

*Univerzita Karlova
Fakulta přírodních věd
Katedra filosofie a dějin přírodních věd*

Teoretická a evoluční biologie

Autoreferát disertační práce



Morfogeneze a vzájemné ovlivňování bakteriálních kolonií

RNDr. Tomáš Rieger

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Anton Markoš, CSc.

Praha, 2017

Abstrakt

Tato disertace navazuje svým zaměřením na další práce naší skupiny (Rieger T. *et al.*, 2008, dále Cepel J. *et al.*, 2010 a Patkova I. *et al.*, 2012), kde jsme se věnovali studiu morfogeneze bakteriálních kolonií *Serratia marcescens* za různých inokulačních podmínek na nutričně bohatých agarech. Bakterie *S. marcescens* dokáží, pokud rostou v dostatečné izolaci na misce s živným agarem obohaceném o glukózu, vytvářet barevné strukturované kolonie, jež jsme nazvali „fontánka“ (**F**). Díky schopnosti reagovat na proměny okolních podmínek změnou struktury či barevnosti, se tento fenotyp stal ideálním organismem pro další studia vzájemného ovlivňování bakteriálních kolonií.

Všimli jsme si, že při standardním výsevu se bakteriální kolonie rostoucí v těsné blízkosti vybarvují dříve než kolonie rostoucí na misce izolovaně. Zjišťovali jsme, za jakých podmínek a jakým způsobem se toto ovlivňování děje. Prokázali jsme, že různé druhy bakteriálních makrokolonií (*S. marcescens*-fenotyp **M**, *S. rubidea* a *E. coli*) vysílají skrze živný agar informační agens, po jehož přijetí na ní dokáží recipientní fontánkové kolonie *S. marcescens* reagovat vždy stejným způsobem (**X** struktura). Jde tedy patrně o jakousi univerzální reakci na látku vysílanou různými druhy Enterobakterií.

Růst kolonií fenotypu **F** na definovaném agaru je podmíněn jeho indukci konspicivní i heterospicivní rostoucí makrokolonií. Při snaze identifikovat hledanou signální molekulu jsme zjistili, že rostoucí makrokolonie *S. rubidea* (**R**) vypouští do vzdáleného agaru (až několik centimetrů) protein, který jsme identifikovali jako hypotetický protein (35 KDa) *Serratia marcescens* “WP_025304701.1” se 100 % shodou. Nicméně filtrace funkčního kondicionovaného média membránou s propustností 3500Da prokázala, že tento protein není signální molekula, jež indukuje růst **F** kolonie na definovaném médiu.

Pro indukci růstu kolonií fenotypu **F**, stačí do definovaného agaru zasáknout médium kondicionované rostoucí makrokolonií **R**. V další části práce jsme se snažili identifikovat signální agens obsažené v kondicionovaném minimálním médiu využitím analytických metod moderní biologie. Podařilo se nám zjistit, že hledanou molekulou je patrně krátký termostabilní peptid o přibližné velikosti 3284 Da.

Věříme, že předkládaná disertační práce může poskytnout kvalitní základ pro další studii, jež by za předpokladu optimalizace postupu pročištění signální molekuly, mohla vést k přesné identifikaci signálního agens vysílaného a přijímaného různými druhy Enterobakterií a mohla by tak přispět k lepšímu porozumění intra – i inter – druhové komunikace těchto mikroorganismů.

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Cíle práce.....	8
3. Materiál a metodika.....	9
4. Výsledky a diskuse	10
5. Závěry.....	13
6. Použitá literatura	14
7. Seznam publikací	15

1. Úvod

Chceme-li porozumět nějakému slovu, je nutné se podívat na jeho původ. Slovo komunikace pochází z latinského *communicare*, jenž znamená „společně něco sdílet, činit něco společným“.

Komunikace v sobě nezahrnuje pouze výměnu informací mezi účastníky, ale i podílení se na celkovém dopadu zprávy a kontextu, jenž může celý význam tohoto procesu pozměnit. V tomto slova smyslu tedy můžeme komunikaci chápat spíše jako synonymum interakce, procesu vzájemného ovlivňování a působení (Vybiral Z., 2005).

Všechny organismy žijí v neustále se měnícím prostředí. Schopnost přizpůsobení se těmto změnám je zásadní pro úspěch každého jedince, a v dlouhodobém uvažování i každého druhu. Vzhledem k tomu, že mezi organismy a jejich prostředím dochází k neustálému toku látek, energií a informací, je umění dorozumívání mezi jednotlivými organismy nezbytné pro jejich přežití. Neustále se měnící vlivy prostředí tak vytvářejí tlak na jednotlivé organismy i společenstva a nutí je vytvářet nové strategie pro přežití. Tyto nové strategie nezřídka zahrnují i nové komunikační možnosti vyvíjejících se organismů.

Pokud chceme v laboratoři zkoumat vliv komunikace s prostředím na výsledný fenotyp daného organismu, je potřeba mít neustále na paměti celou šíři možných informačních vstupů. Proto je potřeba s pečlivostí volit pokusné uspořádání tak, abychom měli celý systém v konstantních podmínkách a vždy měnili pouze jediný požadovaný parametr. Potom můžeme s úspěchem popisovat vliv tohoto konkrétního parametru na výsledný fenotyp buněčného těla.

Bakterie byly v minulosti považovány za primitivní jednobuněčné mikroorganismy, které žijí samostatně nebo nahromaděny v jednoduše strukturované kolonie, které se skládají z identických pasivních partikulí. Při pozorování kolonií začíná být dnes evidentní, že na ně můžeme hledět jako na mnohobuněčné komunity (každá s počtem cca. 10^9 – 10^{12} bakterií), které mají pokročilé možnosti, jak přežít v prostředí, včetně rozdělení úkolů, regulace genové exprese, buněčné diferenciaci a dokonce i vlastní regulace speciálních úkolových skupin (bakterie se speciálními genetickými možnostmi) (Ben- Jacob E. *et al.*, 2004).

Pro tento účel si bakterie vyvinuly a využívají širokou paletu biochemických komunikačních prostředků, jako jsou jednoduché molekuly, například AHL (Bassler B.L., a Losick R., 2006), vněmembránové vesikly OMV (Schwechheimer C. a Kuehn M.J., 2015), peptidové signální molekuly a bakteriociny (Dirix G. *et al.*, 2004) a dokonce celé soubory těchto činitelů (plazmidy, viry) (Miller R.V., 1998). Takto je zajištěna horizontální výměna informací v kolonii ale i s jinými organismy (v placích, biofilmech).

Bakterie využívají pro vnitro – i mezidruhovou komunikaci rozličné fyzikální, chemické i biologické procesy. Studium signálních drah, tak naráží na mnoha úskalí, které mohou být překážkou i při využití nejmodernějších technik, které v současné době mikrobiologie či molekulární biologie nabízí. Signální molekuly mohou být akceptorem signálu rozpoznávány i při velmi nízkých koncentracích, jež mohou být pod detekčním limitem metodik používaných při jejich odhalení.

2. Cíle práce

Tato práce navazuje na předchozí práce naší skupiny, v nichž jsme studovali morfogenezi, variabilitu a vzájemnou komunikaci bakteriálních kolonií již řadu let. Zkoumali jsme a popisovali morfogenezi kolonií kmene *Serratia marcescens*. Zajímalo nás, jakým způsobem dokáží podmínky prostředí, kterým je kolonie během svého vývoje vystavená ovlivnit časný vývoj kolonie a výsledný vzhled kolonie zralé (fenotyp **F**).

Cílem této práce ze začátku bylo podrobněji popsat efekt ovlivňování blízko rostoucích kolonií. Posléze jsme se chtěli zaměřit na fyzikální či biochemickou podstatu tohoto ovlivňování. Během studia tohoto ovlivňování byl popsán efekt podpory růstu vytečkované **F** kolonie na **MMA** (fenotyp **F** za standardních podmínek na **MMA** neroste) za přítomnosti rostoucí makrokolonie (fenotypy **M**, fenotyp **R**, *E. coli*) na **MMA**.

Po tomto pozorování bylo dalším cílem této práce:

- 1: Identifikace mechanismu (vzduch, agar) přenosu informační agens
- 2: Nalezení konkrétní signální molekuly

3. Materiál a metodika

Bakteriální kmeny: *Serratia rubidaea* (**R**), *Serratia marcescens* (**F, M**), *E. coli*

Pěstování bakteriálních kultur: Metodika zahrnující měření OD, výsev kolonií, inkubaci a dokumentaci byla popsána v příloženém článku (Rieger T., et al, 2008).

SDS PAGE elektroforéza

MALDI TOF

Proteinový fingerprint

Gelová chromatografie

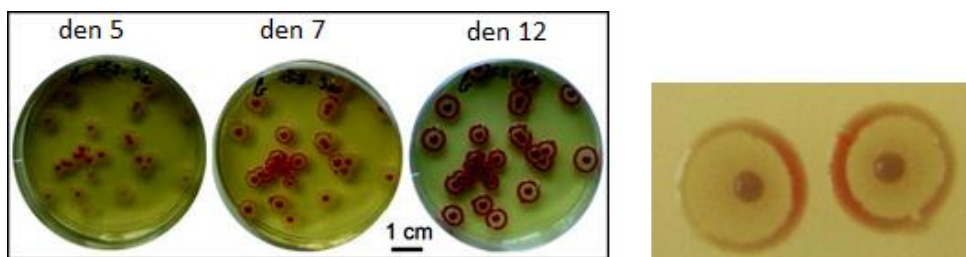
Chromatografie (reverzní fáze)

NMR spektroskopie

Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICR)

4. Výsledky a diskuse

Při klasických výsevech na živné půdě jsme zaznamenali rychlejší dozrání **F** kolonií (vybarvují se rychleji), které vyrůstají v blízkém sousedství, než u kolonií osamocených (Obr. 1).



Obr. 1: Urychlení vybarvování **F** kolonií vyšetých na Petriho misku ve vzájemné blízkosti; Nalevo – časový průběh zrání kolonií na misce; napravo – detail urychleného zrání **F** kolonií (Patkova I. *et al.*, 2012)

Zjistili jsme, že toto urychlení vybarvování je reakce na rozpoznávání agens vypouštěných do agaru ostatními koloniemi.

Abychom mohli lépe tyto informační molekuly identifikovat, museli jsme přejít na médium definované (**MMA**). Zjistili jsme, že **F** kolonie na **MMA** za standardních podmínek neroste, pouze přežívá.

Pozorovali jsme schopnost indukce růstu **F** kolonií na **MMA** (Obr. 2) pomocí rostoucích heterospecifických (*E. coli*, **R**) i konspecifických makul (**M**). Tato zjištění nás nasměrovala k následnému studiu tohoto fenoménu.

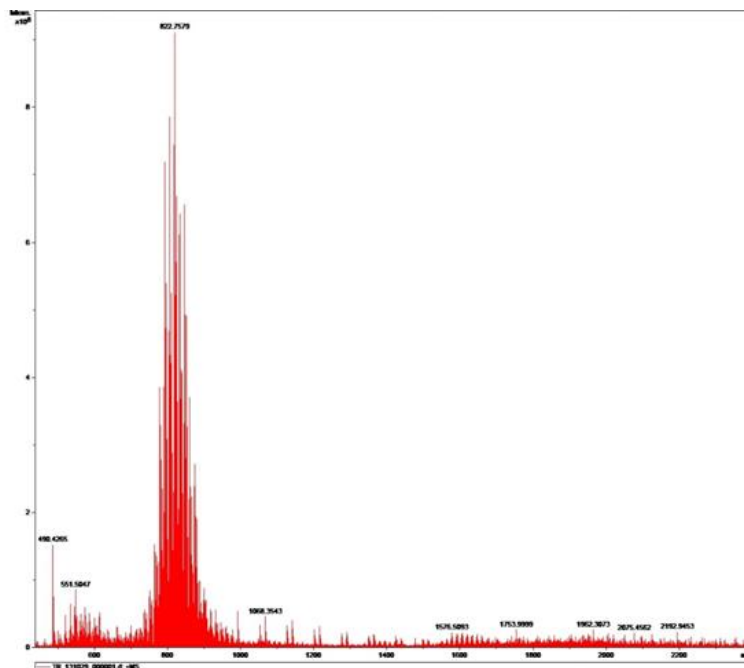


Obr. 2: Vytečkované F kolonií nad různé makuly na MMA. 1 - F kolonie vytečkované nad rostoucí makulu *E. coli*; 2 - F kolonie vytečkované nad rostoucí makulu **R**; 3 - F kolonie (nerostoucí) vytečkované nad (nerostoucí) makulu **F**; 4 - F kolonie vytečkované nad rostoucí makulu **M**.

Prokázali jsme, že rostoucí makrokolonie **R** produkuje během růstu do okolního agaru protein (100 % shoda s hypotetickým proteinem “WP_025304701.1” o velikosti 35 kDa), který může mít signální funkci. V našem případě to však není hledané agens, což jsme dokázali funkčností indukovaní růstu **F** kolonií na **MMA** pomocí kondiciovaného agaru přefiltrovaného přes filtr s membránou 3500 Da.

Při dalším hledání funkčního agens jsme narazili na limity ohledně optimalizace separačních metod. Pro metody moderní biologie jsme nedokázali námi hledanou signální molekulu pročistit a zkoncentrovat natolik, abychom jí mohli spolehlivě identifikovat.

Nicméně jsme poukázali na to, že indukce růstu **F** kolonií na **MMA** bude nejspíše způsobená signální molekulou vyslanou agarem, kterou bude zřejmě krátký termostabilní peptid o váze cca. 3284 Da (přibližně 21 aminokyselin) (Obr. 3).



Obr. 3: Výsledek hmotnostní spektrometrie FT-ICR funkční frakce; Osa X - m/z (hmota/náboj); Osa Y - intenzita signálu

5. Závěry

Definovali jsme, že induktorem helperovského signálu může být jak konspecifická, tak i heterospecifická rostoucí makrokolonie.

Specifikovali jsme, že helperovské agens se nešíří vzduchem, ale agarem nebo tekutým médiem.

Vyloučili jsme nutričně podmíněnou iniciaci růstu **F** kolonií na **MMA**.

Dokázali jsme v agaru kondiciovaném rostoucí makrokolonií *S. rubidea* nalézt aminokyselinové sekvence, jež jsou dle programu BLAST ve 100 % shodě s hypotetickým proteinem “WP_025304701.1”.

Definovali jsme, že signální molekula je menší než 3500 Da.

Díky FT-ICR hmotnostní spektrometrii jsme našli molekulu se silným signálem vůči pozadí s hmotností cca 3284 Da.

Analýza NMR naznačila, že by se mohlo jednat o krátký peptid.

6. Použitá literatura

Bassler B.L., Losick R. Bacterially speaking. *Cell*. 2006 Apr 21;125(2):237-46.

Ben Jacob E., Becker I., Shapira Y., Levine H., Bacterial linguistic communication and social intelligence. *Trends Microbiol.* 2004 Aug;12(8):366-72.

Cepl J., Patkova I., Blahuskova A., Cvrckova F., Markos A. Patterning of mutually interacting bacterial bodies: close contacts and airborne signals. *BMC Microbiol.* 2010 May 12; 10:139.

Dirix G., Monsieurs P., Dombrecht B., Daniels R., Marchal K., Vanderleyden J., Michiels J., Peptide signal molecules and bacteriocins in Gram-negative bacteria: a genome-wide in silico screening for peptides containing a double-glycine leader sequence and their cognate transporters. *Peptides*. 2004 Sep;25(9):1425-40.

Miller R.V., Bacterial gene swapping in nature., *Sci Am.* 1998 Jan;278(1):66-71.

Patkova I., Cepl J., Rieger T., Blahuskova A., Neubauer Z., Markos A., Developmental plasticity of bacterial colonies and consortia in germ-free and gnotobiotic settings. *BMC Microbiol.* 2012 Aug 15; 12:178.

Rieger T., Neubauer Z., Blahůšková A., Cvrčková F., Markoš A., Bacterial body plans: Colony ontogeny in *Serratia marcescens*, *Commun Integr Biol.* 2008 Jul-Sep; 1(1): 78–87.

Schwechheimer C., Kuehn M.J., Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol.* 2015 Oct;13(10):605-19.

Vybiral Z., Psychologie komunikace. 2005, 2.vyd. ISBN 978-80-7367-387-1

7. Seznam publikací

Rieger T., Neubauer Z., Blahuskova A., Cvrckova F., & Markos A., (2008). Bacterial body plans: colony ontogeny in *Serratia marcescens*. *Communicative & integrative biology*, 1(1), 78-87.

Patkova I., Cepl J., Rieger T., Blahusková A., Neubauer Z., & Markos A., (2012). Developmental plasticity of bacterial colonies and consortia in germ-free and gnotobiotic settings. *BMC microbiology*, 12(1), 178.