

In vivo regulon kinetik

Relationerne mellem signalmolekyler og genudtryk i levende celler.

Af Christian Bille Jendresen, Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability, DTU, Jan Martinussen, Systembiologi, DTU og Mogens Kilstrup, Systembiologi, DTU

I forbindelse med udnyttelsen af celler som produktionsorganismer er det helt afgørende at kunne lave valide modeller over cellernes ydeevne under specifikke forhold. Det kræver integration af en række forskellige faglige discipliner f.eks. biokemi, molekylærbiologi og cellefysiologi. Det er meget vigtigt at kunne forudsige, hvordan cellens gener bliver udtrykt under specifikke forhold, da dette translateres til cellens metaboliske tilstand. Her beskriver vi kvantitativt, hvordan mælkesyrebakterien *Lactococcus lactis* registrerer tilstedeværelsen af en specifik komponent i omgivelserne og justerer metabolismen herefter.

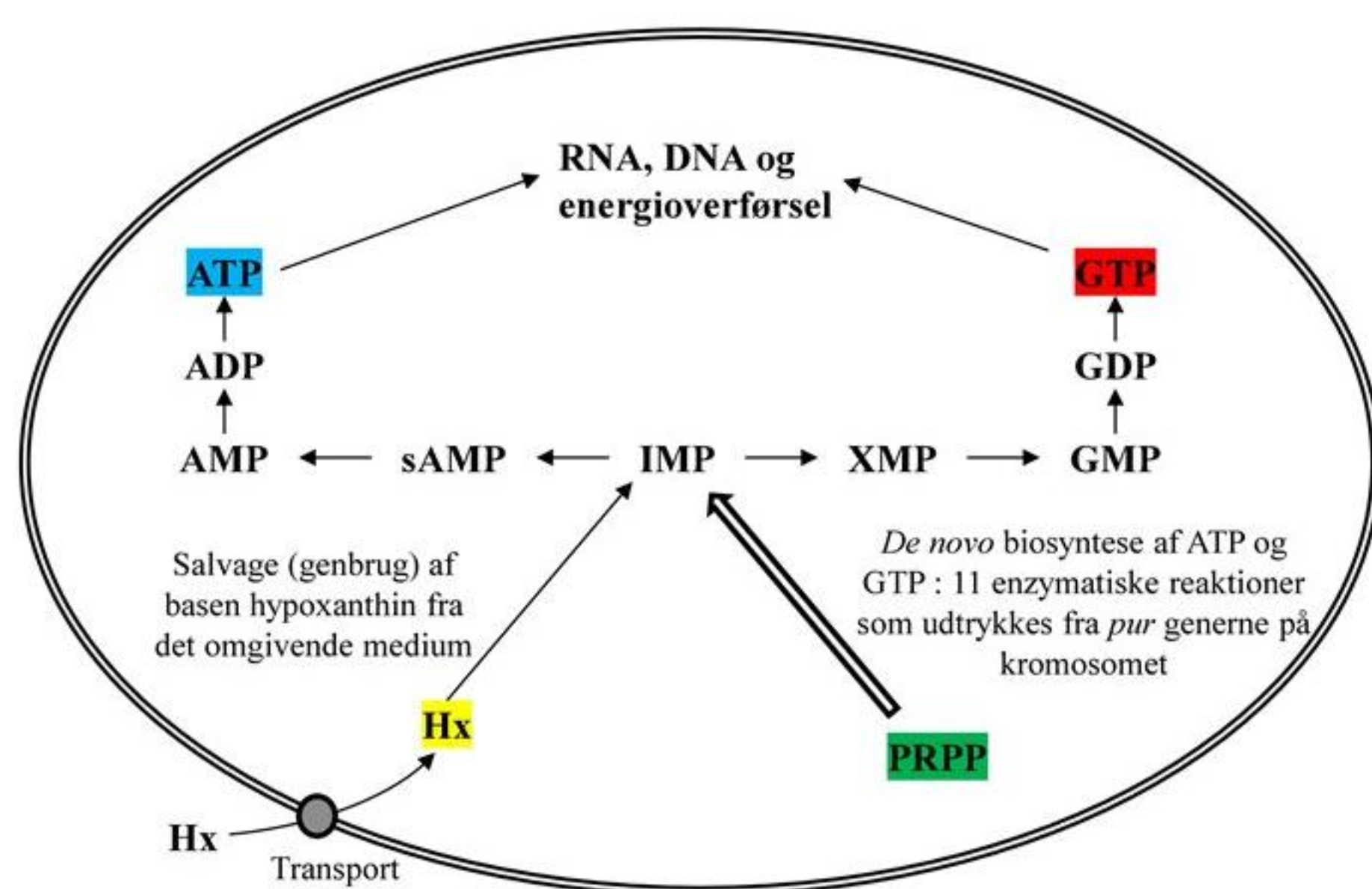
Introduktion

Den levende celledes stofskifte – eller metabolisme – er summen af flere tusinde kemiske reaktioner, der bl.a. omdanner energi og er byggesten til makromolekyler. Samlet kalder vi stofferne cellens *metabolom*. De enzymatiske reaktioner er afhængige af koncentrationerne af de enkelte stoffer.

samtidigt. Sammensætningen af cellens enzymer og andre proteiner er givet ved *proteomet*, der varierer kraftigt efter ændringer i miljøet. I bakterier er der som regel proportionalitet mellem mængderne af aflæste gener – antal mRNA-molekyler pr. gen – og mængderne af protein der bliver dannet. Mængden af mRNA-molekyler kalder vi for *transskriptomet*, og ved moderne teknikker kan det kvantificeres i en celle.

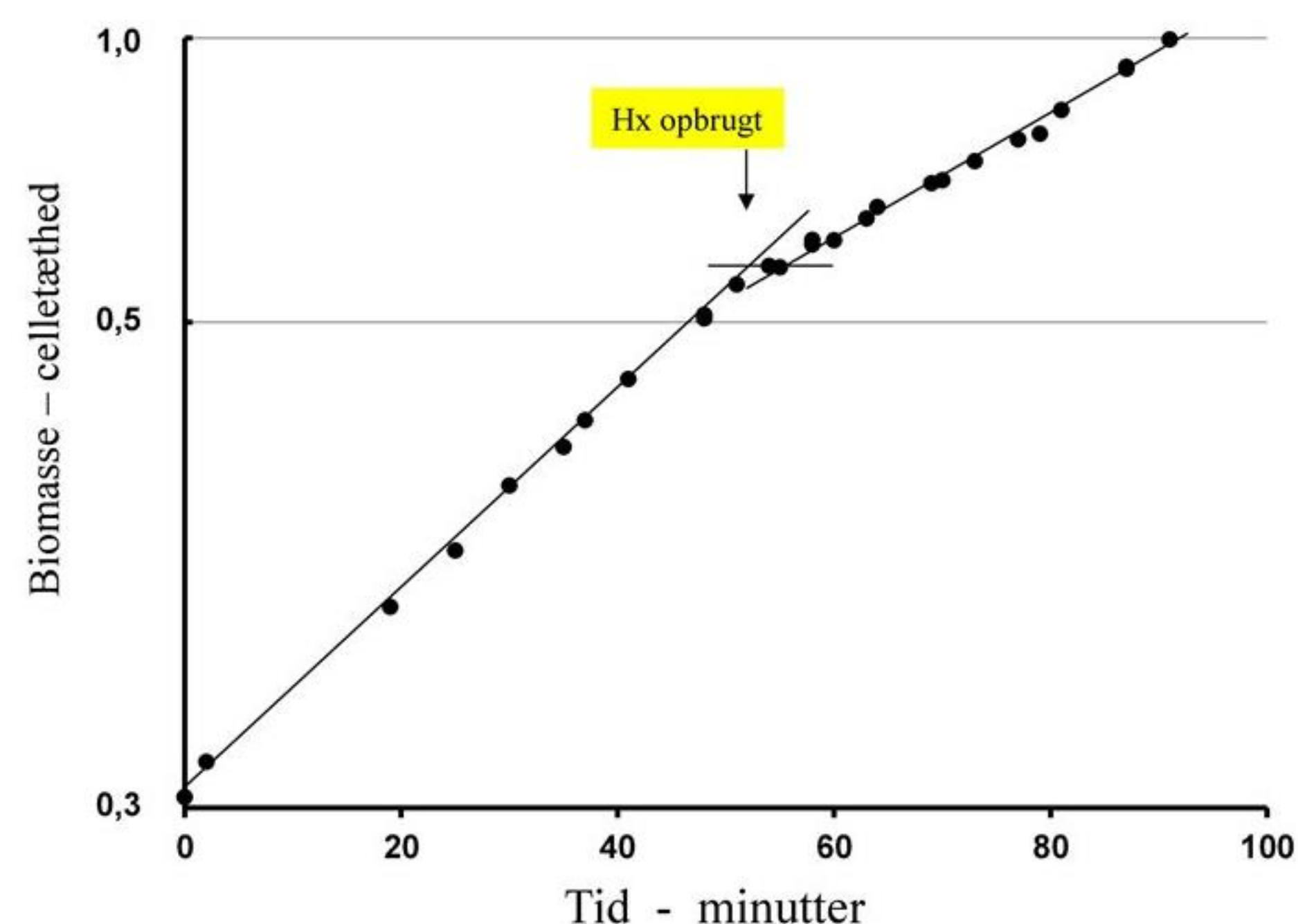
Hvis cellen hurtigt skal kunne tilpasse sig til et ændret miljø, er den afhængig af at kunne prioritere sit genetiske potentiale. Det kræver regulatoriske systemer, der kan aflæse cellens metabolitkoncentrationer og reagere ved at optimere metabolismen. Det sker ved at øge aflæsningen af nogle gener og reducere aflæsningen af andre: kort sagt et nyt transskriptom. Traditionelt har undersøgelserne af sådanne regulatoriske systemer været kvalitative, hvorfor forudsigelseskraften af matematiske modeller ikke er så stor. Vi har forsøgt at udvikle metoder til kvalitative målinger af systemerne *in vivo*, altså i den levende celle.

Vi har i en årrække studeret en modelorganisme, den industrielt relevante mælkesyrebakterie *Lactococcus lactis* med fokus på nukleotidmetabolismen, der leverer byggestenene til DNA og RNA [1]. Specielt har vi set på, hvordan to af purinnukleotiderne ATP og GTP (der også er vigtige energibærere)



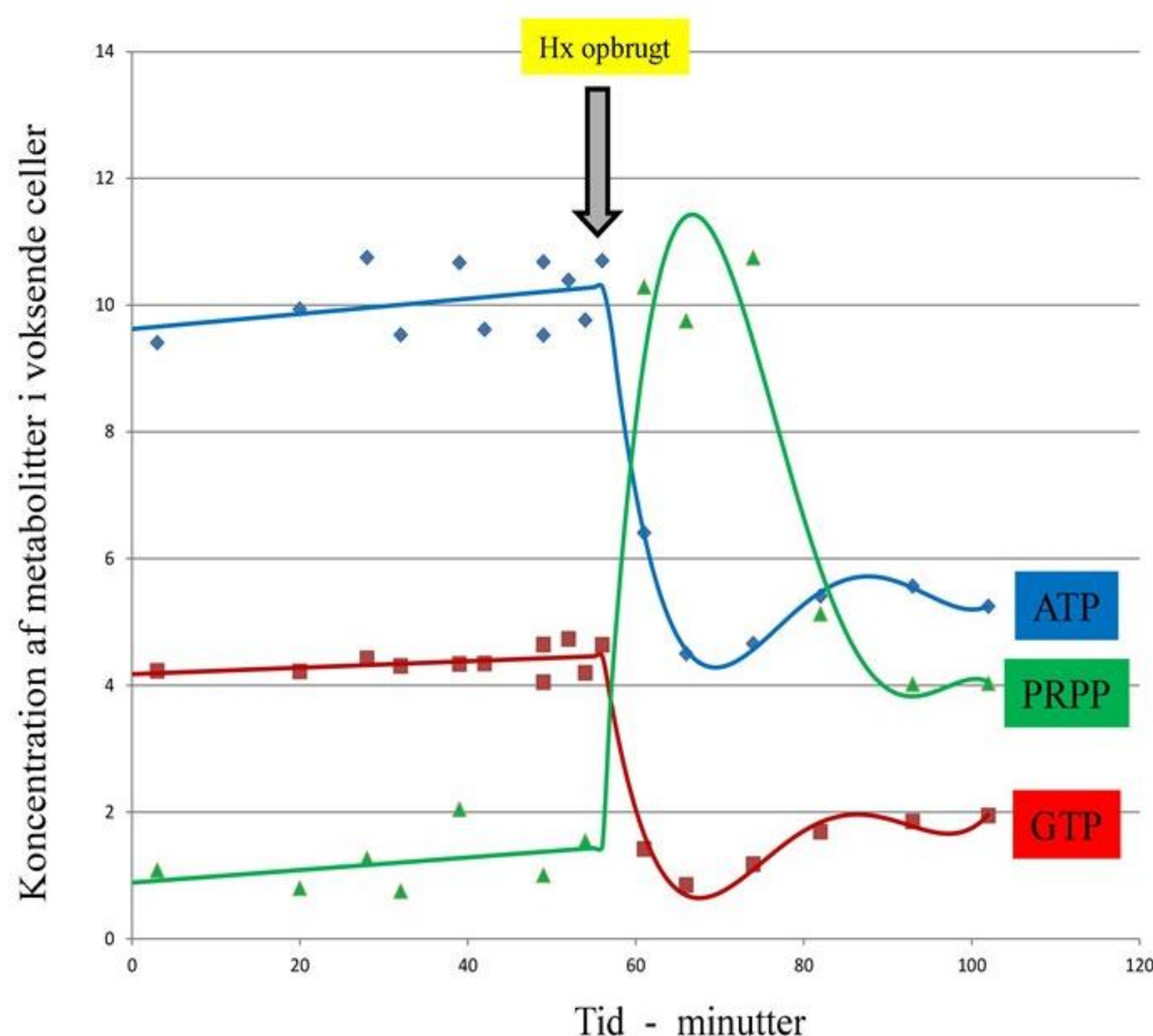
Figur 1. Purinnukleotider er basale dele af alt liv, bl.a. til dannelse af DNA, RNA og som energibærere. Hvis byggestenene, her eksemplificeret ved basen hypoxanthin (Hx), er tilgængelige fra miljøet, kan de genbruges og inkorporeres. Alternativt kan nukleotiderne bygges gennem en række reaktioner, der starter med det phosphorylerede sukkermolekyle PRPP.

Der er lavet matematiske modeller, der inkluderer de fleste kemiske reaktioner i forskellige celler, så vi kan forudsige, hvad det kemiske potentiale for en given celle er. De fleste reaktioner kan kædes sammen med specifikke enzymer, som enten er kendte fra forsøg - eller som oftest er forudsagt på baggrund af cellens DNA-sekvenser gennem lighed med andre kendte sekvenser. For at en celle kan leve under forskellige forhold og vækstfaser er det dog klart, at ikke alle reaktioner er aktive



Figur 2. Sammenhængen mellem biomassen målt spektrofotometrisk som funktion af tiden af en voksende kultur af mælkesyrebakterien *Lactococcus lactis* i et logaritmisk plot. Tidspunktet, hvor Hypoxanthin (Hx) er opbrugt, er vist.

bliver dannet med udgangspunkt i stoffet 5-phosphoribosyl- α -1-pyrophosphat (PRPP). Vi har tidligere vist, at generne er nødvendige for purinbiosyntesen, der er reguleret af et DNA-bindende protein, som vi kalder PurR for Purin Regulator. Dette protein aktiverer udtrykket af generne. Alle gener, der er underlagt den samme regulator, kaldes for en *regulon*. Vi vil her beskrive, hvordan der er en dynamisk sammenhæng mellem PRPP og cellens mRNA-molekyler.



Figur 3. Koncentrationen af ATP, GTP og PRPP (nmol pr. mg tørvægt) som funktion af tiden. Prøverne blev udtaget fra en eksponentielt voksende kultur, hvis vækstkurve er vist i figur 1. Tidspunktet, hvor Hypoxanthin (Hx) er opbrugt, er vist.

Hvad sker der med metabolomet, når miljøet ændres, og cellen skal respondere på en øjeblikkelig opstået sult?

Som de fleste andre organismer kan mælkesyrebakterien enten syntetisere purinbyggestenen fra bunden (*de novo*) eller udnytte allerede syntetiserede molekyler i miljøet (*salvage*). Der er energimæssig besparelse i at optage færdige metabolitter snarere end at syntetisere dem. I denne sammenhæng er det også værd at bemærke, at over 15% af bakteriens tørstof er frie nukleotider, RNA og DNA (dog også afhængig af vækstbetingelserne). Figur 1 viser, hvorledes ATP og GTP kan syntetiseres eller optages, f.eks. i form af byggestenen hypoxanthin (Hx). Når der er Hx til stede vokser cellerne hurtigere og generne for biosyntesen er inaktive [1]. For at følge et dynamisk skift, lod vi cellerne gro med en så begrænset mængde Hx, at de opbrugte den midt i en ellers eksponentiel vækst. Som man kan se på figur 2, går væksten kortvarigt i stå, hvorefter den starter igen med en lavere væksthastighed. Vi udtog prøver til måling af bl.a. ATP, GTP og PRPP [2] (figur 3) samt mRNA gennem forløbet. Koncentrationen af metabolitterne var konstant, indtil al Hx'en var opbrugt, hvorefter der skete et kraftigt fald i mængden af ATP og GTP, mens niveauet af PRPP steg over ti gange. I løbet af en halv time, faldt PRPP tilbage til et nyt *steady state*, ca. tre gange over udgangspunktet, mens ATP og GTP faldt til ca. det halve.

SIKRE PRODUKTER FOR PHARMA OG MEDICO

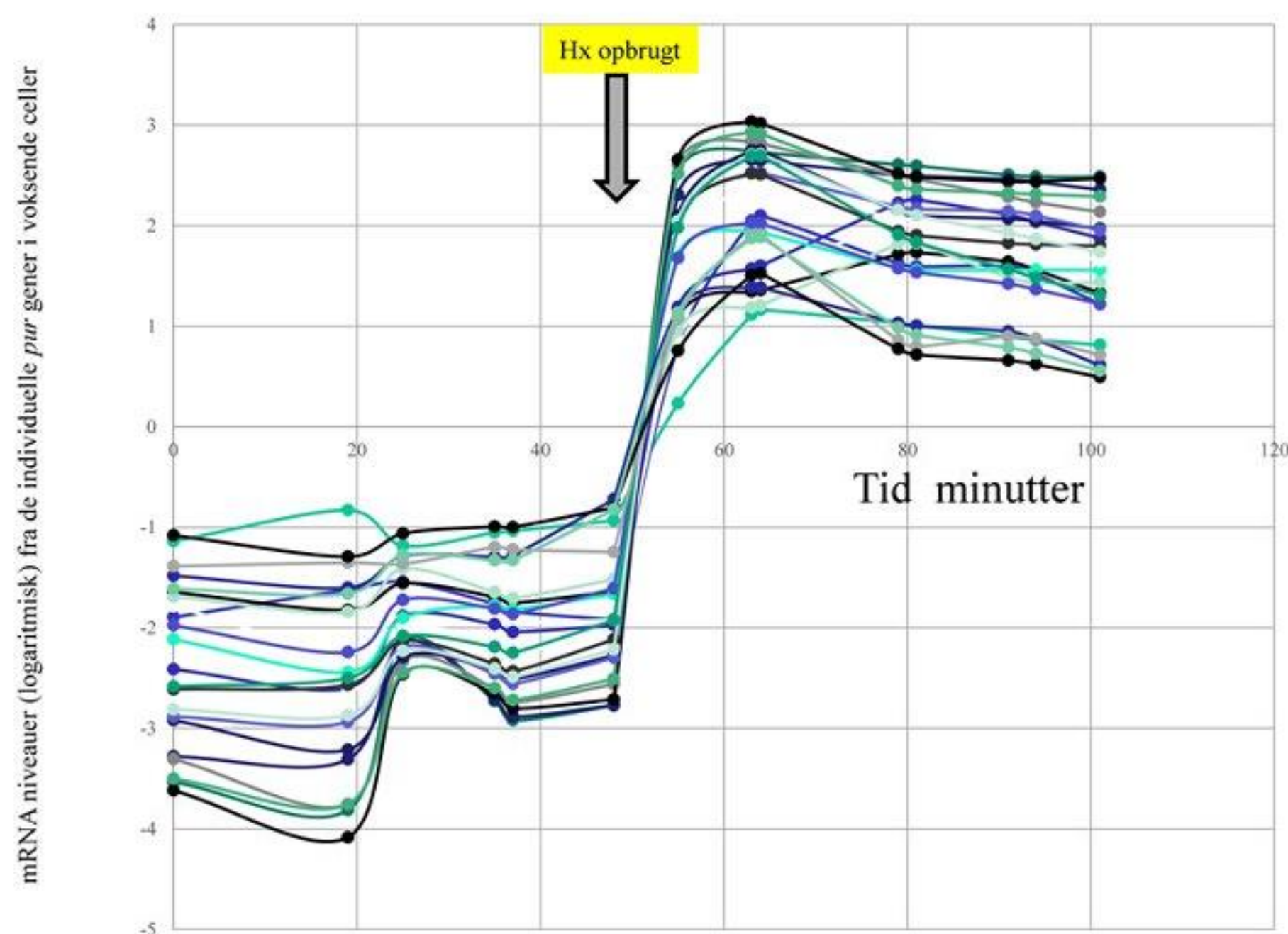
- Risikovurdering af restkoncentrationer og urenheder
- Non-clinical dokumentation
- Dokumentation af biosafety jf. ISO 10993
- Økotoksikologiske test i henhold til GLP og ISO 17025
- Miljørisikovurdering af lægemidler

www.tox.dhi.dk

DHI
Agern Allé 5, DK-2970 Hørsholm
Tel: 4516 9200 – Fax: 4516 9292
dhi@dhigroup.com

The expert in **WATER ENVIRONMENTS**

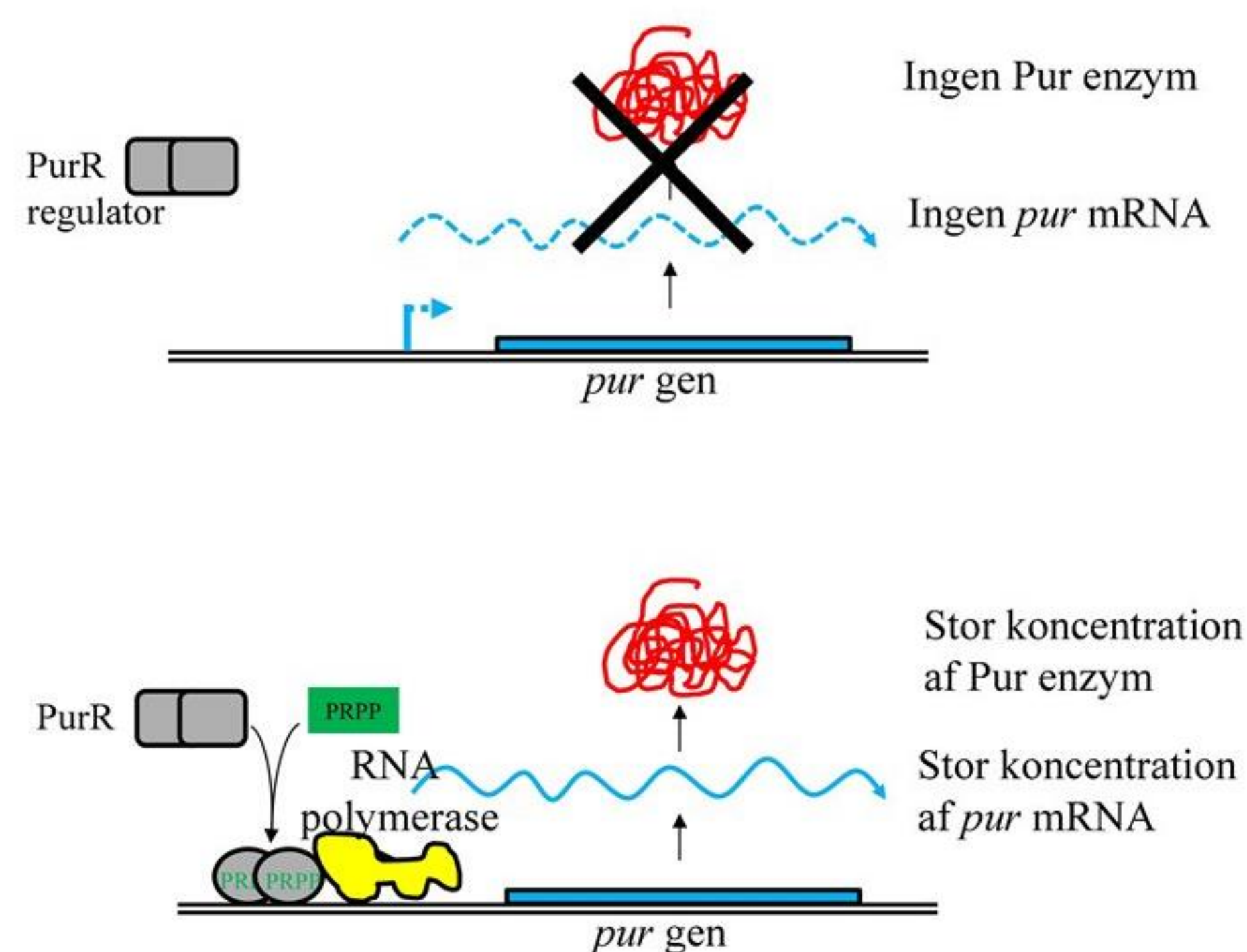




Figur 4. Mængden af mRNA ($\log_2$ transformeret – arbitrær skala) fra 22 gener reguleret af PurR som funktion af tiden. Prøverne blev udtaget fra en eksponentielt voksende kultur, hvis vækstkurve er vist i figur 1. Tidspunktet, hvor Hypoxanthin (Hx) er opbrugt, er vist.

Hvordan udnytter cellen sit kemiske potentiale, når den skal tilpasse sig en ny situation?

Ved undersøgelse af transskriptomet undervejs i skiftet kunne vi se, at 105 af cellens næsten 2.500 gener responderede signifikant henover forløbet. Det er interessant, at der var forskellige mønstre for forskellige grupper af gener: nogle viste et fald, andre en stigning, mens nogle viste et transient respons. Det meste dramatiske respons var for 22 gener, som steg umiddelbart efter skiftet. Denne gruppe inkluderede alle generne i purinbiosyntesen (figur 4), som vi har vist er reguleret af PurR. Vi kunne nu se en klar sammenhæng mellem mængden af genudtryk og mængden af PRPP inde i cellen.

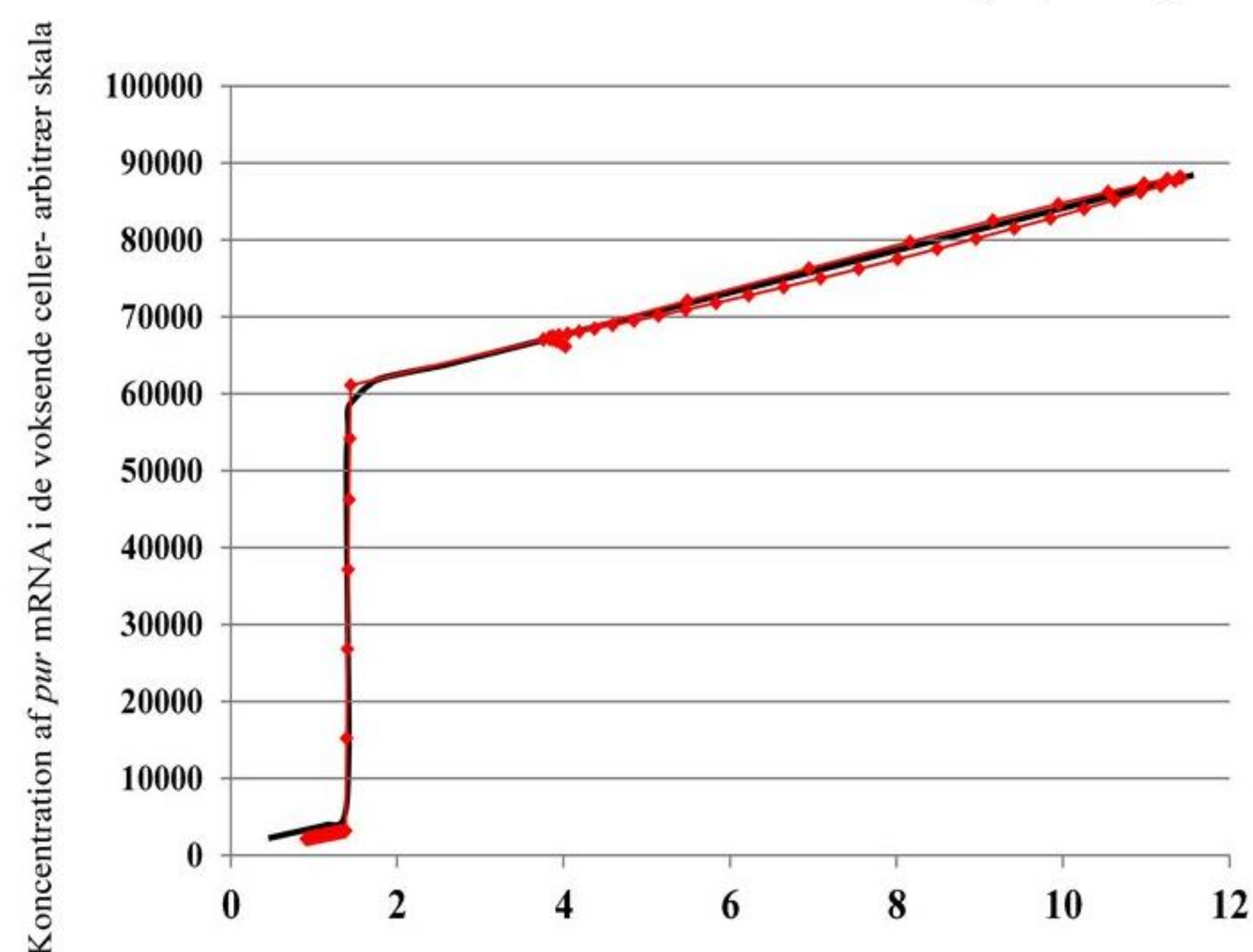


Figur 5. Model for hvordan generne i purinbiosyntesen er reguleret af PurR. Når to PRPP-molekyler er bundet til de to PurR-subunits, aktiveres RNA-polymerasen, der katalyserer produktionen af mRNA.

In vivo PRPP kinetik af PurR-regulerede gener

Ud fra en hypotese om at PRPP er den inducer, der skal til for at få PurR til at aktivere generne (figur 5), undersøgte vi sammenhængen mellem genudtrykket og metabolitniveauet

som vist i figur 6. Det ses, at genudtrykket er en entydig og homogen funktion af metabolitniveauet. Dette kunne genfindes for hvert af de resterende gener. Kurveforløbet er en klassisk biokemisk S-formet mætningskurve, der fremkommer, når en metabolit binder kooperativt til et protein, ganske som man kender det fra hæmoglobins binding af ilt [3]. Vi har fundet, at PurR-proteinet består af to identiske proteinhalvdele - subunits, der hver især er i stand til at binde et PRPP-molekyle, men gør



Figur 6. Mængden af *purK* mRNA som funktion af PRPP-koncentrationen i nmol pr. mg tørvægt.

det kooperativt – dvs. at når der er bundet et PRPP-molekyle til den ene subunit, kan der meget lettere bindes et molekyle til det andet. Den biologiske effekt af denne mekanisme er, at generne er *meget* lavt udtrykt, når der er purinbyggesten i omgivelserne, fordi PRPP-koncentrationen er lav, mens generne er *meget* højt udtrykt i deres fravær.

Perspektiver

Vi har med dette studium for første gang beskrevet et arbejdende reguleringssystem i voksende celler under en gradvis sult for en metabolit. Herved opnåede vi entydige sammenhænge mellem koncentrationerne af et signalmolekyle og responset fra det tilhørende reguleringssystem, afkodet som mRNA-niveauerne fra flere gener. Arbejdet er publiceret i Microbiology [4]. Den strategi, vi anvendte til at beskrive den matematiske sammenhæng mellem mRNA-niveauer og metabolitniveauer, kan tilpasses til stort set alle organismer og metabolitter til at belyse regulatoriske netværk *in vivo*.

E-mail

Jan Martinussen: jma@bio.dtu.dk

Referencer

1. Kilstrup, M., K. Hammer, J. P. Ruhdal, and J. Martinussen. 2005. Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **29**:555-590.
2. Jendresen, C. B., M. Kilstrup, and J. Martinussen. 2011. A simplified method for rapid quantification of intracellular nucleoside triphosphates by one-dimensional thin-layer chromatography. Anal. Biochem. **409**:249-259.
3. Berg, J. M., J. L. Tymoczko, and L. Stryer. 2011. Biochemistry. W.H. Freeman & Co, New York.
4. Jendresen, C. B., P. Dimitrov, L. Gautier, L. Meng, J. Martinussen, and M. Kilstrup. 2014. Towards in vivo regulon kinetics: PurR activation by PRPP during purine depletion in *Lactococcus lactis*. Microbiology (in press) <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.077933-0>.