

ZAJĘCIA nr 10

ZAGADNIENIA TEORETYCZNE DO PRZYGOTOWANIA NA ĆWICZENIE: „Genomy bakterii i wirusów”

Genom bakteryjny: struktura i organizacja DNA (chromosom i plazmidy); ekspresja genów w komórce bakteryjnej; źródła zmienności bakterii (koniugacja, transformacja, transdukcja). Genomy wirusów: wirusy DNA, wirusy RNAi retrowirusy; strategie powielania (replikacji) wirusów patogennych dla człowieka.

LITERATURA

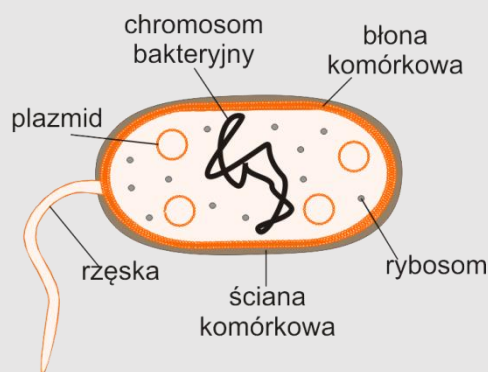
1. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: Podstawy biologii komórki. PWN, Warszawa 2009.
2. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA.: Mikrobiologia Elsevier Urban&Partner, Wrocław 2009

I. Część teoretyczna

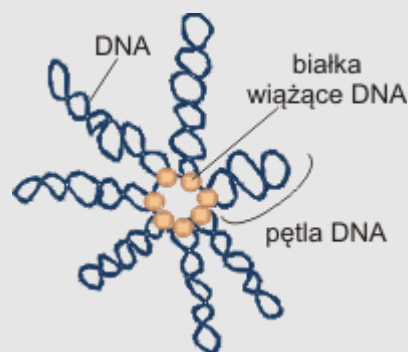
1. Genom bakterii

Genom bakterii składa się z pojedynczej kolistej cząsteczki dwuniciowego kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA), zwanej **chromosomem bakteryjnym** oraz z małych pozachromosomowych cząsteczek DNA – **plazmidów** (Rysunek 1). Wielkość chromosomowego DNA u zdecydowanej większości bakterii mieści się w zakresie od 2 do 5 milionów par zasad. Cząsteczka DNA jest podzielona na kilkadziesiąt superskręconych pętli, które dołączone są do rdzenia białkowego. Struktura ta nazywana jest **nukleoidem**. Geny stanowią około 80-90% chromosomowego DNA i kodują białka metabolizmu podstawowego (zaangażowane są w translację, replikację i wytwarzanie energii), białka adaptacyjne (są wytwarzane w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska) oraz białka nadające cechy charakterystyczne danemu gatunkowi. Przeciętny genom bakteryjny zawiera 3000 genów. W skład chromosomu bakteryjnego wchodzi również sekwencje międzygenowe (oddzielają poszczególne geny) i transpozony (ruchome elementy genetyczne). **Plazmidy** to małe zwykle kuliste dwuniciowe cząsteczki DNA, których

Chromosomowy DNA (nukleoid)
Pozachromosomowy DNA - plazmid



Model struktury nukleoidu *E. coli*



Nukleoid składa się z 40-50 superskręconych pętli DNA, które rozchodzą się promieniście od centralnie położonego białkowego rdzenia.

Rysunek 1. Genom komórki bakteryjnej.

wielkość waha się w zakresie od 1% do 2% wielkości głównego genomu bakteryjnego. Zawierają niewielką liczbę genów, które nie są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania bakterii, ale mogą warunkować różnorodne cechy fenotypowe. Typy plazmidów sklasyfikowanych według zawartych w nich genów i właściwości jakie nadają komórce bakteryjnej są przedstawione poniżej.

Plazmidy typu R	zawierają geny nadające bakterii oporność na antybiotyki i sulfonamidy
Plazmidy typu F	kodują białka wytwarzające pile płciowe i umożliwiające przenoszenie genów między bakteriami w procesie zwanym koniugacją.
Plazmidy wirulencji	nadają bakteriom zdolność do wywoływania chorób
Plazmidy kolicynowe	zawierają geny kodujące białka – kolicyny, które zabijają inne bakterie
Plazmidy degradacyjne	kodują białka pozwalające bakterii na metabolizm nietypowych związków (np. kwas salicylowy, toluen)

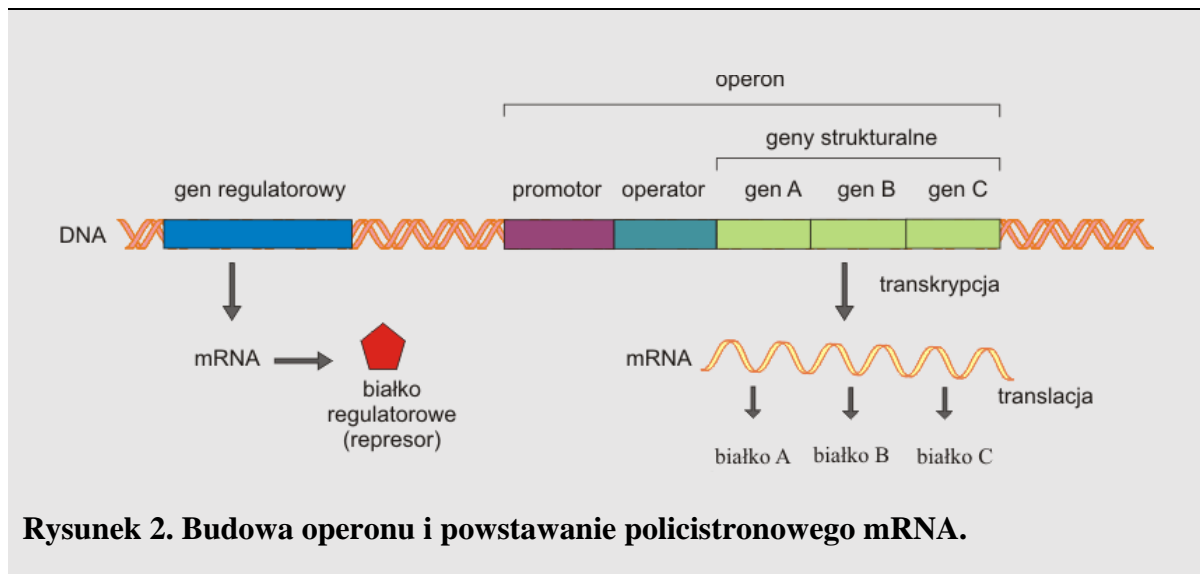
Niektóre typy plazmidów mają zdolność włączania się do głównego genomu.

Projekt „Przedmioty przyrodnicze – kluczem do zawodów przyszłości”. Wyższa jakość kształcenia przedmiotów chemiczno-biologicznych w I LO w Białymstoku dzięki nauczaniu poprzez eksperyment i współpracy z jednostką naukowo-badawczą”

współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Podlaskiego na lata 2014-2020

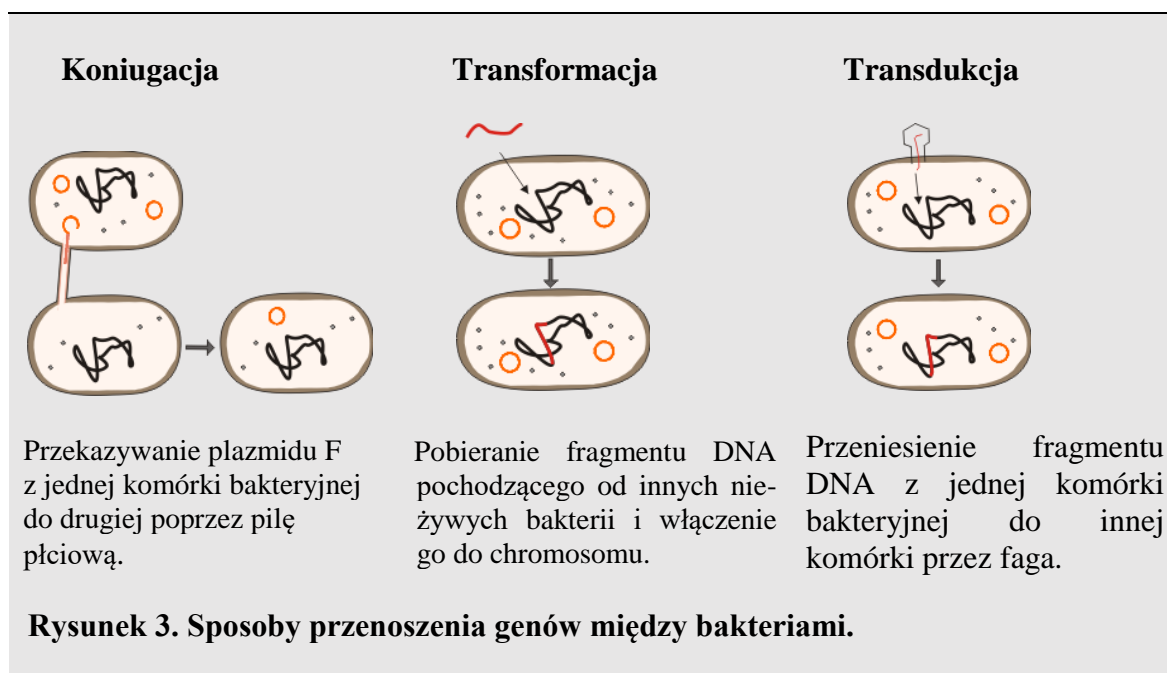
Ekspresja genów w komórce bakteryjnej

Cechą charakterystyczną genomu chromosomowego jest obecność **operonów**. Operon składa się z **promotora**, do którego przyłącza się polimeraza RNA, **genu operatorowego** i kontrolowanych przez niego **genów strukturalnych** (Rysunek 2). Geny strukturalne kodują różne białka enzymatyczne, które uczestniczą w tym samym szlaku biosyntezy (enzymy anaboliczne) lub drodze rozkładu (enzymy kataboliczne). Geny te są położone obok siebie, a ich wspólna transkrypcja powoduje powstanie jednej, długiej cząsteczki mRNA (tzw. **policistronowe mRNA**). Powyżej operonu, znajduje się pojedynczy **gen regulatorowy**, który koduje białko zwane **represorem**. Związanie represora przez gen operatorowy uniemożliwia transkrypcję genów strukturalnych (zjawisko to nosi nazwę **represji**). Natomiast odłączenie represora od genu operatorowego pobudza funkcje genów strukturalnych (tzw. **indukcja lub derepresja**).



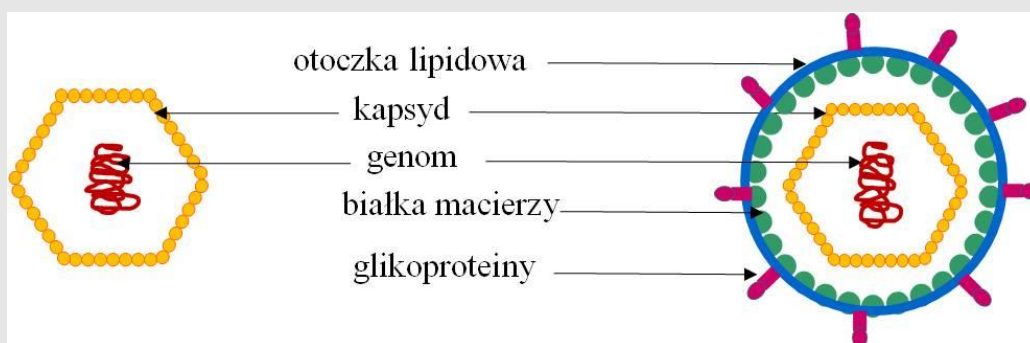
Źródła zmienności genetycznej bakterii (Rysunek 3)

Komórki bakterii mogą uzyskać geny od innych bakterii na drodze koniugacji, transformacji, transdukcji.



2. Genomy wirusów

Wirusy posiadają genom w postaci DNA lub RNA, który może być kolisty lub liniowy. Genom znajduje się wewnątrz jest otoczony białkowym kapsydem zbudowanym z podjednostek – kapsomerów (Rysunek 4). Kompleks genomowego kwasu nukleinowego i białek nazywany jest **nukleokapsydem**. U wielu wirusów nukleokapsyd jest dodatkowo otoczony osłonką lipidową, w która wbudowane są glikoproteiny. Białka osłonki są kodowane przez genom wirusa, natomiast lipidy osłonkowe pochodzą z błon komórkowych (z błony cytoplazmatycznej, błony jądrowej lub retikulum endoplazmatycznego) komórki gospodarza.



Wirus bezotczkowy

Wirus otczkowy

Rysunek 4. Schemat budowy wirusa

Genom wirusów DNA i wirusów RNA może być dwuniciowy (ds DNA lub ds RNA; ang. *double-stranded*) lub jednoniciowy (ss DNA lub ssRNA; ang. *single-stranded*). Zawierają one kodujące białka kapsydu (ochraniają genom), macierzy (łączą białka nukleokapsydu z osłonką) i białka osłonki (rozpoznają komórkę gospodarza) oraz geny kodujące białka niestrukturalne, tj. enzymy niezbędne do przebiegu replikacji wirusa, białka niezbędne do odtwarzania cząstek potomnych wirusa i białka regulujące transkrypcję. Białka wirusowe są syntetyzowane z wykorzystaniem rybosomów komórki gospodarza. W wielu przypadkach ulegają one modyfikacjom potranslacyjnym (np. glikozylacji).

Replikacja wirusów

Wirusy są bezwzględnyymi wewnątrzkomórkowymi pasożytami, co oznacza że mogą namnażać się tylko wewnątrz komórki. Główne etapy namnażania się wirusów w komórkach gospodarza są wspólne dla wszystkich wirusów:

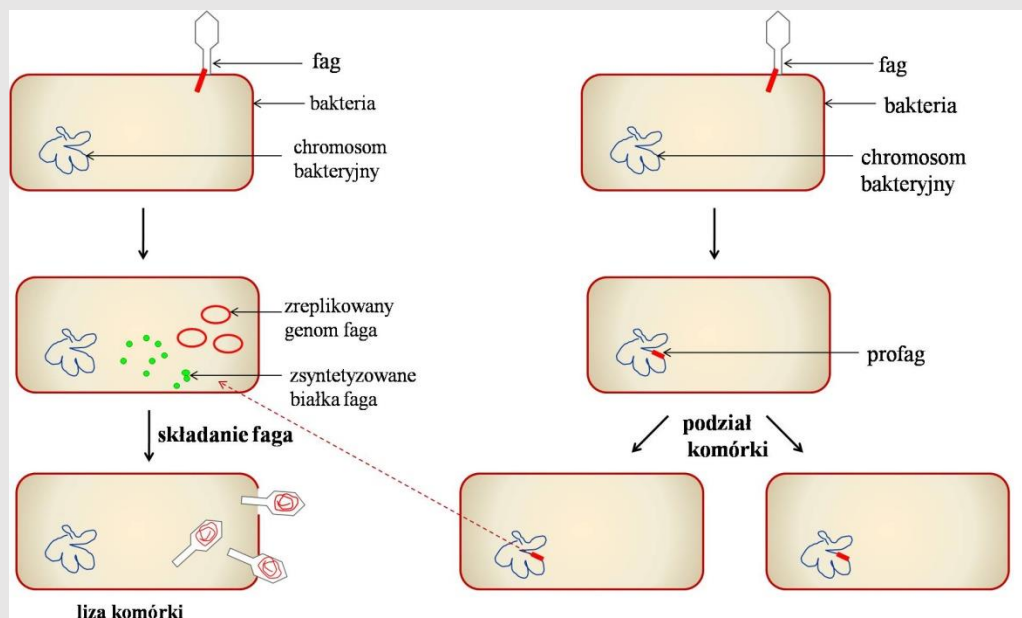
- rozpoznanie komórki docelowej i wiązanie się wirusa z receptorem błony komórkowej,
- penetracja czyli проникnięcie wirusa do komórki na drodze endocytozy z udziałem receptora lub w sposób bezpośredni – wiroleksji (wirusy bezotoczkowe) lub na drodze fuzji otoczki wirusowej z błoną komórkową,
- uwolnienie genomu z otoczki i kapsydu (odpłaszczenie),
- ekspresja genów kodujących białka wczesne (tj. enzymy i białka wiążące kwasy nukleinowe),
- replikacja genomu,
- ekspresja genów kodujących białka późne (tj. białka strukturalne) i potranslacyjna modyfikacja białek,
- składanie i dojrzewanie wirusa,
- uwolnienie cząstek wirusowych (wirionów) z komórki na drodze egzocytozy lub lizy komórki (wirusy bezotoczkowe) lub wskutek fuzji błon (wirusy otoczkowe).

Cykl życiowy bakteriofagów (Rysunek 5)

Większość bakteriofagów ma genom w postaci dsDNA, który otoczony jest płaszczem białkowym (kapsydem). Po wnikięciu do komórki bakteryjnej, fag może wejść w **cykl lityczny** (następuje ekspresja genów faga, replikacja genomu, synteza białek kapsydu, składanie cząstek faga i ich uwalnianie w wyniku lizy komórki bakteryjnej) lub w **cykl lizogeniczny** (genom faga jest włączony do genomu bakterii i replikuje się razem z chromosomem bakteryjnym). Bakteria posiadająca w swoim genomie wbudowany genominfekującego ją faga to **lizogen**, a bakteriofag wbudowany w genom gospodarza to **profag**. Profag może ulec spontanicznej indukcji i wejść w cykl lityczny.

Cykl lityczny

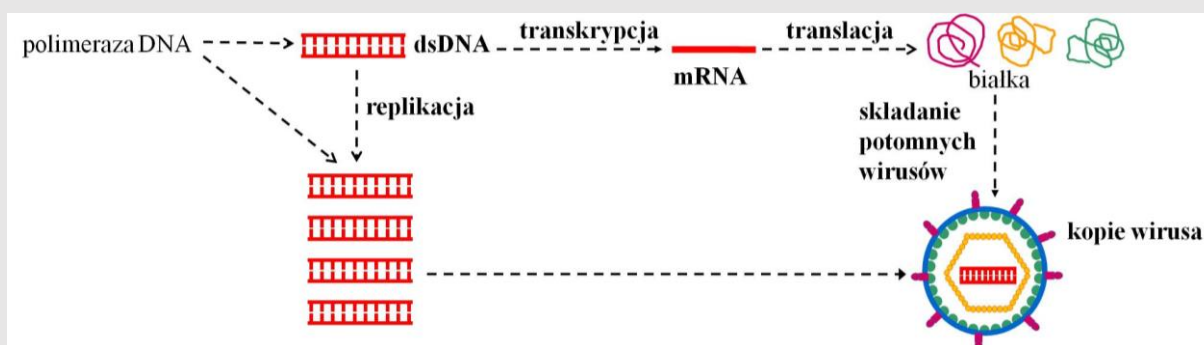
Cykl lizogeniczny



Rysunek 5. Cykl życiowy bakteriofagów.

Sposoby powielania się ludzkich wirusów w komórkach

Wirusy ds DNA (Rysunek 6): DNA wirusa jest matrycą do biosyntezy mRNA kodującego białka (polimerazy DNA niezbędne do replikacji genomu wirusa i białka strukturalne). Replikacja genomu zachodzi w jądrze komórkowym z udziałem wirusowej polimerazy DNA .

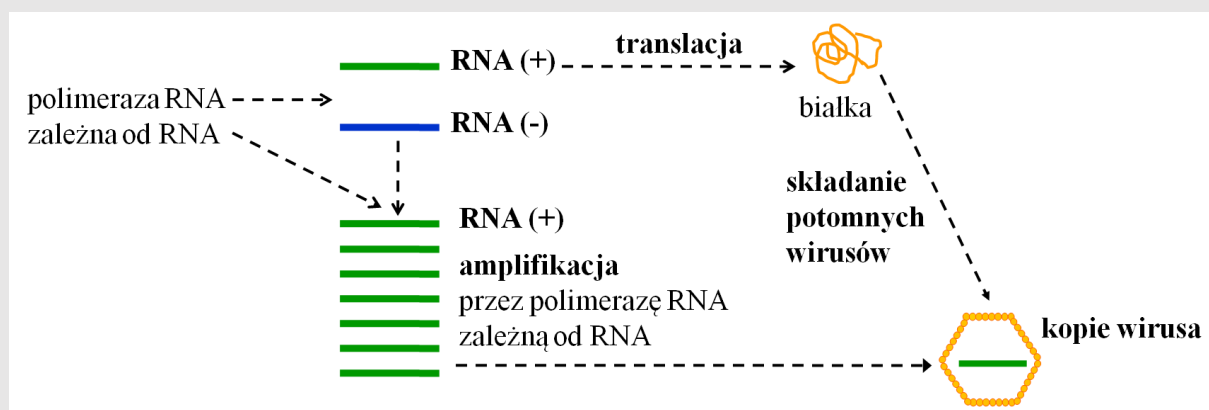


Rysunek 6. Replikacja wirusów ds DNA w komórce gospodarza.

Przykłady ludzkich wirusów:

- **Herpeswirusy** (posiadają otoczkę): **ludzki wirus opryszczki** (*Herpes virus hominis*; HSV; namnaża się w jądrze komórkowym), **wirus ospy wietrznej-półpaśca** (*Varicella zoster*; namnaża się w cytoplazmie), **wirus cytomegalii** (CMV; zakażenie w czasie ciąży może przyczyniać się do wystąpienia wad rozwojowych u noworodków); **wirus Epsteina-Barr** (EBV; powoduje mononukleazę zakaźną, może powodować dwie choroby nowotworowe: chłoniaka Burkitta i nowotwory nosogardzieli).
- **Adenowirusy** (nie posiadają otoczki) – replikują się w jądrze komórkowym; powodują zakażenia układu oddechowego, zapalenie spojówek (różowe oczy), krwotoczne zapalenia pęcherza moczowego i zapalenia żołądkowo-jelitowe.
- **Ludzki wirus brodawczaka** (HPV) - genom w postaci kolistego dsDNA; nie jest osłonięty otoczką. Istnieje ok. 100 typów HPV odpowiedzialnych za brodawki skóry i błon śluzowych; HPV typ 16 i typ 18 są wirusami wysokiego ryzyka zachorowania na raka szyjki macicy i innych narządów moczowo-płciowych.

Wirusy ssRNA o dodatniej polarności (Rysunek 7) : RNA (+) wirusa bezpośrednio służy do biosyntezy białek wirusa (pełni funkcję mRNA). W celu replikacji (amplifikacji) genomu syntetyzowana jest komplementarna nić o polarności (-) przy udziale wirusowej polimerazy RNA zależnej od RNA. Następnie syntetyzowana jest komplementarna nić (+) RNA, która ulega powielaniu.

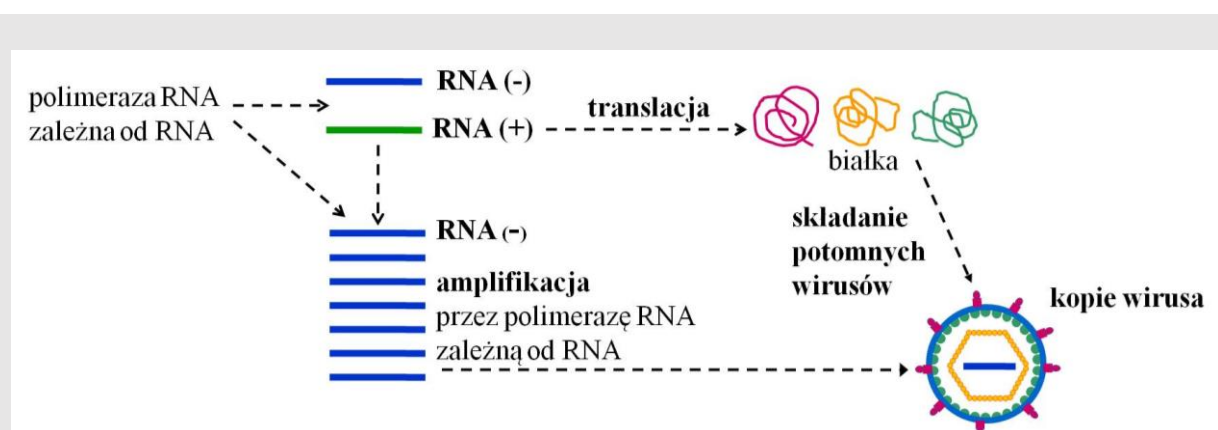


Rysunek 7. Strategia powielania się wirusów RNA o dodatniej polarności (+).

Przykłady ludzkich wirusów:

- **wirus polio** (bezotczkowy)– wywołuje zapalenie rogów przednich rdzenia, czyli porażenie dziecięce (chorobę Heinego-Medina); szczepionki zapewniają pełną ochronę przed wirusem, ale odporność taka nie utrzymuje się całe życie. Co 10 lat należy przyjmować kolejną dawkę.
- **rhinowirusy** (bezotczkowe); są najważniejszą przyczyną **przeziębienia** i zakażeń górnych dróg oddechowych; replikacja zachodzi głównie w jamie nosowej.
- **wirus różyczki** (posiada otoczkę); zakażenie w okresie ciąży może spowodować poważne wady wrodzone u dziecka.

Wirusy ssRNA o ujemnej polarności (Rysunek 8): Na matrycy wirusowego RNA (-) jest najpierw transkrybowana komplementarna nić o polarności (+) przez polimerazę RNA zależną od RNA. Nić RNA (+) pełni funkcję mRNA i służy do biosyntezy białek wirusa. Następnie na matrycy RNA (+) jest syntetyzowana komplementarna nić (-) RNA, która ulega amplifikacji (powieleniu). Wszystkie wirusy RNA (-) posiadają otoczkę.

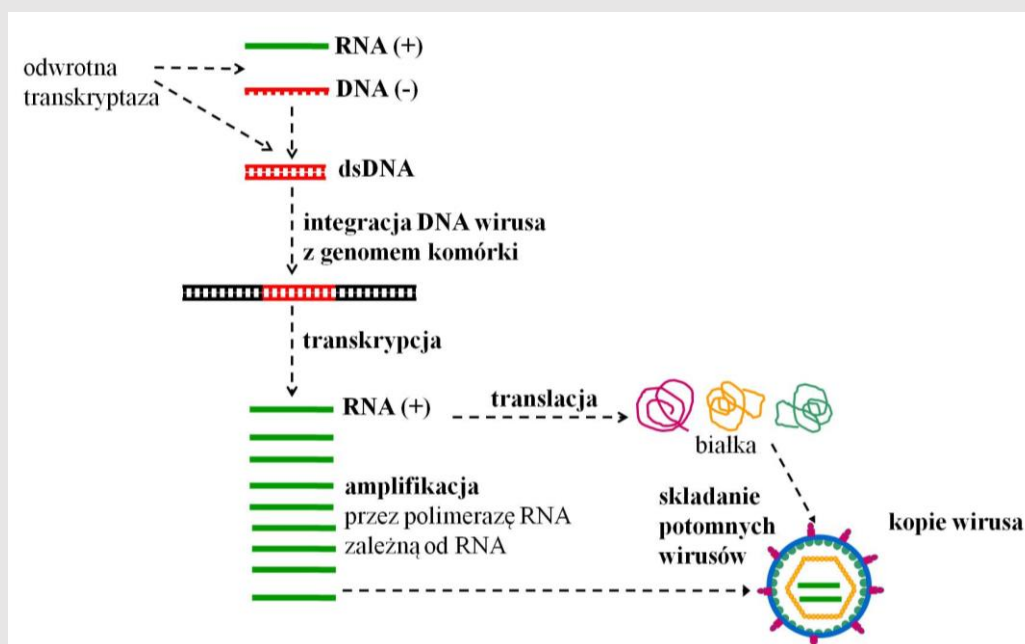


Rysunek 8. Strategia powielania się wirusów ssRNA o polarności (-)

Przykłady ludzkich wirusów:

- **wirusy grypy A, B, C** – replikują się w jądrze komórkowym, posiadają osiem segmentów ssRNA(-), które kodują enzymy odpowiedzialne za transkrypcję, białka macierzy i kapsydu oraz białka wbudowane w osłonkę lipidową: **hemaglutyninę** (łączy się z kwasem sjałowym obecnym na powierzchni komórek nabłonka dróg oddechowych) i **neuraminidazę** (hydrolizuje kwas sjałowy i umożliwiają wniknięcie wirusa). Ludzkie podtypy hemaglutyninowe i neuraminidazowe wirusa grypy typu A to: H1, H2, H3 oraz N1 i N2. Białka te mają właściwości antygenowe i wchodzą w skład szczepionek.
- **wirus odry i wirus świnki** – ssRNA (-) występuje w postaci liniowej (nie jest segmentowane); replikują się w cytoplazmie; ich otoczką lipidową zawiera specyficzną hemaglutyninę. Szczepionki skojarzone zawierają żywe odpowiednio osłabione wirusy.

Retrowirusy (Rysunek 9): jednoniciowa cząsteczka RNA (+) jest transkrybowana za pomocą wirusowego enzymu - **odwrotnej transkryptazy** do dwuniciowej cząsteczki DNA, która jest następnie wbudowywana do genomu komórki gospodarza. W wyniku aktywacji genomu wirusa, na matrycy DNA są transkrybowane cząsteczki wirusowego RNA, które wraz z rybosomami komórkowymi uczestniczą w biosyntezie białek wirusa.



Rysunek 9. Strategia powielania się retrowirusów.

Przykłady ludzkich retrowirusów:

- **wirus ludzkiego niedoboru odporności (HIV)** – jest przenoszony głównie na drodze kontaktów seksualnych, poprzez zakażoną krew i preparaty krwiopochodne; jest też przenoszony z matki na dziecko; zakaża limfocyty T i makrofagi; aktywacja wirusa wywołuje zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS).
- **wirus ludzkich białaczek limfocytów T (HTLV)** - odpowiada za rozwój ostrej białaczki z limfocytów T i chłoniaków z limfocytów T.

Oba wirusy posiadają **dwie kopie RNA (+)** i trzy główne geny kodujące poliproteiny: *env* (białko powierzchniowe i transbłonowe), *gag* (białka nukleokapsydu) i *pol* (proteazę, odwrotną transkryptazę i integrację). HIV-1 zawiera dodatkowo 6 innych genów, natomiast HTLV-1 dwa onkogeny: *Tax* i *Rex*.

II. Część praktyczna

1. Obserwacja bakterii w mikroskopie świetlnym

1.1. Barwienie pozytywne proste – preparat barwi się przy pomocy jednego barwnika (np. błękit metylenowy); wszystkie bakterie są zabarwione podobnie.

Badany materiał będą stanowiły produkty spożywcze: jogurt naturalny, sok z kiszonej kapusty, woda z miodem.

Wykonywanie i utrwalenie preparatu:

- odtłuścić szkiełko podstawowe (zwilż papierowy ręcznik alkoholem, dokładnie wytrzyj szkiełko)
- za pomocą pipety Pasteura nanieś 1-2 krople badanego materiału
- wykonaj rozmaz (rozprowadź zawiesinę na całej powierzchni szkiełka)
- wysusz preparat na wolnym powietrzu (10-15 minut)
- trzymając szkiełko w szczypcach, utrwál rozmaz przesuwając go trzykrotnie przez płomień palnika,
- ostudź szkiełko
- preparat jest gotowy do barwienia.

Wykonania barwienia:

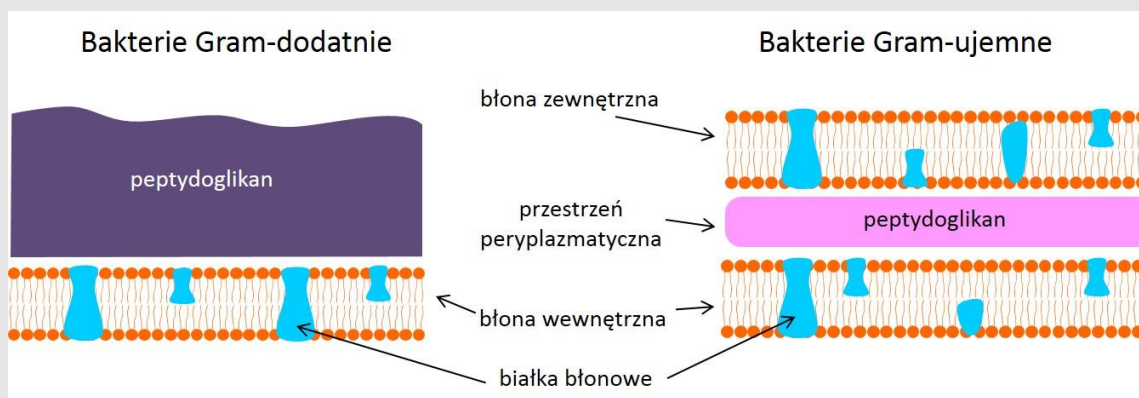
- umieść preparat w przygotowanej kuwecie do barwienia
- na utrwalone bakterie nanieś błękit metylenowy i odczekaj 60 sekund
- usuń barwnik delikatnie wodą za pomocą tryskawki
- pozostaw preparat do wyschnięcia
- gotowy preparat można obserwować pod mikroskopem bez szkiełka nakrywkowego przy użyciu obiektywu immersyjnego (x100)

1.2. Barwienie złożone metodą Grama - pozwala odróżnić bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne (Rysunek 10). Bakterie Gram-dodatnie mają grubą ścianę komórkową zbudowaną z wielu warstw peptydoglikanu (zatrzymują fiolet krystaliczny),

Natomiast bakterie Gram-ujemne mają cienką warstwę peptydoglikanu i dodatkowo zewnętrzną błonę. Ich ściana komórkowa zostaje uwidoczniła (kolor różowy) po zastosowaniu barwnika kontrastowego – safraniny.

Wykonanie barwienia metoda Grama

- a. na utrwalony preparat (umieszczony w kuwecie do wybarwiania) nanieś fiolet krystaliczny na 30 sekund,
- b. spłucz barwnik wodą destylowaną z tryskawki (zrób to delikatnie żeby nie zmyć wszystkich bakterii)
- c. utrwaj barwnik nanosząc płyn Lugola (10 sekund)
- d. wypłucz barwnik za pomocą 95% etanolu do momentu aż przestanie uwalniać się z niego fiolet krystaliczny
- e. opłucz preparat wodą destylowaną
- f. nanieś na szkiełko safraninę (30 sekund)
- g. spłucz barwnik delikatnie wodą destylowaną z tryskawki
- h. pozostaw preparat do wyschnięcia
- i. oglądaj preparat bez szkiełka nakrywkowego pod mikroskopem z użyciem obiektywu immersyjnego (x100)



Rysunek 10. Barwienie metodą Grama: ściana komórkowa bakterii Gram-dodatnich - ciemny fiolet i Gram-ujemnych - kolor różowy.

2. Obserwacja preparatów trwałych w mikroskopie optycznym:

- Escherichia coli* – Gram- ujemna pałeczka okrężnicy
- Clostridium botulinum*– Gram- dodatnia laseczka jadu kiełbasianego wytwarzająca przetrwalniki.