

## Predavanje GIO 2

### Mikrobna raznolikost i metagenomika

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

#### Mikroorganizmi na Zemlji

- Procijenjeno je da na Zemlji postoji  $10^{30}$  mikrobnih stanica (Sleator i sur., 2008),
- Problem što se najveći broj mikroorganizama ne može uzgajati u laboratorijima,
- Vjerojatno su potrebni posebni uvjeti ili specijalna simbioza pa način uzgoja i njihova fiziološka svojstva ostaju nepoznati,
- 1995. godine Global Biodiversity Assessment (Cambridge Un. Press, Cambridge) procijenio je mogućnost postojanja  $10^6$  bakterijskih vrsta pa čak i  $10^8$  (Sleator i sur., 2008. Metagenomics. Lett. Appl. Microbiol. 47:361-366).

#### Metagenomika

- Snaga podataka metagenomike omogućiti će bolje razumijevanje postojećih obitelji gena i otvoriti će mogućnost za daljnja istraživanja mehanizama funkcije, strukture i evolucije obitelji proteina (Life Science news, 2007).

#### Opisano oko 4 200 vrsta bakterija

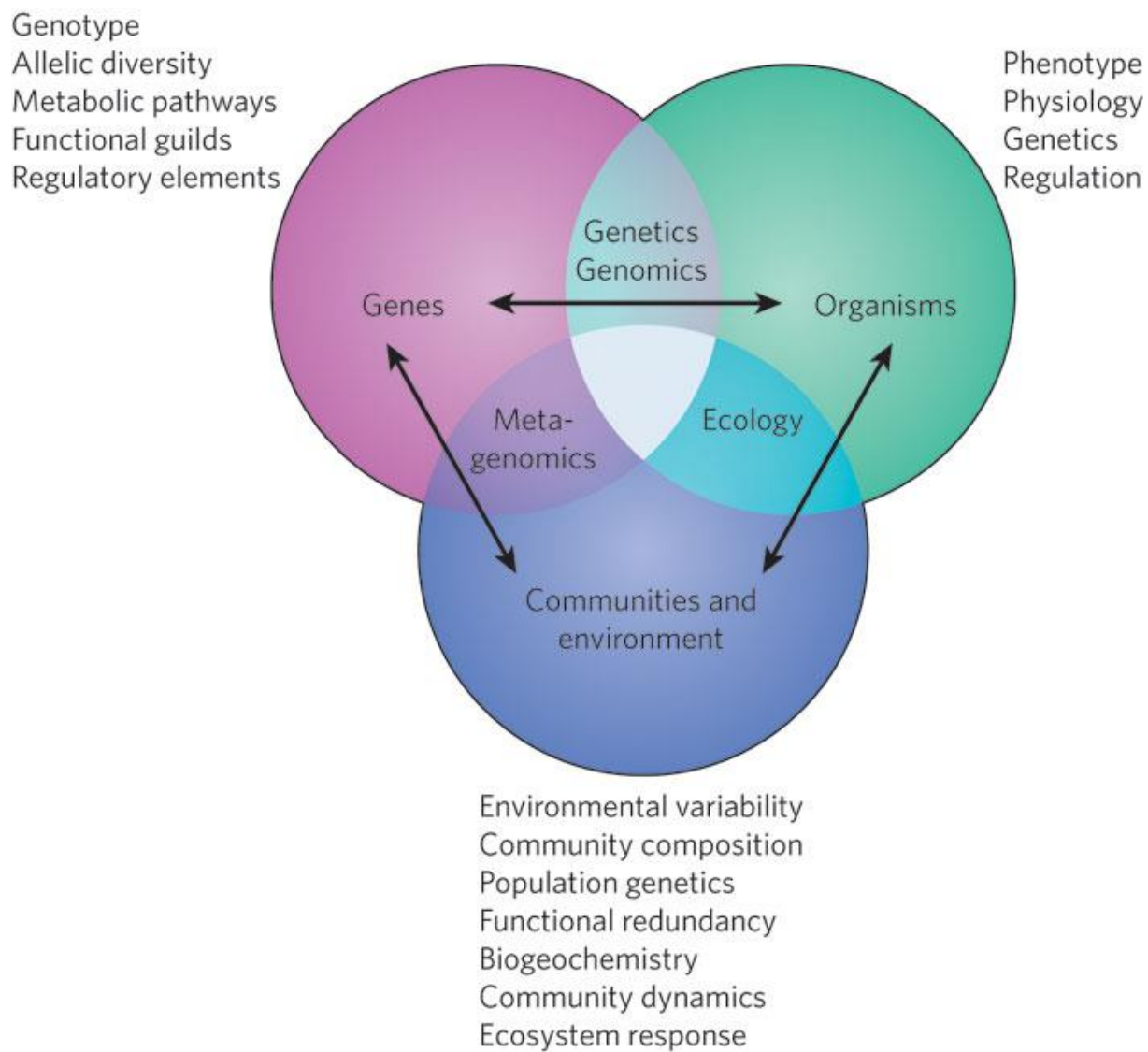
- smatra se da je to samo 0,1 do 1 % bakterija u prirodi
- nekoliko linija provjere ukazuje da je broj nepoznatih bakterija ogroman (prokarioti na Zemlji najmanje 3,8 milijardi godina)

#### Problemi

- selekcija i uzimanje uzoraka m. o. za koje se ne zna kako ih uzgojiti,
- pitanje kako ih održati i rekonstruirati genetički materijal,
- obnavljanje DNK i učinkovita analiza.

Tablica 1. Metode za proučavanje mikrobnih stanica iz okoliša

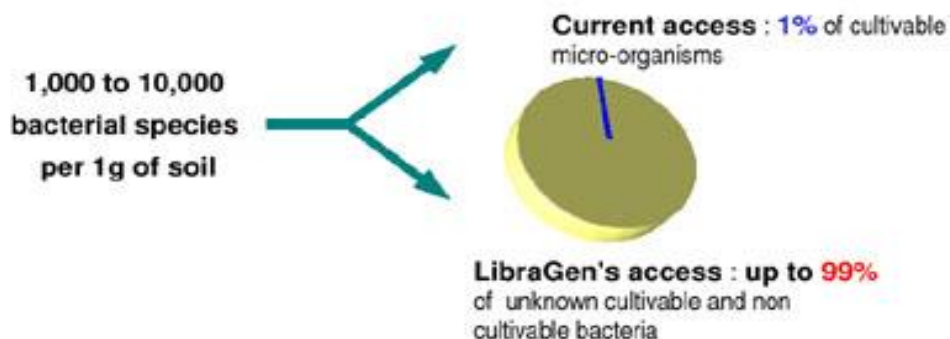
<b>Metode</b>	<b>Opis</b>	<b>Komentar</b>
Mikroskopija	Za proučavanje mikrobnog fenotipa	Nepouzđano
Uzgoj	Pojedinačne stanice rastu u tekućim ili na krutim podlogama	Ukazuje na biologiju m.o.; Mnogi neuzgojivi u lab. (nepoznati uvjet ili simbioza)
PCR-rRNK	rRNK konzervirana unutar vrste, PCR za umnožavanje, sekvencijiranje i filogena analiza –filogena stabla	1980tih napredak u mikrobiologiji i stvaranje filogenih stabla
Sekvencioniranje genoma “shotgun” metodom	DNK izolirana, rezana i dijelovi sekvencijirani	Korišteno za sekvencioniranje tisuća genoma
Metagenomika	DNK direktno izolirana iz okoliša i sekvencijirana	Pregled genoma bez uzgoja



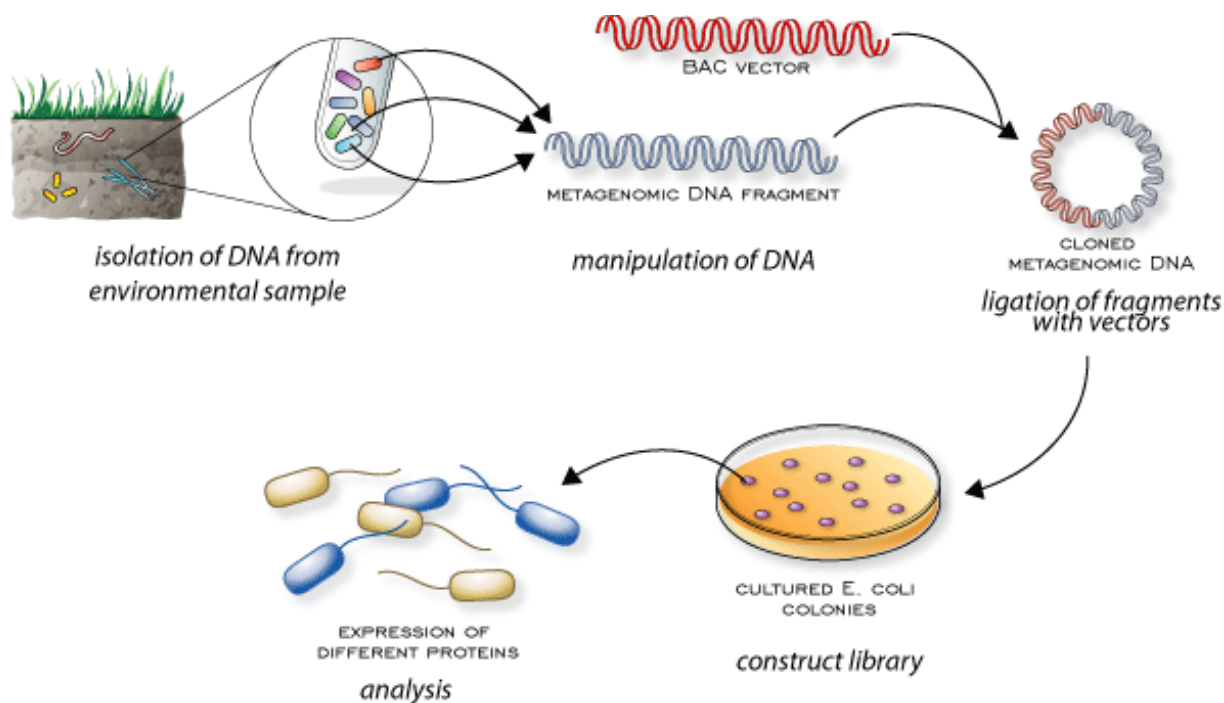
Slika 1. Presječište tradicionalnih disciplina i metagenomika

## Što je metagenomika?

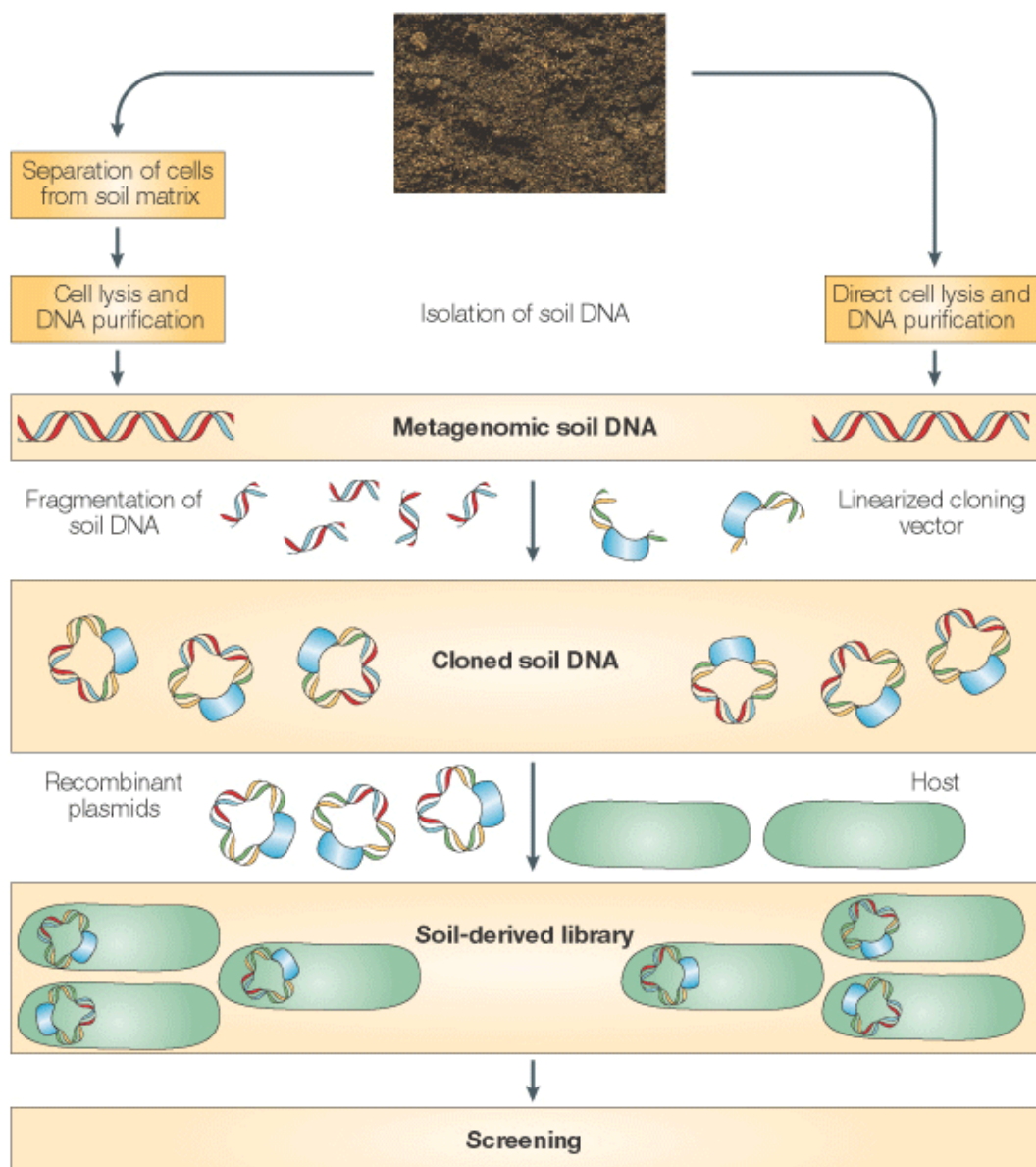
Metagenomika je proučavanje metagenoma, tj. analiza genetskog materijala iz uzoraka (zemlja, vrući izvori, more, probavni trakt, koža i drugo) iz okoliša bez uzgoja mikroorganizama u laboratoriju. Metagenomika, "genomika zajednice" ili "genomika ekološke niše", je sekvencijiranje i analiza DNK mikroorganizama obnovom iz okoline, bez potrebe za njihovim uzgojem.



Slika 2. Procjena metagenoma iz tla



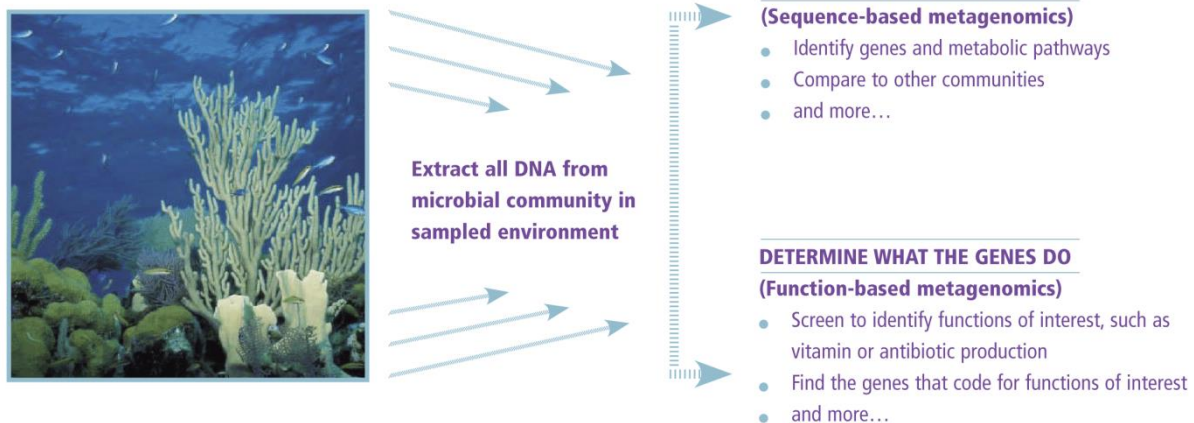
Slika 3. Standardni pokusi metagenomike



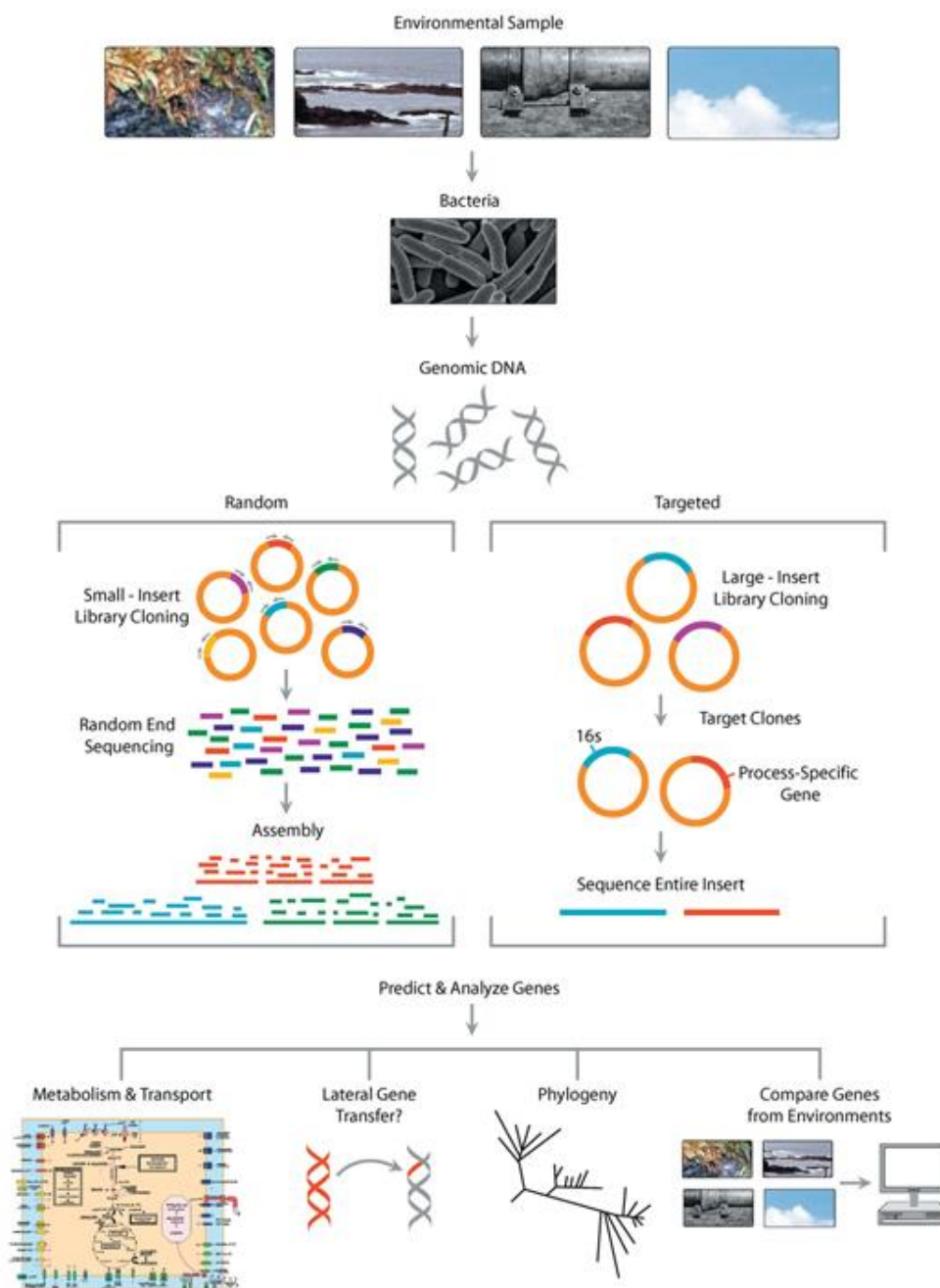
Nature Reviews | Microbiology

Slika 4. Osnovni koraci u metagenomici za istraživanje genomske raznolikosti mikrobnih zajednica u tlu.

## THE METAGENOMICS PROCESS



Slika 5. Postupci u metagenomici



Slika 6. Postupci u analizi metagenoma

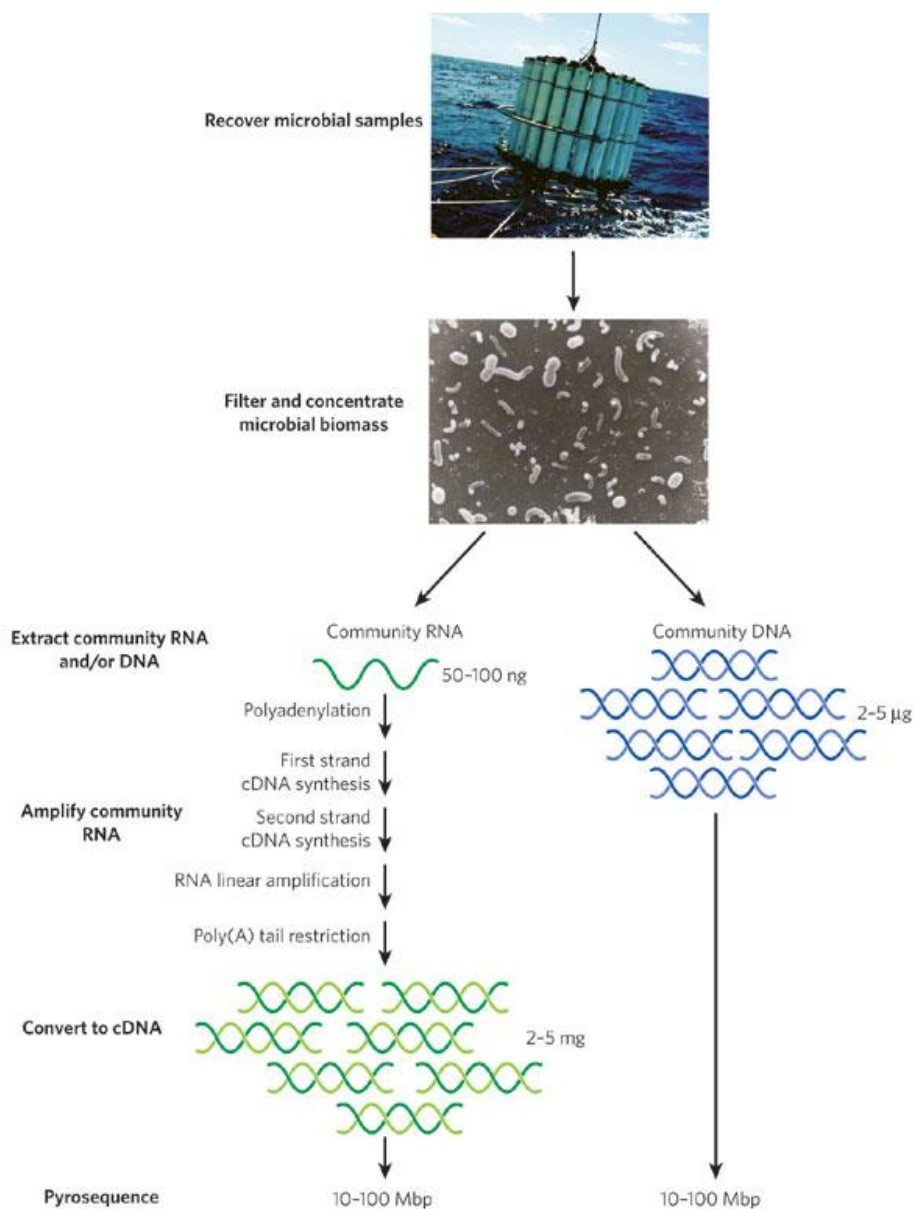
#### Mikrobna raznolikost u oceanu

- Manje od 5% mikrobne raznositosti u oceanima su poznate vrste koje se mogu uzgojiti,

- tisuće DNA sekvencija iz Saragoškog mora (Sargasso Sea), detektirano na temelju filogenetskih markera 16S rRNA, RecA, EF-Tu, EF-G, HSP70 i drugih, kodira više od milijun nekarakteriziranih strukturnih gena, nisu nužno svi novi (JC Venter i sur., Science, 2004).

#### Mikrobna raznolikost u oceanu

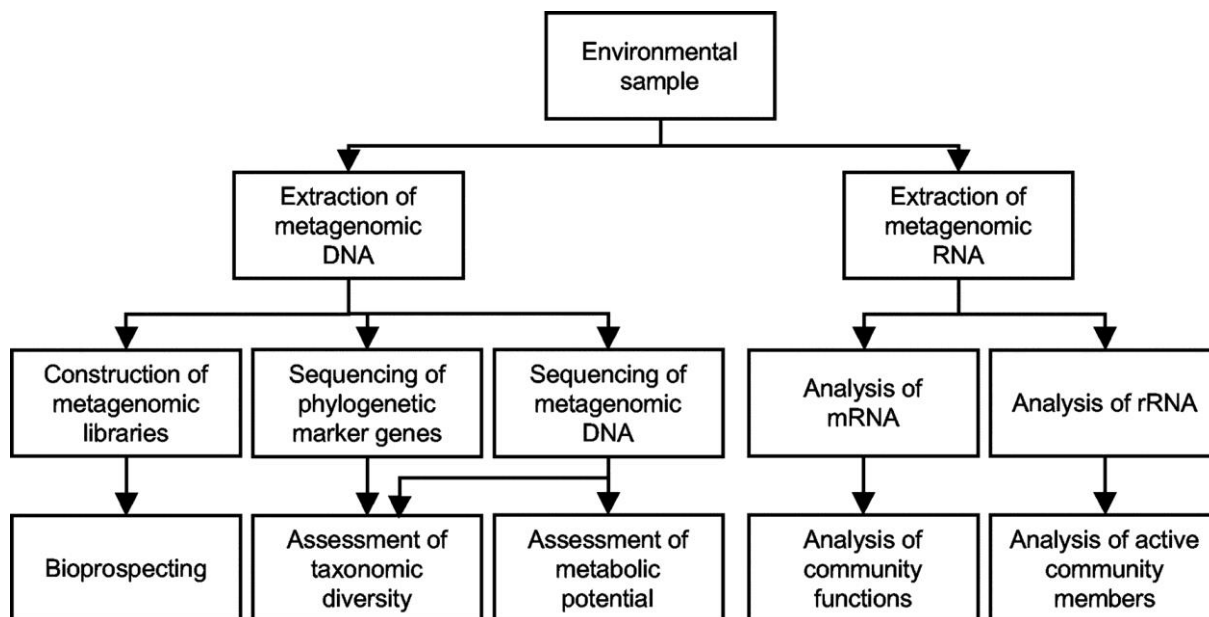
- Manje od 5% mikrobne različitosti u oceanima su poznate vrste koje se mogu uzgojiti, tisuće DNA sekvencija iz Saragoškog mora (Sargasso Sea), detektirano na temelju filogenetskih markera 16S rRNA, RecA, EF-Tu, EF-G, HSP70 i drugih, kodira više od milijun nekarakteriziranih strukturnih gena, nisu nužno svi novi (JC Venter i sur., Science, 2004).



Slika 7. Protokol sekvencioniranja transkriptoma (RNK) i genoma (DNK) iz morskih mikrobnih zajednica.

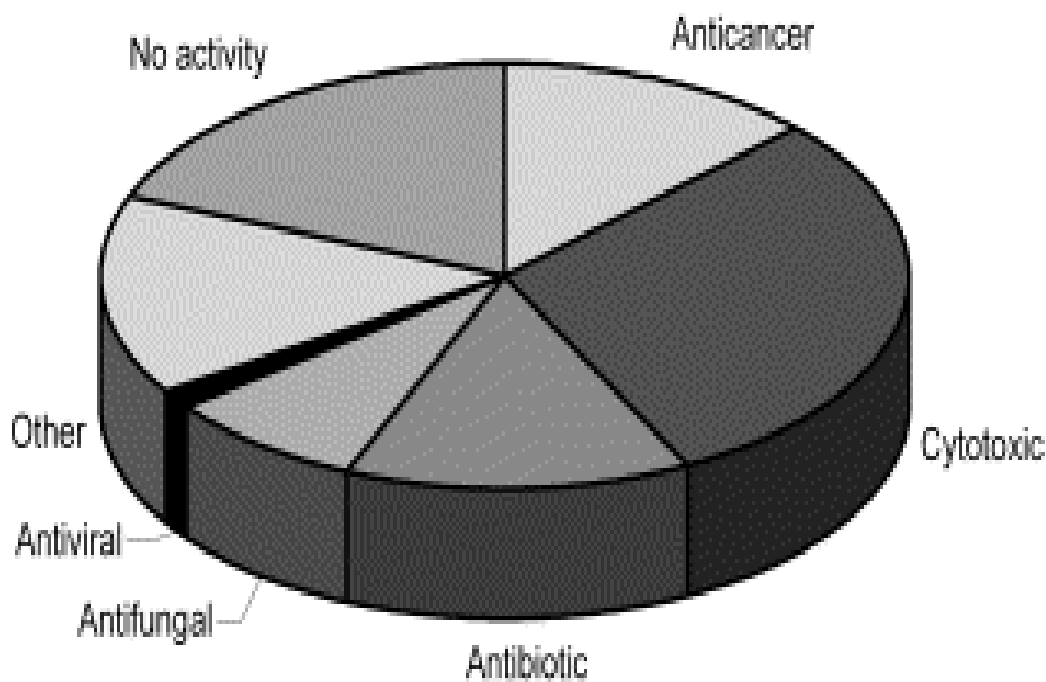


### Metagenomske analize mikrobnih zajednica bazirane na nukleinskim kiselinama



Slika 8. Metagenomske analize mikrobnih zajednica bazirane na nukleinskim kiselinama (Simon C , Daniel R Appl. Environ. Microbiol. 2011, 77, 1153-1161)

### Biološka aktivnost spojeva iz morskih cijanobakterija



Slika 9. Udjeli i svojstva metabolita morskih cijanobakterija

## Gljive

- za gljive broj poznatih vrsta je oko 72 000;
- Hawksworth (1990) procjenjuje aproksimacijama da postoji ukupno 1,6 milijuna različitih vrsta.

## Ljudi

- Genom
- Epigenom (mikrobiom)

### **Venter's Genome Sheds New Light on Human Variation**

*Science* 7 September 2007

- J. Craig Venter je prvi usporedio DNK iz vlastog kromosomima s naslijedim materialom svojih roditelja.
- 2003. vodio i objavio sekvencionirani humani genom



Slika 10. J. Craig Venter

### **Nove spoznaje o varijacijama humanog kromosoma**

- Venter i njegovi suradnici su usporedili njegov genom sa dva haploidna genoma njegovih roditelja te procijenili razlike između DNA.
- Analizom je pronađeno više od 4.000.000 varijante između kromosoma Venterove majke i očeve.

- Zaključili su da se humani kromosomi međusobno razlikuju za 0,5%, a ne 0,1%, kao što se prethodno ložio procjenjivalo.

### **Prvi objavili skvencionirani genoma (2007)**

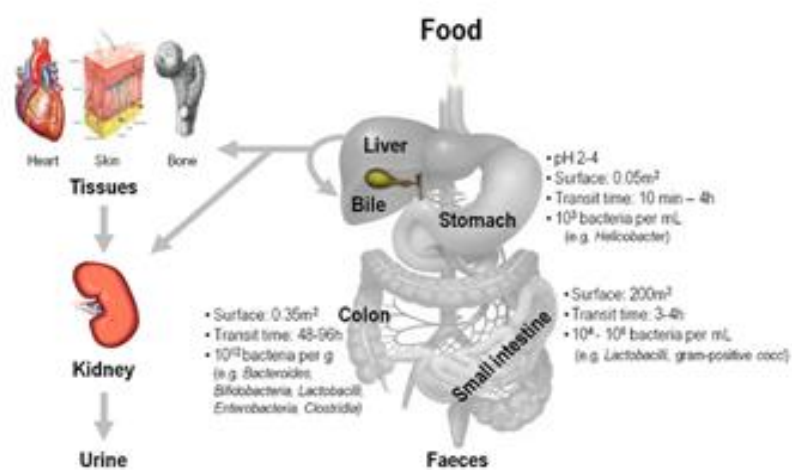
- James Watson, struktura DNA, objavio podatke sekvencioniranog genoma.
- Venterov rad (2007) o vlastitom genomu uključuje tablicu koja popisuje više od dvije varijante desetak gena koji su povezani s povećanim rizikom za alkoholizam, asocijalnim ponašanje, ovisnosti o duhan i drugim ovisnostima, bolesti srca i Alzheimerove bolesti.
- Njegov otac je bio pušač koji je umro u 59 od infarkta, a njegova 84-godišnja majka još uvijek igra golf i jedri s njim.

### **Što smo mi sami?**

- Rođeni sterilni.
- Prvu *E. coli* dobivamo od majke.
- Postupna kolonizacija probavnog trakta.
- U probavnom traktu od  $10^{13}$  do  $10^{14}$  mikroorganizama (Silverman i Paquette, *Science* 2008) dok se naše tijelo sastoji od  $10^{12}$  stanica.
- U kontaktu s mješovitim kulturama mikroorganizama.

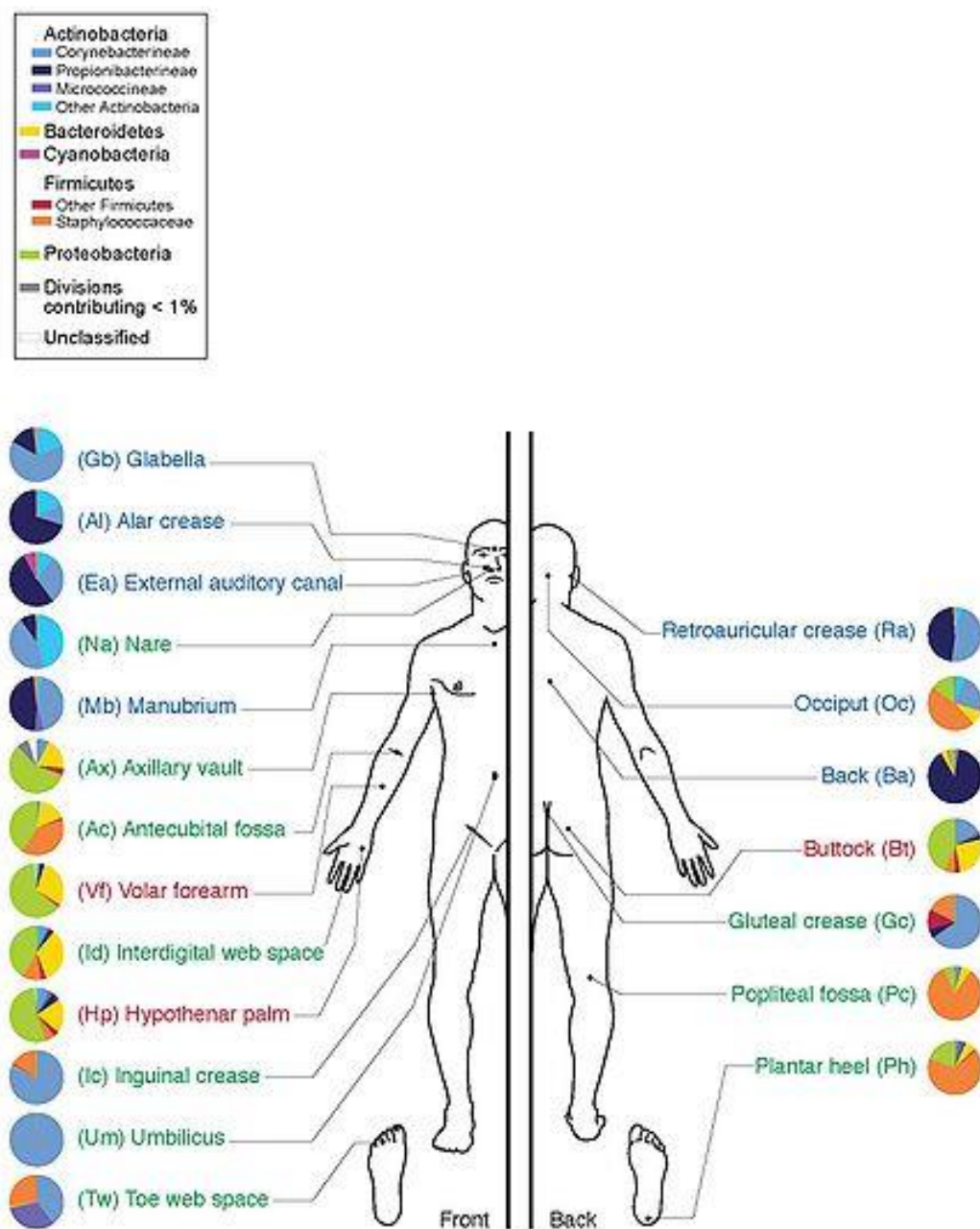
## Mikroorganizmi prisutni u humanom probavnom traktu

Food compounds (macro- and micronutrients) are digested and absorbed the gastro-intestinal tract (GIT) before they may reach various other body tissues



Slika 11. Mikroorganizmi prisutni u probavnom traktu

Prikaz ljudskog tijela i bakterije koje dominiraju na koži



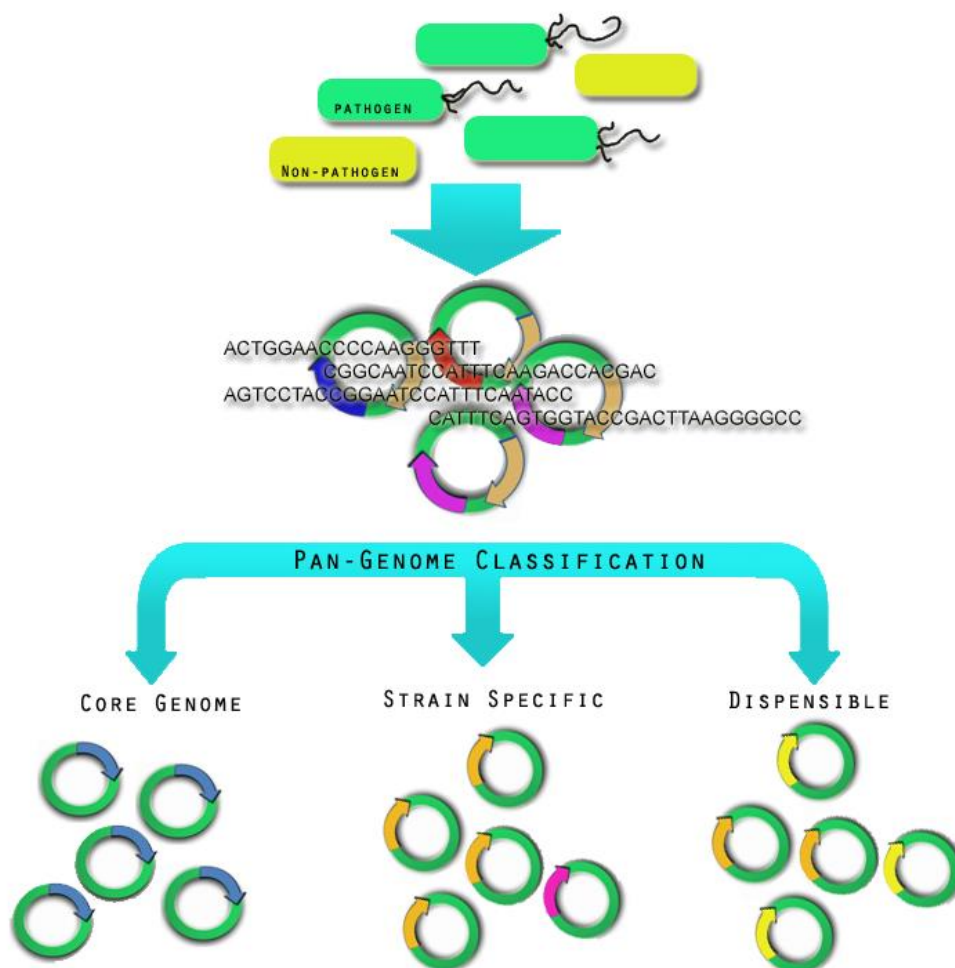
Slika 12. Prikaz ljudskog tijela i bakterija koje dominiraju na koži

## Komparativna genomika

- Studij o odnosu genomske strukture i funkcije unutar različitih bioloških vrsta ili sojeva.
- Komparativna genomika služi za povezivanje informacija o genomima za razumijevanje njihovih funkcije i evolucijskih mehanizama.

## Analize genomskih raznolikosti

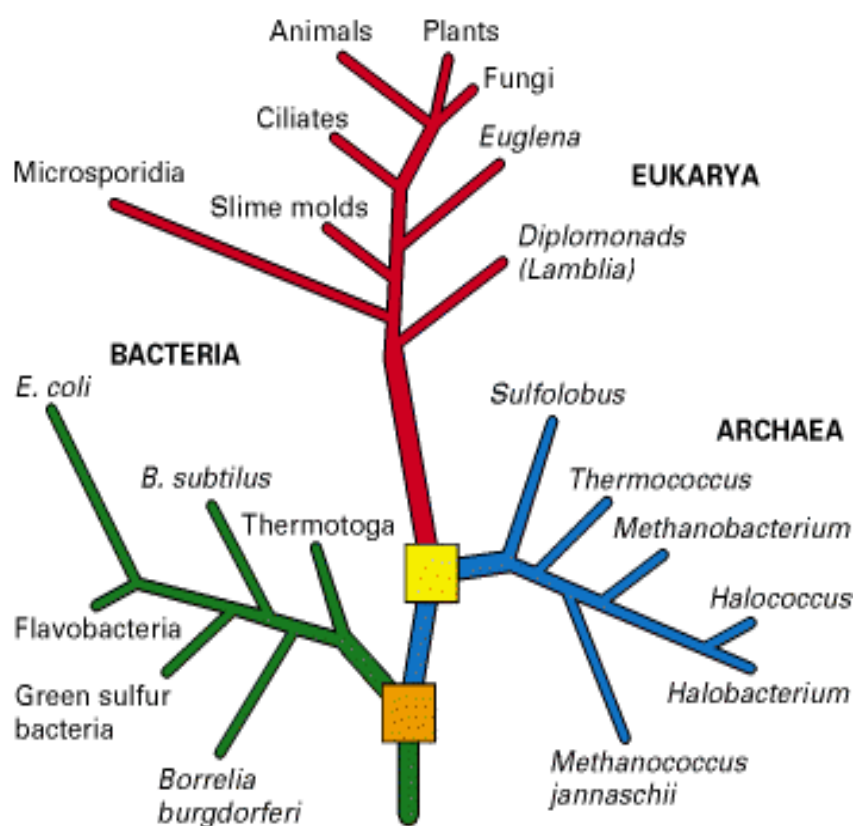
pan-genom (ili supra-genom) opisuje sve gene nađene u određenoj vrsti organizma (prokarioti)





Slika 13. Klasifikacija pangenoma

## Bakterije

- Fosilni nalazi od 3,5-3,8 milijardi godina
- Prave bakterije i Archae bakterije



-  Presumed common progenitor of all extant organisms
-  Presumed common progenitor of archaeobacteria and eukaryotes

Slika 14. Stablo života i tri domene

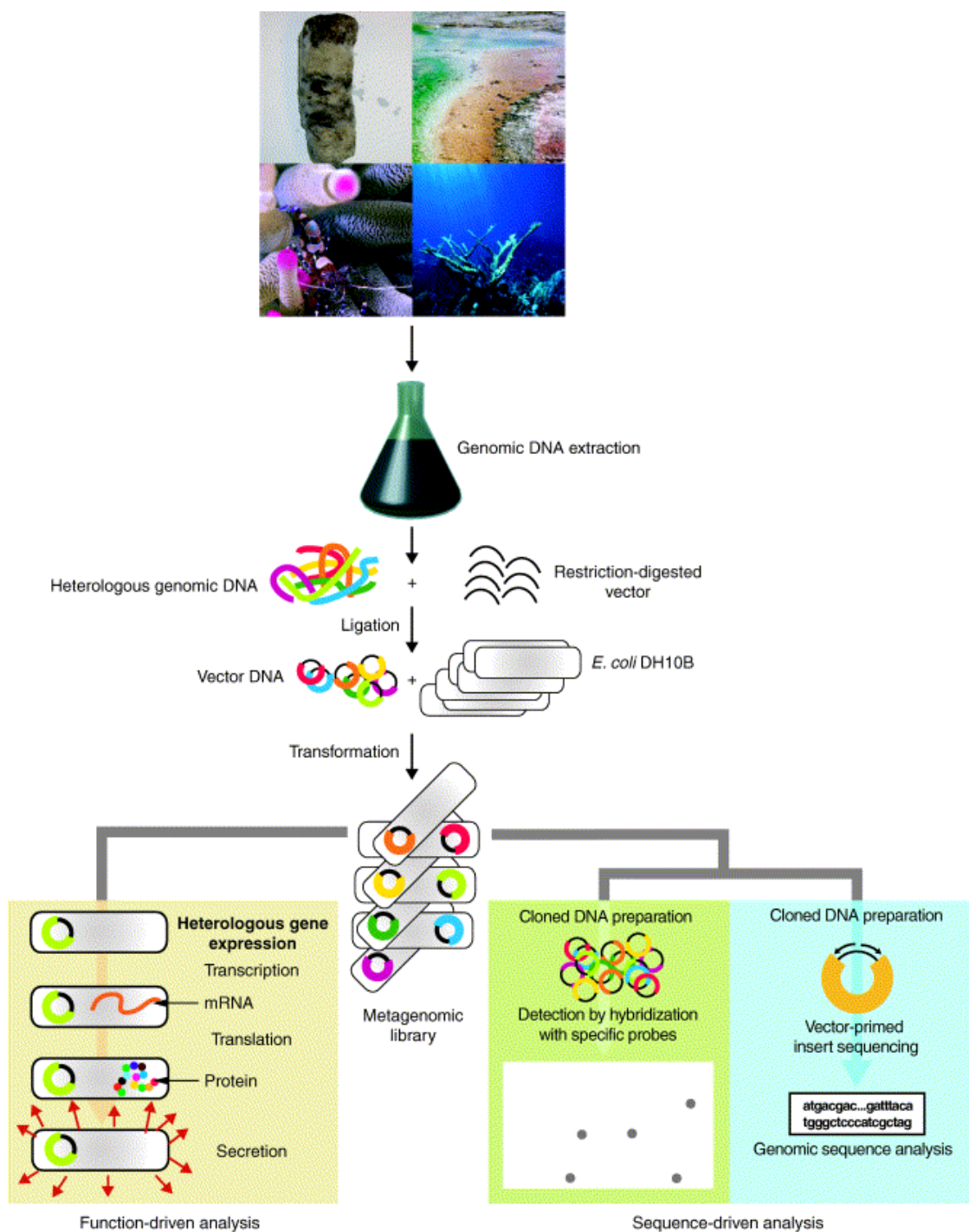
#### Što nas okružuje

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

#### Metagenomika

- Metagenomika je proučavanje metagenoma, tj. analiza genetskog materijala iz uzoraka (zemlja, vrući izvori, more, probavni trakt, koža i drugo) iz okoliša bez uzgoja mikroorganizama u laboratoriju.

- Metagenomika, "genomika zajednice" ili "genomika ekološke niše", je sekvencijiranje i analiza DNK mikroorganizama obnovom iz okoline, bez potrebe za njihovim uzgojem.



Slika 15. Konstrukcija i analiza metagenomskih knjižnica



Različita istraživanja u ljudi za bolje razumijevanje i poboljšanje zdravlja:

- Genom i epigenom
- **Metagenom** (mikrobiom različit kod raznih ljudi, Chronova bolest, neizlječive diaree =zamjena mikrobioma crijeva od sina majci)
- Nutrigenomika
- „Foodgenomics“
- Parmagenomika

Humani genom

- 3 milijardi pb s mtDNK.
- Kodirajuća DNK <2%;
- Nekodirajuća DNK 98%, sadrži sekvencije za miRNK i SNP

Mikrobiom projekt u ljudi

- 2010-2013.
- Ukupni broj mikroorganizama, njihovih genetskih elemenata (genomi) i ekološke interakcije u određenom okruženju.

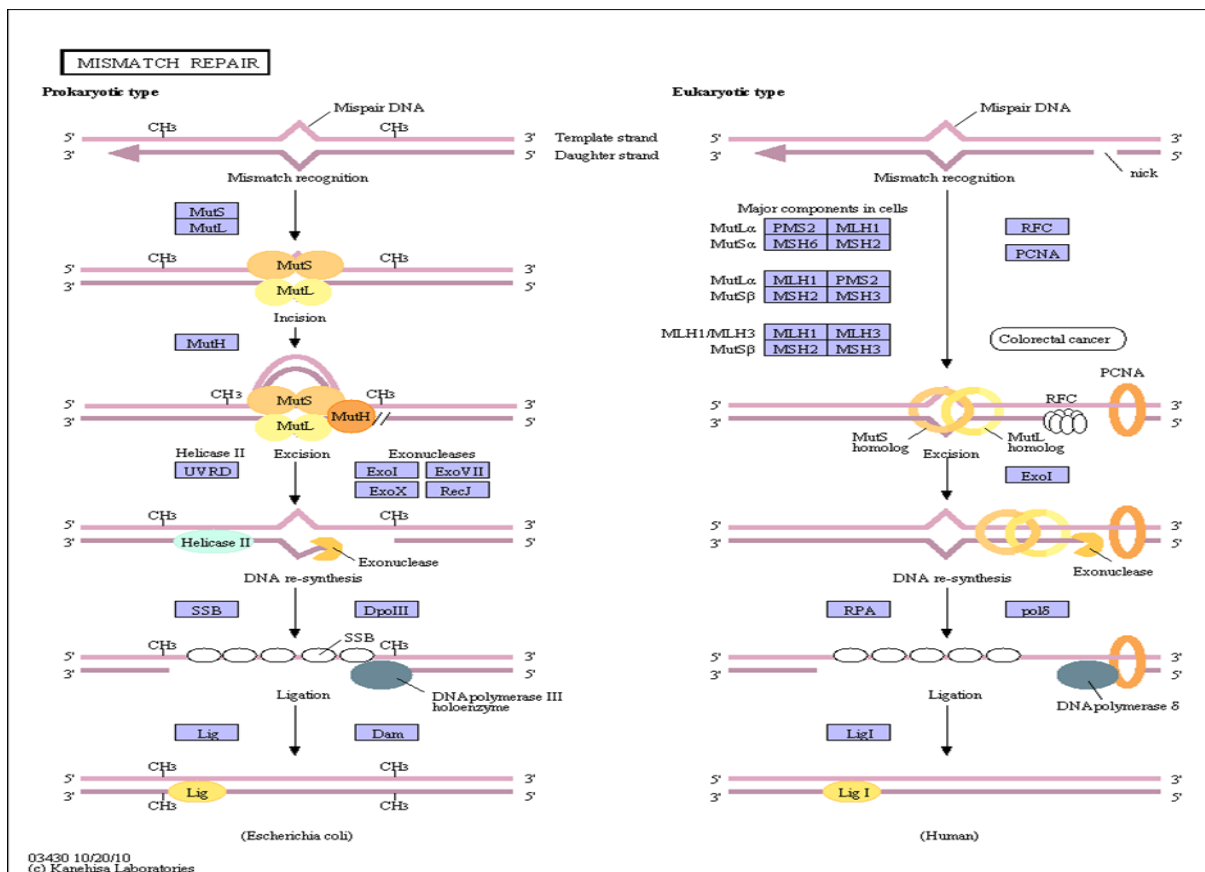


Slika 16. Mikrobiom u ljudi

Divergentnost (raznolikost) za zdravlje ljudi i za dobivanje novih ind. organizama:

- Rekombinacija spriječena između divergentnih vrsta: bakterije, kvasac i embrionalne stanice miša,
- Genetičke barijere su gotovo potpuno uklonjene u mutanata *mutS. Salmolishia*
- Mismatch repair
- <http://www.youtube.com/watch?v=dgPh1qigv7s&list=PLeZVz-SOssvlbQtG19xVKelZlixVZZH2I&index=2>
- Stari lanac u sekvenciji GATC je A-Met, a u novonastalom lancu nema metilacije na A
- Homodimer MutS prepoznaje nesparene baze,
- MutH (nukleaza) prepoznaje i veže se na susjedne nemetilirane sekvencije GATC i zarezuje u toj nemetiliranoj sekvenciji GATC,
- MutL povezuje proteine MutS i MutH (zahtjeva ATP)

- UvrH helikaza II, ssb proteini,
- Exo I egzonukleaza



Slika 17. Popravak krivo sparenih baza u prokariota i eukariota

Tablica 2. Mutator geni u *E. coli*

Mismatch repair:		
<i>dam</i>	DNA methyltransferase	Methylation A in GATC sequence (7 – 50)
<i>mutS</i>	Mismatch recognizes	Binds DNA mismatches(100)
<i>mutL</i>	68 kDa protein	Stimulates MutS, MutH activity (100)
<i>mutH</i>	Endonuclease	Nicks no-methylated GATC sequence

<i>uvrD</i>	DNA helicase II	Strand displacement
-------------	-----------------	---------------------

Usmjerena (eksperimentalna) evolucija

- obuhvaća evolucijske procese u definiranim i reproducibilnim uvjetima, posebno na modelnim laboratorijskim bakterijskim populacijama.

Korisno mutiranje za organizam

a) Hipermutabilne sekvencije:

-imunoglobulini

-proteini na površini bakterijskih stanica

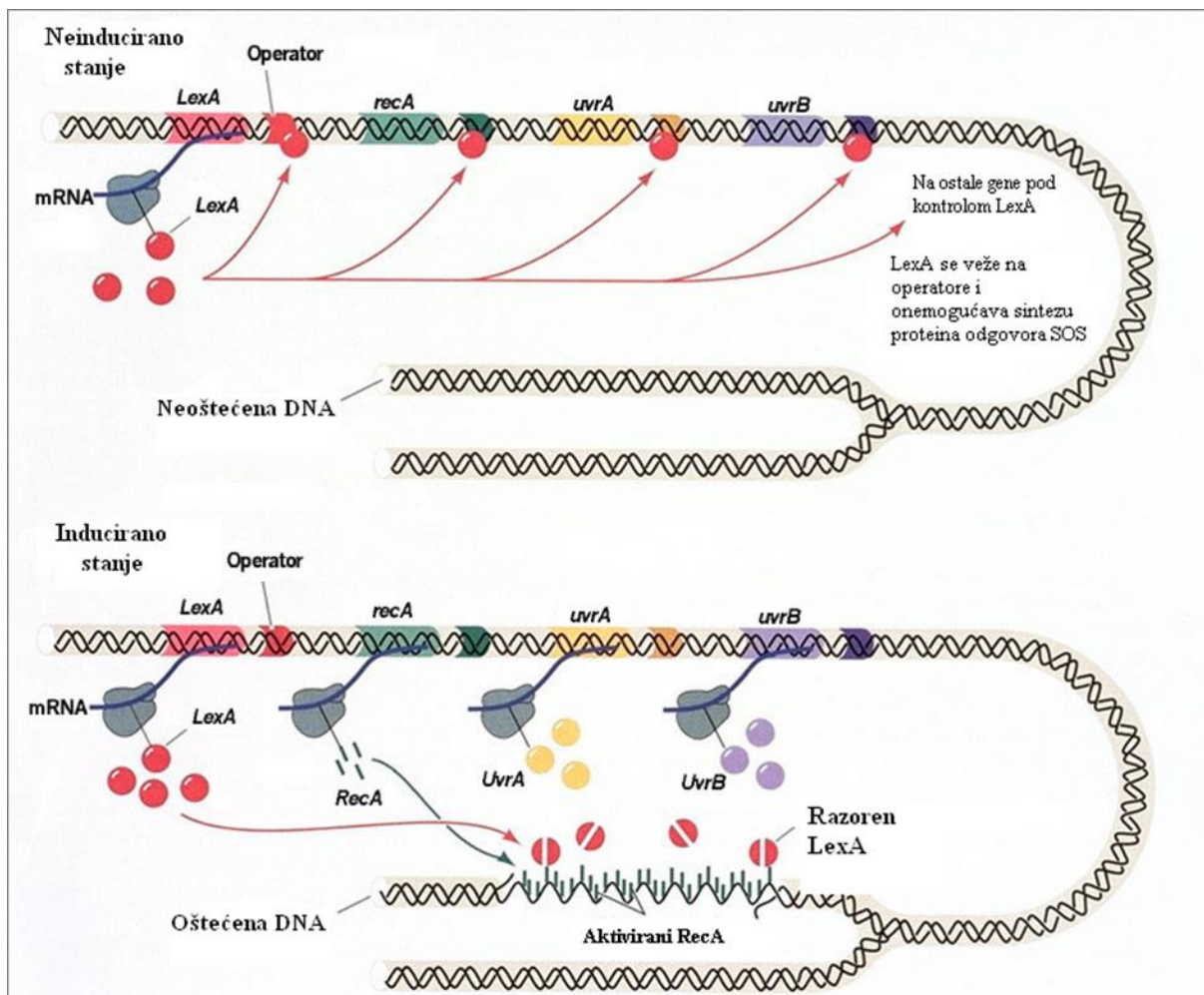
-(mikrosateliti)

b) Inducibilni mutatori: DNA mutaze

Ubrzavanje stope mutacije i/ili rekombinacije u populaciji bakterija



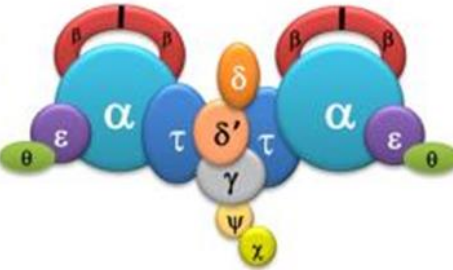


- Inducirati stresom gene divljeg tipa (uobičajeno dio SOS regulona)
- Odabrati gene čiji funkcionalni gubitak ili podregulacija povećava stopu genetičke varijabilnosti (mutator i/ili hiper - *rec* mutatori)

Regulon odgovora SOS u neinduciranom i induciranom stanju u *E. coli*:



Slika 18. Regulon odgovora SOS u neinduciranom i induciranom stanju

Pet DNA polimeraza *E. coli*, njihova svojstva i biološke funkcije

	Pol I	Pol II	Pol III	Pol IV	Pol V
DNA polymerase family	A	B	C	Y	Y
Activity	5'-3' polymerase 3'-5' exonuclease 5'-3' exonuclease	5'-3' polymerase 3'-5' exonuclease	5'-3' polymerase 3'-5' exonuclease	5'-3' polymerase	5'-3' polymerase
					
Number of molecules/cell					
- SOS	400	50 - 75	10 - 20	150 - 250	< 15
+ SOS	400	350 - 1000	10 - 20	1200 - 2500	200
Biological functions in the cell	DNA replication, Okazaki fragment maturation, DNA repair	DNA replication (backup DNA polymerase), DNA repair, TLS	DNA replication DNA repair	TLS	TLS

Slika 19. Pet DNA polimeraza *E. coli*, njihova svojstva i biološke funkcije (FEMS Microbiol Rev.36, 2012)

### Mutator geni u *E. coli*

#### Primjena usmjerene evolucije u biotehnologiji

#### Uloga MMR u bakterijskoj evoluciji

##### MMR mutatori

- U stabilnim uvjetima MMR mutatori gube prednost nad stanicama divljega tipa zbog nagomilanih štetnih mutacija.
- Mutator s povoljnom mutacijom može preživjeti ako ponovno stekne normalne MMR funkcije.

##### Hiperrekombinacija

- Hiperrekombinacijski fenotip MMR mutatora omogućuje da se MMR funkcije vrate horizontalnim prijenosom gena iz stanica u okolišu.

## Mozaička struktura

- Tijekom bakterijske evolucije, ovisno o uvjetima okoliša, MMR funkcije neprekidno se gube mutacijom i ponovno vraćaju horizontalnim prijenosom gena između divergentnih, hiperrekombinogenih sojeva.
- nađena mozaična struktura MMR gena pokazatelj je evolucije u bakterija.

ECOR20 TGCCCCTCAGGCCCTAATCTCCGATCGCAGCCTACCGCATGCTAGCTGCAGTGACGTCT  
 ECOR23 TGCCCCTCAGGCCCTAATCTCCGATCGCAGCCTACCGCATGCTAGCTGCAGTGACGTCT  
 ECOR4 TGCCCCTCAGGCCCTAATCTCCGATCGCAGCCTACCGCATGCTAGCTGCAGTGACGTCT  
 ECOR1 TGCCCCTCAGGCCCTAATCTCCGATCGCAGTCTACCACGTAAGCCGCGGTGATATCT  
 ECOR10 TGCCCCTCAGGCCCTAATCTCCGATCGCAGTCTACCACGTAAGCCGCGGTGATATCT  
 ECOR13 TGCCCCTCAGGCCCTAATCTCCGATCGCAGTCTACCACGTAAGCCGCGGTGATATCT  
 ECOR24 TGCCCCCAGGCCCTAATCTCCGATCTCAGTCTACCACGTAAGCCGCGGTGATATCT  
 ECOR17 TGCTCCTCGTGTCCGCGTCTCGATCTCAGTCTACCGCGCTCACCTGCGGTAGCGCCT  
 ECOR70 TGCTTTCCAGGCCCTAATCTCCGATCTCAGTCTACCACGTAAGCCGCGGTGATATCT  
 ECOR26 TGCTTTCCAGGCCCTAATCTCCGATCTCAGTCTACCACGTAAGCCGCGAGTGACGCCT  
 ECOR27 TGCTTTCCAGGCCCTAATCTCCGATCTCAGTCTACCACGTAAGCCGCGAGTGACGCCT  
 ECOR68 TGCTTTCCAGGCCCTAATCTCCGATCTCAGTCTACCACGTAAGCCGCGAGTGACGCCT  
 ECOR45 TGTCCCTCAGGCCCTAATCTCCGATCTCAGTCTACCACGTAAGCCGCGAGTGACGCCT  
 ECOR58 TGTCCCTCGTACTCCGCGTCTCGATCTGGCCTATCATATGCTAGCTGCGGTGACGCCT  
 ECOR34 TGTCCCTCGTACTCCGCGTCTCGATCTGGCCTATCATATGCTAGCTGCGGTGACGCCT  
 ECOR35 CGTCCCTCAGCTCCGCGTCTCGTCTATAGCCCGCGGCGTGTAGCTGCTGTGATGCTC  
 ECOR41 CGCCCTTCGTGGTCCGCGCCTCGACTATAGCCTACCATGTGCTAGCTACGACAGCGTCT  
 ECOR40 CGCCCTTCGTGGTCCGCGCCTCGACTATAGCCTACCATGTGCTAGCTACGACAGCGTCT  
 ECOR46 CGTCCCTTACGCCCTAATCTCGAGTTATAACCTACCGCAGTCCGGTGCAGTAGTGCCT  
 ECOR47 CGTCCCTTACGCCCTAATCTCGAGTTATAACCTACCGCAGTCCGGTGCAGTAGTGCCT  
 ECOR49 CGTCCCTTACGCCCTAATCTCGAGTTATAACCTACCGCAGTCCGGTGCAGTAGTGCCT  
 ECOR50 CGTCCCTTACGCCCTAATCTCGAGTTATAACCTACCGCAGTCCGGTGCAGTAGTGCCT  
 ECOR60 CGTCCCTTCGTGGTCCGCGTCTTCGTTTTAGCCTACCATGTGCTAGTTATGACAGCGTCT  
 ECOR59 CGTCCCTTCGTGGTCCGCGTCTTCGTTTTAGCCTACCATGTGCTAGTTATGACAGCGTCT  
 ECOR62 CGCCCCTCGTGGTTCGGGCTCTCGTTTTAGCTCGCCACGTGTCAGCTGTGACAGCGTCT  
 ECOR64 CGTCCCTTCGTGGTCCGCGTCTTCGTTTTAGCCTACCATGTGTTAGCTGTGACAGCGTCT  
 ECOR57 CATCCTTCGTGGTCCGCGTCTTTGTTTTAGCCTACCACGTGCTAGCTATGACAGCGTCT  
 ECOR52 CATCCTTCGTGGTCCGCGTCTTTGTTTTAGCCTACCACGTGCTAGCTATGACAGCGTCT  
 ECOR51 CATCCTTCGTGGTCCGCGTCTTTGTTTTAGCCTACCACGTGCTAGCTATGACAGCGTCT  
 ECOR37 TGCCTTTCAGCTCCGCGTCTGAGTTTTAGCTCGCCGCGCGTCACTGCGGTGGCGCCT

Slika 20. Mozaička struktura gena *mutS* u *E. coli* (Molecular Microbiology 2006, 60, 820–827)

## Različite strategije ubrzane evolucije

- Hipermutabilni geni, korisni pri adaptaciji na jedan selektivni pritisak
- Inducibilni mutatori , ne produciraju različitost u periodima lakog života
- Genetički mutatori , favorizirani kada je za adaptaciju potrebno nekoliko mutacija, spas jedino horizontalni prijenos gena i rekombinacija da preuzmu funkcionalan mutator gen i postanu adaptivni nemutatori

### Mozaicizam

- Što je češća seksualna reprodukcija i rekombinacija i jači selektivni pritisak na genom, bit će viši stupanj genomskog mozaicizma što rezultira nepodudarnošću genomskih sekvencija različitih genoma jedne vrste organizma.

### Važnost mikrobne raznovrsnosti

- recikliranje elemenata i razgradnja materija ljudske civilizacije,
- uči nas strategijama i limitima života (ekstremni uvjeti, redoks sparivanja za korištenje energije, novi procesi),
- novi biotehnološki produkti, uključujući nove farmaceutike, enzime, specijalne kemikalije i dr.,
- utječe na raznovrsnost viših organizama, obnavljanje ugroženih ekosustava te očuvanju postojećih viših organizama.

### Primjena usmjerene evolucije

- Do sada u području biotehnologije vrlo uspješna u proizvodnji industrijskih enzima s poboljšanom aktivnošću i termostabilnošću,
- cjepiva i lijekovi,
- u stvaranju novih sojeva mikroorganizama sa željenim svojstvima.