

Řízená evoluce utilizace nepřirozených substrátů u bakterií

RNDr. PAVEL KYSLÍK, CSc., Mikrobiologický ústav ČSAV Praha, oddělení enzymového inženýrství

Klíčová slova: selekční tlak, nový fenotyp, nepřirozený substrát, kryptický gen, bakteriální endoenzymy

ÚVOD

Experimentální selekci bakterií je míněn proces, kdy je populace buněk, v podmínkách jednorázové nebo kontinuální kultivace, vystavena specifickému selekčnímu prostředí. V těchto podmínkách bakterie využívají základního mechanismu, kterým se mohou přizpůsobit novému prostředí, genetické mutace.

Často je selekční experiment koncipován tak, že jeho výsledkem je vznik mutantů s novým růstovým fenotypem. V tomto případě se v literatuře často setkáme s pojmem „řízená evoluce metabolických drah“ [1–4].

V tomto příspěvku bude pojednáno o některých aspektech základních mechanismů na úrovni exprese genomu, kterými se proces experimentální selekce řídí v podmínkách, kdy je růst prokaryontního mikroorganismu limitován zdrojem uhlíku a energie.

Vztah mezi specifickou růstovou rychlostí (μ) a koncentrací substrátu

Na rozdíl od jednorázové kultivace, kde většinou použítá koncentrace zdroje C a energie značně převyšuje K_S kultury pro daný substrát (K_S udává míru afinity populace k limitujícímu substrátu) a kultura proto roste prakticky μ_{\max} (maximální specifická rychlost na daném substrátu), je v chemostatu možné udržovat koncentrace limitující živiny na hodnotách umožňujících růst submaximálními růstovými rychlostmi. Lze proto popsat průběh selekce v chemostatu na základě růstových parametrů K_S a μ_{\max} .

Stanovit přímý vztah mezi K_S nebo μ_{\max} a příslušnou buněčnou funkcí je obtížné. V některých případech byla zjištěna přímá souvislost mezi K_S kultury a K_M enzymu, jímž katalyzovaná reakce určovala rychlost růstu na příslušném substrátu [5]. Byl popsán i přímý vztah mezi hladinou aktivity enzymu limitujícího růst a μ kultury [6].

V podmínkách jednorázové kultivace, zejména v případě vzniku nových enzymových aktivit nebo růstových fenotypů, je kultivační prostředí voleno tak, aby rostl pouze mutant požadovaných vlastností. Tím je soustředěn zájem pouze na výsledek (nikoliv průběh) selekce.

Použití chemostatu při studiu experimentální selekce umožňuje sledovat vliv selekčního prostředí na dostatečně vysokou populaci buněk, sledovat průběh populačních změn, jimiž kultura prochází a akumulovat ve fermentoru kmeny, které mají vysoké aktivity endoenzymů. Zvýšení aktivity lze vysvětlit hyperprodukcí enzymu nezměněných vlastností nebo syntézou enzymu se změněnou substrátovou specificitou, resp. jinou charakteristikou enzymu: rezistence ke katabolické represi, pH optimum, stabilita apod. [7, 8]. Vesměs jde o změny, které v daných podmínkách zajišťují co nejrychlejší růst a které se

realizují na úrovni transportu přes cytoplazmatickou membránu, počátečních reakcí katabolismu a na úrovni efektivnosti metabolismu [9].

Přirozený a nepřirozený zdroj uhlíku a energie

Nepřirozeným substrátem [10] je míněn zdroj uhlíku a energie, který se v přírodě vyskytuje velice zřídka, buňka jej běžně není schopna využít a roste na něm (za určitých předpokladů, viz dále) nízkou růstovou rychlostí.

Převažujícím mechanismem, kterým buňka mobilizuje svůj genový a biochemický potenciál za účelem utilizace takového substrátu, je mechanismus dereprese syntézy enzymů, jejichž syntéza podléhá v buňce specifickým regulačním mechanismům a jsou využívány k utilizaci nepřirozených substrátů. Často dochází k postupné derepresi více operonů [1]. Motivací pro eliminaci mechanismů regulujících syntézu enzymů je využití širšího spektra specifických enzymů, které tak mohou konvertovat příslušný substrát až na metabolit dále buňkou běžně zpracovatelný, a obehnutí specifických požadavků mechanismů regulujících expresi genomu během růstu na přirozených substrátech.

Kromě mechanismu, který využívá mutací měnících regulaci exprese genů katalytických enzymů existujících metabolických drah, může buňka rozšířit svůj metabolický potenciál derepresí kryptických genů [11]. Produkty těchto genů zřejmě sehrály svou úlohu v minulosti během evoluce mikroorganismů a kryptické geny mohou mít svůj původ v chromosomálních amplifikacích. Předpokládá se, že takové geny přestaly být pro buňku nepostradatelné, během další evoluce nebyly z chromosomu odstraněny a za běžných okolností nejsou exprimovány. Experimentálně byla problematika dereprese kryptických genů studována zejména v podmínkách jednorázové kultivace (tab. 1).

Expresi kryptických genů nastává nejčastěji v selekčních experimentech, v nichž byl genový potenciál mikroorganismu záměrně modifikován a selekční tlak byl soustředěn na specifickou biochemickou reakci, při níž buňka nemohla využít enzymových aktivit jiných metabolických drah [12, 13].

Derepresi syntézy enzymů, zejména vlivem selekčního tlaku kultivačního prostředí v chemostatu, často následují mutace, které vedou k dalšímu zvýšení syntézy enzymů [2]. V podmínkách kontinuální kultivace může dereprese syntézy všech potřebných enzymů pro utilizaci nepřirozeného substrátu představovat pro buněčný metabolismus značnou zátěž [9]. Výsledkem působení selekčního tlaku je v těchto případech eliminace „nabytých“ metabolických reakcí a částečné „vytvoření“ vybraných metabolických dráh.

Obecné závěry, které lze ze studia evoluce metabolické

Tab. 1. Příklady dereprese kryptických genů

Mikroorganismus	Zdroj uhlíku a energie	Katalytická aktivita	Citace
<i>E. coli</i> K12	D-arabinitol D-Abt	dehydrogenáza D-Abt → D-xylulóza	14
<i>E. coli</i> K12	D-lyxóza	izomeráza D-lyxóza → D-xylulóza	15
<i>E. coli</i> K12	celobióza aryl-β-glukozidy	* transportní a hydrolázová aktivita	13
<i>E. coli</i> lac-	laktóza	** β-galaktozidáza	6
<i>K. pneumoniae</i>	xylitol Xlt	dehydrogenáza Xlt → L-xylulóza	12

* současná dereprese více enzymových aktivit

** tzv. „ebg“ β-galaktozidáza

kých drah vyvodit, se týkají reprodukovatelnosti výsledků a formulace zákonitostí, kterými se změny metabolických schopností mikroorganismů řídí.

Baktérie odpovídají na specifické selekční podmínky specifickým způsobem. Výsledkem opakování selekčních experimentů je vznik mutací postihujících stejné geny, a to ve stejném pořadí. Možnost změny metabolických schopností mikroorganismu je zřejmě limitována a vymezena v buňce přítomným a regulacím podléhajícím genovým potenciálem. Jiných možností může buňka využít v případě, že genový potenciál byl záměrně modifikován. Selekční tlak tak může být usměrněn na specifickou biochemickou reakci a výsledkem je vznik nové enzymové aktivity.

Literatura

- [1] LIN, E. C. C., HACKING, A. J., AGUILAR, J., 1976, *BioScience*, **26**, 548—555.
- [2] RIGBY, P. W. J., BURLEIGH, B. D. JR., HARTLEY, B. S., 1974 *Nature*, **251**, 200—204.
- [3] MORTLOCK, R. P., 1982 *Ann. Rev. Microbiol.*, **36**, 259—284.
- [4] HARDER W., KUENEN J. G., MATIN A.: *J. Appl. Bacteriol.* 1977, **43**, 1—24.
- [5] HARTLEY B. S.: (1974) ve sborníku 24. Symposia Soc. Gen. Microbiol., „Evolution in the microbial world“, str. 170—178, editoři Carille a Skehel, Cambridge University Press.
- [6] HALL B. G. a CLARKE N. D.: *Genetics* 1977, **85**, 193—201.
- [7] CLARKE P. H.: *Proc. R. Soc. Lond.* 1980, **B 207**; 385—404.
- [8] DYKHUIZEN D. E. a HARTL D. L.: *Microbiol. Rev.* 1983, **47**, 150—168.
- [9] KOCH A. L.: *J. Mol. Evol.* 1983, **19**, 455—462.
- [10] MORTLOCK R. P.: *Adv. Microbiol. Physiol.* 1976, **13**, 1—93.
- [11] WU T. T.: *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 1978, **6**, 33—51.
- [12] DOTEN R. C. a MORTLOCK R. P.: *J. Bact.* 1984, **159**, 730—735.
- [13] KRICKER M. a HALL B. G.: *Mol. Biol. Evol.* 1984, **1**, 171—182.
- [14] WU T. T.: *J. Gen. Microbiol.* 1976, **94**, 246—256.
- [15] STEVENS F. J. a WU T. T.: *J. Gen. Microbiol.*, 1976, **97**, 257—265.

Kyslík, P.: Rízená evoluce užitizace nepřirozených substrátů u bakterií, *Kvas. prům.* **31**, 1985, č. 7—8, s. 169—170.

Je-li růst prokaryontního mikroorganismu limitován v přírodě

běžně se nevyskytujícíím zdrojem uhlíku a energie — nepřirozeným substrátem, dochází v jednorázové i kontinuální kultivaci k selekci a akumulaci mutantů s novými fenotypovými vlastnostmi. Takový fenotyp je výsledkem přítomnosti nových enzymových aktivit a změn v regulaci exprese operonů katabolických endoenzymů. Uvedené změny nemají nahodilý charakter a podléhají určitým zákonitostem.

Кислик, П.: Управляемая эволюция утилизации неестественных субстратов бактериями. *Квас. прум.* **31**, 1985, № 7—8, стр. 169—170.

V případě limityování růsta prokaryontních mikroorganismů v přírodě obvykle nenajdeme zdroj uhlíku a energie — neeestvenným substrátem, v periodické a nepřerývané kultuře prochází selekce a akumulace mutantů s novými fenotypovými vlastnostmi. Takový fenotyp je výsledkem přítomnosti nových enzymových aktivit a změn v regulování exprese operonů katabolických endofermentů. Uvedené změny nemají náhodný charakter a podléhají určitému zákonitosti.

Kyslík, P.: Controlled evolution of utilization of unnatural substrates by bacteria. *Kvas. prům.* **31**, 1985, No. 7—8, pp. 169—170.

The mutants with new phenotype are selected and accumulated in batch and continuous cultures if the growth of prokaryotes is limited by a source of carbon and energy rarely-existing in nature, by an unnatural substrate. Such a phenotype is a result of the presence of new enzyme activity and changes in the regulation of the expression of operons of catabolic endoenzymes. The culture response to the selection pressure has no occasional character and is subjected to definite laws.

Kyslík, P.: Gesteuerte Evolution der Ausnützung unnatürlicher Substrate bei Bakterien. *Kvas. prům.* **31**, 1985, Nr. 7—8, S. 169—170.

Wenn das Wachstum prokaryonten Mikroorganismen durch eine in der Natur nicht geläufig vorkommende Kohlenstoff- und Energiequelle — ein unnatürliches Substrat-limitiert wird, kommt es während der einmaligen wie auch kontinuierlichen Kultivierung zur Auslese und Anhäufung von Mutanten mit neuen Phänotyp-eigenschaften. So ein Phänotyp ist ein Ergebnis der Anwesenheit neuer Enzymaktivitäten sowie Veränderungen in der Regulation von Expression der Operone katabolischer Endoenzyme. Die erwähnten Veränderungen sind nicht zufälliger Natur und fassen auf gewissen Gesetzmäßigkeiten.