

# Genetika mikroorganismů

.

# Literatura

- Rosypal S., Úvod do molekulární biologie, I.díl, Brno 2006
- Snyder R., Champness W., Molecular genetics of bacteria, ASM Press, Washington D.C., 1997

# Mikrobiologie

- Je obor náročný
- Dnes renesance zájmu
- Mikroorganismy fyziologicky velmi různé
- Na Z je jich velmi mnoho
- Dnes popsáno 5000 druhů (Bergyho manuál, 5%, 1%, 0,1% všech?)

# Úkol mikrobiologů 21. století

- Identifikovat
- Izolovat
- Charakterizovat nové mikroorganismy (včetně nekultivovatelných)
- Studovat mikroorganismy v jejich přirozeném prostředí
- Sledovat evoluční vztahy mezi nimi
- Využít je (biotechnologie)

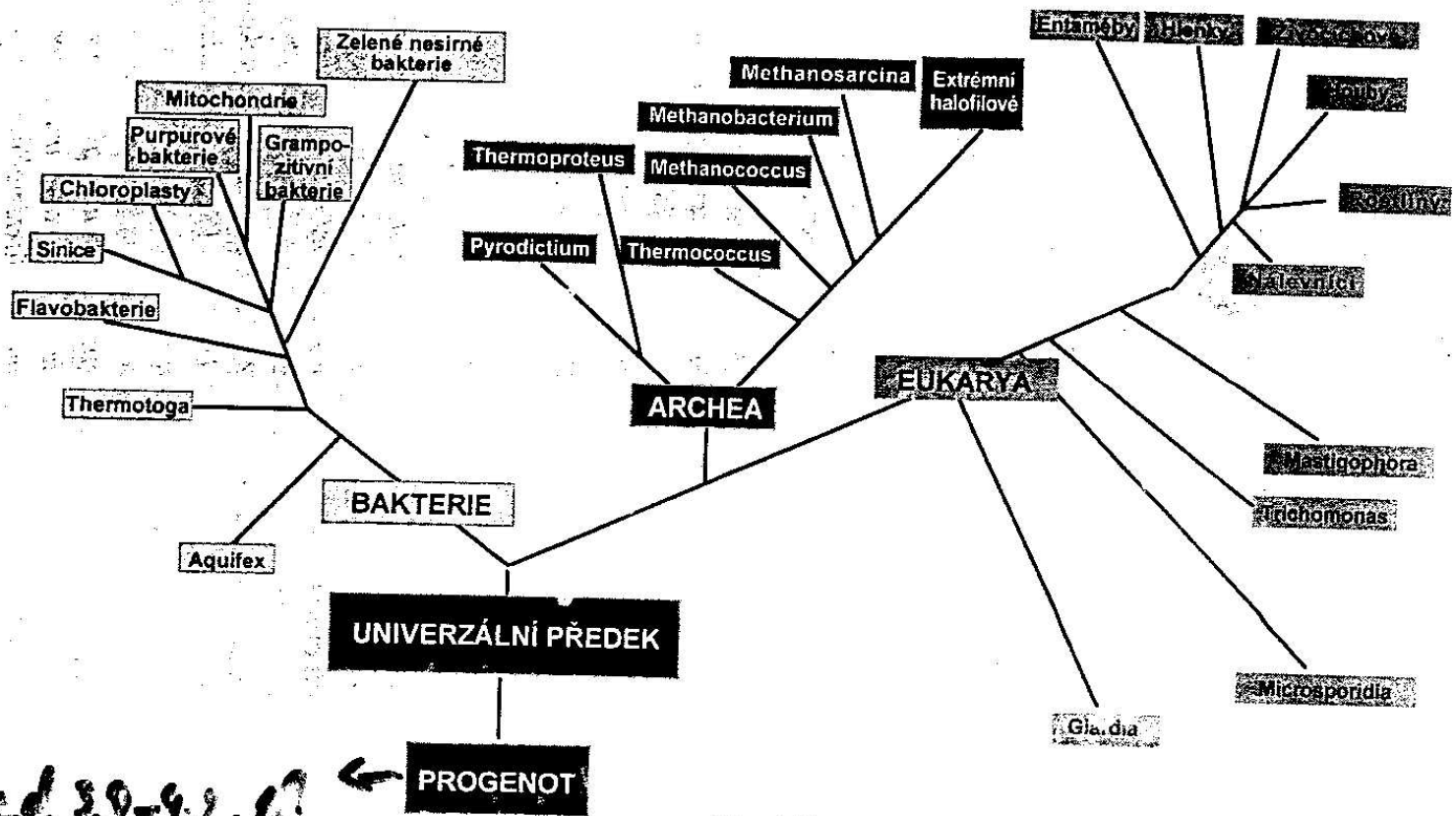
# Mikroorganismy dnes řadíme

- Do 3 domén (doména je nejvyšší taxon, nadříše)
- Bakterie (Bacteria)
- Archea (Archaea)
- Eukarya (Eucarya)

# Doména Bakterie

- Je evolučně odlišná od archeí
- Doména Archea je evolučně blíže k doméně Eukarya než k doméně Baktérie
- Univerzální fylogenetický strom (Woese)

# Univerzální fylogenetický strom (Rosypal 2006)



red. 3,0-4,2. 10  
 10/1

Obr. 123  
 Univerzální fylogenetický strom

# Co vyplývá z fylogenetického stromu

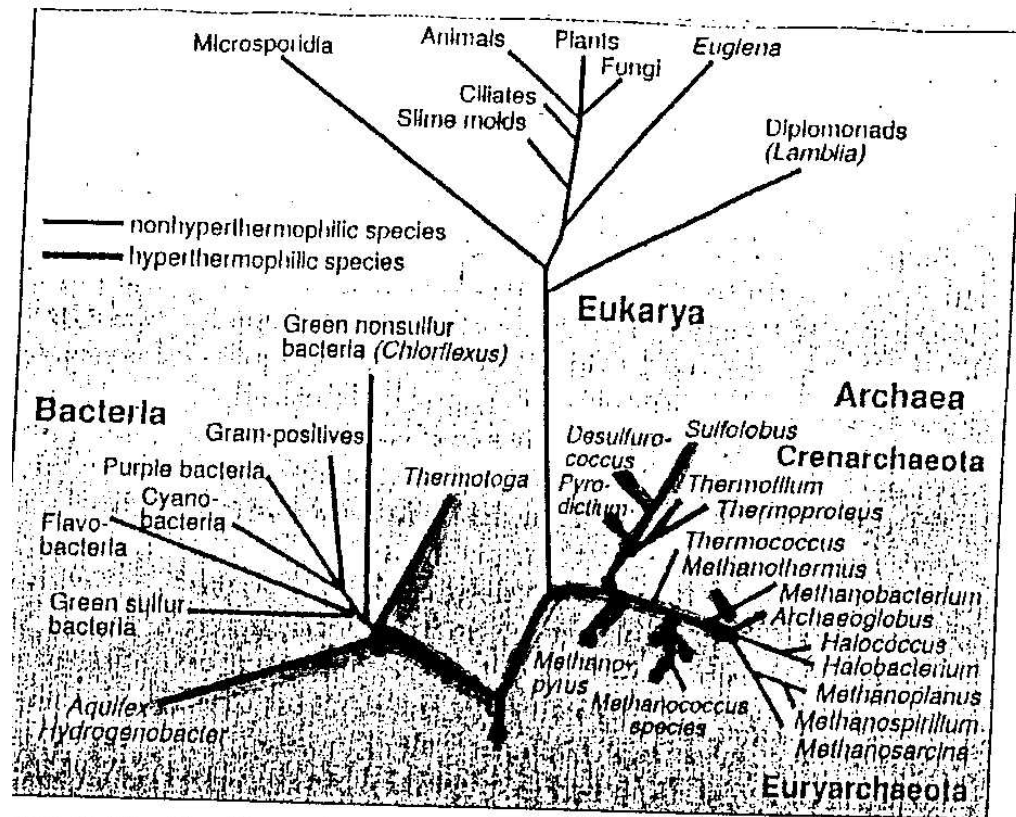
- Bakterie, archea a eukarya se vyvinuly z hypotetického univerzálního předka
- Jemu logicky předcházela jednodušší živá soustava –
- progenot, jehož vznik se datuje do období 3,8 až 4,2 x 10<sup>9</sup> let před současnou dobou



# Co dále vyplývá z univerzálního fylogenetického stromu

- Většina organismů na Z je jednobuněčných
- Nejstarší organismy jsou hypertermofilní

# Nejstarší organismy jsou hypertermofilní (Woese 1990)

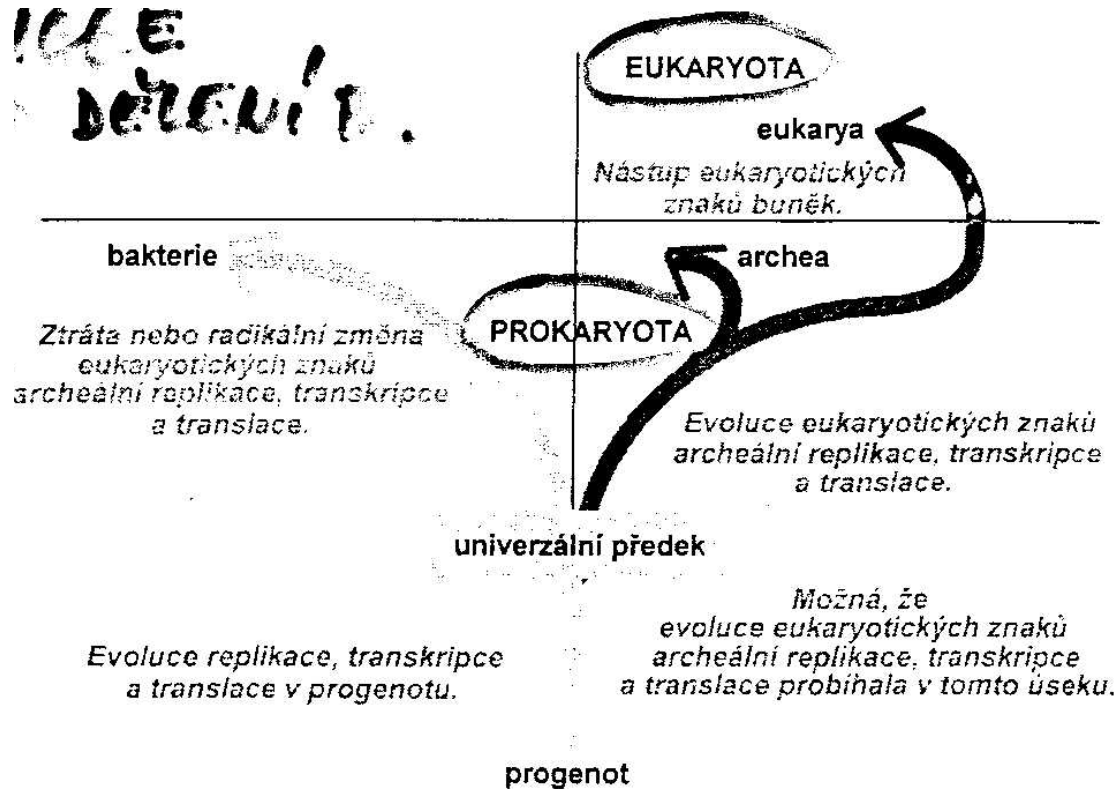


ree of life. The Woese family tree shows that most life is one-celled, and that the oldest cells were hyperthermophiles.

# Vznik života

- Život mohl vzniknout v horkých podmínkách, za vysokých koncentrací  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  (sopečná činnost),  $\text{N}_2$ , žádné organické sloučeniny
- !Není kompatibilní s hypotézou RNA světa (RNA je při vysokých teplotách nestabilní)

# Progenot, univerzální předek a evoluce prokaryot a eukaryot (Rosypal 2006)



Obr. 193

Doplňkový výklad univerzálního fylogenetického stromu znázorněného na obr. 123

# Domény Bakterie a Archea

- mají z cytologického hlediska prokaryotický typ buněk,
- zatímco doména Eukarya eukaryotický typ buněk

# Bakterie (Bacteria)

- Jednobuněčné organismy
- Prokaryotického typu
- Zahrnují též sinice
- 16S-rRNA obsahuje sekvence specifické jen pro bakterie
- Sekvence podobné eukaryální 18S-rRNA a archeální 16S-rRNA

# Archea (Archaea)

- Jednobuněčné organismy
- Prokaryotického typu
- 16S-rRNA obsahuje sekvence specifické jen pro archaea
- Sekvence podobné bakteriální 16S-rRNA a eukaryální 18S-rRNA
- Archeální translace se vyznačuje jak prvky bakteriální translace tak i ještě nevyvinutými, rudimentálními prvky translace eukaryální

# Eukarya (Eucarya)

- Jednobuněčné a mnohobuněčné organismy
- Typ buněk je eukaryotický
- 18S-rRNA obsahuje kromě jiných sekvencí sekvence specifické jen pro tuto doménu



# Cytologické hledisko dělení buněk

- Na prokaryontní a eukaryontní zůstává

# Rozdělení do domén

- Bylo provedeno na základě znalostí a srovnání sekvencí 16S RNA (baktérie a archea) a 18S RNA (eukarya)



# Sekvence genomů a analýza sekvencí

- Nový vědní obor Bioinformatika
- Dnes je známo přes 100 kompletních sekvencí mikrobiálních genomů
- Usnadňuje izolaci celých genů a dedukovat jejich funkci.

# Příklady a velikosti sekvencovaných genomů (Snyder a spol. 1997)

TABLE 1-1 Some Genomes That Have Been Completely Sequenced

SPECIES	SPECIAL FEATURES	HABITAT	GENOME SIZE (1000s OF NUCLEOTIDE PAIRS PER HAPLOID GENOME)	NUMBER OF GENE PAIRS PER (PROTEIN
<b>EUBACTERIA</b>				
<i>Mycoplasma genitalium</i>	smallest genome of any known cell	human genital tract	580	468
<i>Synechocystis</i> sp.	photosynthetic, oxygen-generating (cyanobacterium)	lakes and streams	3573	3168
<i>Escherichia coli</i>	laboratory favorite	human gut	4639	4289
<i>Helicobacter pylori</i>	causes stomach ulcers and predisposes to stomach cancer	human stomach	1667	1590
<i>Bacillus subtilis</i>	bacterium	soil	4214	4099
<i>Aquifex aeolicus</i>	lithotrophic; lives at high temperatures	hydrothermal vents	1551	1544
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	causes tuberculosis	human tissues	4447	4402
<i>Treponema pallidum</i>	spirochaete; causes syphilis	human tissues	1138	1041
<i>Rickettsia prowazekii</i>	bacterium most closely related to mitochondria; causes typhus	lice and humans (intracellular parasite)	1111	834
<i>Thermotoga maritima</i>	organotrophic; lives at high temperatures	hydrothermal vents	1860	1877
<b>ARCHAEA</b>				
<i>Methanococcus jannaschii</i>	lithotrophic, anaerobic, methane-producing	hydrothermal vents	1664	1750
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	lithotrophic or organotrophic, anaerobic, sulfate-reducing	hydrothermal vents	2178	2493
<i>Aeropyrum pernix</i>	aerobic, organotrophic hot-steam vents	coastal volcanic	669	2620
<b>EUCARYOTES</b>				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (budding yeast)	minimal model eucaryote	grape skins, beer	12,069	-6300
<i>Arabidopsis thaliana</i> (wall cress)	model organism for flowering plants	soil and air	-142,000	-26,000
<i>Caenorhabditis elegans</i> (nematode worm)	simple animal with perfectly predictable development	soil	-97,000	-19,000
<i>Drosophila melanogaster</i> (fruit fly)	key to the genetics of animal development	rotting fruit	-137,000	-14,000
<i>Homo sapiens</i> (human)	most intensively studied mammal	houses	-3,200,000	-30,000

# Genetika

- Vědní oblast biologie, která se zabývá genetickou informací a jejím přenosem na potomstvo (dědičností)
- Dnes: Molekulární genetika
- Vědní oblast molekulární biologie, která se zabývá geny a funkcí genů tj. funkcí informačních biomakromolekul (NK) při přenosu genetické informace

# Všechny molekuly DNA (nebo RNA u RNA-virů)

- živé soustavy, které se vyznačují replikací a dědí se na potomstvo
- se označují jako genom

# Prokaryotický genom

- Nejlépe prostudován u bakteriálních buněk
- Soustřeďuje se do funkčního ekvivalentu jádra označovaného jako nukleoid
- Je reprezentován jediným genoforem – molekulou ds DNA - představujícím prokaryotický chromosom



# U řady druhů

- Jsou některé geny lokalizovány na plasmidech
- U těchto druhů se genom skládá ze 2 složek:
  - Prokaryotického jádra (nukleoidu)
  - Plasmidů
- (dvousložkový genom)

# Prokaryotický chromosom

- Tvoří většinou kruhová molekula dsDNA, na níž jsou umístěny všechny pro život prokaryotické buňky nepostradatelné geny
- tj. strukturní geny kódující proteiny zajišťující životní funkce buňky a
- geny přepisované do tRNA a rRNA (nezbytná složka translačního systému)

# Prokaryotický chromosom *E.coli*

- Je tvořen kružnicovou dsDNA
- obsahuje  $4,6 \cdot 10^6$  nukleotidových párů (4 639 221 bp)
- Je dlouhý 1,56 mm ( $4\,639\,221 \times 0,14\text{nm}$ ), tloušťky 2 nm a má molekulovou hmotnost  $2,9 \cdot 10^9$  ( $4\,639\,221 \times 660$ )

# U rodů

- *Borelia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* byla zjištěna lineární chromosomová dsDNA
- Není jasné, jak se lineární chromosomy replikují
- U druhu *Rhodobacter sphaeroides* je chromosom tvořen 2 kružnicovými molekulami (chromosom I -  $3 \cdot 10^6$ bp a chromosom II-  $3 \cdot 10^5$ bp)

# Plasmidy

- Jsou mimochromosomové genofory, na nichž jsou často lokalizovány geny, které může prokaryotická buňka postrádat

# Nukleoid je jádro prokaryotické buňky (chromosom)

- které není proti cytoplasmě ohraničeno membránou
- Nukleoid je tvořen proteiny a DNA
- Nejlépe je prostudován u *E. coli* K12

# Proteiny nukleoidu

- Jsou u bakterií dvojího typu
- Proteiny podobné histonům neboli HLP proteiny (podobají se v primární struktuře a molekulové hmotnosti histonu H2A)
- Proteiny nehistonové povahy

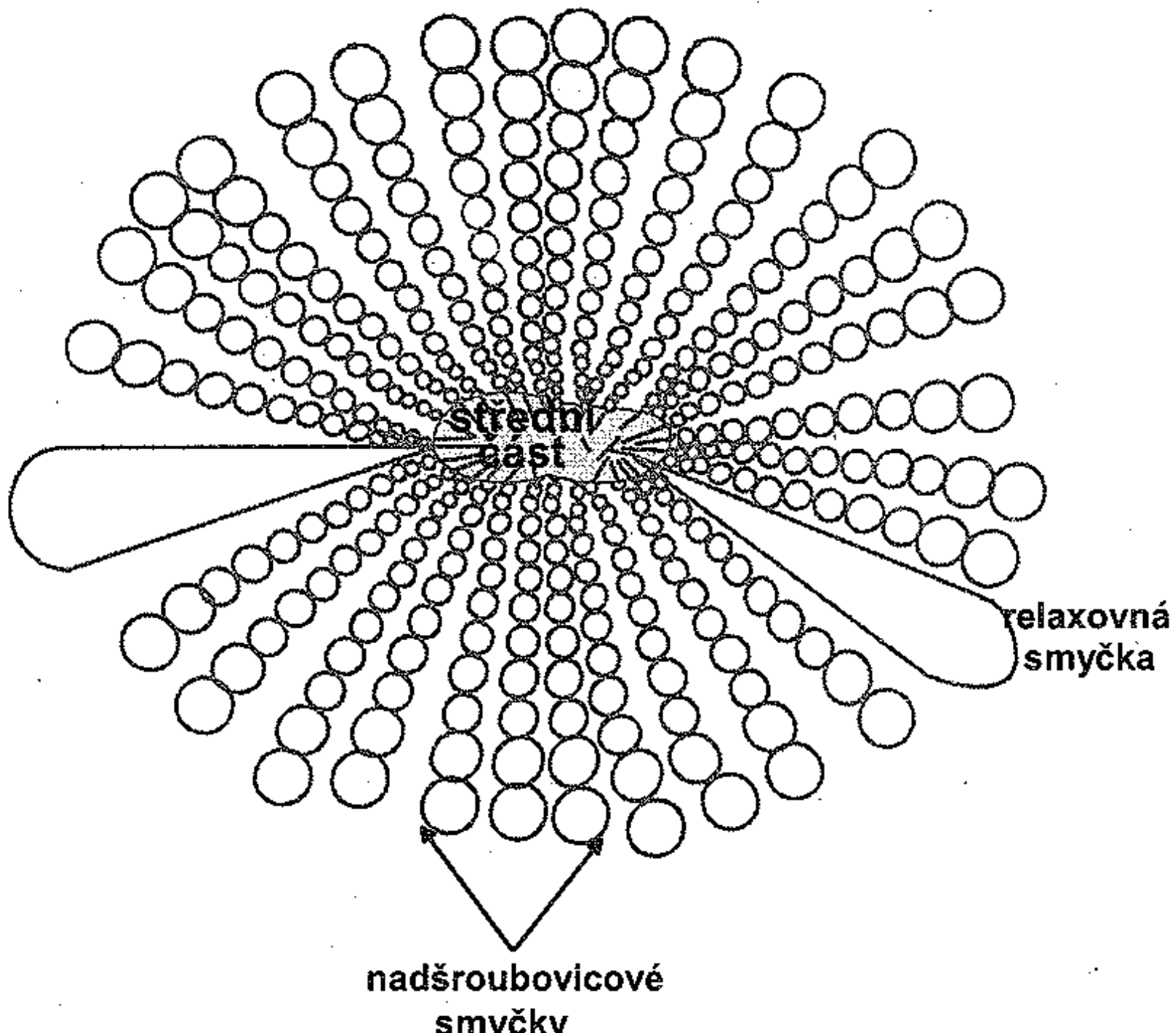
# Nukleoid se pojí

- na více místech k cytoplasmatické membráně
- Jedním z těchto míst je oblast *oriC* neboli počátek replikace chromosomové DNA *E. coli*



# DNA je v nukleoidu uspořádána

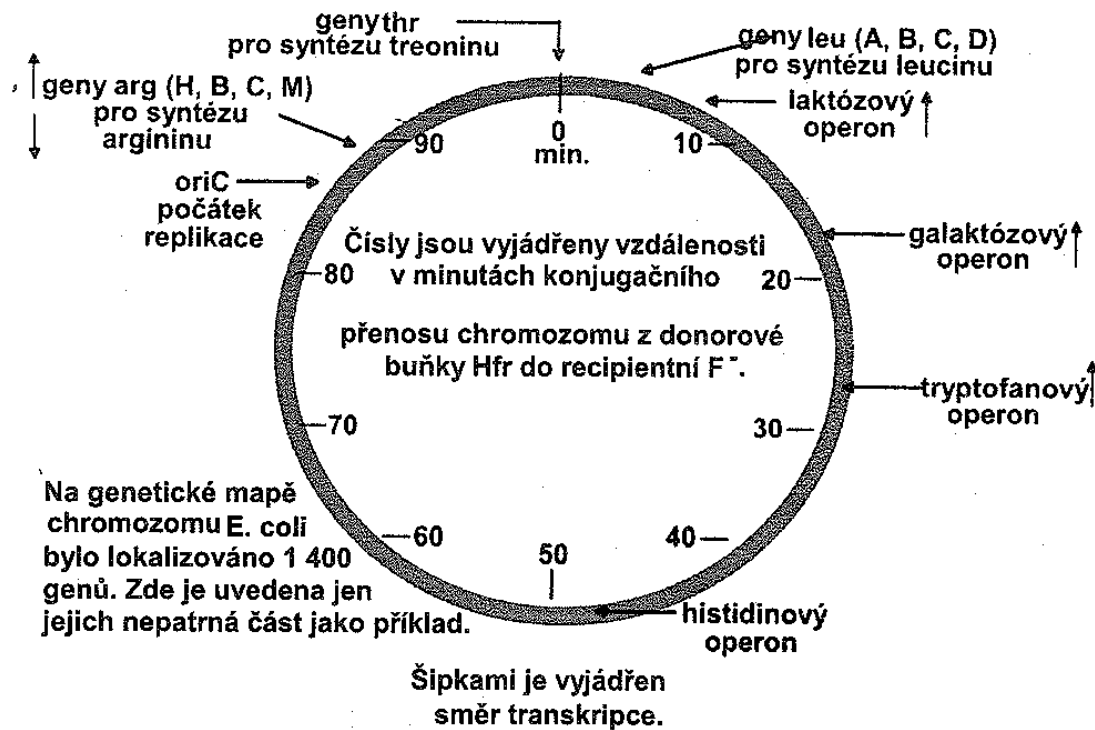
- V konformaci, jejímž základem je nadšroubovice rozdělená do smyček, které se mohou vyskytovat v různých konformačních stavech
- Ve stavu relaxovaném,
- ve stavu nadšroubovice,
- Celá struktura je držena pohromadě proteiny.
- Smyčky v relaxovaném stavu jsou přístupny transkripci a replikaci.



# Dlouhé vlákno DNA

- nemá volné konce a je smotáno ve střední části nukleoidu, z níž vybíhá ve formě nadšroubovicových a relaxovaných smyček.
- Mohou relaxovat nejen jednotlivé smyčky, ale také celá struktura, takže chromosom přejde do tvaru kružnice
- V tomto tvaru se formálně znázorňuje

# Zjednodušená genetická mapa chromosomu *E. coli* (Rosypal 2006)



Obr. 108

Zjednodušená genetická mapa chromozomu *Escherichia coli*-K12

# Na prokaryotickém chromosomu

- jsou lokalizovány všechny geny potřebné pro životní funkce a činnost prokaryotické buňky
- Prokaryotický chromosom je replikon (má 1 počátek replikace)

# Velikost chromosomu různých druhů bakterií

- od  $0,58 \times 10^6$  *Mycoplasma genitalium* (obligátní parazit, množí se pouze v hostitelské buňce)
- po  $9,2 \times 10^6$  *Myxococcus xanthus* (tvoří mycelia, sporulují, jsou všestrannější ve výživě)
- I uvnitř rodu mohou být rozdíly ve velikosti druhů (*Treponema pallidum*  $1,04 \cdot 10^6$  *Treponema denticola*  $3 \cdot 10^6$  )
- průměrná velikost  $2 \cdot 10^6$

# Genom archeí

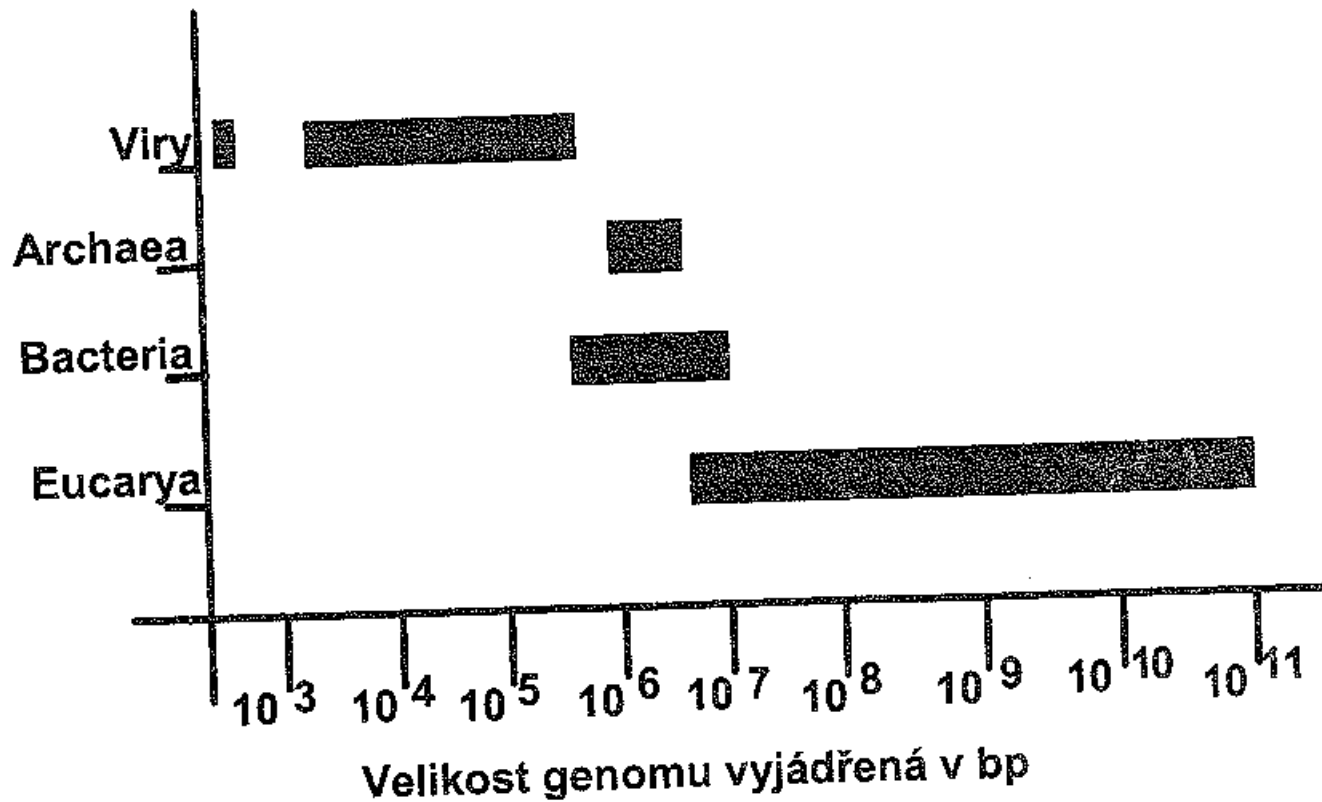
- Se strukturálně podobá bakteriálnímu genomu (sestává z chromosomu a plasmidů)
- Chromosom je kružnicový a není ohraničený membránou
- Buňky archeí jsou prokaryontního typu

# Archeální chromosom

- Obsahuje histony, které kondenzují jejich chromosomovou DNA do struktur podobných nukleosomům
- Archeální histony tvoří homodimery i heterodimery a
- poměr těchto dimerů se liší v závislosti na podmínkách růstu
- (u eukaryot se histony vyskytují jako heterodimery – H2A + H2B a H3 + H4)
- Střed archeálních nukleosomů je tvořen podobně jako v eukaryotickém typu buněk histonovým tetramerem (H3+H4)<sub>2</sub>



# Srovnání velikosti genomu živých soustav (Rosypal 2006)



Obr. 106  
Srovnání rozmezí velikosti genomu živých soustav



# Vlastnosti bakterií (archeí), jež usnadňují genetické experimenty

- Jsou haploidní (1 kopie – alela – každého genu, snadno se identifikují mutanti)
- Za selektivních podmínek se snadno izolují i řídce se vyskytující mutanti (na 1 misce může být selektováno až  $10^9$  bakterií, kolonie je přečištěna rovněž za selektivních podmínek)
- Mají relativně malý počet genů (1000 až 4000)
- Mají krátkou generační dobu (dobu nezbytnou k dosažení dospělosti a produkci potomstva, *E. coli* 20 min.)
- Množí se asexuálně dělením (všichni potomci 1 buňky jsou geneticky identičtí – tvoří klon)
- Mohou být snadno uchovávány bez neustáleho množení (spory, lyofilizáty, zamrazení ve tekutém N)
- Je u nich i sexuální reprodukce (výměna DNA mezi buňkami, 3 způsoby) – vzniká merozygota

# Rozlišuje se

- Klasická genetická analýza
- Reverzní genetická analýza

# Klasická genetická analýza

- **Mutagenizace** tj. vystavení živé soustavy účinku mutagenu
- Izolace **mutantů** tj. organismů nesoucích mutantní alelu projevující se fenotypicky
- Lokalizace mutací (mutantních alel) na chromozomu pomocí genetického křížení a
- konstrukce **genetické mapy**
- tj. určení pořadí a vzdálenosti genů na chromosomu podle četnosti rekombinace mezi nimi
- Dedukce počtu a **funkce** genů

# Reverzní genetická analýza

- **Izolace** genu (fragmentu DNA, bez znalosti funkce) –
- **Fyzikální (restrikční) mapa** (schematické znázornění poloh restrikčních míst na molekule DNA, vzdálenosti se udávají v bp)
- **Mutageneze** genu *in vitro* (mění se primární struktura izolovaných DNA molekul)
- **Vnesení** mutovaného genu do organismu (příp. náhrada původního genu)
- Dedukce **funkce** genů
- Při reverzní genetice se využívá technik rekombinantní DNA a konstruuje se GMO

# Klasická a reverzní genetika

- Se doplňují