

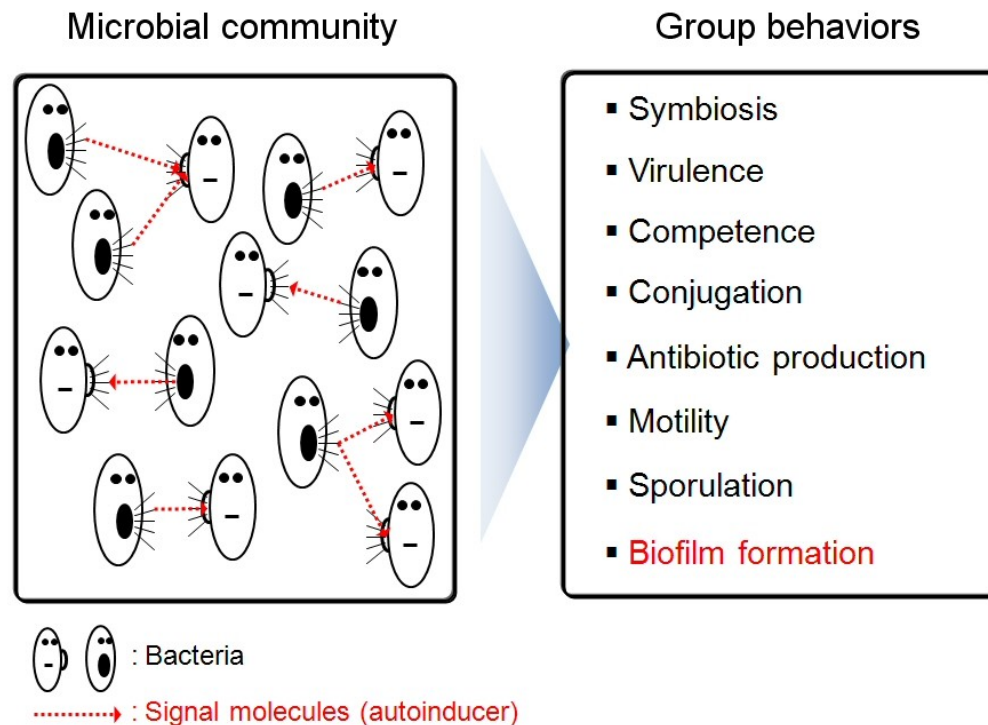
# **Sistemi za zaznavanje celične gostote v sintezni biologiji**

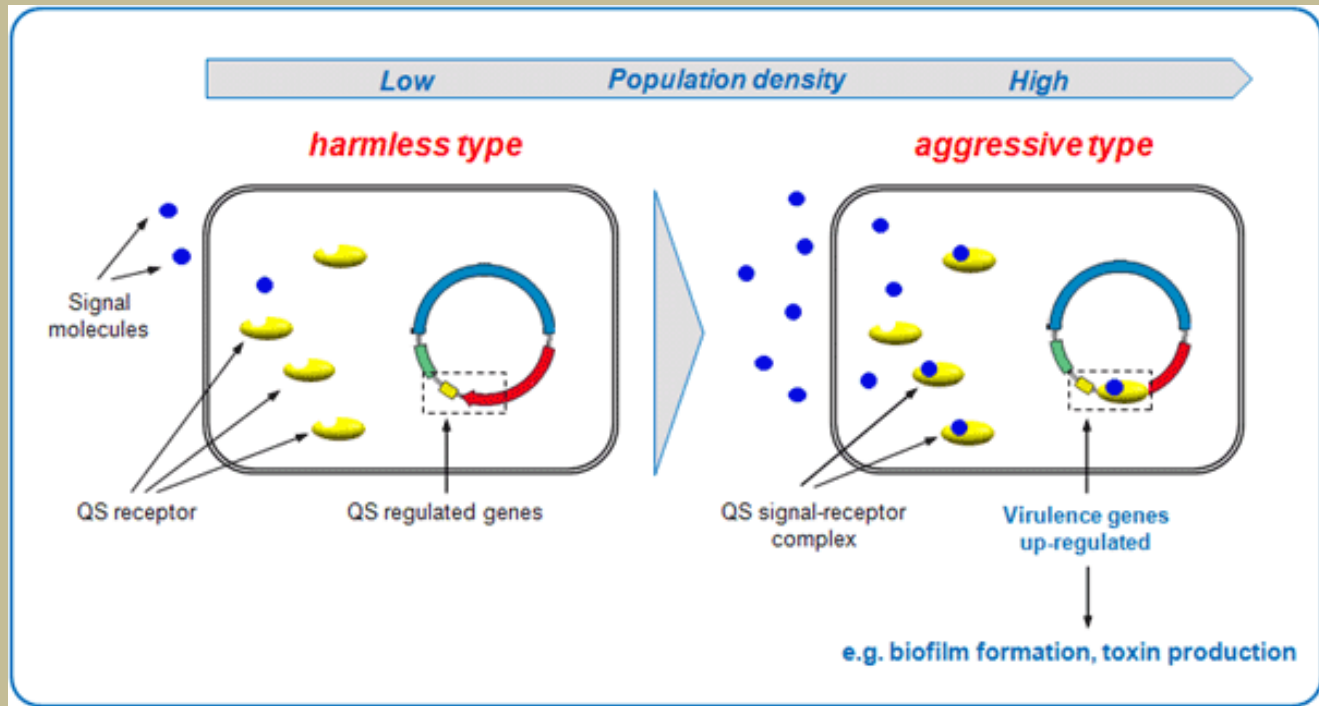
## Zaznavanje celične gostote (quorum sensing, QS)

Celice med seboj komunicirajo preko signalnih molekul, ki v drugi celici sprožijo odziv na ravni transkripcije.

Več ko je celic v bližini neke celice, ki jo opazujemo, več signalnih molekul jo bo doseglo. Informacija o gostoti celic je pomembna, ker celice v gosti kulturi (lahko) spremenijo fenotip.

Signalne molekule omogočajo sinhronizacijo fenotipa (npr. usklajen odgovor na imunski odziv gostitelja ali na spremembe v okolju, kjer rastejo). Med geni, ki se inducirajo, so tudi geni za sintezo signalnih molekul (sicer je njihovo izražanje nizko). Povečana koncentracija signalnih molekul torej sproži pozitivno povratno zanko.





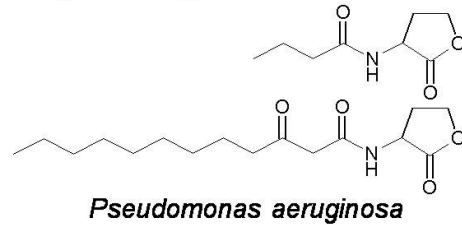
<http://www.advancedhealing.com/quorum-sensing-and-biofilm/>

## Signalne molekule za zaznavanje celične gostote

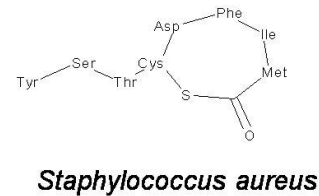
Različni mikroorganizmi uporabljajo različne signale, ki so zanje specifični in jih torej signali drugih mikrobov ne motijo. Če zaznavajo več različnih signalov, se lahko na vsakega od njih odzovejo drugače. Obstaja tudi signaliziranje med celicami različnih organizmov (QS cross-talk).

Obstaja več skupin signalnih molekul, znotraj vsake skupine pa so razlike npr. v dolžini stranskih verig ipd. Signalne molekule nekateri na splošno imenujejo tudi avtoinduktorji, imajo pa jih tudi za bakterijske feromone.

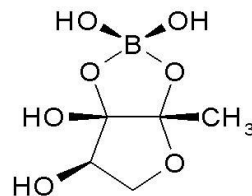
- **N-acyl homoserin lactone (AHL)**  
for gram-negative bacteria



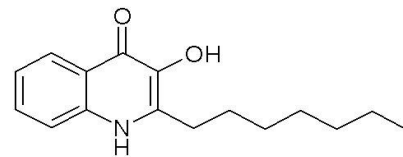
- **Oligopeptide**  
for gram-positive bacteria

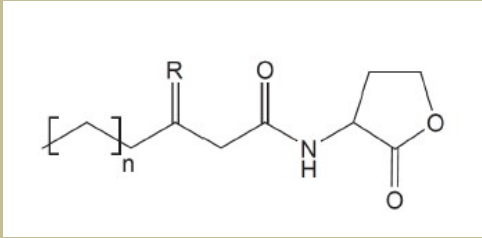


- **Autoinducer-2 (AI-2)**  
for interspecies communication



- **Others**





**Box 1. Structures of Some Quorum Sensing Signal Molecules**

Signal	Structure	Organisms
C4-HSL (an AHL)		<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
C6-HSL		<i>Erwinia carotovora</i> , <i>Pseudomonas aureofaciens</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>
3-Oxo-C6-HSL		<i>E. carotovora</i> , <i>Vibrio fischeri</i> , <i>Y. enterocolitica</i>
3-Oxo-C8-HSL		<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Autoinducing Peptide (AIP)-I	 Tyr-Ser-Thr-Cys-Asp-Phe-Ile	<i>Staphylococcus aureus</i> Group I strains
AI-2 ( <i>S</i> -THMF-borate)		<i>Vibrio harveyi</i>
Competence and Sporulation Stimulating Factor (CSF)	Glu - Arg - Gly - Met - Thr	<i>Bacillus subtilis</i>
Farnesol		<i>Candida albicans</i>

G-:  
(acil)homoserinlaktoni (HSL)  
alkil-kinoloni (AQ)  
metilni sestri maščobnih kislin

G+:  
peptidi  
butirolaktoni (*Streptomyces*)

# Odkritje QS

Princip QS so odkrili pri gojeni bakteriji *Vibrio fischeri*, ki sicer živi v svetilnem organu havajske pritlikave sipe *Euprymna scolopes* (pa tudi drugih mehkužcev in rib). Izražanje luciferaze je omejeno na kratko obdobje, ko celice dosežejo določeno gostoto ( $>10^{10}/\text{ml}$ ). Kasneje so podobne sisteme odkrili tudi pri številnih drugih bakterijah, obstajajo pa tudi načini komuniciranja med organizmi, ki so si filogenetsko zelo oddaljeni.

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, October 1970, p. 313-322  
Copyright © 1970 American Society for Microbiology

Vol. 104, No. 1  
Printed in U.S.A.

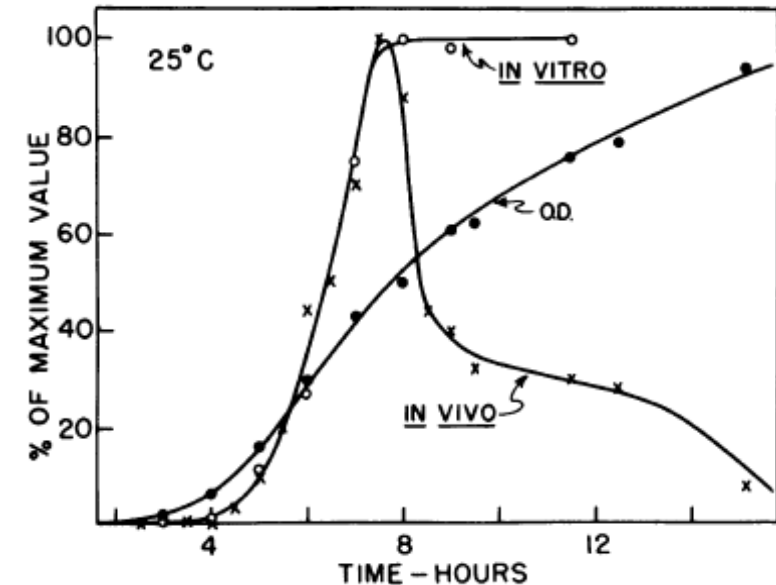
## Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System<sup>1</sup>

KENNETH H. NEALSON, TERRY PLATT, AND J. WOODLAND HASTINGS

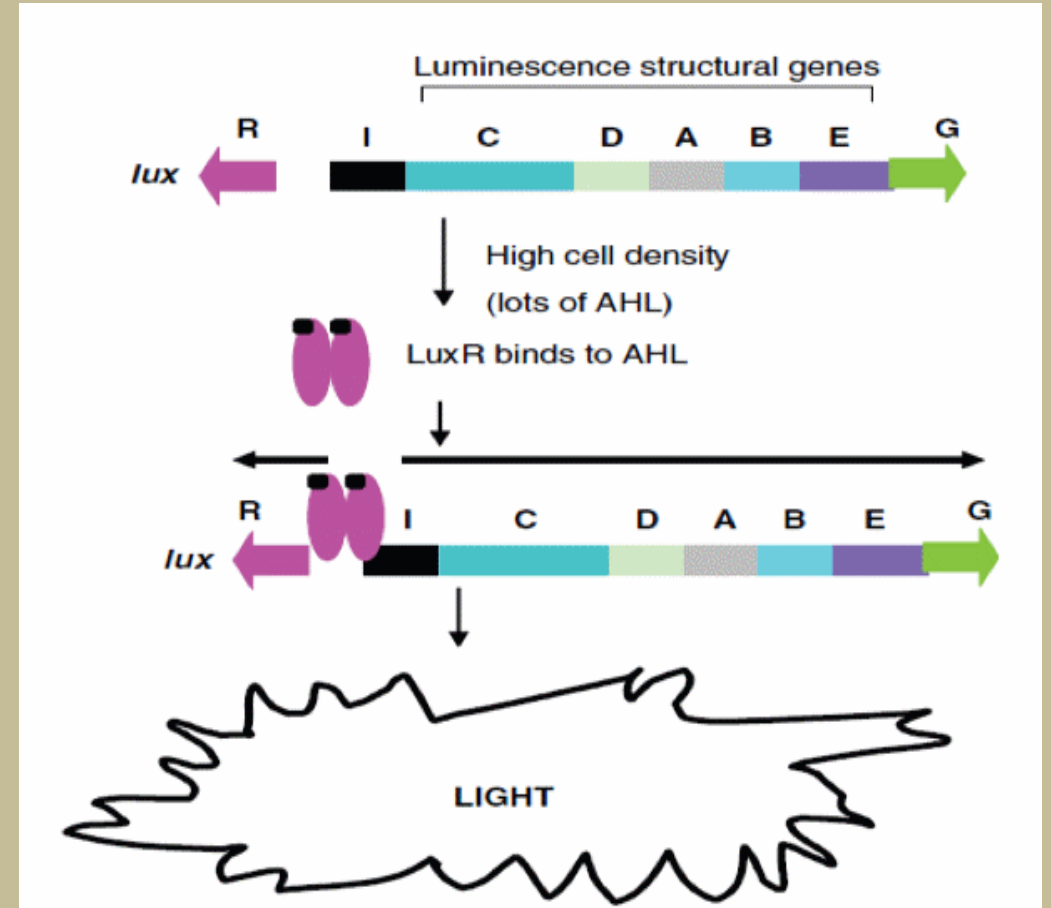
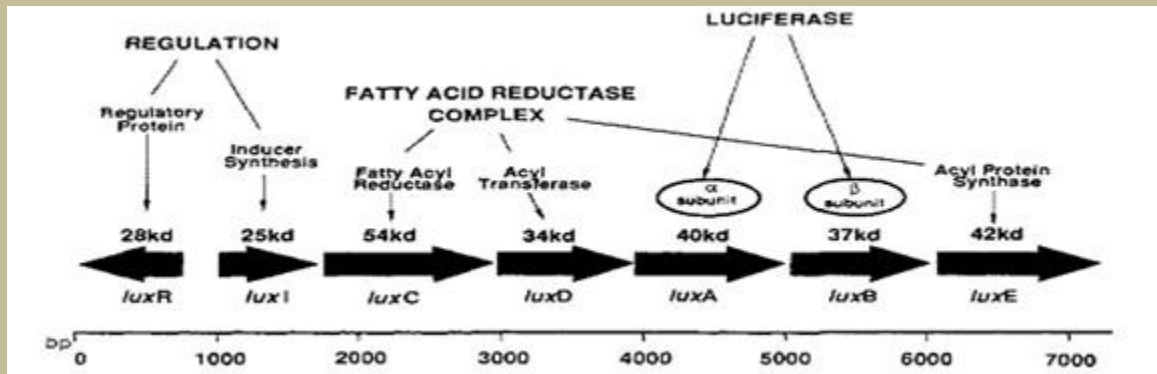
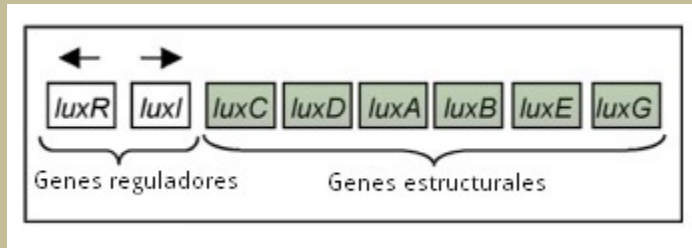
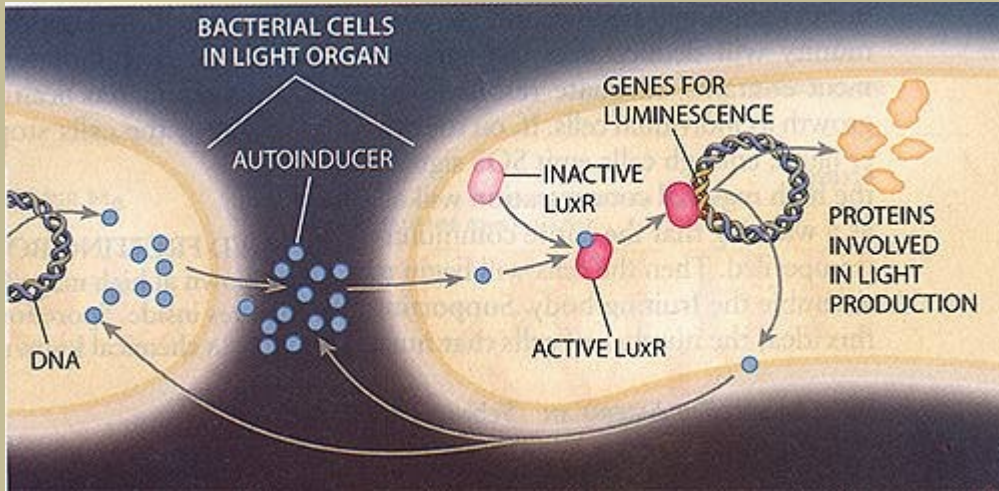
Biological Laboratories, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, 02138 and  
Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts 02534

Received for publication 30 April 1970

In bioluminescent bacteria growing in shake flasks, the enzyme luciferase has been shown to be synthesized in a relatively short burst during the period of exponential growth. The luciferase gene appears to be completely inactive in a freshly inoculated culture; the pulse of preferential luciferase synthesis which occurs later is the consequence of its activation at the level of deoxyribonucleic acid transcription which is attributed to an effect of a "conditioning" of the medium by the growing of cells. Although cells grown in a minimal medium also exhibit a similar burst of synthesis of the luminescent system, the amount of synthesis is quantitatively less, relative to cell mass. Under such conditions, added arginine results in a striking stimulation of bioluminescence. This is attributed to a stimulation of existing patterns of synthesis and not to induction or derepression per se.

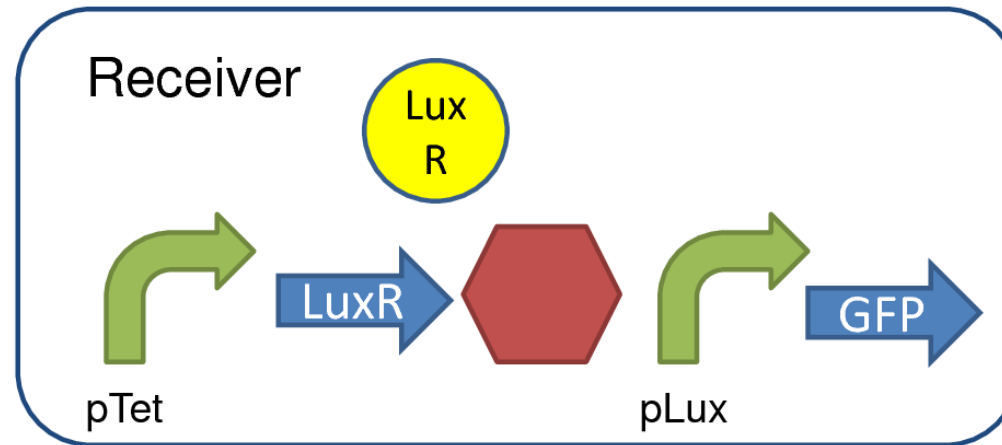
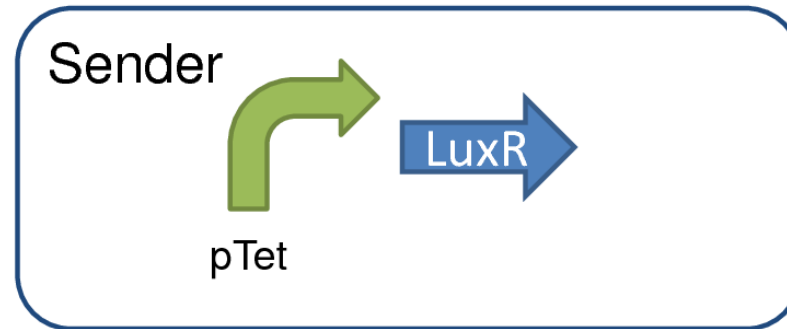
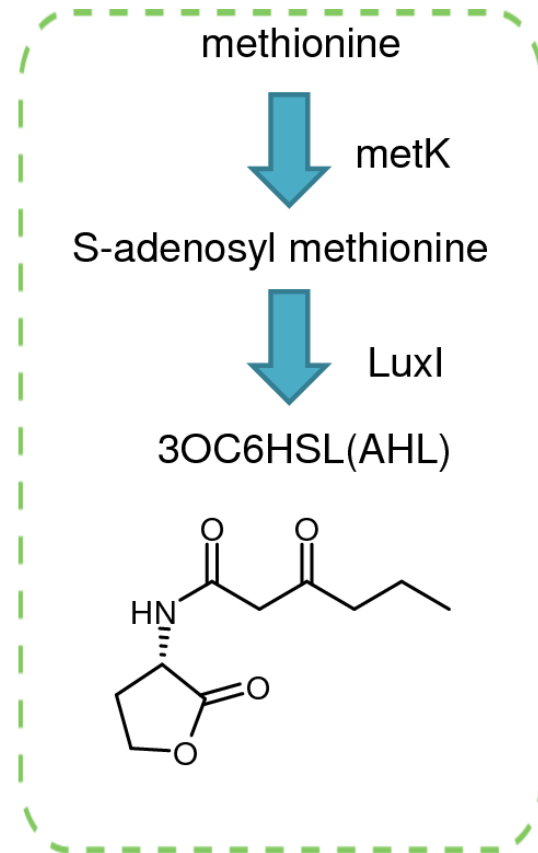


# Signalni sistem LuxR/I



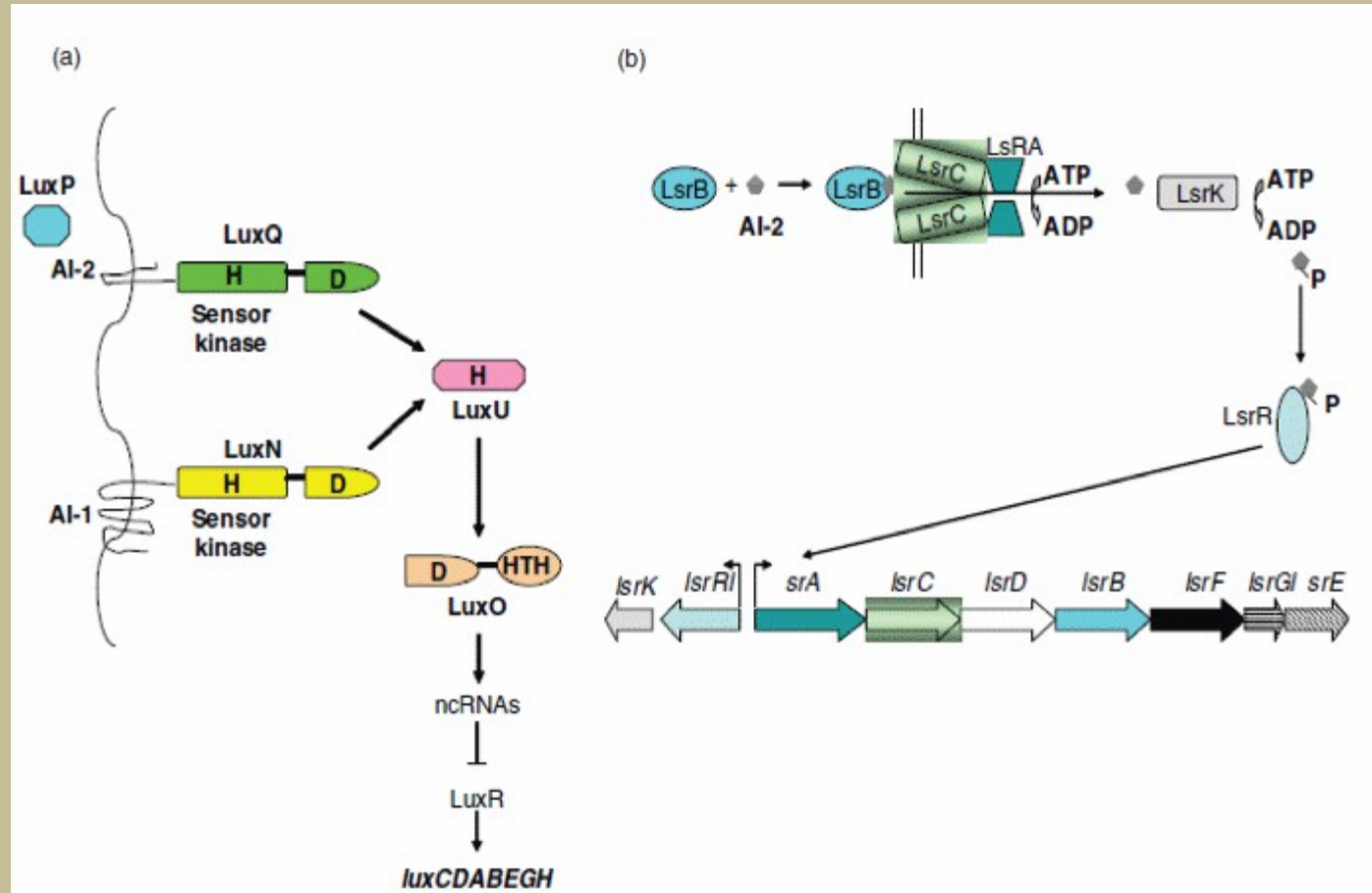
<https://www.bio.cmu.edu/courses/03441/TermPapers/97TermPapers/lux/communication.html>  
[http://2010.igem.org/Team:UNAM-Genomics\\_Mexico/Modules/In\\_vivo](http://2010.igem.org/Team:UNAM-Genomics_Mexico/Modules/In_vivo)  
<http://maestradelia.wordpress.com/2013/03/03/el-twitter-de-las-bacterias/>  
[http://aquafind.com/articles/Quorum\\_sensing.php](http://aquafind.com/articles/Quorum_sensing.php)

# Quorum Sensing

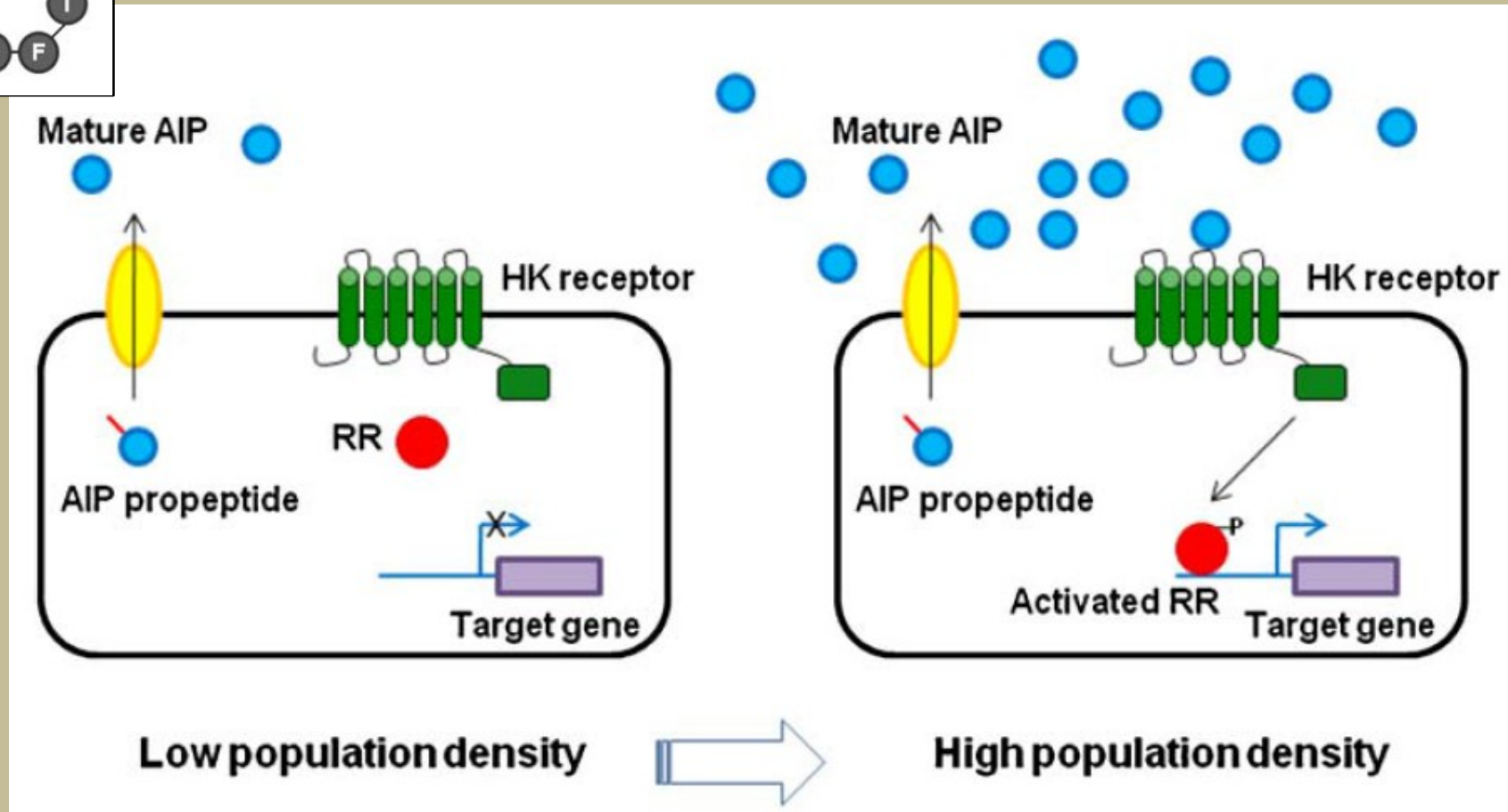
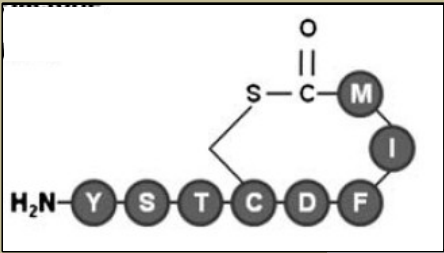




# Signalni sistem LuxS/AI-2 pri *V. harveyi* (a) in *E. coli* (b)



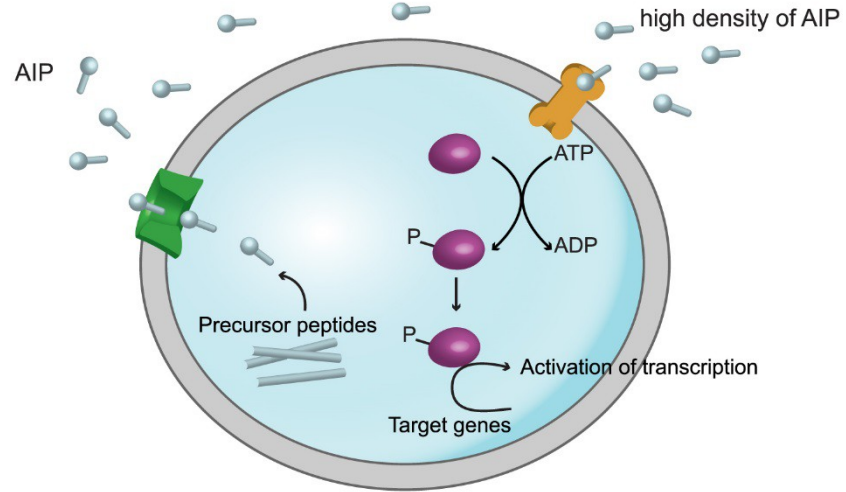
## Signalni sistem AgrC/AgrA pri *S. aureus*



Signalni peptid (AIP, autoinducing peptide) je dolg 7-9 AK in nastaja po aktivaciji gena *argD*. Iz celic se izloča z aktivnim transportom. Membranski receptor ArgC je histidin kinaza, ki fosforilira in s tem aktivira ArgA. Ta uravnava izražanje operona *arg* ter regulatorne RNA (RNA III), ki nato vpliva na izražanje *argC/argA*, s tem pa pride do sprememb v nastajanju biofilma in virulentnosti bakterij.

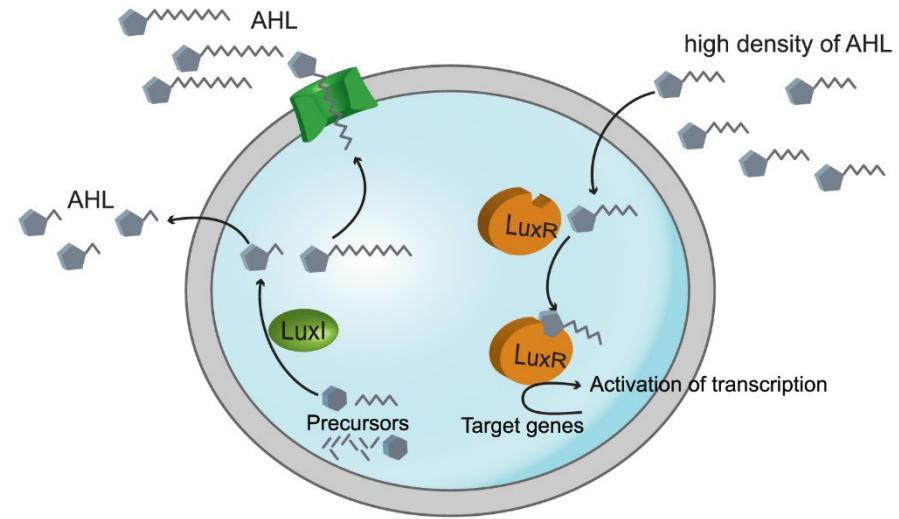
### MECHANISM 1

Quorum sensing in mainly Gr<sup>+</sup> bacteria: autoinducing polypeptides (AIP)



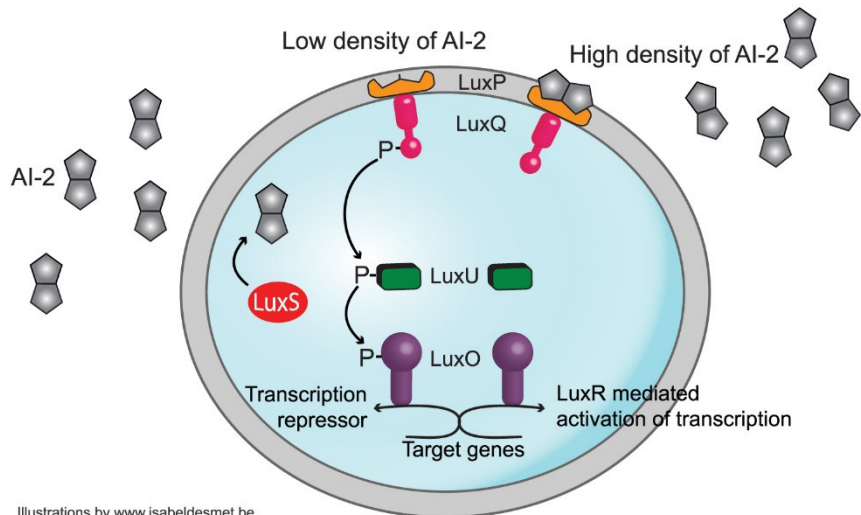
### MECHANISM 2

Quorum sensing in Gr<sup>-</sup> bacteria: N-acylhomoserine lactones (AHL / AI-1)



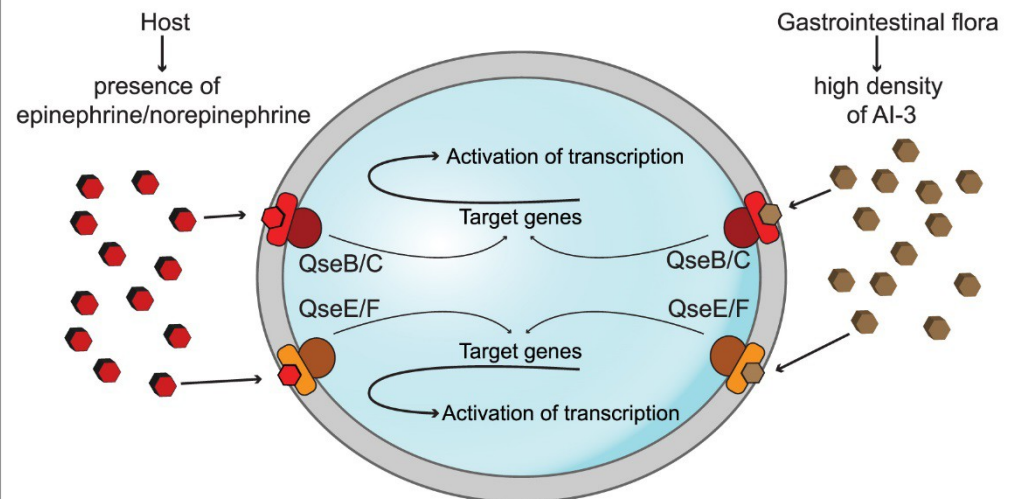
### MECHANISM 3

Quorum sensing in both Gr<sup>+</sup> and Gr<sup>-</sup> bacteria: autoinducer 2 (AI-2)

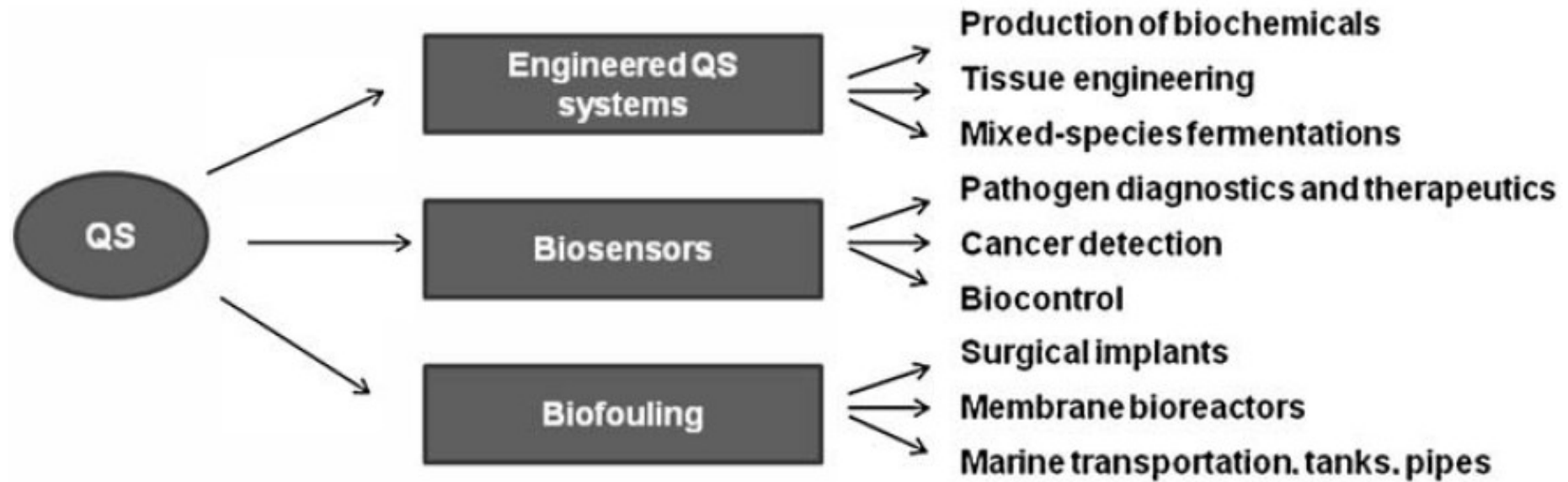


### MECHANISM 4

Quorum sensing beyond bacterial borders: autoinducer 3 (AI-3)

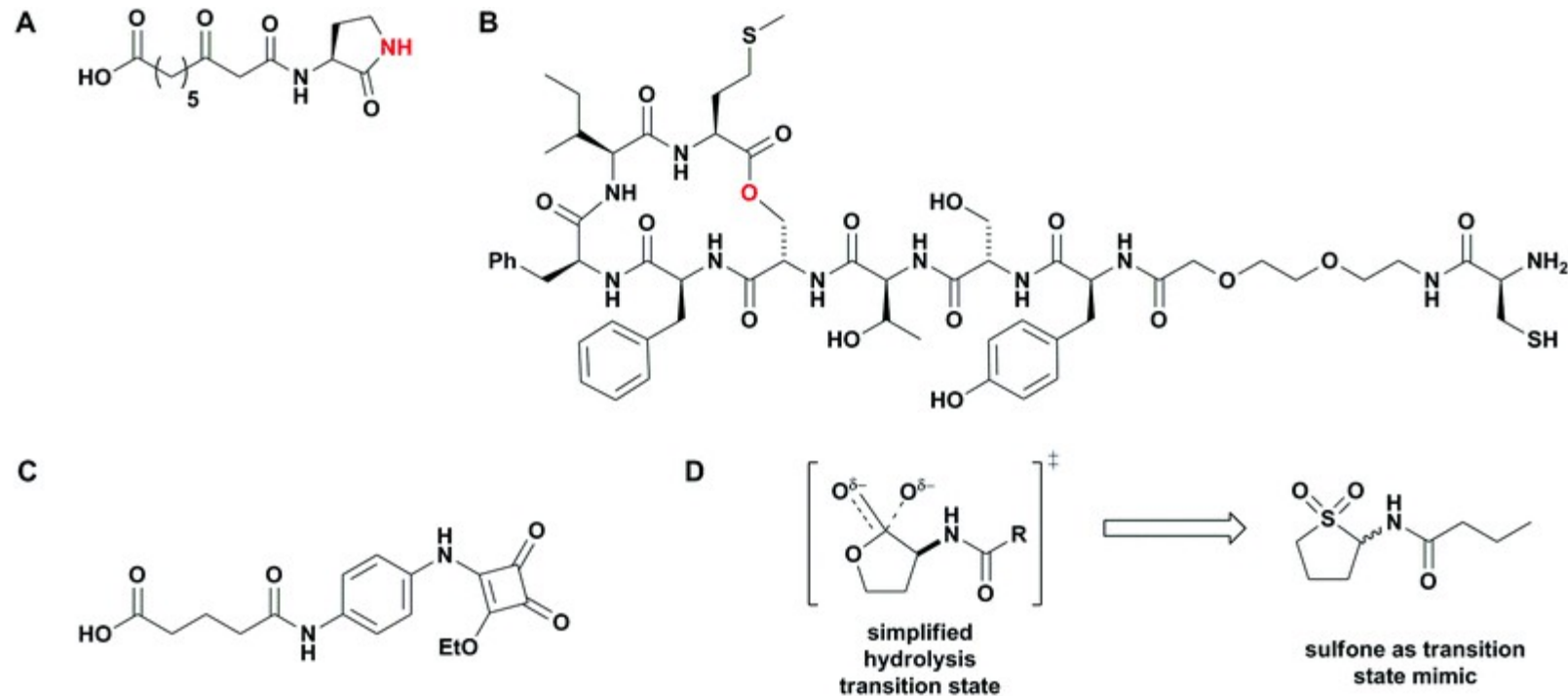


# Biotehnoška uporabnost QS



# Motilci QS

Ker je QS med drugim pomemben pojav pri patogenezi različnih bolezni, zato so razvili motilce tega procesa (proces imenujejo quorum quenching). Možni pristopi so z razgradnjo signalnih molekul ali z njihovo inaktivacijo.



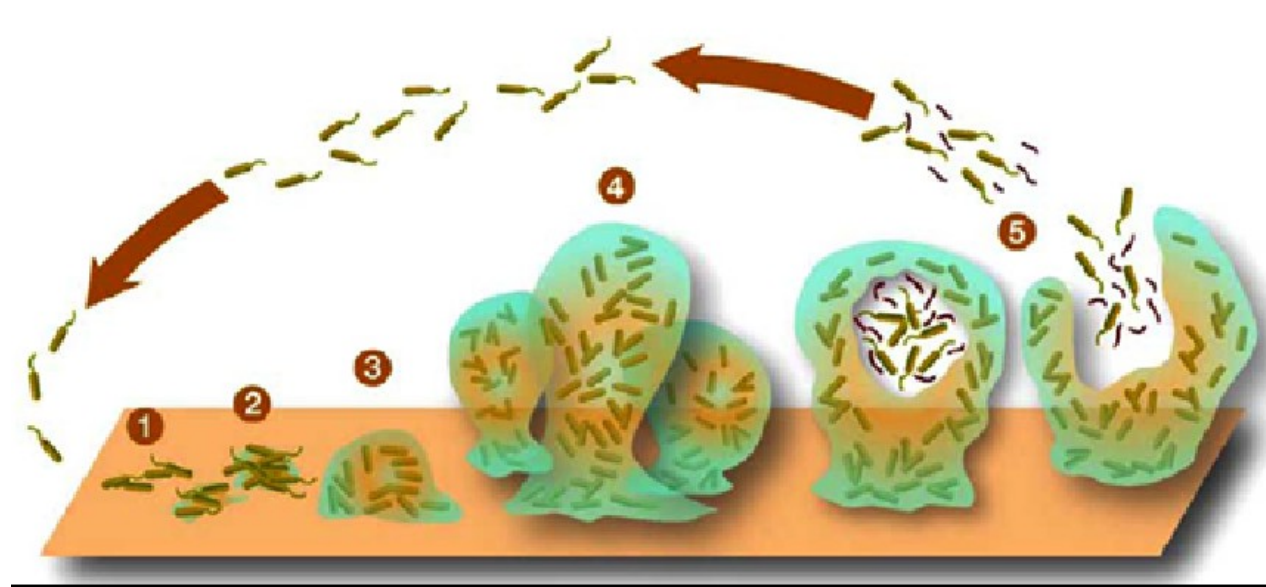
Haptens used to prepare quorum quenching antibodies

Org. Biomol. Chem., 2012, 10, 8189-8199

## Problem mikrobnih biofilmov

Predvsem pri patogenih bakterijah biofilmi predstavljajo resen problem, ker so v njih celice obdane s polisaharidnim ovojem, ki preprečuje dostop protimikrobnim učinkovinam. Raziskovanje medcelične komunikacije znotraj biofilma ne more temeljiti na analizah celic v stresani kulturi, saj je difuzija signalnih molekul v biofilmih do 50x počasnejša kot takrat, ko celice rastejo prosto.

Preučevanje signaliziranja v biofilmu je lažje, če sistem za zaznavanje signalnih molekul povežemo z reporterji in tako spremljamo hitrost širjenja signalov in njihov doseg.



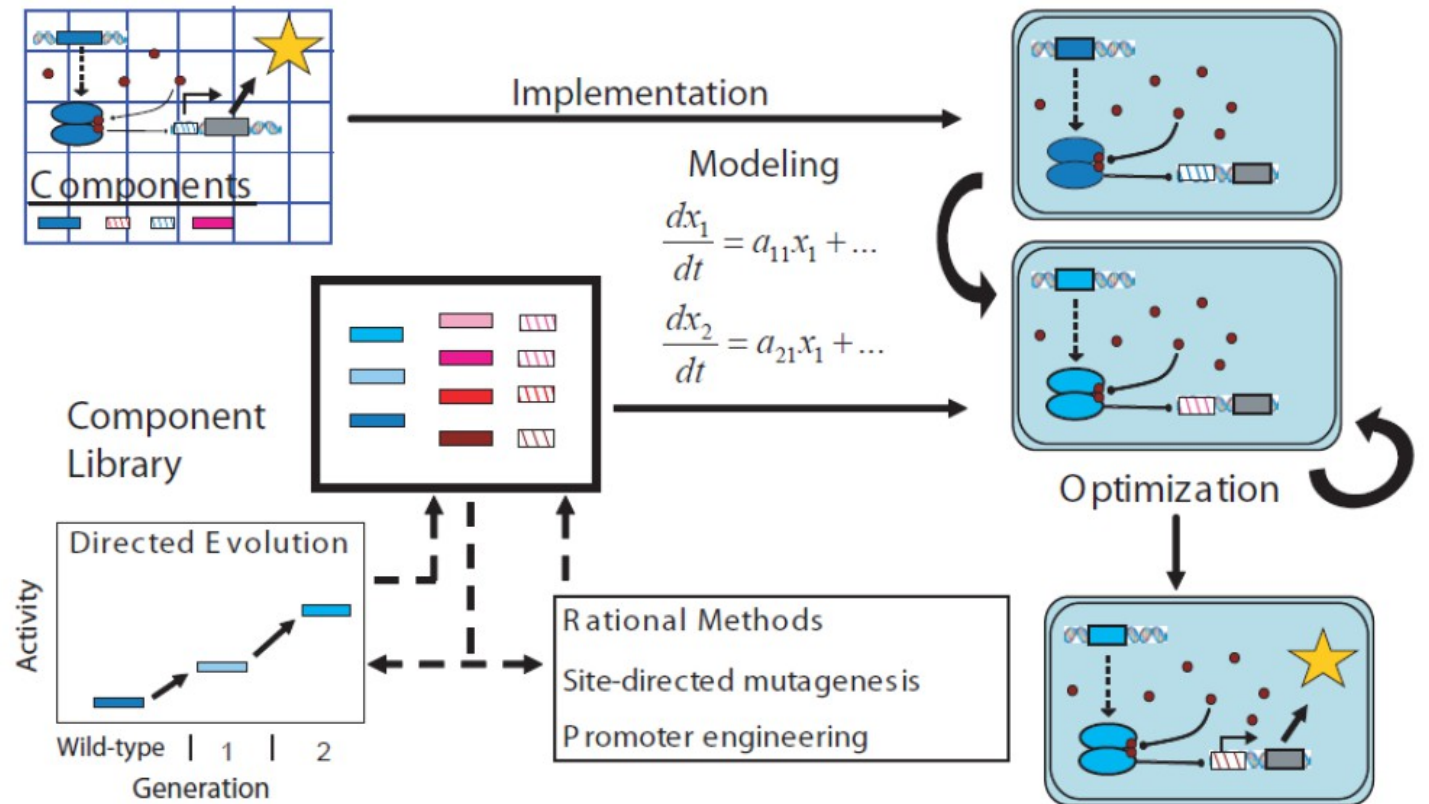
# Inženirski pristopi k uporabi sistemov za zaznavanje gostote celic

S spreminjanjem ravni izražanja lahko dosežemo velike razlike v obnašanju sistemov. Najpogostejša načina regulacije sta preko spreminjanja promotorskih zaporedij in preko spreminjanja RBS. Slednje je pogostejše, ko gre za spreminjanje vezij, kjer bi lahko sprememba tipa promotorja porušila arhitekturo vezja. Spreminjanje promotorskih regij je smiselno pri tistih promotorjih, za katere imamo dovolj predhodnih eksperimentalnih podatkov o vplivu točno določenih mutacij. Spremenimo lahko tudi življenjsko dobo posameznih proteinov, če jim dodajamo oznake za razgradnjo.

## Engineering of Artificial Cellular Circuits Based on the LuxI-LuxR Quorum-Sensing System

Daniel Jon Sayut  
University of Massachusetts - Amherst, djsayut@gmail.com

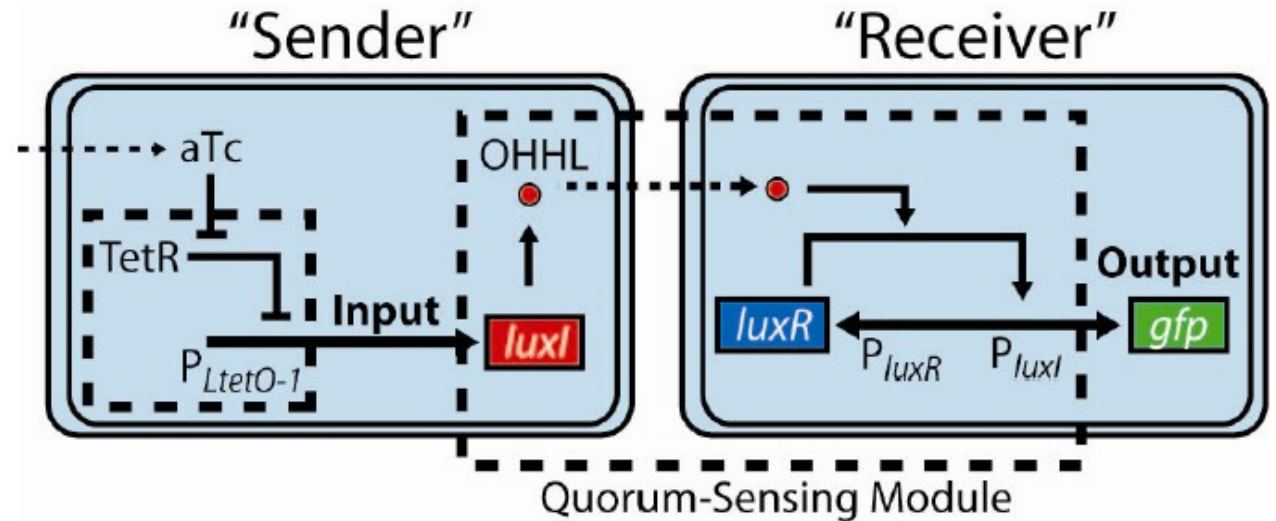
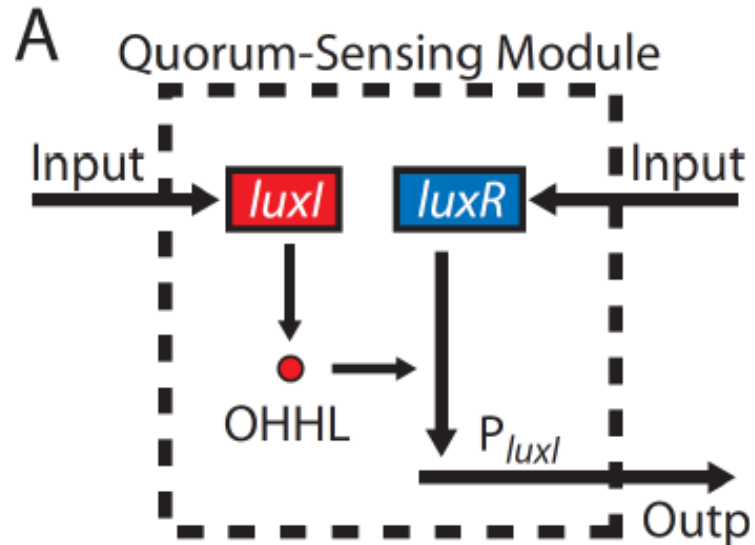
PhD, 2010



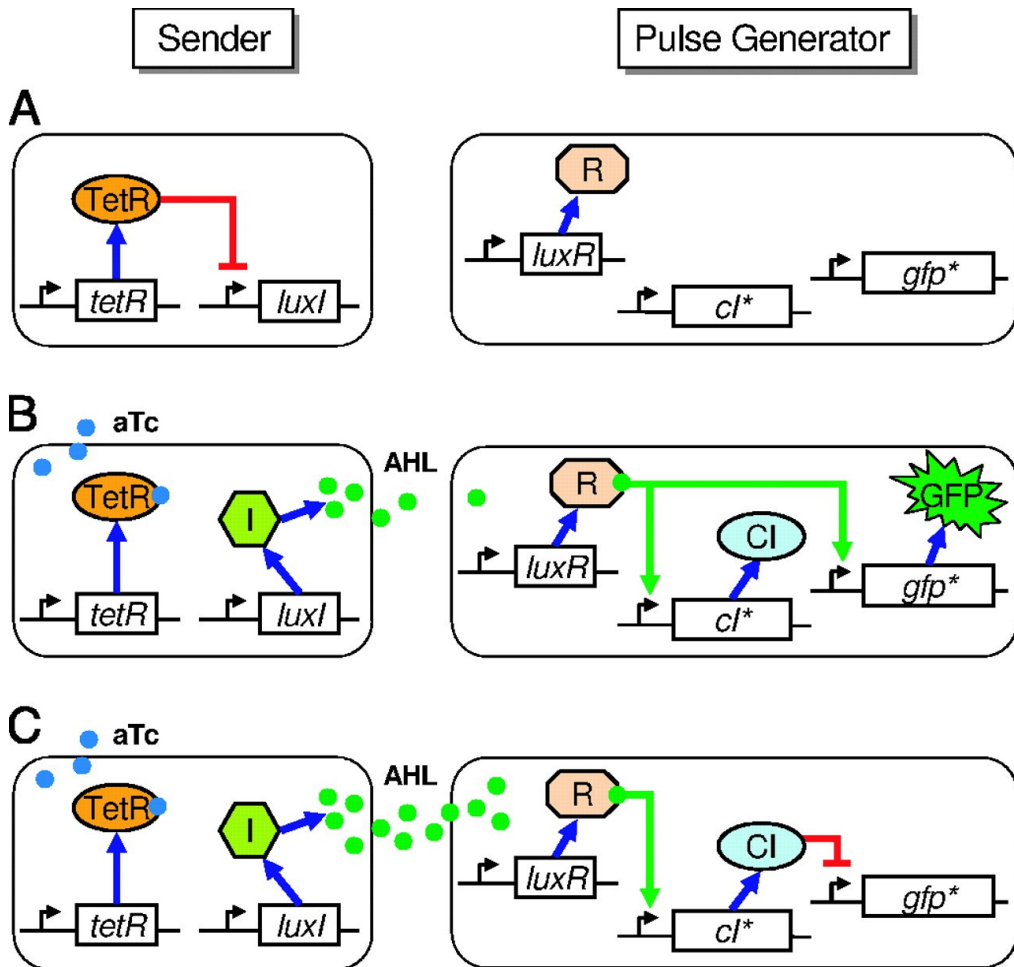
## Za kaj lahko uporabimo sisteme za zaznavanje gostote celic?

Z uporabo naravnih in prilagojenih sistemov lahko dosežemo usklajeno izražanje točno določenih genov v populaciji tarčnih celic, ko te dosežejo ustrezno gostoto – smiselno npr. pri izražanju toksinov, za izvedbo logičnih vrat, za klinične aplikacije.

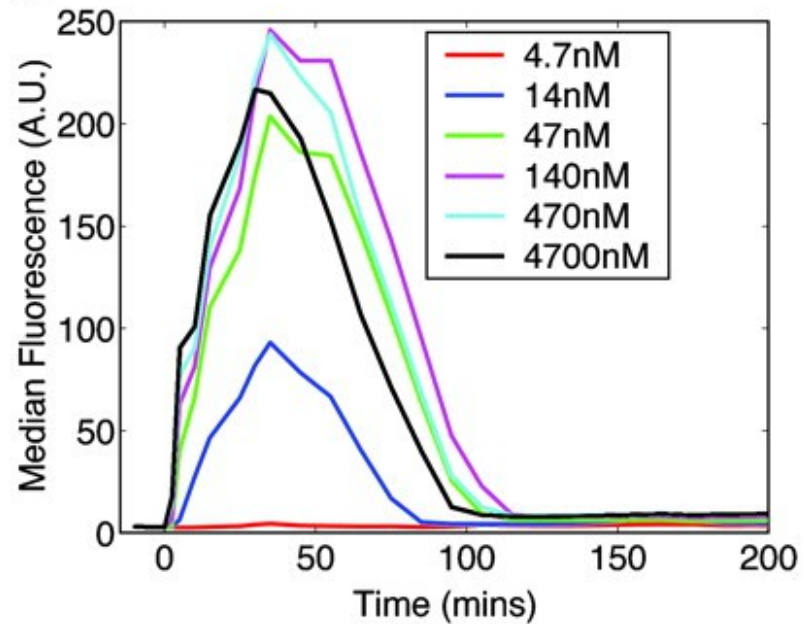
Prednost uporabe teh sistemov je tudi v tem, da lahko zakasnjeno izražanje sprožimo v oddaljenih celicah (oddajniki → sprejemniki).







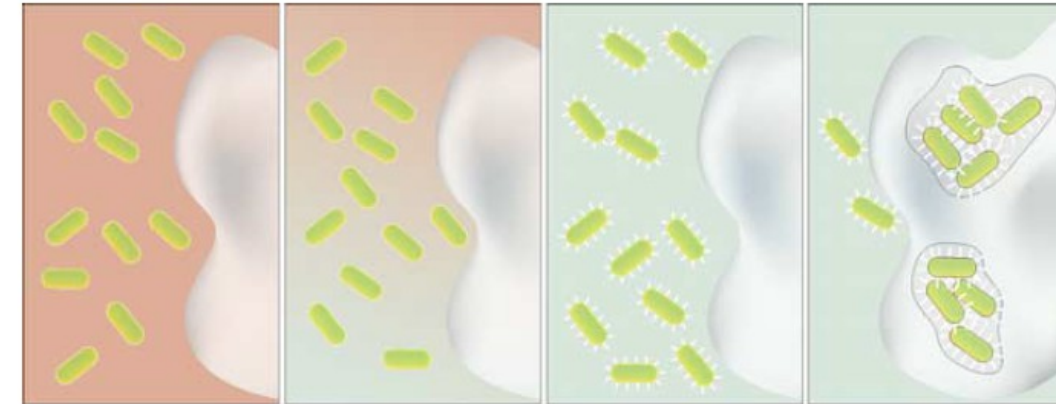
A: začetno stanje – ni komunikacije  
 B: po dodatku aTc se sintetizira AHL, prejemna celica pa izraža GFP\* in Cl\*  
 C: postopno koncentracija Cl\* toliko naraste, da pride do represije izražanja gfp; signal ugasne, ker je GFP\* kratkoživ



## Sistem za zaznavanje in uničevanje tumorskih celic

Zasnovali so sinteznobiološki sistem, ki zazna hipoksične pogoje v okolici tumorjev, nato pa sproži izražanje invazina (iz bakterije *Yersinia pseudotuberculosis*) in bakterije *E. coli* napadejo tumorsko tkivo.

Uporabili so promotor *fdhF* (format dehidrogenaza), ki se aktivira v hipoksičnih pogojih, vzporedno pa še *araBAD*, da so lahko sistem preizkušali v normalnih pogojih. Celice napadejo tumorje, ko bakterije dosežejo koncentracijo 10<sup>8</sup>/ml. Optimizirati so morali RBS za invazin, da so optimalno delovali v kombinaciji z induktorskim sistemom (hipoksija/*fdhF* oz. *araBAD*) – knjižnica z 1M kombinacijami.

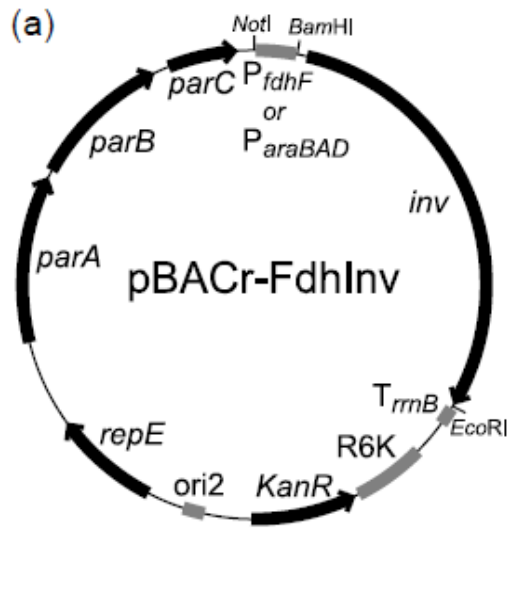


Aerobic Conditions  
Low Cell Density  
Invasion OFF

Hypoxia  
High Cell Density  
Invasion ON

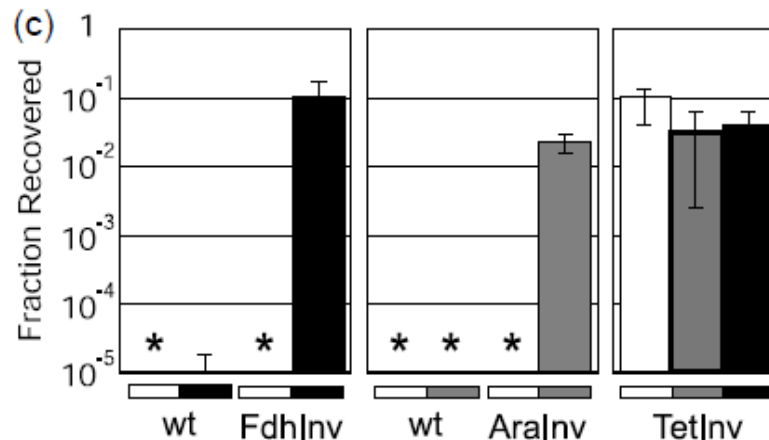
*inv* Induction

Invasion



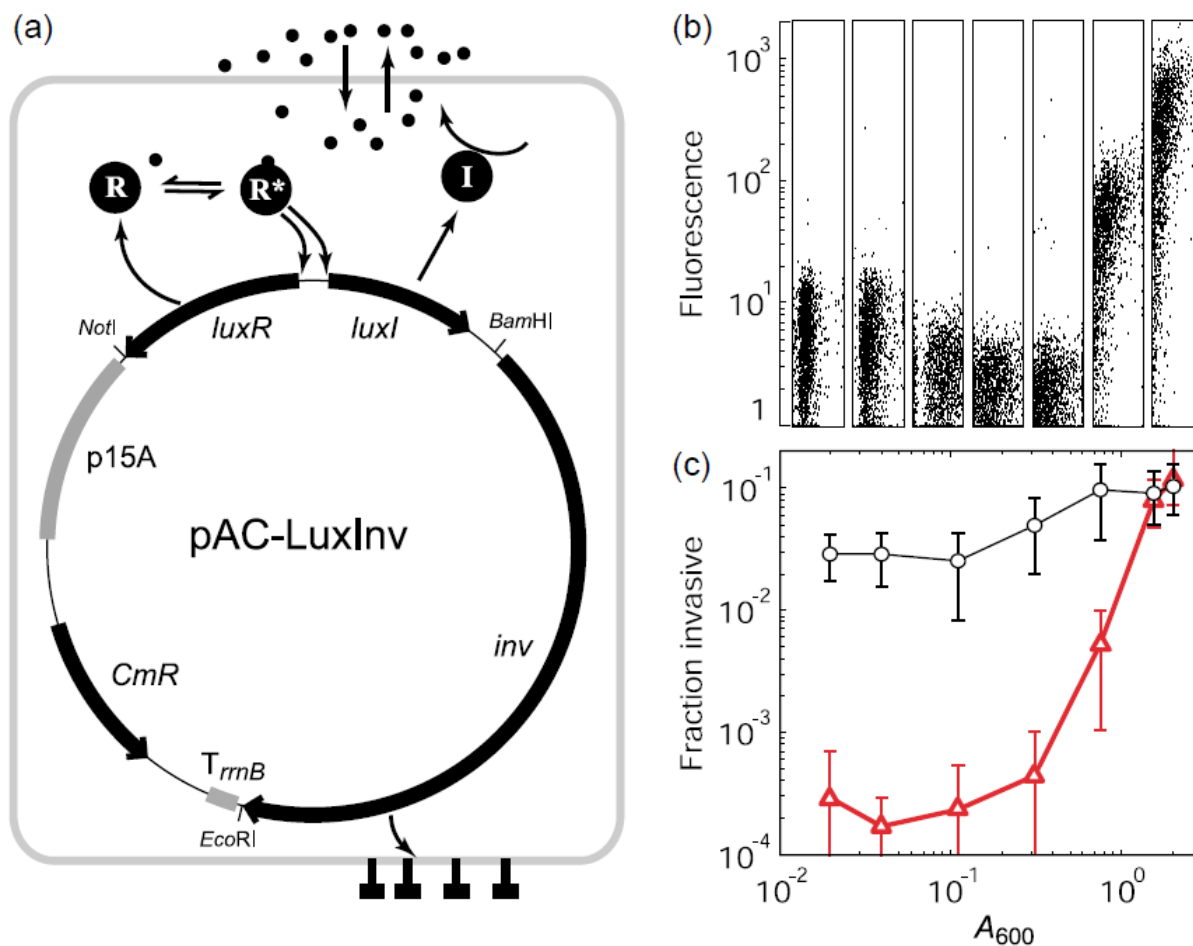
(b) Comparison of RBS sequences for wild-type, library, and specific constructs:

wild-type	TTTCATTTAAATTatgatgggtt
RBS Library	NNNGGAGNNNNNNrtgntgggtt
FdhInv	AAAGGAGTAAAAAatgatgggtt
AraInv	...CCCGGAGCCCCCcatgctgggtt



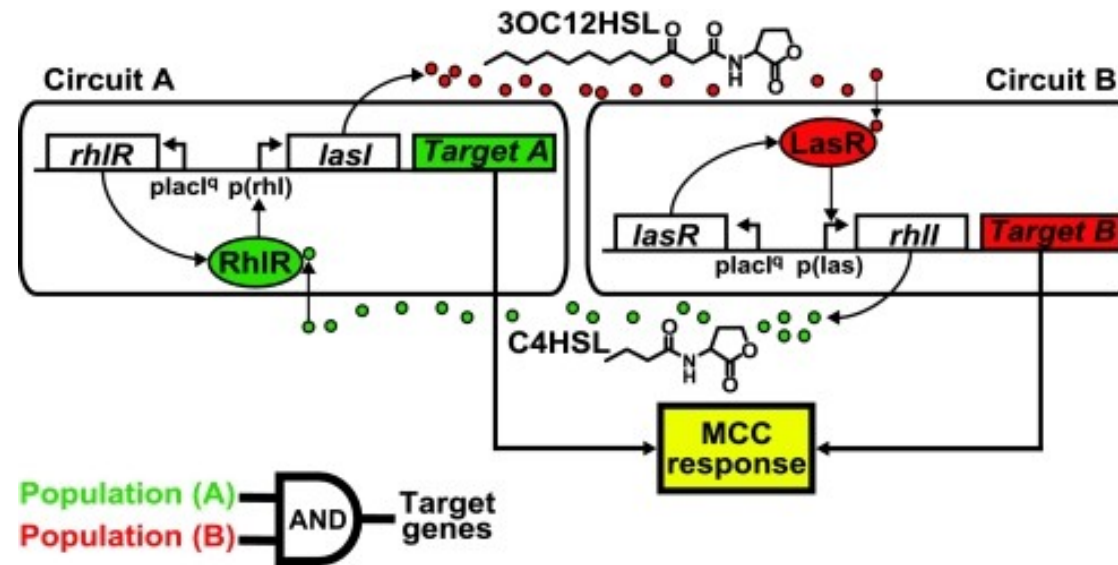
## Uničevanje tumorskih celic v povezavi z zaznavanjem gostote celic

Številne bakterije, če jih vbrizgajo v poskusno žival, se zberejo v trdnih tumorjih (1000x več kot v zdravih tkivih), tako da je njihova konc. 1000 M/g. To so izkoristili na način, da bi se invazin začel izražati šele v okolju z visoko koncentracijo celic, torej predvidoma v tumorski masi. Vzporedno so testirali konstrukt, kjer je bil namesto gena za izvazin zapis za GFP.



## Logična vrata IN za zaznavanje obvezne hkratne prisotnosti dveh bakterijskih populacij

Dve populaciji medsebojno komunicirata preko sistema za QS iz *Pseudomonas aeruginosa*. Prvo vezje proizvaja signalno molekulo (encim LasI). Signalna molekula nato difundira do celic iz druge populacije, kjer pride do aktivacije promotorja Plas (preko LasR). Encim RhII katalizira sintezo druge signalne molekule, ki difundira do prvih celic. Tam se veže na regulator RhIR in aktivira promotor Prhl. Detektiramo hkratno izražanje fluorescenčnih reporterjev A in B. Sistem deluje tudi znotraj biofilma. MCC = konsenzni mikrobn konzorcij



# Generic Metric to Quantify Quorum Sensing Activation Dynamics

ACS Synth. Biol., Article ASAP  
 DOI: 10.1021/sb400069w  
 Publication Date (Web): September 6, 2013

