Bezug auf den Fitnessvorteil aufstellen. Ein Partitionierungssystem bietet einen höheren Fitnessvorteil als ein Toxin-Antitoxin-System, aber wenn man sie in einen direkten Wettkampf stellt, ist das Plasmid mit dem Toxin-Antitoxin-System überlegen. Ein Plasmid, das beide Systeme enthält, ist ideal für ein von Natur aus instabiles Plasmid. Die Fitnesssteigerung durch ein Stabilitätssystem ist jedoch nicht so vorteilhaft wie die Stabilität, die auf einer ordnungsgemäßen Replikation beruht. Außerdem hat sich gezeigt, dass die Plasmid-Heterogenität unter nicht-selektiven Bedingungen über einen längeren Zeitraum erhalten werden kann. Dies veranlasst mich zu der Theorie, dass die Multimerisierung zwischen verschiedenen Plasmid-Allel-Varianten ein Motor für die Plasmid-Evolution sein könnte.