

Predavanje: Osobitosti prokariotskih i eukariotskih stanica

Genetika industrijskih organizama (GIO) 1

Dr. sc. Višnja Bačun-Družina, izv. prof.

Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Platon: Znanje koje imamo samo je mrvica onoga što nemamo.

Osnovna pitanja ovog predmeta:

Mješovite bakterijske kulture, gdje i kako izolirati ind. m.o., gdje i kako ih održavati?

Kako konstruirati ind. organizam?

Kako održavati ind. organizam

Što nas okružuje

- Mikroorganizmi uvijek u zajednici kao mješovite kulture!
- Opisano oko 4 200 vrsta bakterija to je samo 0,1 do 1 % bakterija u prirodi (16S rDNA- probe, filogenetsko određivanje prokariota tzv. "otisak prsta");
- Manje od 5% mikrobne populacije u oceanima su poznate vrste koje se mogu uzgojiti (J. Craig Venter).

Što smo i kako se mijenjamo

Humani genom

Sekvenciran 2003. godine,

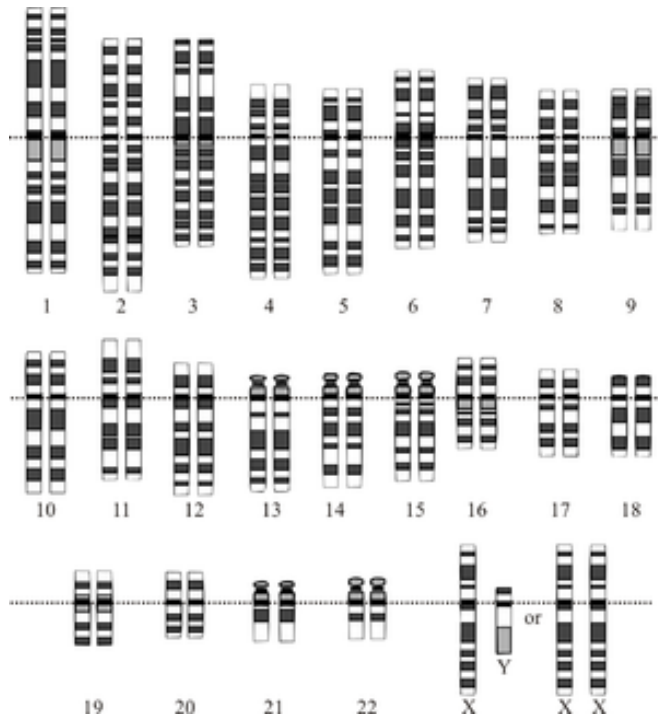
3 milijardi pb s mtDNK.,

kodirajuća DNK <2%;

nekodirajuća DNK 98%,

sadrži i sekvencije za miRNK

genom i epigenom

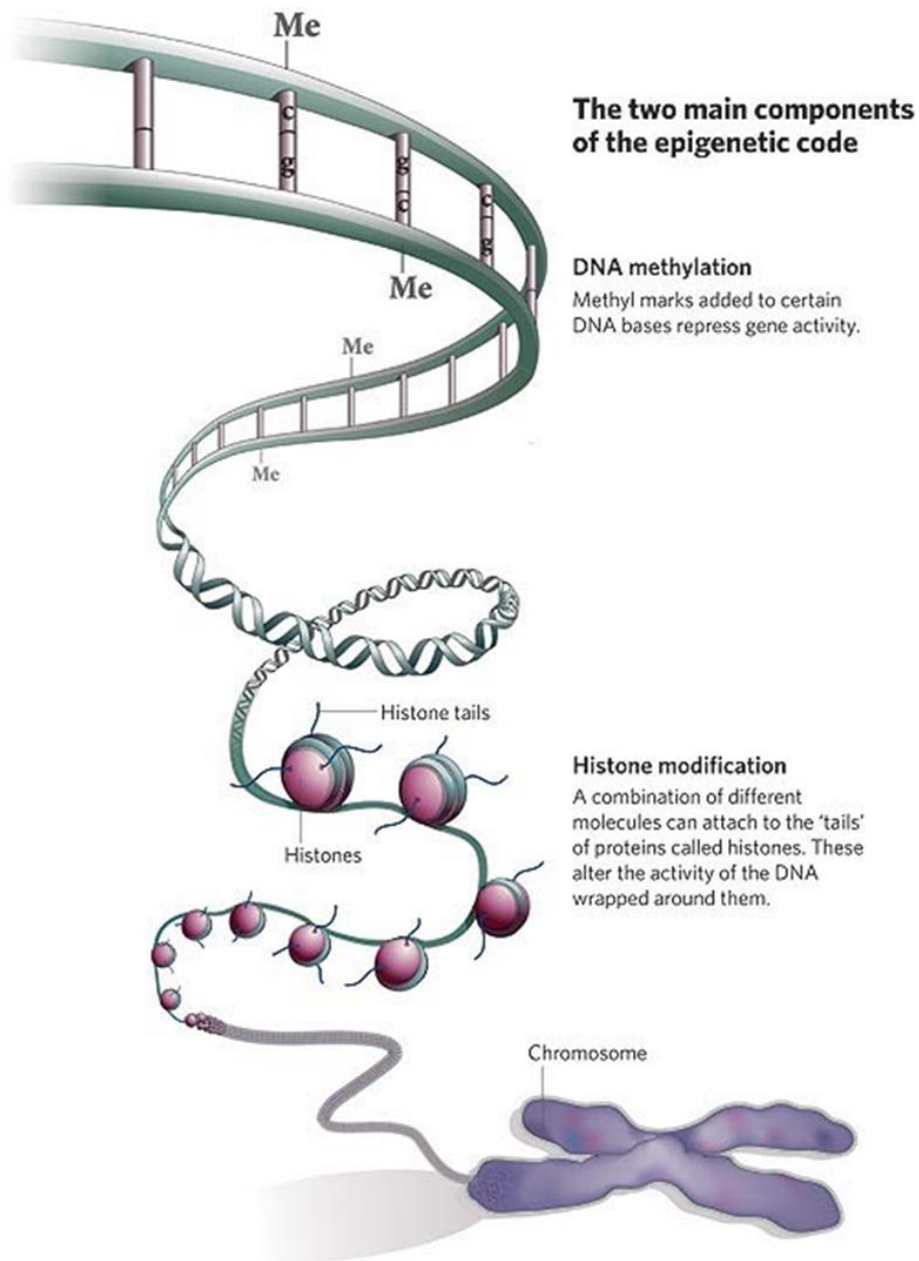


Slika 1. Kariotip humane diploidne stanice

EPIGENETIKA

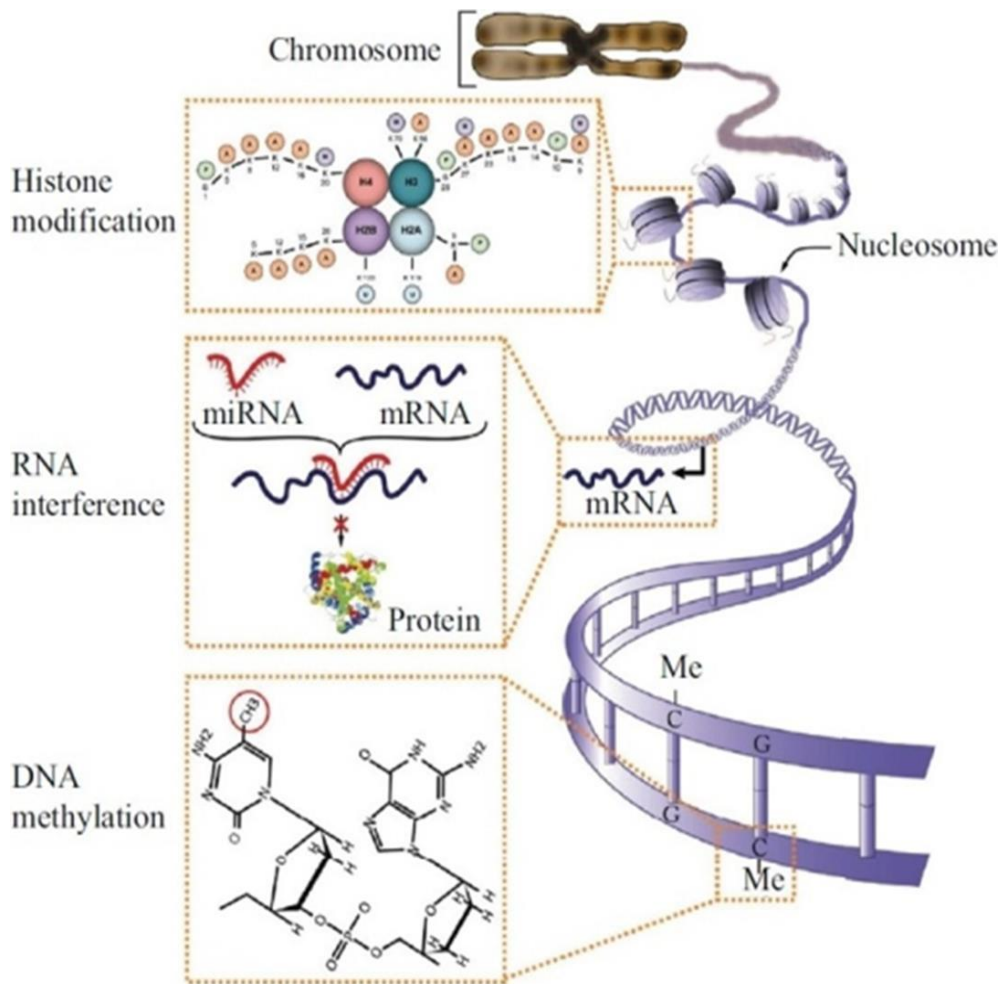
Grana genetike koja objašnjava promjene u ekspresiji gena koje nisu rezultat promjene sekvencije DNA.

- Epigenom.



Slika 2. Glavne značajke eukariotskog epigenoma

Molekularni mehanizmi epigenetskih modifikacija



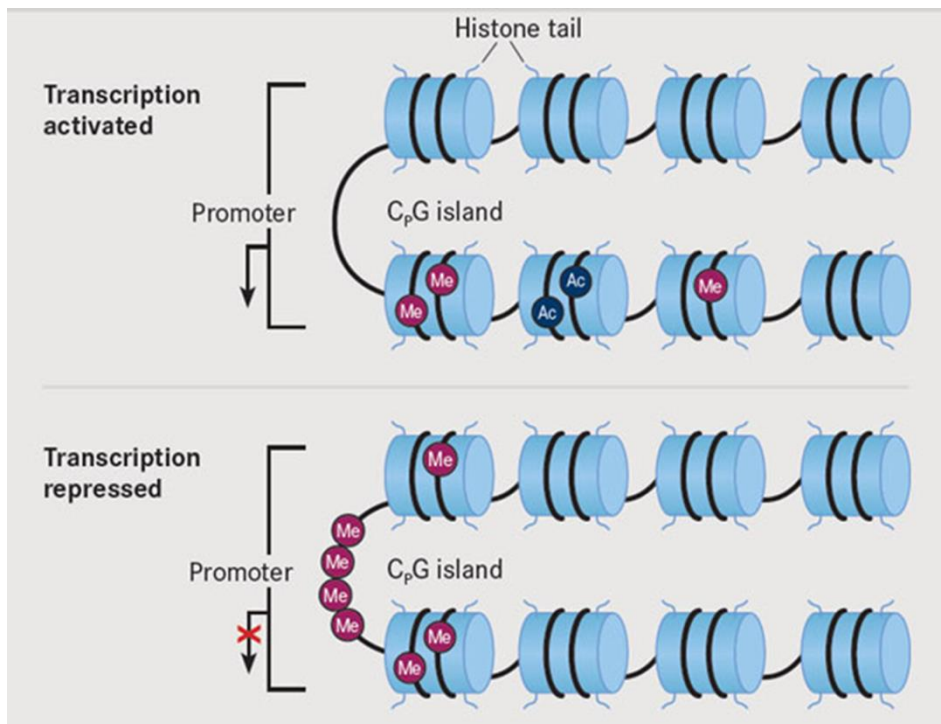
Slika 3. Molekularni mehanizmi epigenetske regulacije

Epigenetski mehanizmi u eukariota

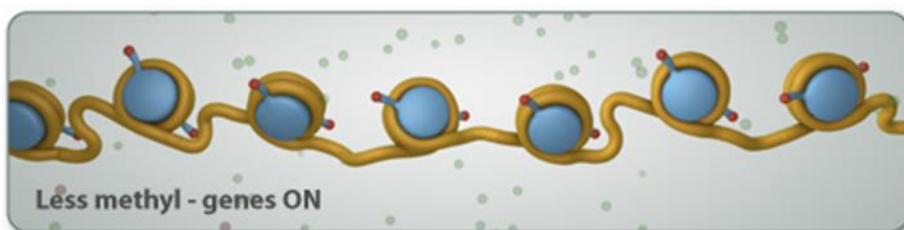
- Epigenetske modifikacije reguliraju transkripciju i translaciju u stanici;
- Epigenetski mehanizmi uključuju metilaciju C u slijedu CpG u DNA, modifikaciju histona (metilacija, ubikvitizacija, diacetilacija) i promijenu microRNA što dozvoljava stanici brzi odgovor na promijene u okolišu.

Metiliranost otoka CpG i histonskih proteina u nukleosomu

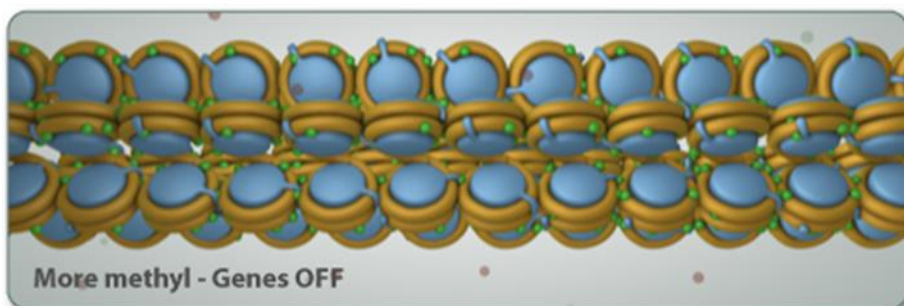
A)



B)

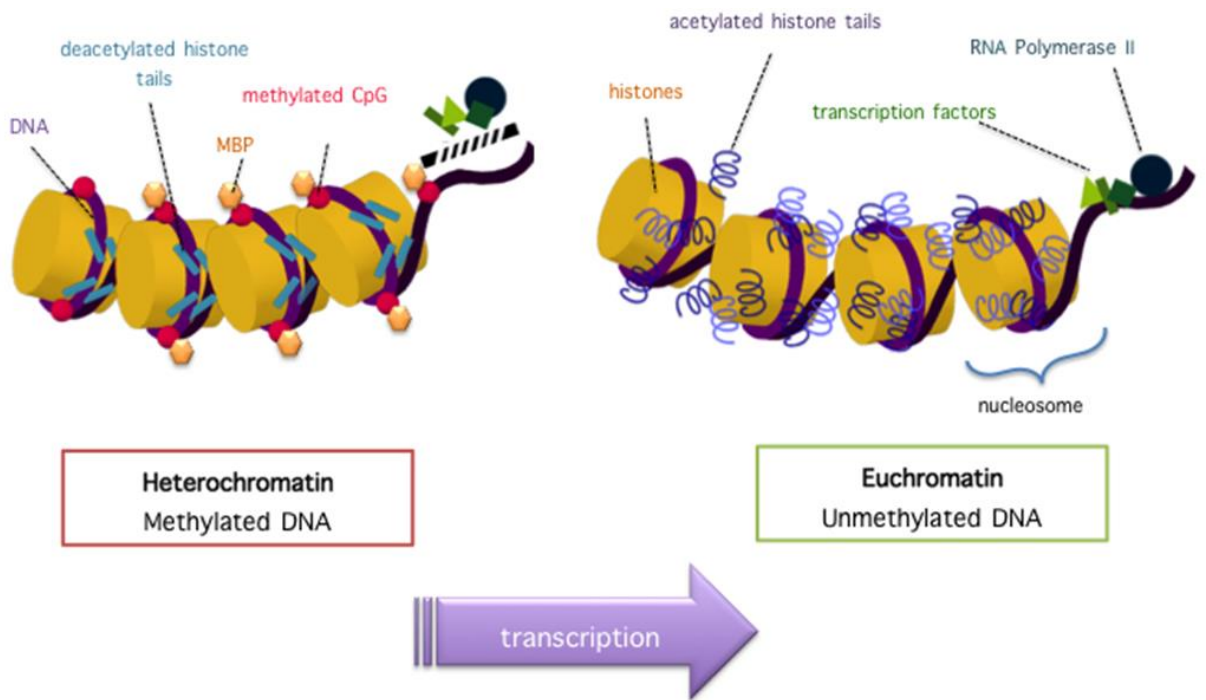


C)



Slika 4. A i B: Manja metiliranost i druge specifične modifikacije kromatina dozvoljava transkripcijsku aktivnost na određenom genu; A i C: Velika metiliranost C u otocima CpG i histonskih proteina u nukleosomu te druge specifične modifikacije kromatina dovode do represije transkripcije.

Ktivnost eukromatina i heterokromatina



Slika 5. Uloga eukromatina i heterokromatina

Epigenom kromosoma 22

Mapping the Epigenome

DNA contains the genetic blueprint for all human cells, but the reading and execution of the blueprint inside each cell is controlled in part by chemical markers attached to the DNA. Scientists have begun to map some of these epigenetic markers, including CpG methylation.



CpG methylation

DNA is a code written with four letters: **A**, **T**, **C** and **G**, each standing for one nucleotide.

In CpG methylation, a small marker called a methyl group attaches to the DNA at a CpG site, where a **C** and a **G** nucleotide sit next to each other.

Genes

Some of the known genes from Chromosome 22 that fall within the tested areas are shown outside the chart. CpG methylation is one of several epigenetic factors that is thought to influence how genes are transcribed or silenced within cells.

Sources: Human Epigenome Project; Nature Genetics; Dr. Florian Eckhardt; Dr. Stephan Beck

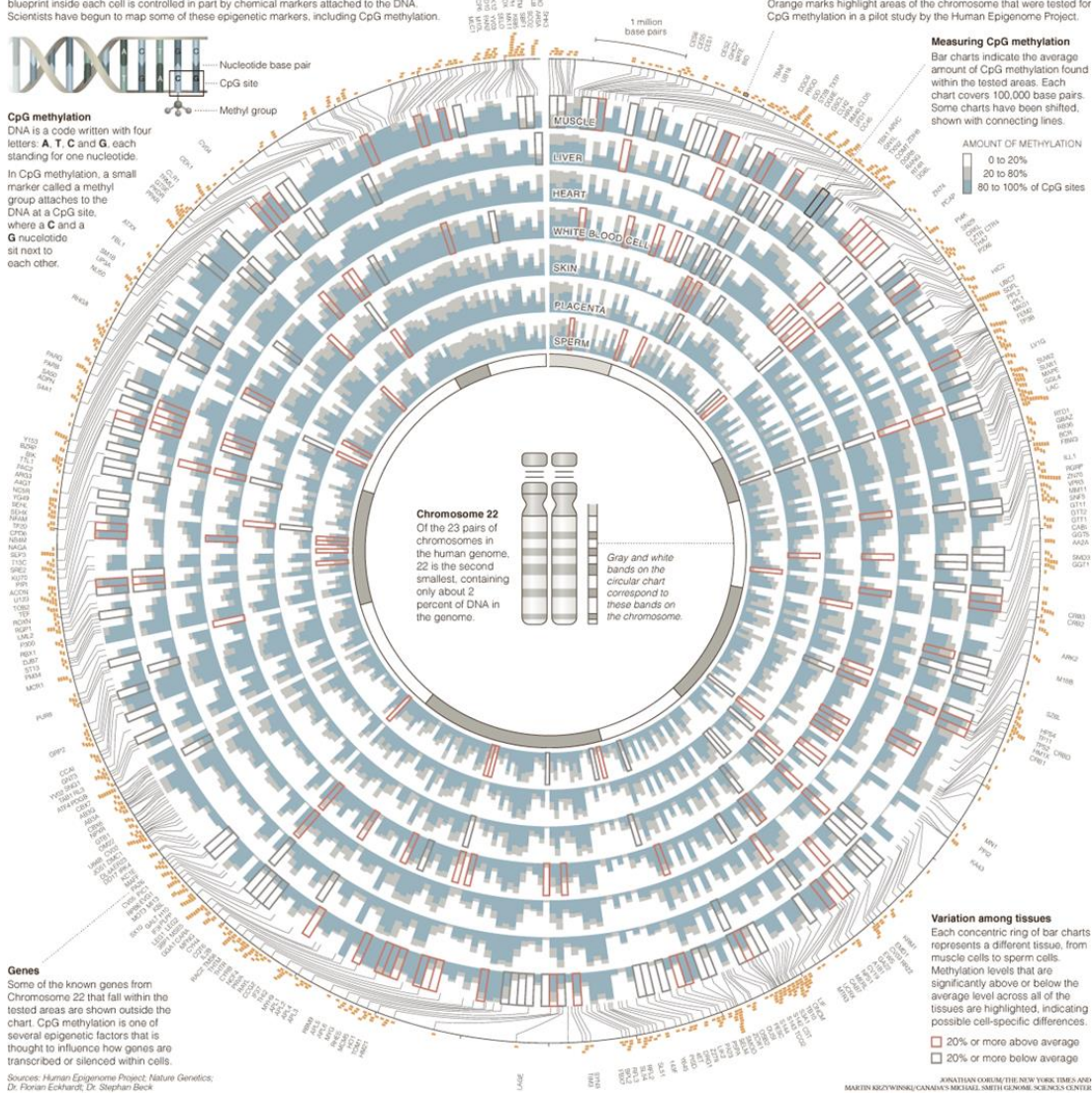
Reading the chart

The outer ring represents 35 million base pairs in Chromosome 22. Orange marks highlight areas of the chromosome that were tested for CpG methylation in a pilot study by the Human Epigenome Project.

Measuring CpG methylation

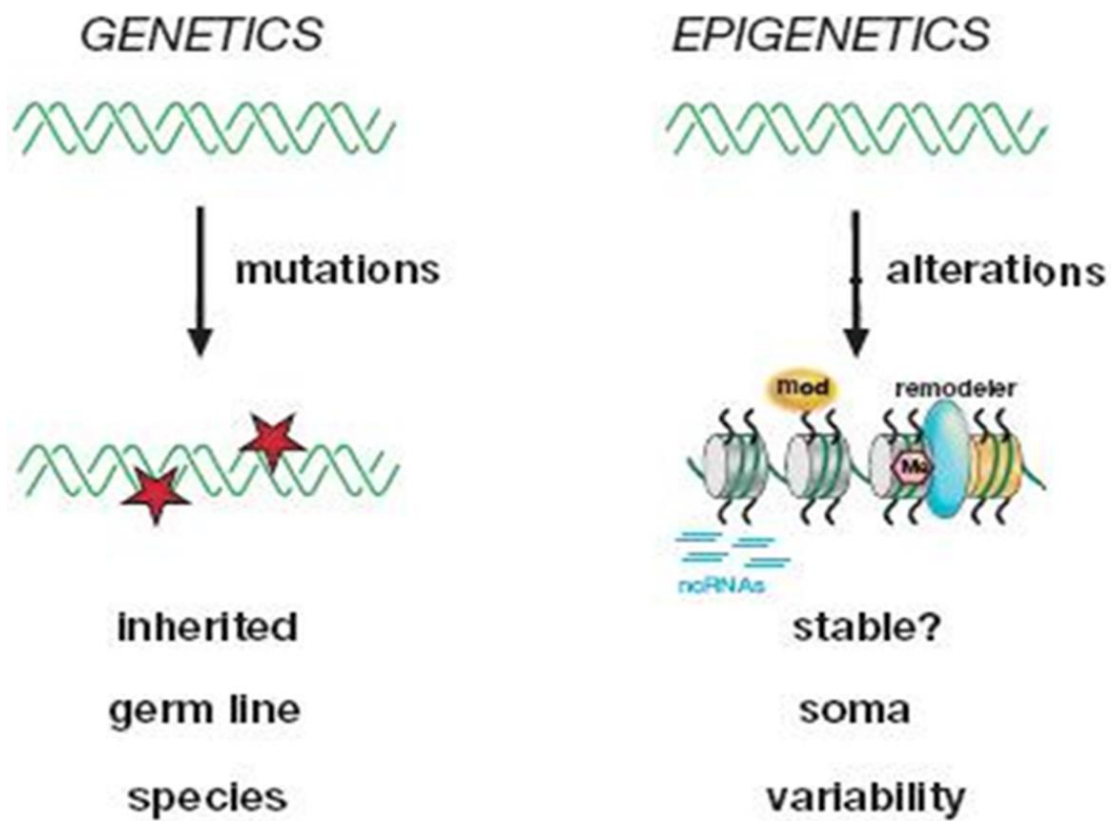
Bar charts indicate the average amount of CpG methylation found within the tested areas. Each chart covers 100,000 base pairs. Some charts have been shifted, shown with connecting lines.

AMOUNT OF METHYLATION
0 to 20%
20 to 80%
80 to 100% of CpG sites



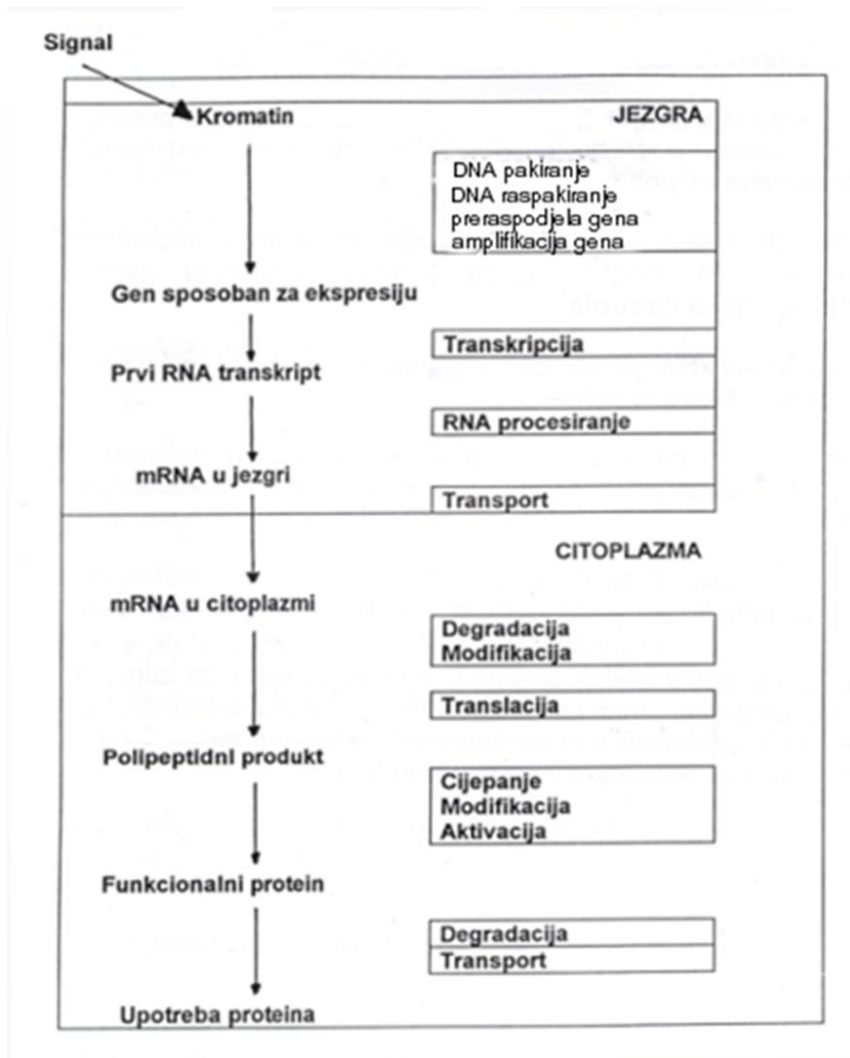
Slika 6. Shematski prikaz humanog epigenoma kromosoma 22

Koje su moguće promijene u genomu i epigenomu?



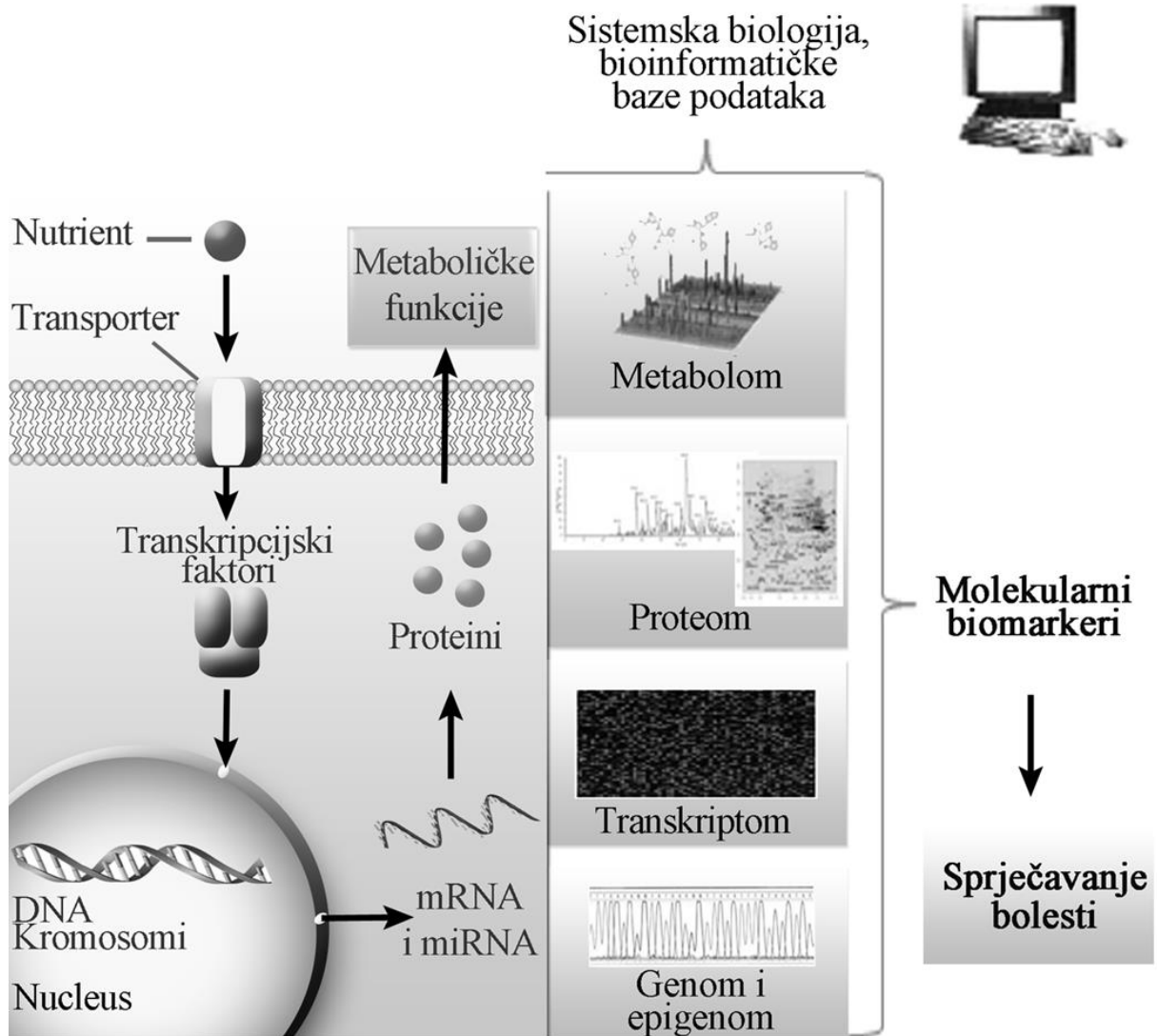
Slika7. Moguće promijene u genomu i epigenomu

Ekspresija eukariotskih gena



Slika 8. Regulacija ekspresije eukariotskih gena

Praćenje djelovanja signalnih molekula

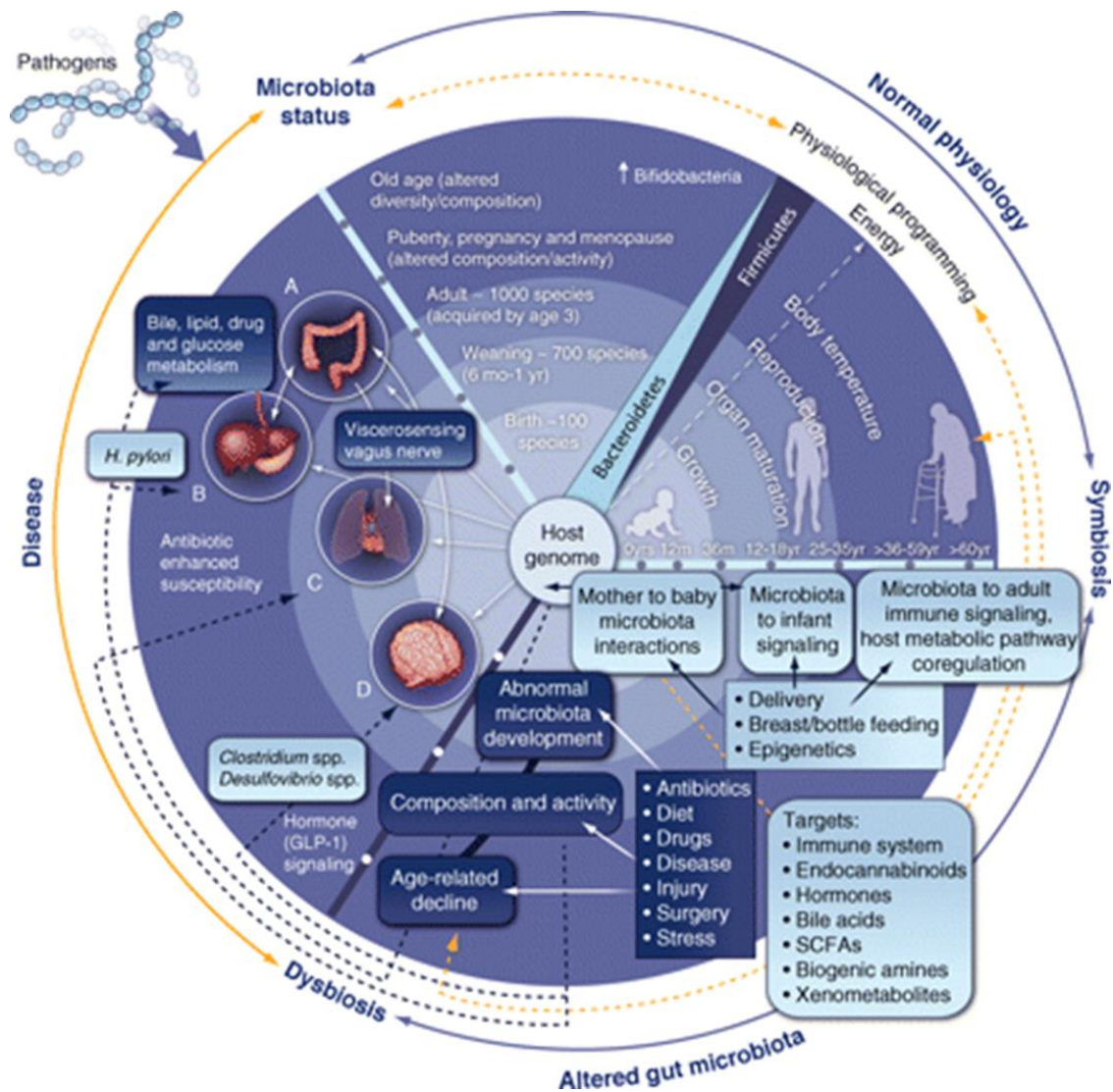


Slika 9. Mogućnosti praćenja signalnih molekula

Što smo mi sami?

- Rođeni sterilni.
- Prva bakterija dobivena od majke.
- Postupna kolonizacija probavnog trakta.
- Probavni trakt 10^{14} mikroorganizama (Silverman i Paquette, *Science* 2008) dok se naše tijelo sastoji od 10^{12} stanica.
- U kontaktu s mješovitim kulturama mikroorganizama.

Crijevne mikroflora čovjeka



Slika 10. Razvitak crijevne mikroflora tijekom ljudskog života (Science 2012, 336, 1262-1267)

Mješovite stanične kulture i stres

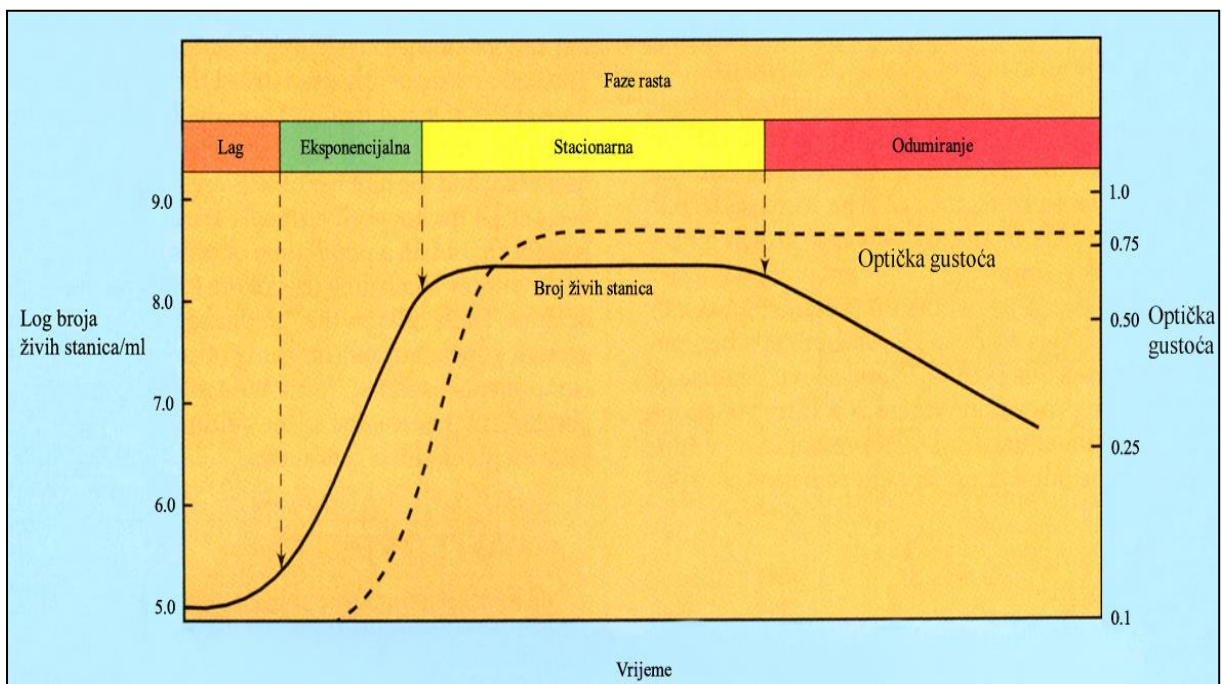
- Kako utječu bakterije na eukariotske stanice? Interakcija? DA, STALNO! Stresno stanje? DA! Homeostaza? DA!
- Kako rastu mješovite bakterijske kulture? Interakcija? DA, STALNO! Stresno stanje? DA!

Kako utječu bakterije na eukariotske stanice?

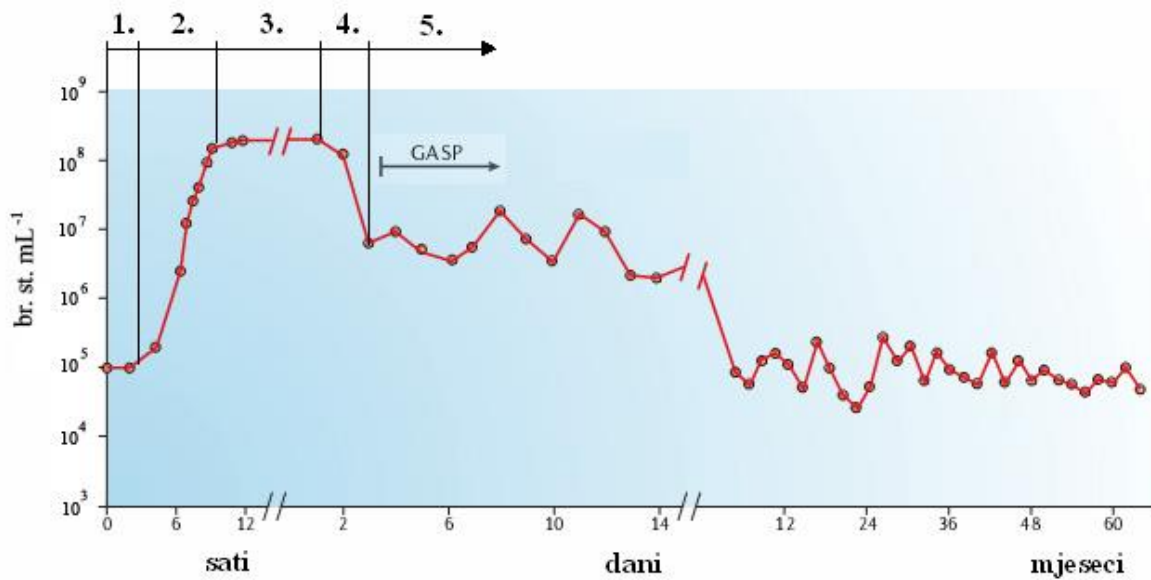
- U prisutnosti bakterija u eukariotskim stanicama dolazi do transkripcije gena odgovornih za imunitet, opstanak ili smrt stanice te prijanjanje ili pokretljivost.
- Metaboliti bakterija mijenjaju strukturu kromatina i efikasnost transkripcije kod eukariotskih stanica djelujući na epigenetske strukture kao što su metilacija DNA, modifikacija histona, proteinski kompleksi povezani s kromatinom, nekodirajuće RNA molekule i faktori za „spicing“ RNA.
-

Kako rastu mješovite bakterijske kulture?

- Kako rastu bakterijske monokulture?



Slika 11. Krivulja rasta bakterijskih stanica



Slika 12. Krivulja rasta nesporogenih bakterija tijekom produljene stacionarne faze rasta (Bačun i sur., 2011)

Promijene bakterijske stanice u stacionarnoj fazi

- Morfologija: manje, okrugle stanice, otpornija stanična stjenka;
- Nukleoid: povećana kondenzacija uz pomoć histon sličnih proteina;
- Metabolizam: represija aerobnog metabolizma, smanjenje sinteze proteina;
- Transkripcija: promjene globalnih regulatora, promjena podjedinice σ iz RNA pol;
- Translacija: 100S ribosomski dimeri, povećana sinteza proteaza i peptidaza;
- Ostalo: povećana otpornost na stres, produkcija sekundarnih metabolita, programirana smrt stanica, mutator fenotip, GASP fenotip, quorum sensing itd.

Tri hijerarhiska stupnja regulacija gena u *E. coli*

- (i) globalna kontrola kromosomske strukture
- (ii) kontrola pomoću transkripcijskih regulatora putem regulona i stimulona
- (iii) operon specifična kontrola

(i) globalna kontrola kromosomske strukture

- (ii) koordinira lokalnu superzavijenost DNA i topološke struktura cijelog kromosoma pomoću histon sličnih proteina;

- (iii) Epigenom: adenin metiliran u sekvenciji GATC pomoću Dam metilaze, signal za DNA replikaciju, kromosomsku segregaciju, popravak nesparenih baza (mismatch repair, MMR), pakiranje virusnog genoma, aktivnost transposaze, regulaciju ekspresije gena i patogenost (hemimetilirani ili nemetilirani).

Metilacija blokira transkripcijske regulatore: katabolički aktivator proteina (CAP), leucin regulatorni protein (Lrp), OxyR (antioksidacijski sustav, senzor peroksida i ostalih reaktivnih metabolita kisika).

Metilacija signal za kratku memoriju metaboličkih uvjeta za razvijanje i dijeljenje bakterijske stanice.

Novi lijekovi koji inhibiraju metilaciju A u sekvenciji GATC u patogenih bakterija .

(ii) globalna kontrola pomoću transkripcijskih regulatora putem regulona i stimulon

- kod regulona različiti afiniteti transkripcijskog regulatornog proteina za različite operatorske regije unutar genoma (kod SOS odgovor LexA autolizirani represor stupnjevito ekspresira gene *recA*, *uvrA*, *uvrB*, *umuCD* i *dinB*);
- više regulona može formirati modulon u kojem pleotropni regulatorni protein regulira više metaboličkih putova ili funkcija (u CAP modulonu pomoću CAP/cAMP regulirani su operon Lac i regulon Ara, a koji imaju specifične regulatorne proteine);
- stimulon je skup gena (mogu biti u operonima ili regulonima) pod kontrolom istog stimulusa (QS u bakterija);
- kao odgovor na signale metabolizma ili signale iz okoliša.

Transkripcijski regulatori

Lrp leucin regulatorni protein (leucine-responsive regulatory protein), homodimer.

FIS nucleoid povezani protein u *E. coli*, sudjeluje u kontroli replikacije kromosoma.

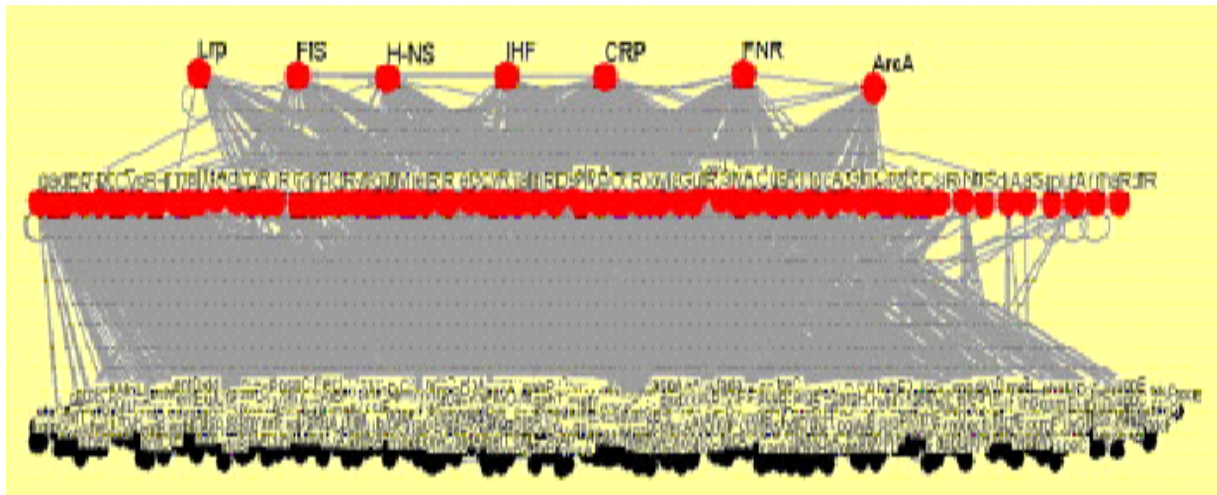
H-NS nucleoid povezani protein u *E. coli*, sudjeluje u regulaciji gena, DNA kondenzacija.

IHF (integration host factor) integracijski faktor domaćina je protein arhitekture zavoja u DNA i aktivira transkripciju određenih promotora.

CRP = cAMP-receptor proteina= catabolite activator protein, CAP

FNR protein (regulator fumarat i nitrat redukcije) je globalni transkripcijski faktor i direktno regulira oko 100 operona.

AraC protein represira i inducira operon araBAD kao odgovor na prisustvo ili nedostatak L-arabinose.



Slika 13. Transkripcijska regulatorna mreža

Odgovor bakterijske stanice na oštećenja u DNA

1. Popravci prije replikacije:

1.1. Reverzija oštećenja

- 1.1.1. Fotoreaktivacija
- 1.1.2. Alkiltransferaze

1.2. Uklanjanje oštećenja

- 1.2.1. Bazni ekscizijski popravak
- 1.2.2. Nukleotidni ekscizijski popravak

2. Popravci poslije replikacije:

Popravak krivo sparenih baza

3. Popravci tijekom replikacije:

3.2. Zaobilazanje oštećenja i mogući nastanak mutacija

- 3.2.1. Odgovor SOS
- 3.2.2. Rekombinacijski popravak

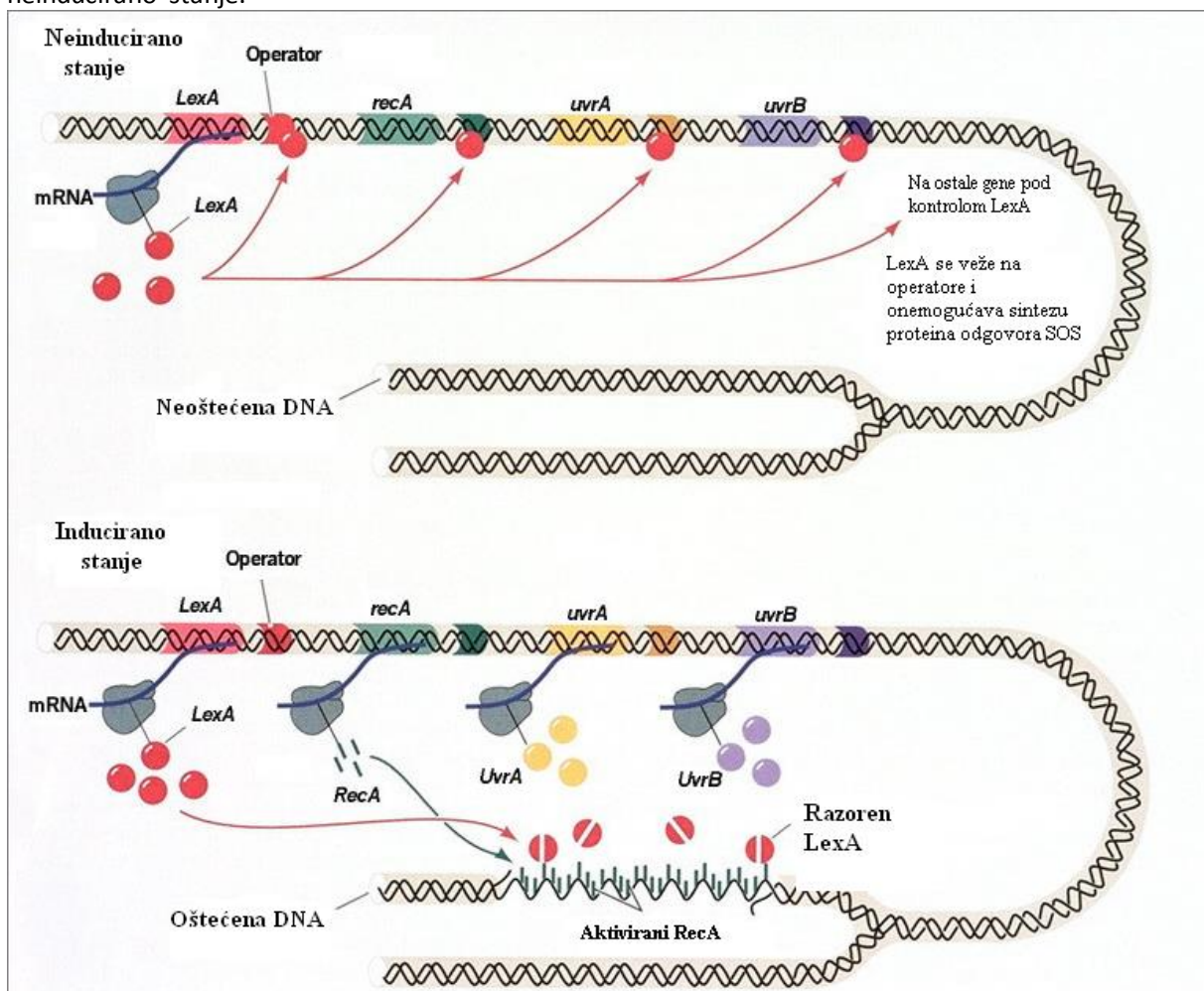
Popravci oštećene DNA

Oštećenja u molekuli DNA koja zaustavljaju replikaciju kromosoma ugrožavaju integritet staničnog genoma kao i stanice. Globalni odgovor na oštećenja u DNA usmjeren je prema očuvanju stanice i aktiviranju više putova popravak DNA. Neki su popravci točni (engl. error free repair) te se uspostavlja prijašnje stanje. Drugi popravci skloni greškama (engl. error prone repair) zaobilaze i toleriraju oštećenja te nasuprot oštećenja dolazi do ugradnje bilo koje nukleinske baze što može rezultirati nastankom mutacija.

3.2.1. Odgovor SOS

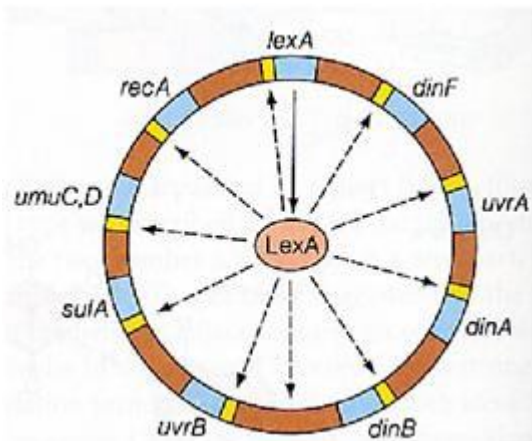
Godine 1974. Miroslav Radman je opisao i imenovao odgovor SOS koji u bakteriji *E. coli* održava integritet genoma pomoću replikacije preko oštećenja u DNA tzv. translezijske sinteze (engl. translesion synthesis, TLS) te mogu nastati greške i mutacije u DNA (engl. error prone repair). Odgovor SOS induciraju vanjski štetni agensi koji oštećuju DNA. Inducirajući signali u bakteriji *E. coli* su: oštećenja DNA metaboličkim intermedijerima, greške u replikaciji, rekombinaciji ili kromosomskoj segregaciji, povišena temperatura iznad svojstvene metaboličke, izloženost antibioticima i visokom tlaku, blago alkalni uvjeti, toksične tvari i mutageni. Iznenadujuće je da se odgovor SOS može aktivirati i prekidom dvostruke zavojnice koja je nastala restrikcijom endonukleaze same *E. coli*.

Signal za ekspresiju gena regulona SOS javlja se upravo u regiji jednolančane DNA kada se DNA polimeraza III zaustavi na oštećenu u DNA. Odgovor SOS reguliran je represorom LexA kao i proteinom RecA koji se veže na jednolančanu nakon zastoja replikacije DNA te djeluje kao aktivator (slika 2). Kompleks RecA-DNA tzv. RecA filament odgovoran je za tri međusobno važne funkcije: indukciju odgovora SOS i induciranu SOS mutagenozu te rekombinaciju DNA. Represor LexA u neinduciranom stanju sprječava ekspresiju gena koji kodiraju za proteine uključene u odgovor SOS (slika 2, neinducirano stanje, gornji dio slike). Nakon izlaganja nekom mutagenom agensu dolazi do oštećenja DNA i nastajanja regije jednolančane DNA. Na jednolančanu DNA (eng. single strand DNA, ssDNA) se veže protein RecA koji postaje aktiviran te inducira autoproteolizu represora LexA (slika 2, inducirano stanje, donji dio slike). Induciranjem odgovora SOS sinteza proteina RecA je brza, 10 molekula u sekundi, a maksimum se postiže sat vremena nakon djelovanja mutagenog agensa. Veća koncentracija nukleoprotein kompleksa i interakcija RecA s LexA izaziva razaranje sve većeg broja represora LexA čime se omogućava ekspresija sve više gena regulona SOS. Produkti ekspresije prvih gena su enzimi (UvrA i UvrB) koji promiču popravak oštećene DNA, a produkti kasnih gena su polimeraze sklone greškama. Kada polimeraze pređu preko oštećenja u DNA i ugrade bilo koju nukleinsku bazu te djeluje DNA ligaza. Tada nestane jednolančane DNA pa se sjetizirani represor LexA više ne cijepa već se ponovno veže na operatorska mjesta gena odgovora SOS i stanica ulazi u neinducirano stanje.



Slika 14. Regulon odgovora SOS u neinduciranom i induciranom stanju. Tijekom neinduciranog stanja u stanici s neoštećenom DNA, represor LexA sprječava sintezu RecA, UvrABC, RecBCD i dugih proteina uključenih u odgovor SOS (gornji dio slike). U induciranom stanju oštećenje DNA potiče protein RecA na vezanje na ssDNA što rezultira samorazaranjem represora LexA i omogućava transkripciju gena regulona SOS (donji dio slike).

Protein LexA kontrolira ekspresiju 43 gena u *E. coli* (Courcell i sur., 2001)



Slika 15. Utjecaj represora LexA na promotorska mjesta određenih gena u *E. coli*