

# Baktēriju mikronodalījumi

*Dr. biol. Jānis Liepiņš,*

LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūts

Rīgā 2020. gada 18. jūnijā



LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
**MIKROBIOĻĪJAS  
UN BIOTEHNOĻĪJAS  
INSTITŪTS**



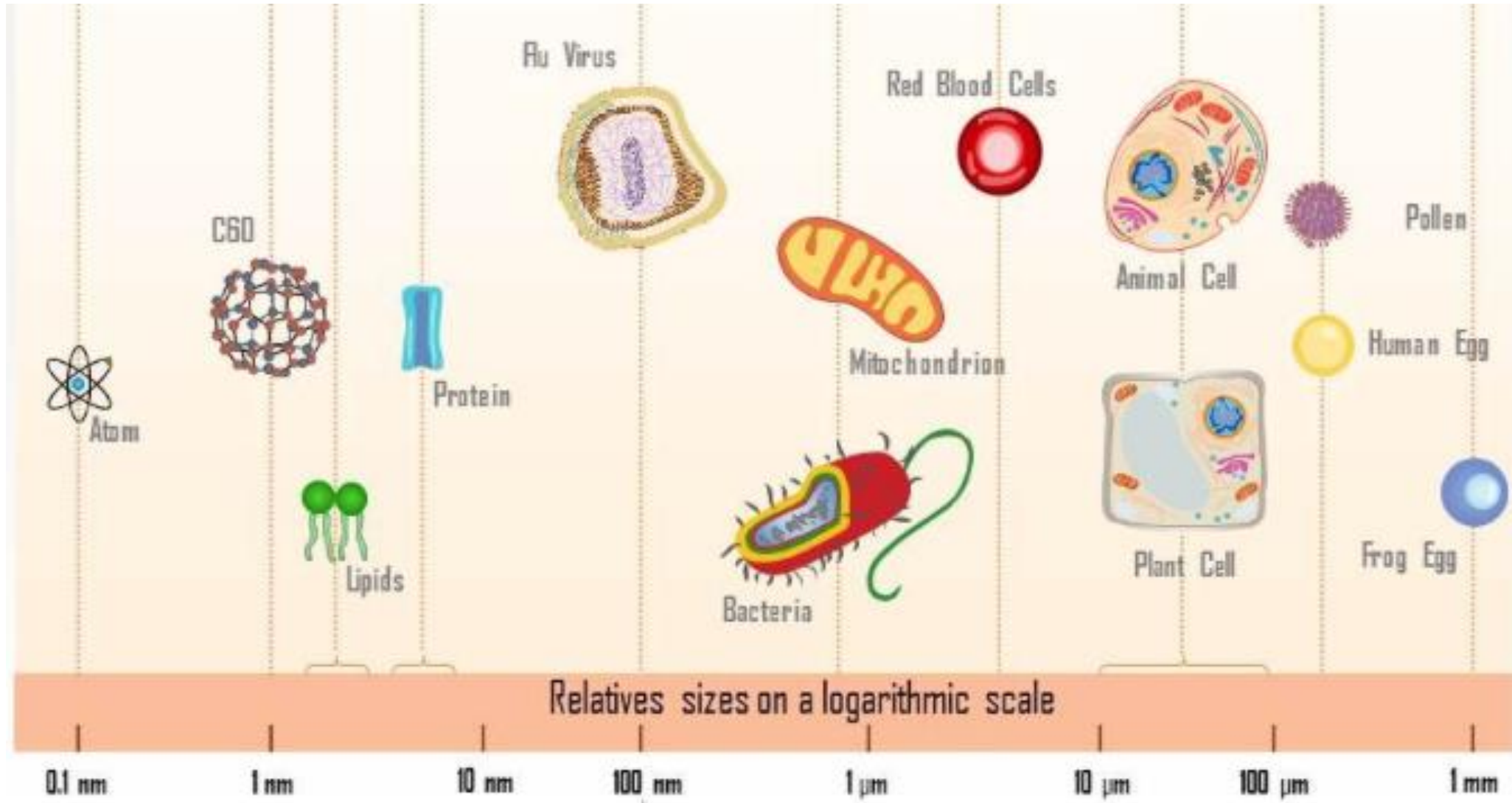
Latvijas Biomedicīnas  
pētījumu un studiju centrs  
biomedicīnas pētījumi un izglītība no gēniem līdz cilvēkam

*Mikro***Tik**

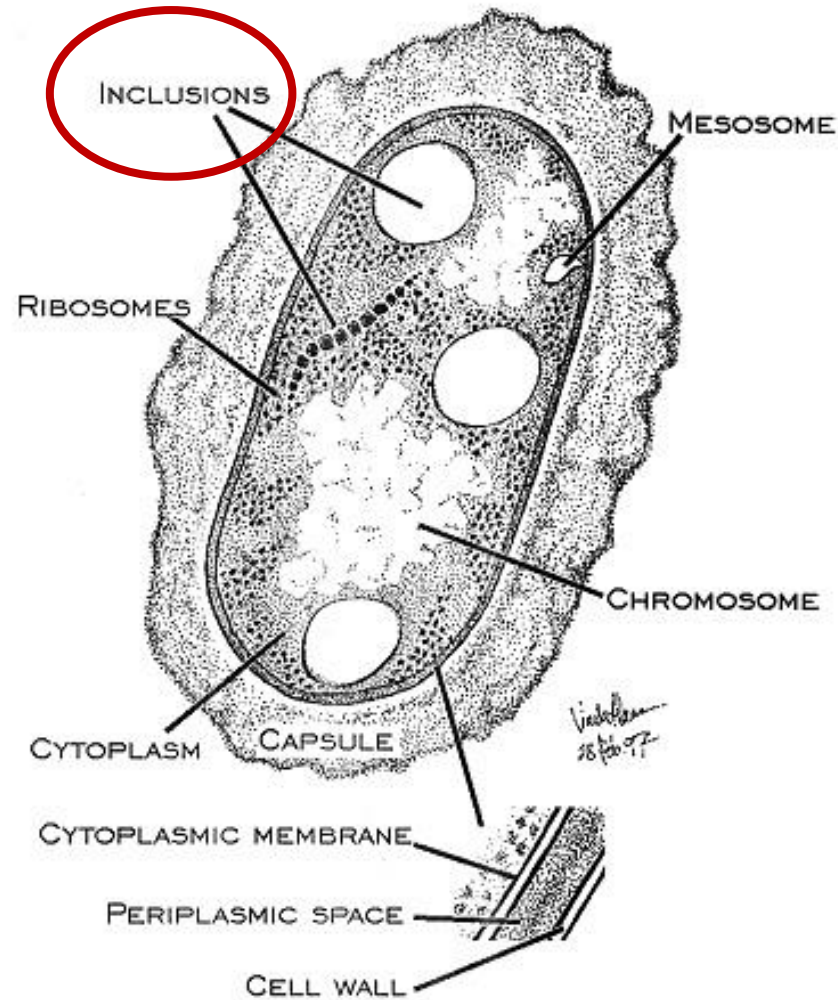


LATVIJAS UNIVERSITĀTES  
FONDS

# Cik liela ir baktērija?

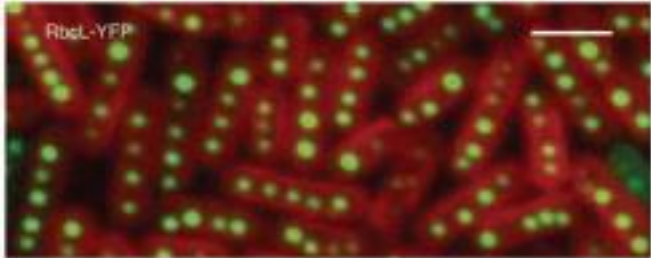


# No kā sastāv baktērija?



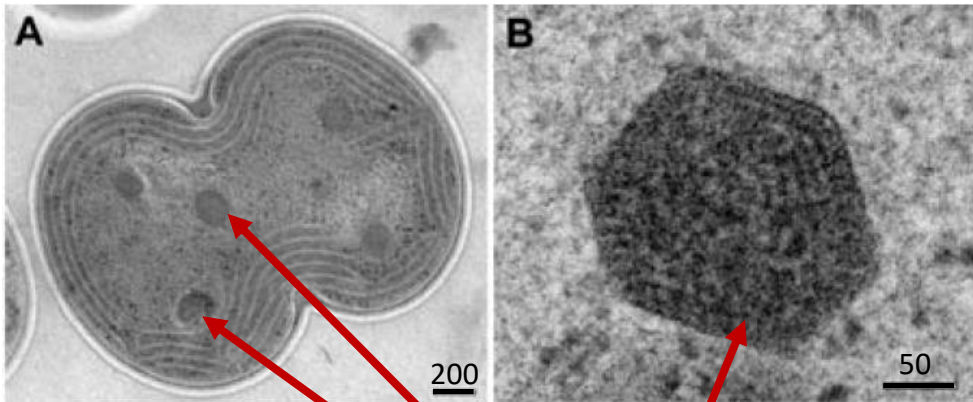
Var pieņemt, ka baktērija ir neliela, ar membrānu norobežota telpa (“maiss”), kurā tiek uzglabāts ģenētiskais materiāls un norit ķīmiskas reakcijas, lai iegūtu enerģiju un būvblokus priekš baktērijas vairošanās.

# Baktēriju mikronodalījumi – kas tie ir?



Zilaļģes *Cynecoccus elongatus*

Savage, et al. 2010, Science



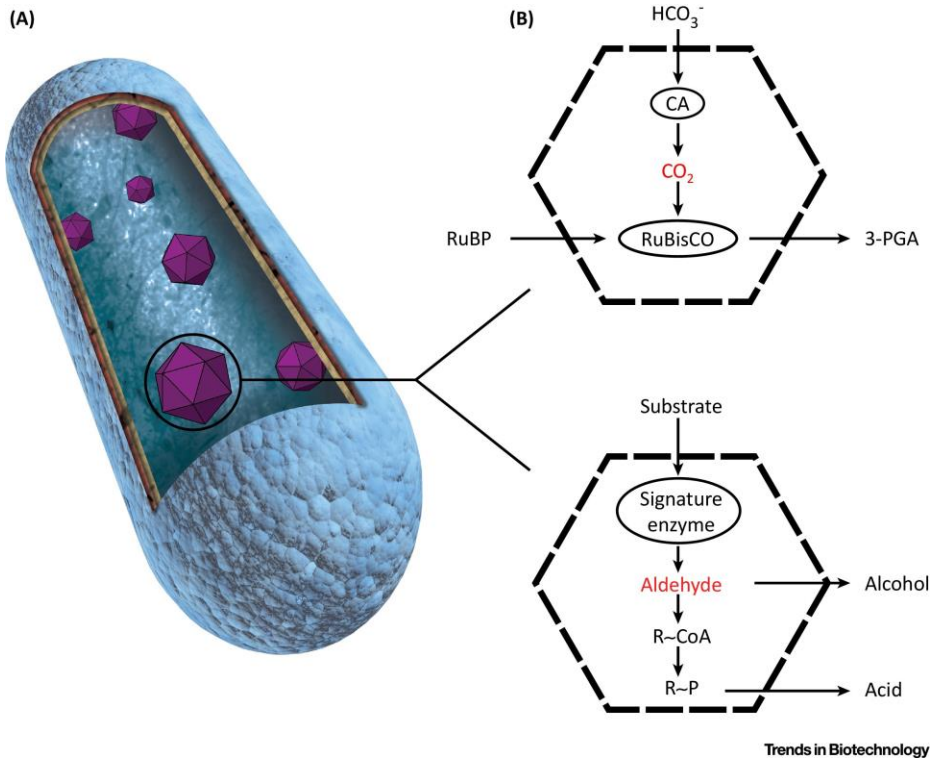
*Cynecocystis* spp.  
Mikronodalījumi –  
karboksisomas

Kerfeld, et al. 2005, Science

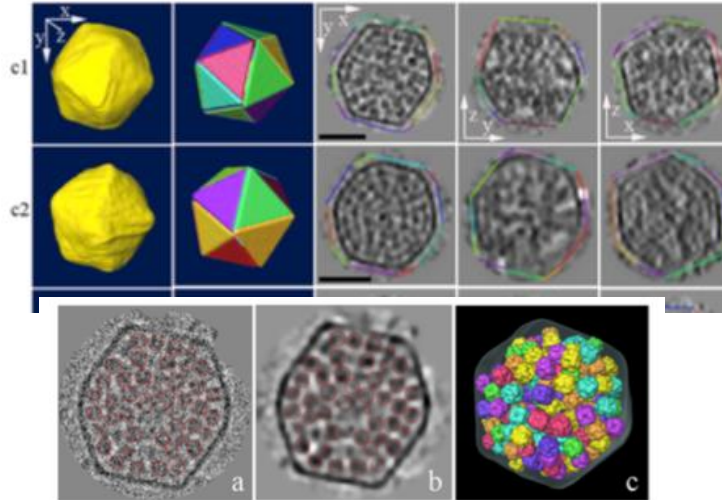
Mikronodalījumi ir viens no baktēriju šūnu ieslēgumu veidiem. Tie paātrina kritiski svarīgas reakcijas šūnā.

Rezultātā baktērija spēj patērēt eksotiskus vai toksiskus substrātus vai uzlabot CO<sub>2</sub> fiksēšanas efektivitāti.

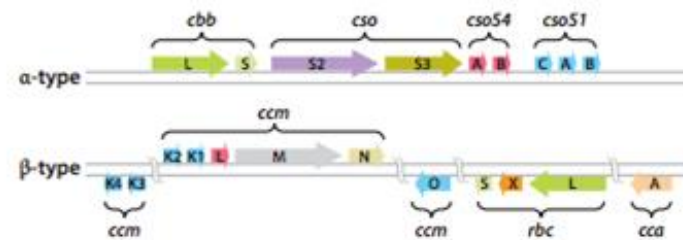
# Baktēriju mikronodalījumi – no kā tie sastāv?



Lee et al., 2019., TiB



(Iancu, et al., 2007, J Mol Biol)



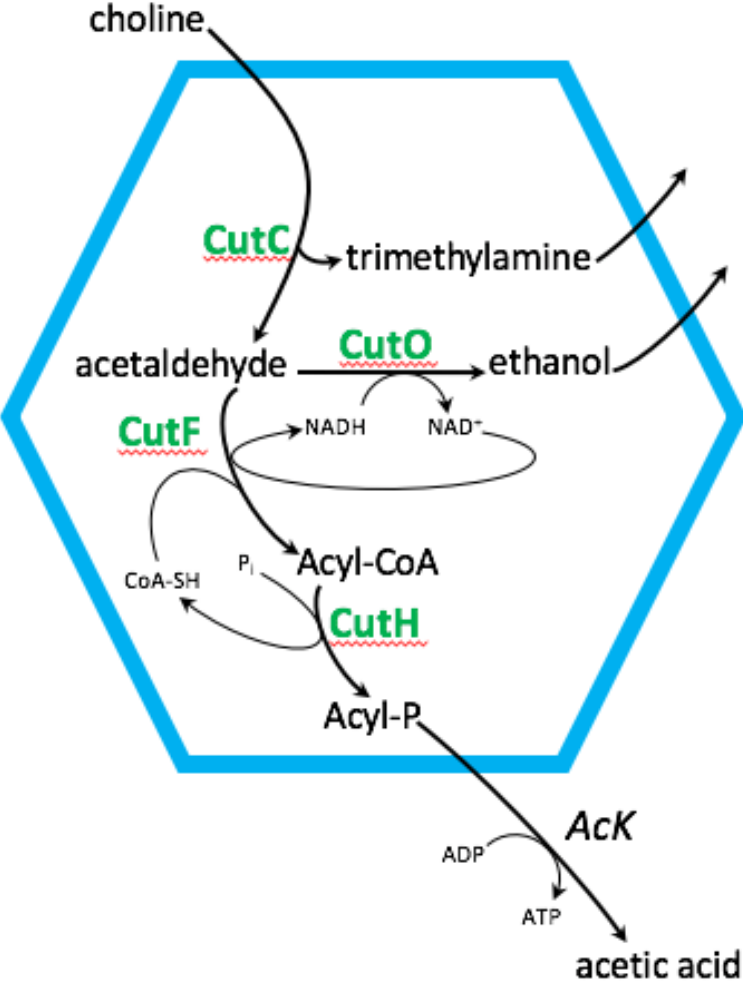
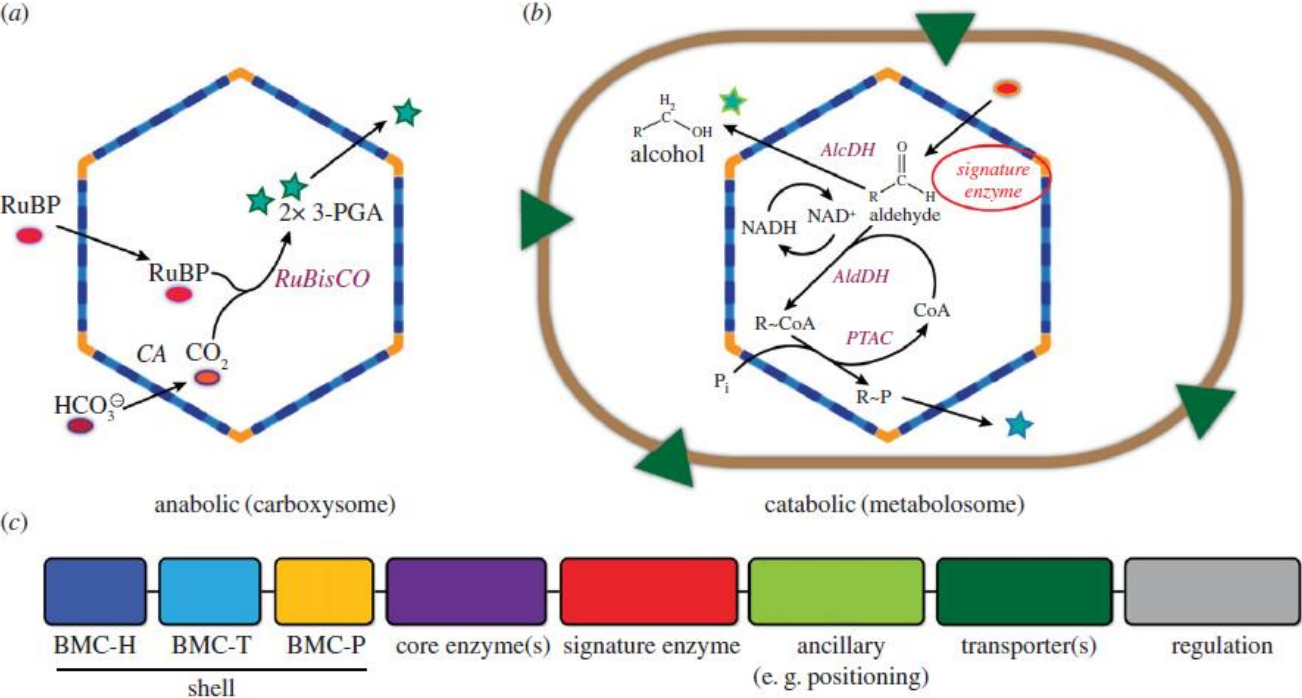
Yeates, et al., 2010, Annu. Rev. Biophys.

Mikronodalījumiem ir noteikta, regulāra forma. Tie realizē noteiktas funkcijas, piem.,  $\text{CO}_2$  fiksēšanu iekšējās esošajos proteīnos.

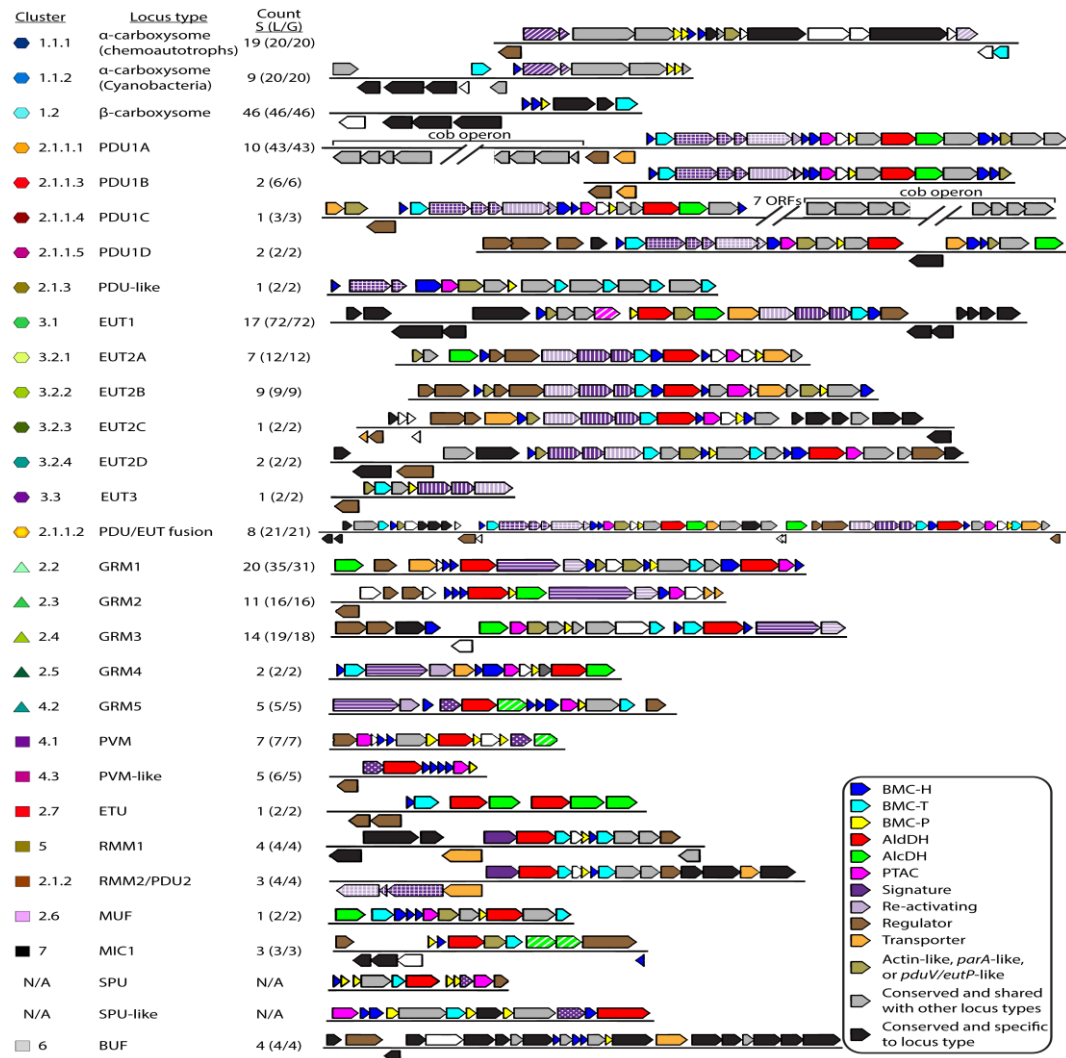
Gan vienu, gan otru kodējošie DNS rajoni baktērijas genomā atrodas cieši blakus vienā “operonā”.



# Baktēriju mikronodalījumi – no kā tie sastāv?



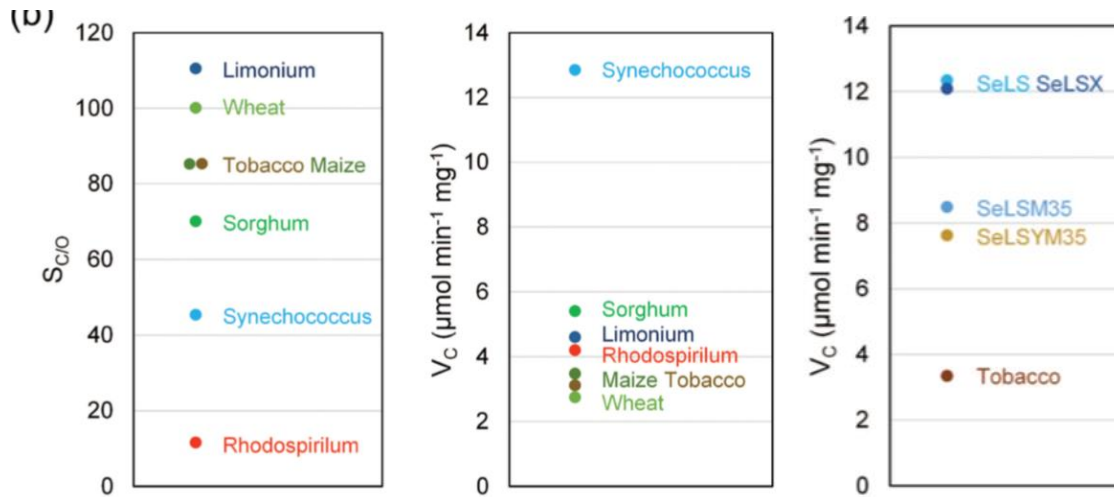
# Baktēriju mikronodalījumi – cik dažādi tie ir?



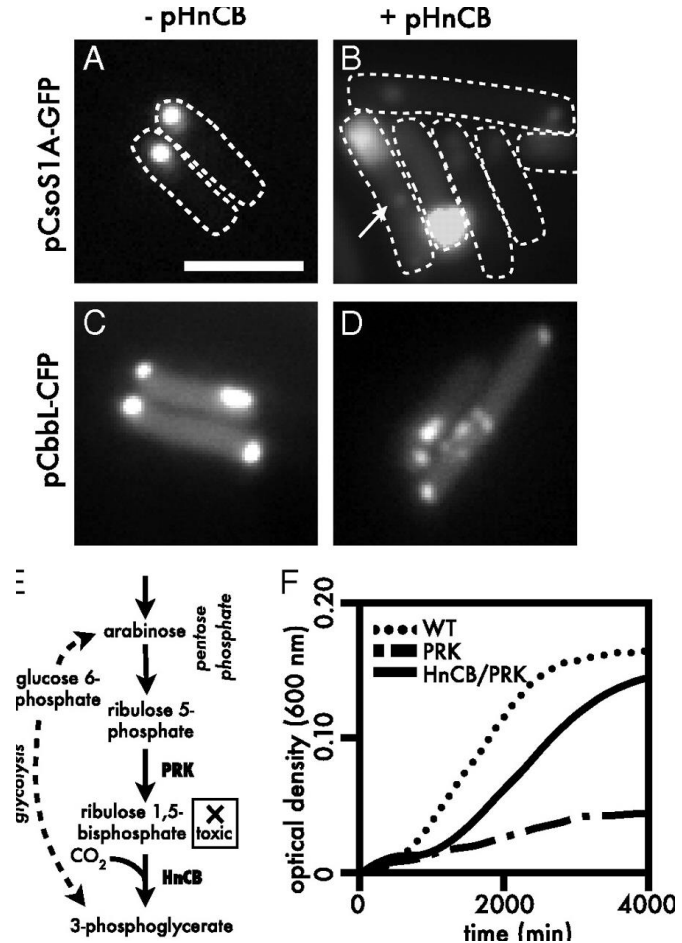
Pašlaik zināmi 23 dažādi mikronodalījumu veidi, (Axen, et al., 2014)

# Baktēriju mikronodalījumu pielietojums

Mikronodalījumus iespējams izmantot, lai uzlabotu CO<sub>2</sub> saistīšanu citos mikroorganismos vai sauszemes augos



Occhialini et al., 2016, Plant J.

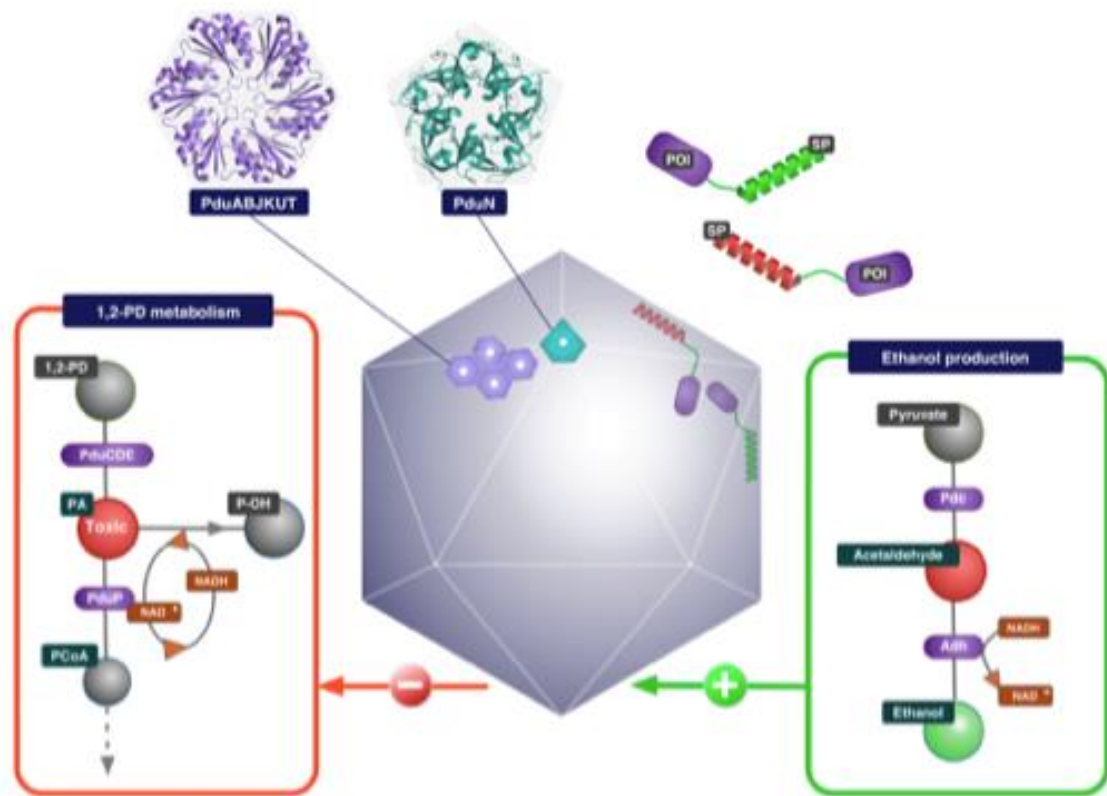


Bonacci et al., 2012, PNAS

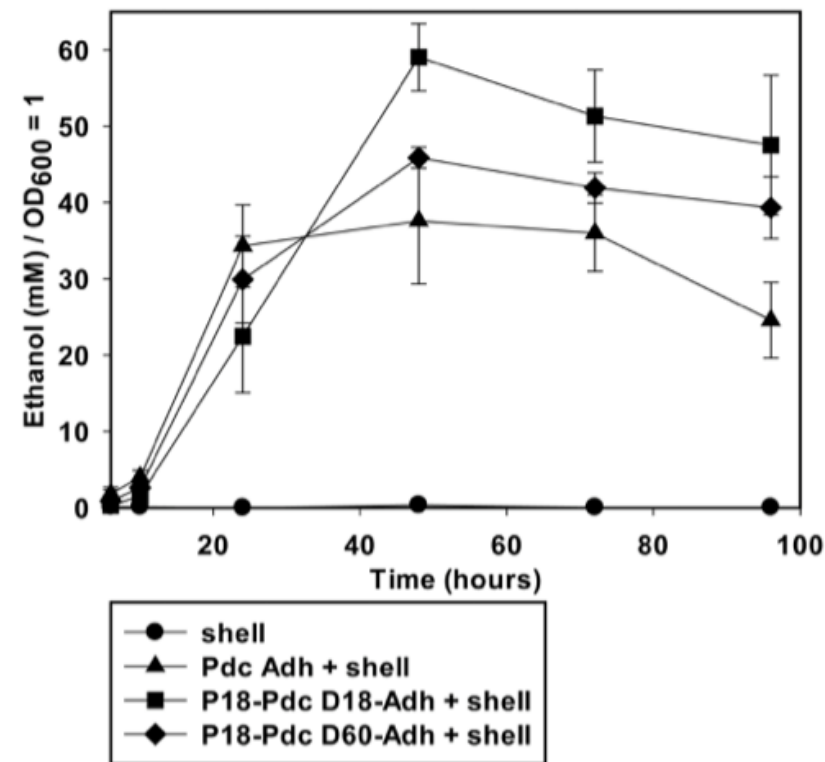


# Baktēriju mikronodalījumu pielietojums

Mikronodalījumus iespējams izmantot, lai radītu jaunas platformas dažādu vielu sintēzes ceļiem, kuros ir toksiski vai nestabili starpsavienojumi.

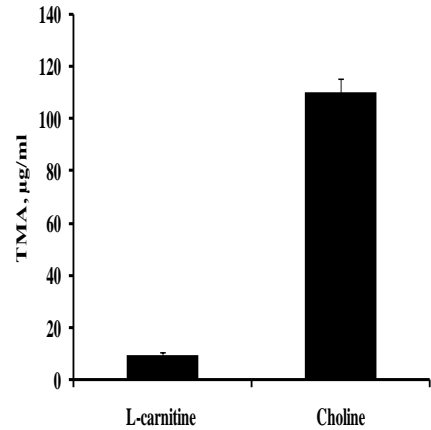


Lawrence et al., 2014., ACS Synth. Biol.



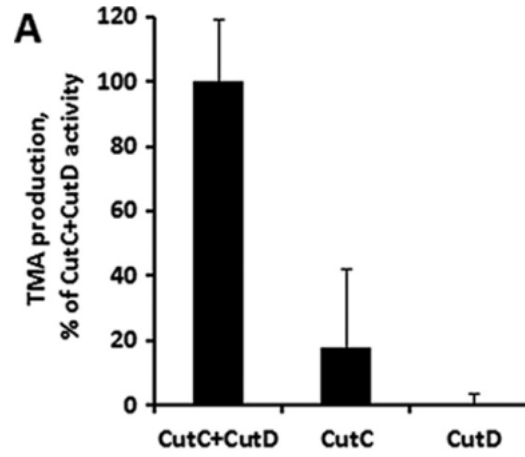
# Holīns un trimetilamīns (TMA)

*K. pneumoniae* ražo vairāk TMA no holīna nekā karnitīna

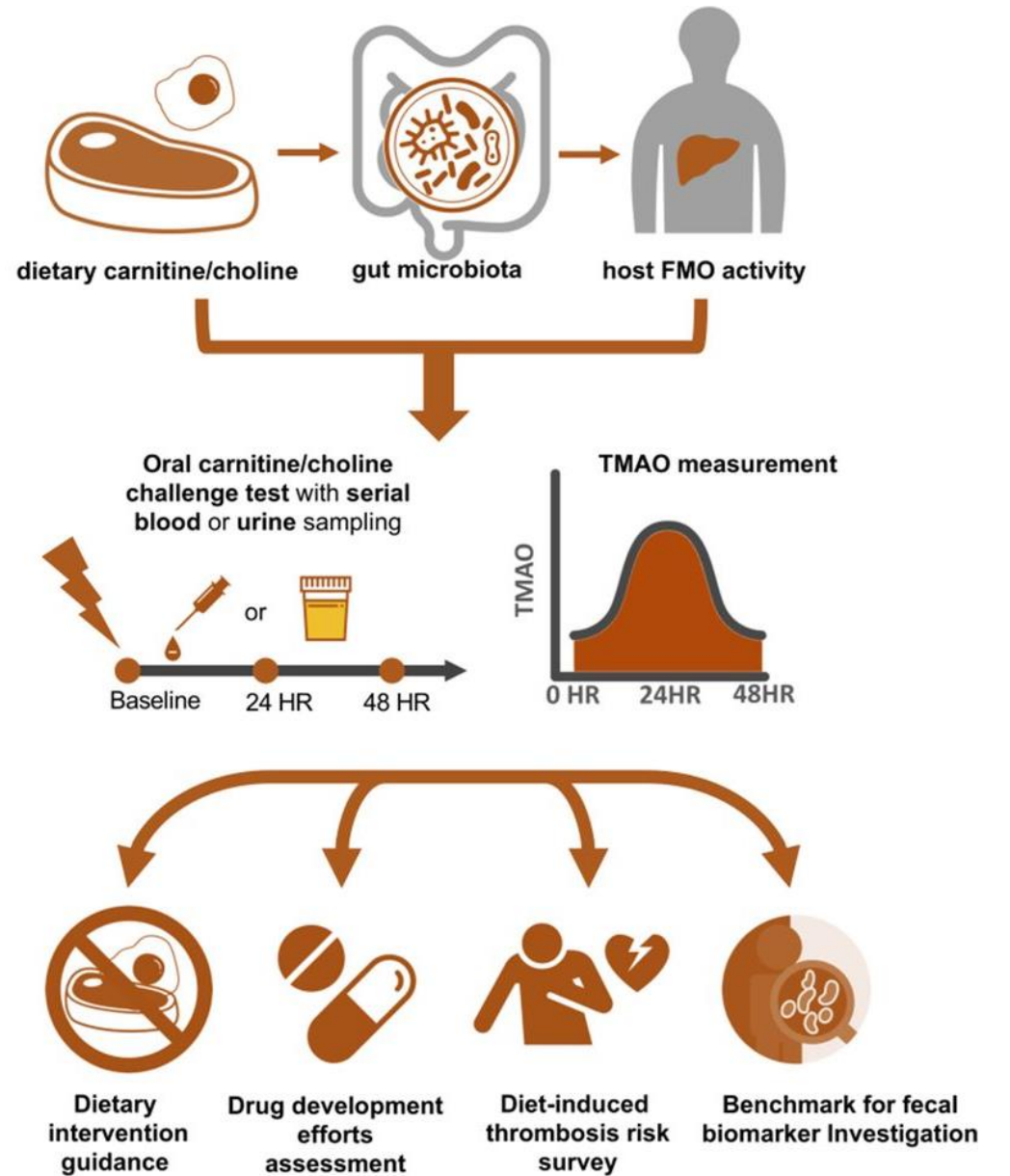


Kuka, et al., 2014, Life Sci.

Holīna šķelšanai *K. pneumoniae* nepieciešami vairāki proteīni



Kalnins et al., 2015, JBC

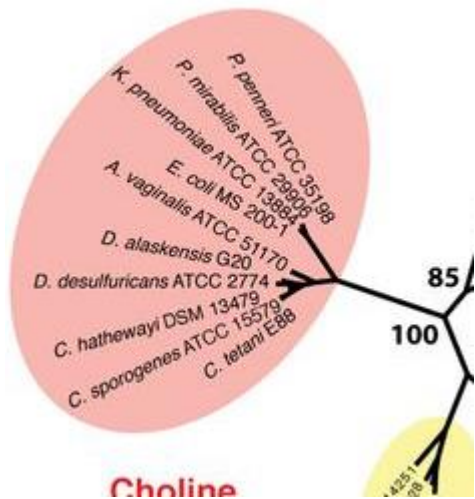


Wei-Kai Wu et al. Gut 2019;68:1439-1449

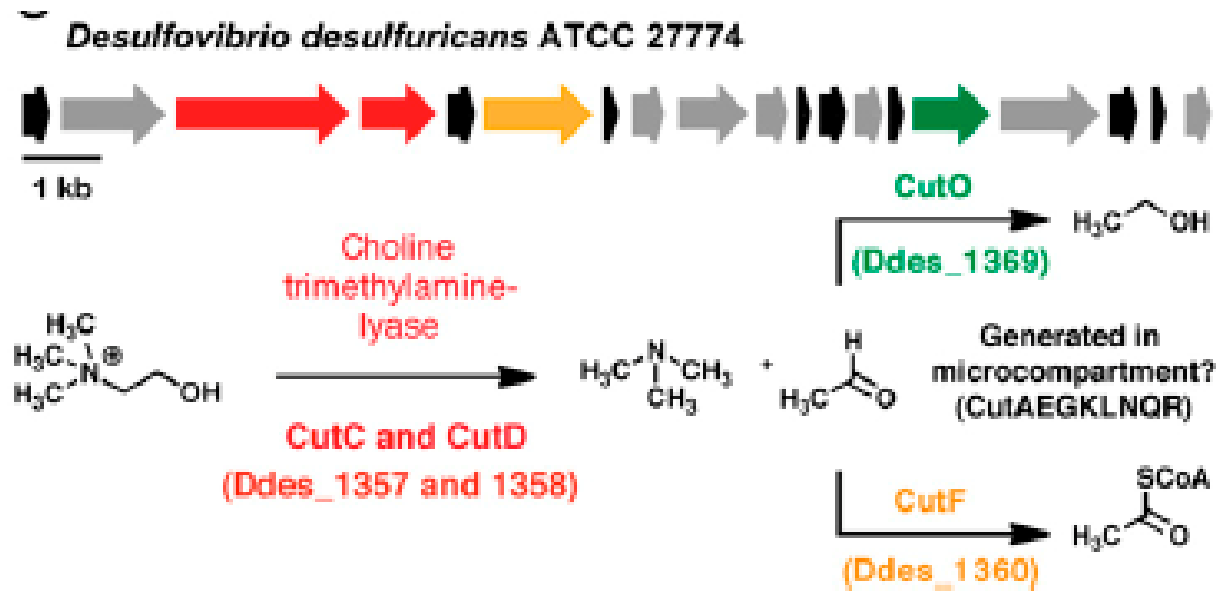
# Kā baktērijas šķeļ holīnu?

Bacterial isolate strain	Locus tag	Length	Sequence
<i>Klebsiella pneumonia</i> MSCL		1128	SDLSYHQINGGGDTI EENQGLQPFIEDARDYCLMGCVEPQKSGRYQWTSTGYTQWPITLSISNN
<i>Desulfovibrio alaskensis</i> G20		846	SDCSYHAVNGGGDSVEENQTMQPFVEDARDYCLMGCVEPQKSGRYQWTSTGYTQWPITLSISNN
<i>Proteus mirabilis</i> HI4320		1142	SDLSYHQINGGGDTVEENQGLQPFIEDARDYCLMGCVEPQKSGRYQWTSTGYTQWPITLSISNN

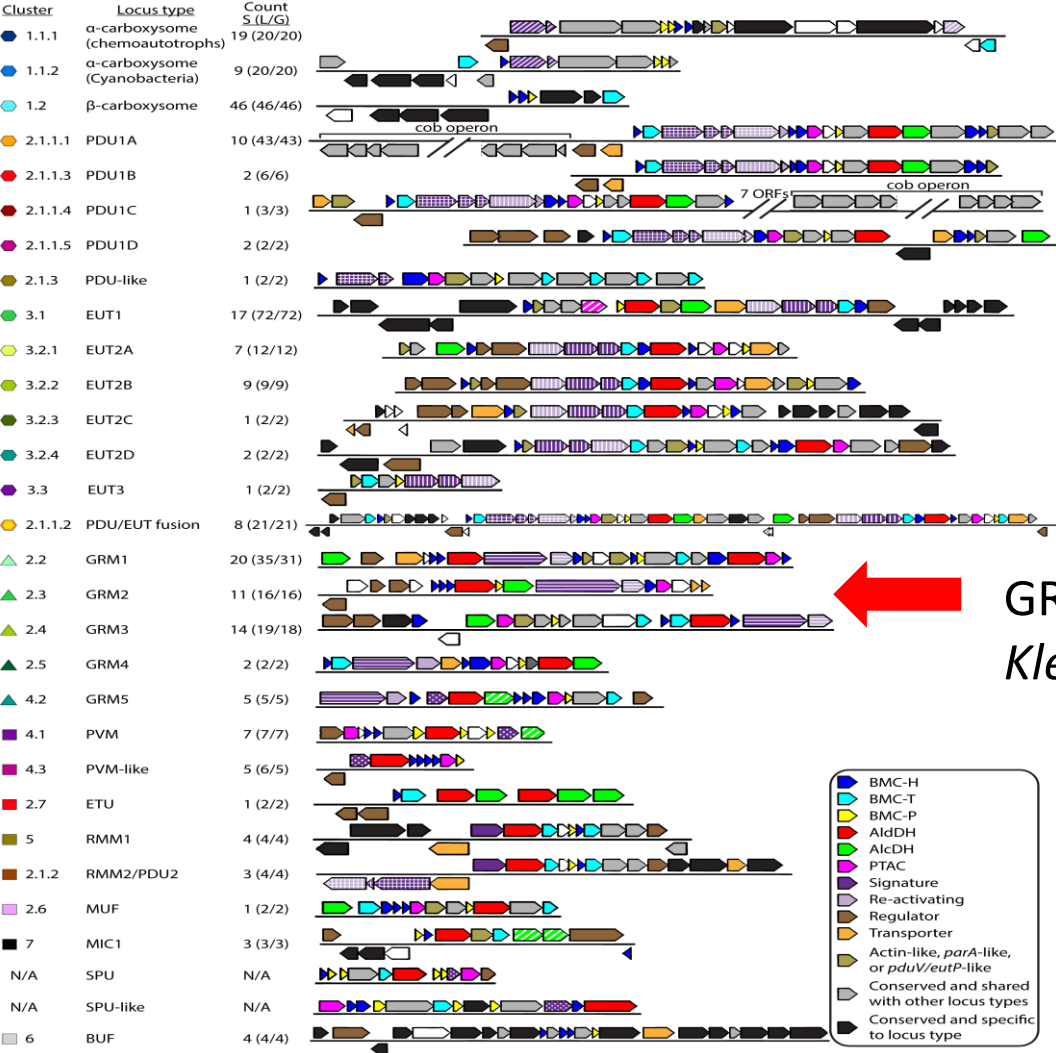
(Jameson et al., 2018. Methods)



(Craciun & Balskus, 2012)



# Baktēriju mikronodalījumi – cik dažādi tie ir?



← GRM2 tipa lokuss, pie kura pieder CutC no *Klebsiella pneumoniae*

- BMC-H
- BMC-T
- BMC-P
- AldDH
- AldDH
- PTAC
- Signature
- Re-activating
- Regulator
- Transporter
- Actin-like, *parA*-like, or *pduV/eutP*-like
- Conserved and shared with other locus types
- Conserved and specific to locus type

Pašlaik zināmi 23 dažādi mikronodalījumu veidi, (Axen, et al., 2014)

# Baktēriju mikronodalījumi kā nanoreaktori

1. *K. pneumoniae* proteīnu bibliotēkas izveide un mikronodalījumu sintēzes optimizācija.
2. Mikronodalījumu proteīnu čaulu caurlaidības mērījumi.
3. Funkcionāla mikronodalījuma izveide un raksturojums.



# GRM2 tipa bakteriālo mikrokompartmentu čaulas pašsalikšanās un enzimatiskās serdes iepakojšanās mehānismi

*Dr. biol. Gints Kalniņš*

Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs



Search



E-alert



Submit



Login

We'd like to understand how you use our websites in order to improve them. [Register your interest.](#)

Article | [Open Access](#) | Published: 20 January 2020

## Encapsulation mechanisms and structural studies of GRM2 bacterial microcompartment particles

Gints Kalnins , Eva-Emilija Cesle, Juris Jansons, Janis Liepins, Anatolij Filimonenko & Kaspars Tars

*Nature Communications* **11**, Article number: 388 (2020) | [Cite this article](#)

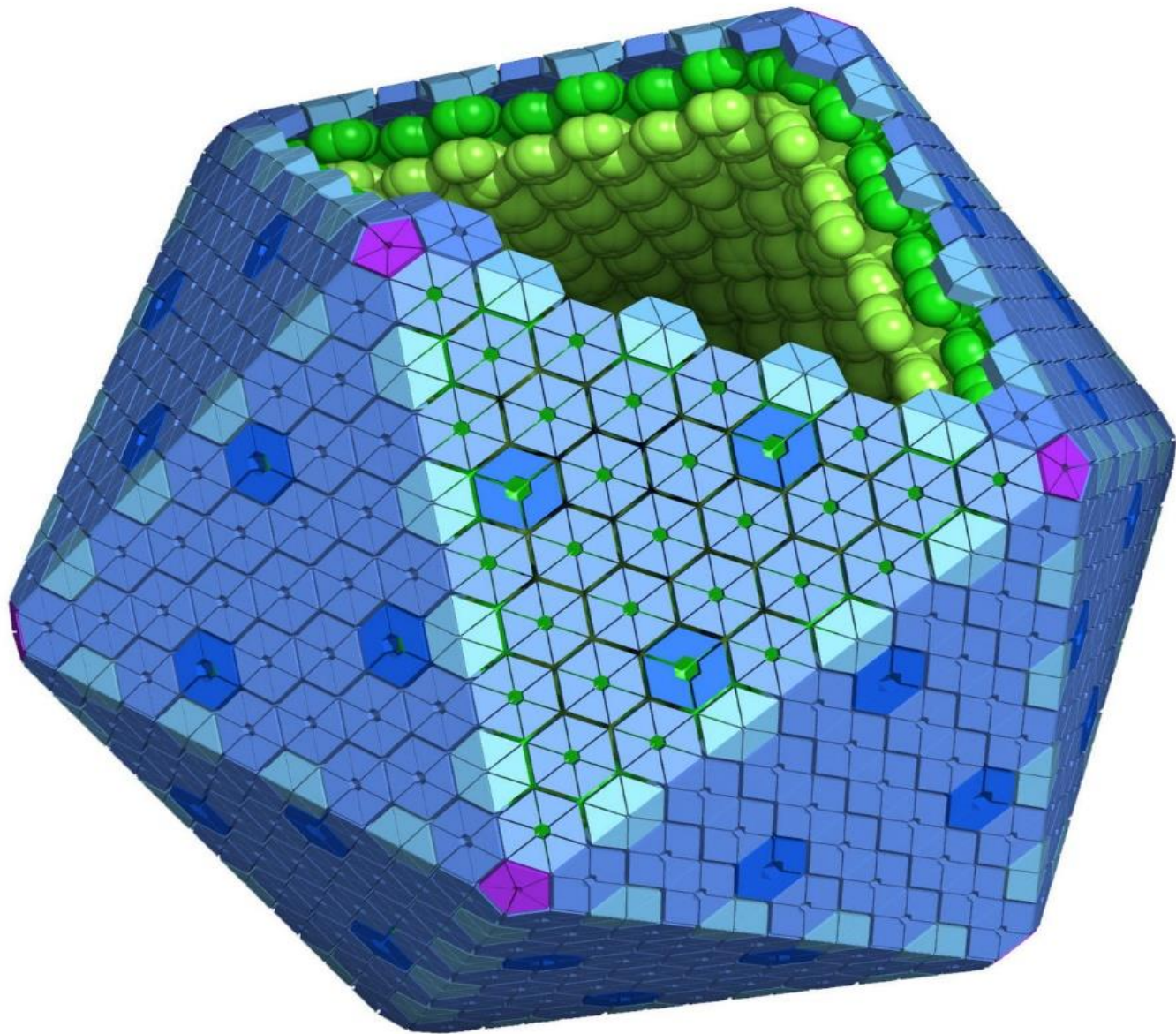
1506 Accesses | [9](#) Altmetric | [Metrics](#)

### Abstract

Bacterial microcompartments (BMCs) are prokaryotic organelles consisting of a protein shell and an encapsulated enzymatic core. BMCs are involved in several biochemical processes, such as choline, glycerol and ethanolamine degradation and carbon fixation. Since non-native enzymes can also be encapsulated in BMCs, an improved understanding of BMC shell assembly and encapsulation processes could be useful for synthetic biology applications. Here we report the isolation and recombinant expression of BMC structural genes from the *Klebsiella*

[Download PDF](#)[Sections](#)[Figures](#)[References](#)[Abstract](#)[Introduction](#)[Results](#)[Discussion](#)[Methods](#)[Data availability](#)[References](#)[Acknowledgements](#)[Author information](#)[Ethics declarations](#)[Additional information](#)[Supplementary information](#)[Rights and permissions](#)[About this article](#)[Comments](#)

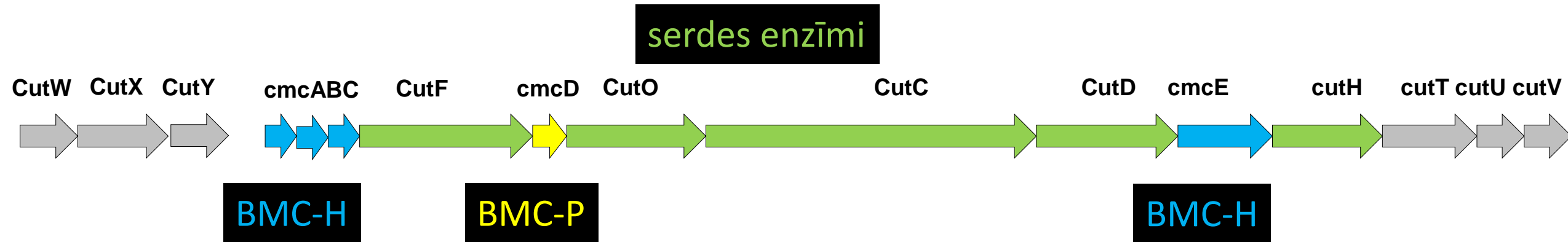
Pētījums publicēts *Nature Communications* žurnālā, IF 11.88



- Čaula sastāv no trīs proteīnu tipiem – heksamēriskajiem BMC-H (*gaiši zils*), pseidoheksamēriskiem trimēriem BMC-T (*tumši zils*) un pentamēriskiem BMC-P (*violets*)

Yeates T, 2010

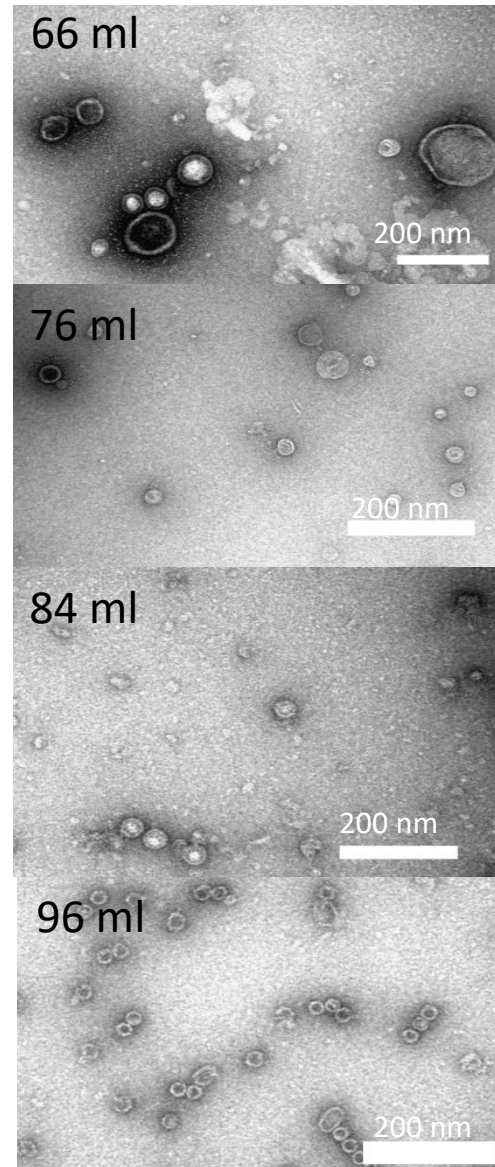
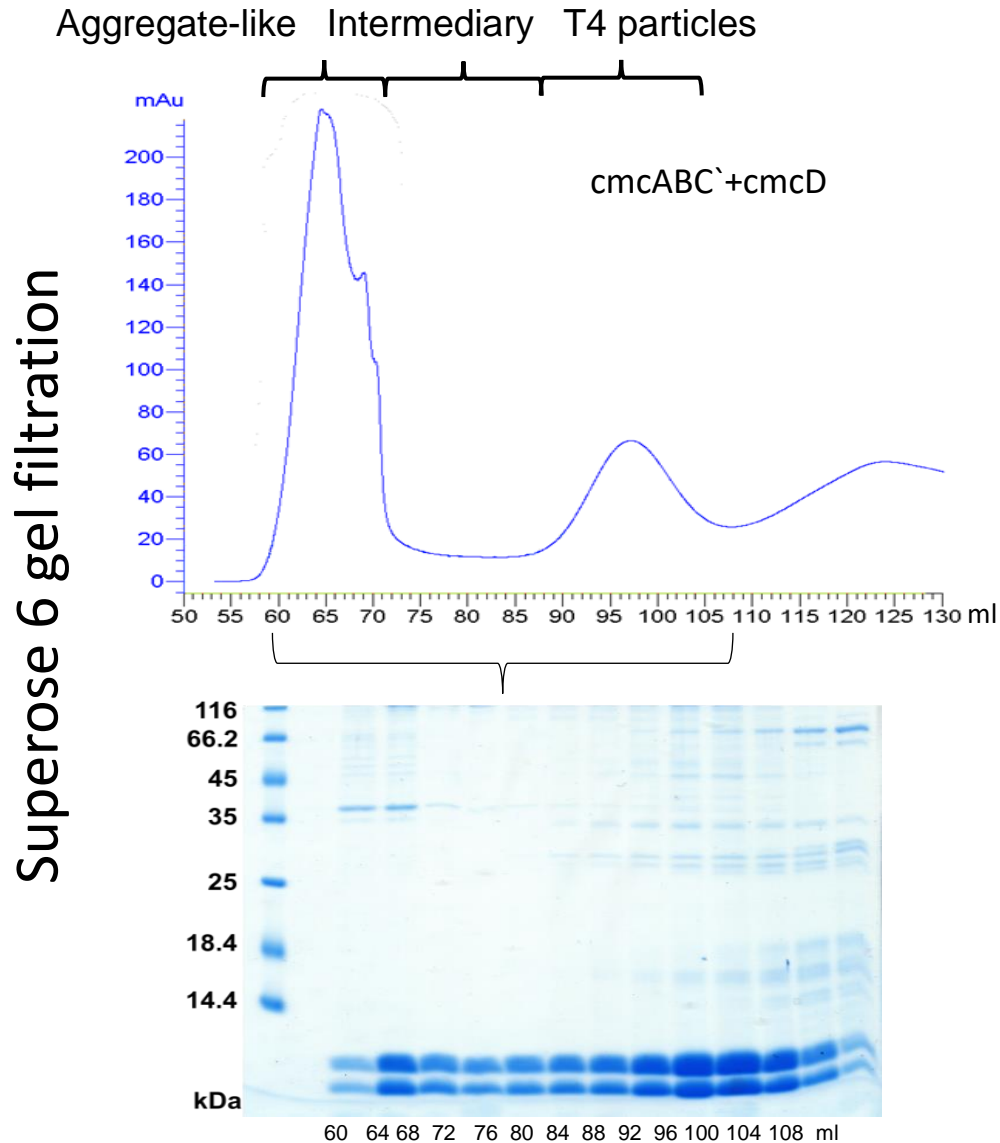
# *Klebsiella pneumoniae* GRM2 lokuss



- Kā GRM2 čaula pašsaliekas – kas nosaka tās izmēru, kapacitāti un spēju iepakot serdes enzīmus?
- Strukturālo čaulas gēnu izolēšana un rekombinanta ekspresija *Escherichia coli* ekspresijas sistēmā atsevišķos gadījumos producēja tukšas čaulas daļiņas zināmās kombinācijās.



# Čaulas daļiņu analīze

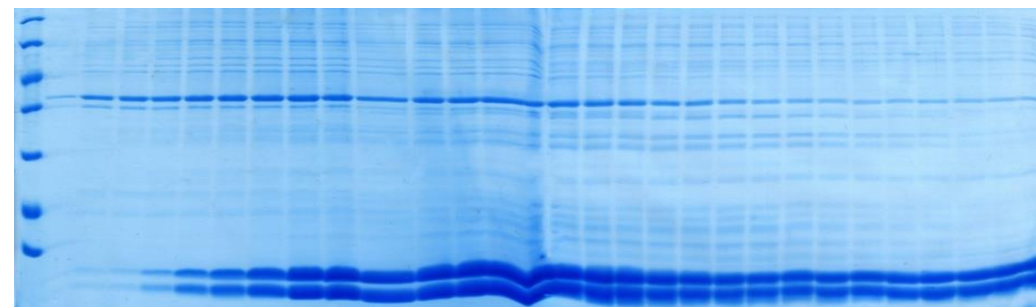


- Gēlfiltrācija daļēji sašķiro BDD pēc to izmēriem.
- Transmisijas elektronmikroskopija apstiprināja dažāda izmēru daļiņu klātbūtni – no 25 nm līdz 200 nm.

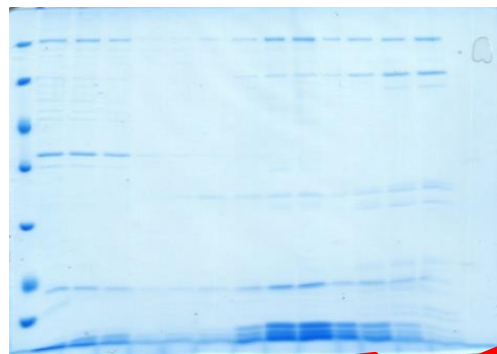


# BMC-H komponentu dažādās īpašības

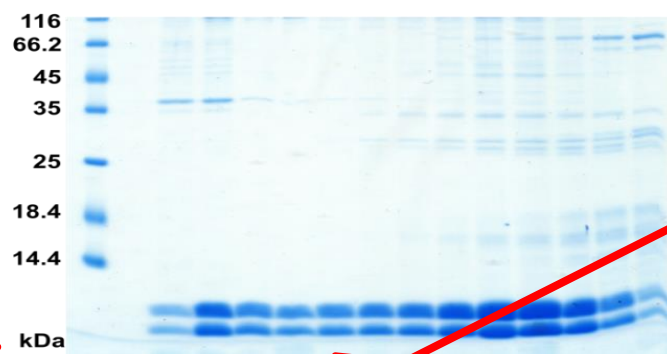
cmcABC<sup>`</sup>: neregulārs «izsmērēts» materiāls



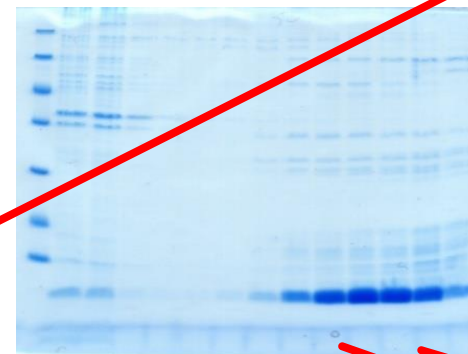
cmcABC+cmcD+cmcE:  
lielas un mazas BDD



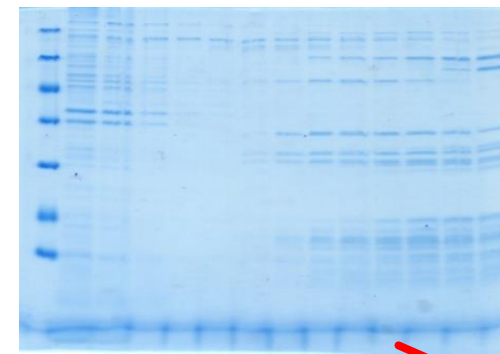
cmcABC<sup>`</sup>+cmcD+cmcE: lielas un mazas BDD



cmcC<sup>`</sup>+cmcD: galvenokārt mazas BDD



cmcA+cmcD:  
nav novērojamas BDD



C-termināli pagarināts mutēts

cmcC<sup>`</sup> variants

cmcA un cmcB – vairāk nešķīstoši, veido planārākas virsmas?

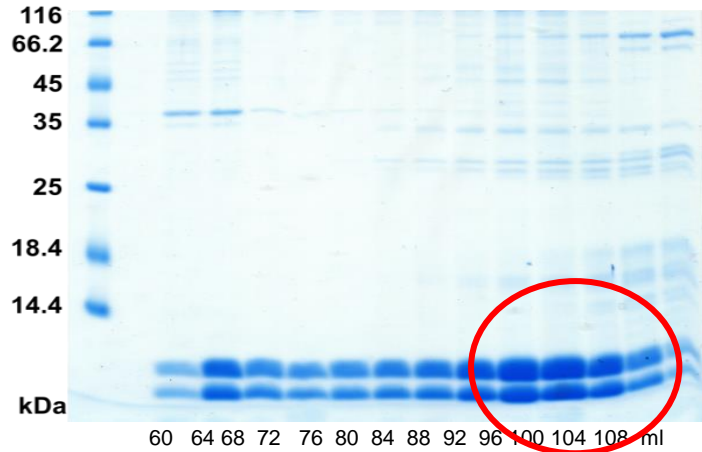
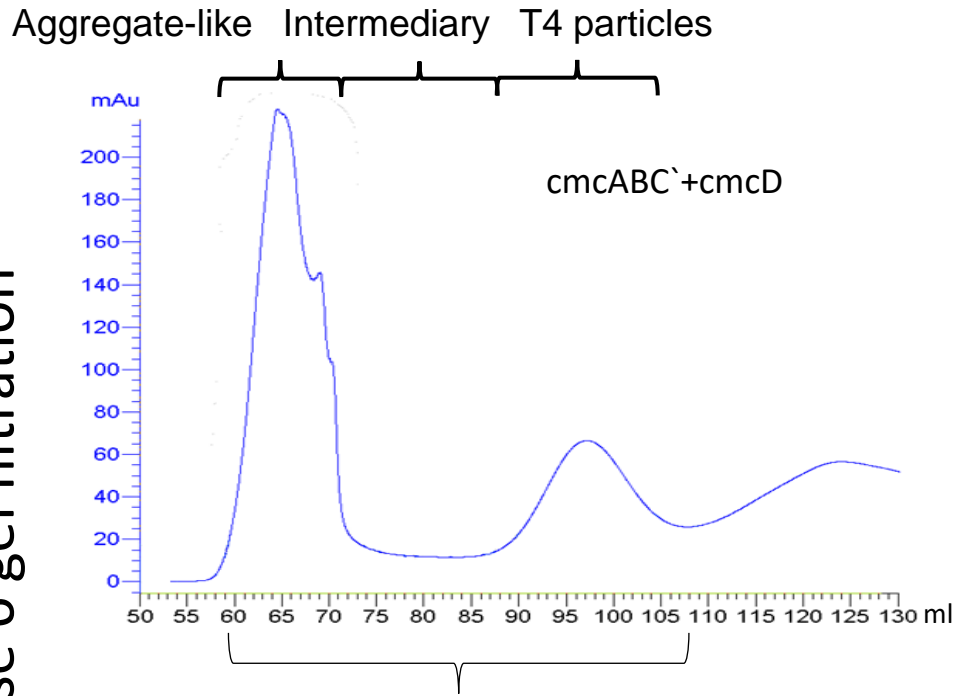
cmcE, cmcC un mutants cmcC<sup>`</sup> - vairāk šķīstoši, veido liektas virsmas?

Dabiski C-termināli pagarināts

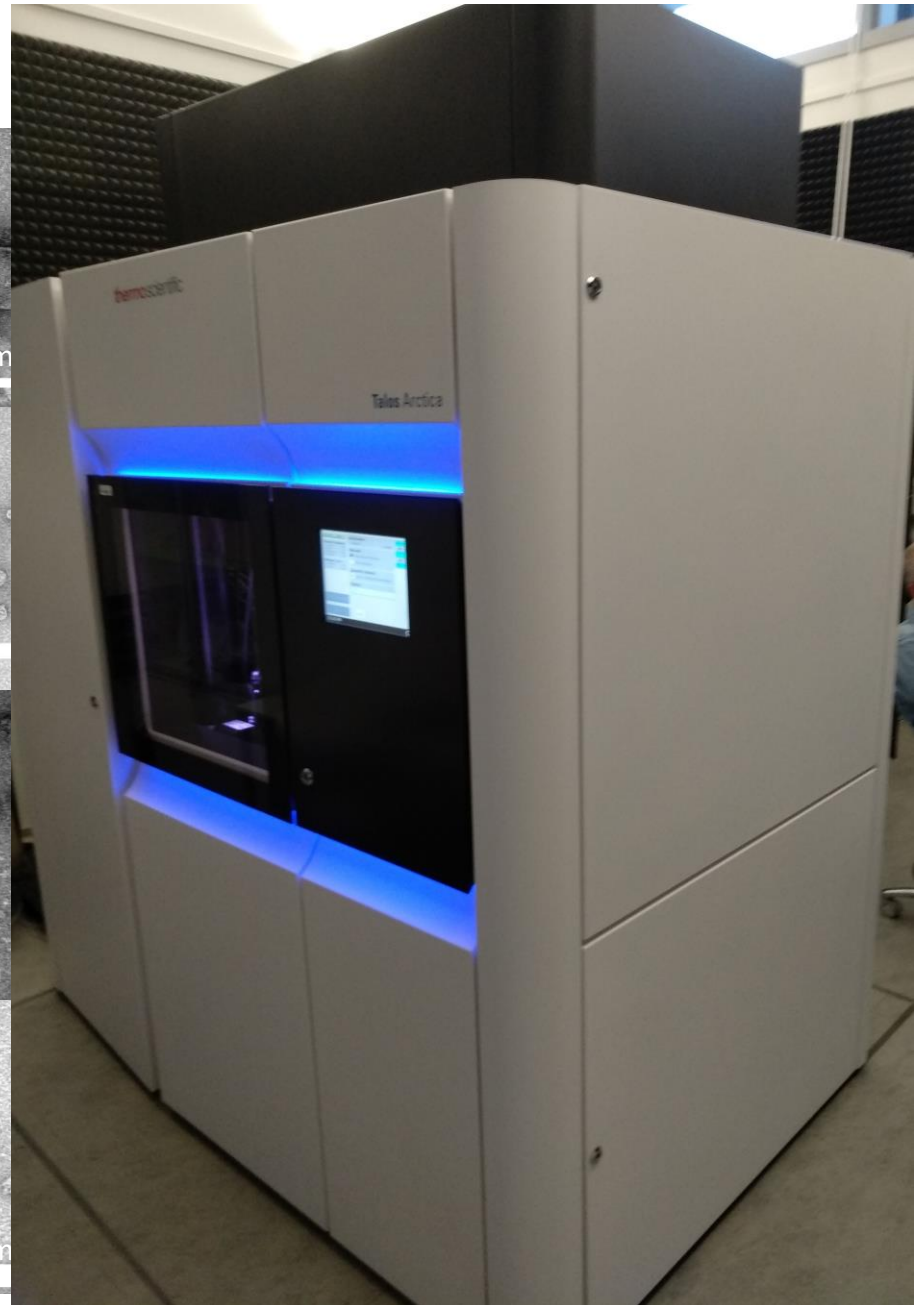
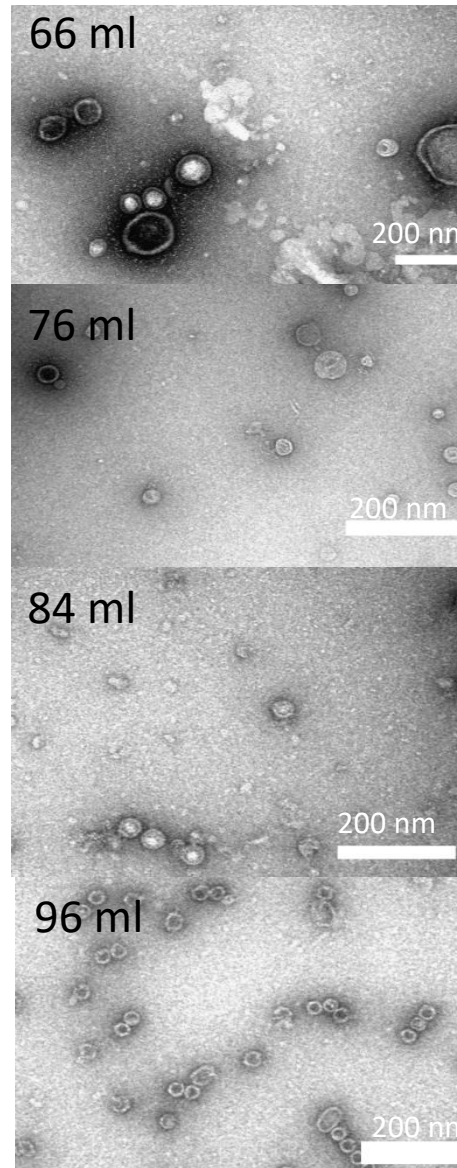
Kalnins *et. al*, Nat Commun, 2020

# BDD analīze

Superose 6 gel filtration

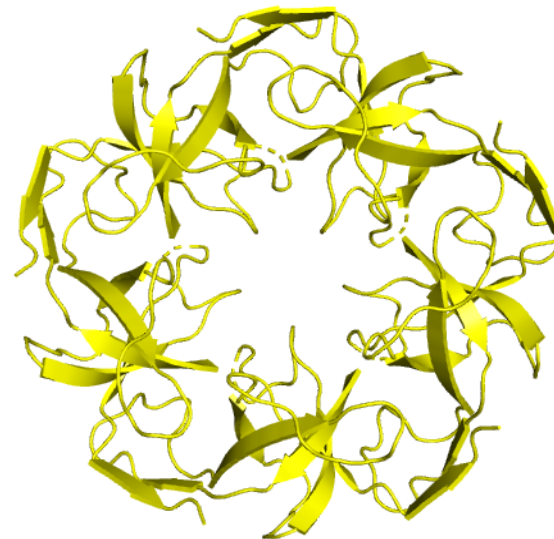
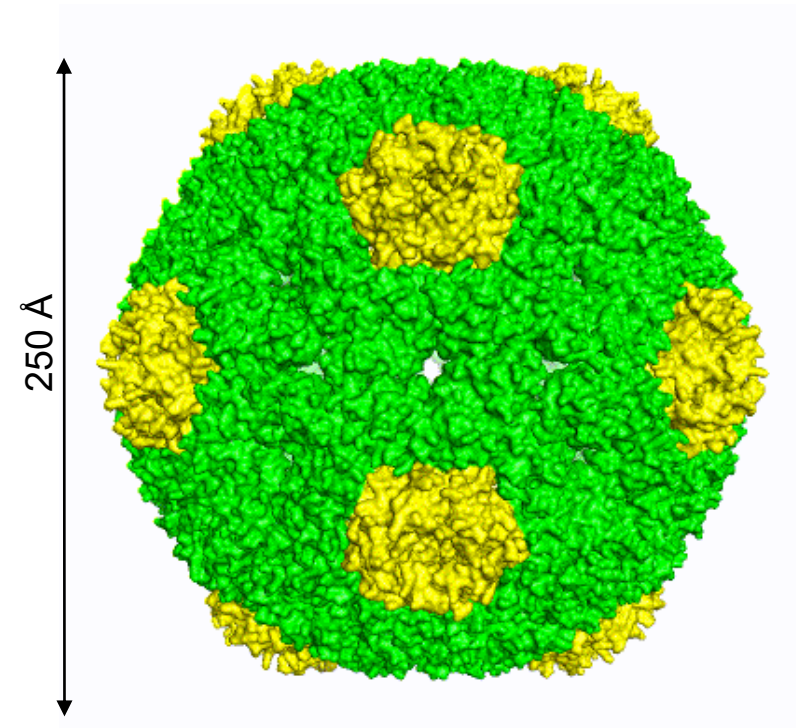


Krio-EM analīze

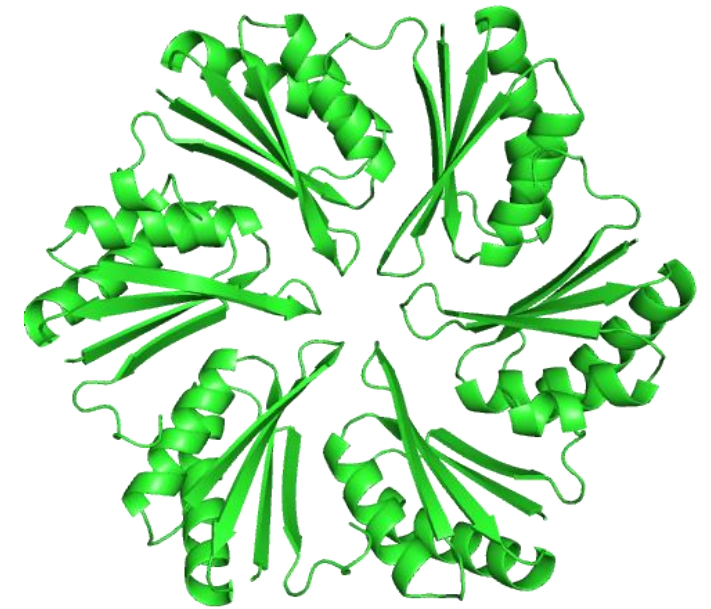


# pT=4 BDPs

- Izrēķināta krio-EM struktūra 3.3 Å izšķirtspējā pT=4 kvazi-simetriskai ikosahedrālai daļiņai, kuru veidoja cmcD pentamēri and cmcC` heksamēri



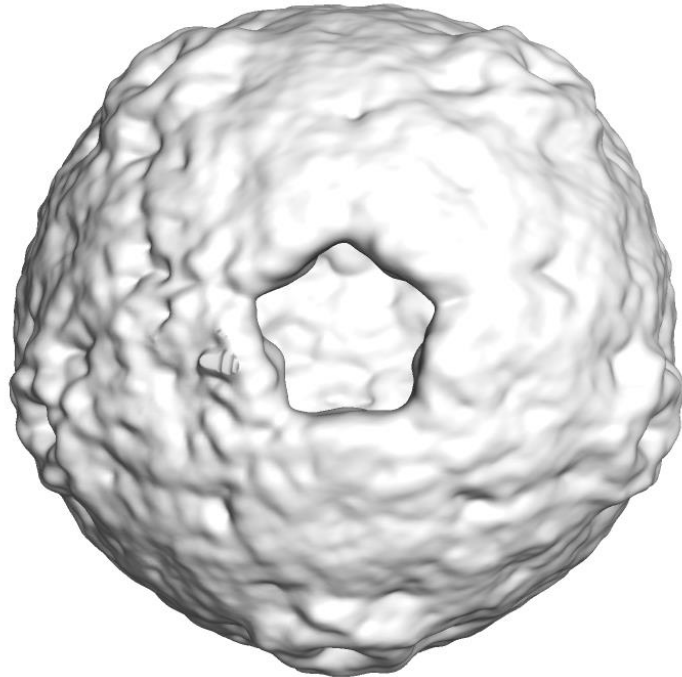
cmcD



cmcC`

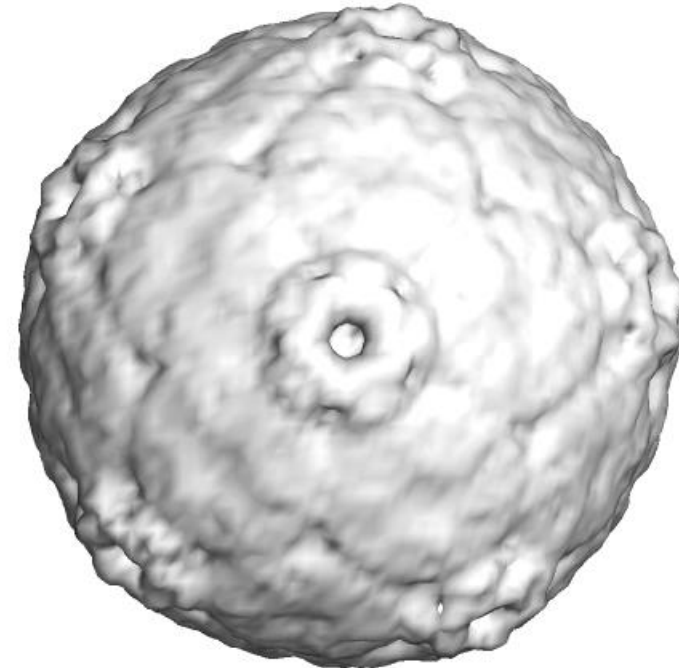


# Minoras BDD klases...



**8.75 Å izšķirtspēja, C1 simetrija**

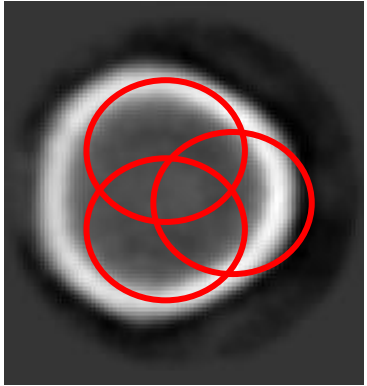
Vienai ceturtdaļai no visām  $pT=4$  daļiņām trūka vismaz viena pentamēriskā vienība



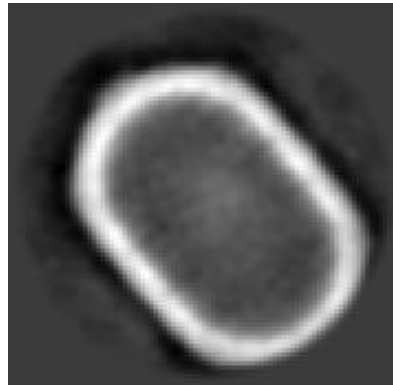
**9.64 Å izšķirtspēja, D5 simetrija**

6% no visām daļiņām bija  $pT=4, Q=6$  pagarinātas daļiņas ar vienu papildus heksamēru gredzenu

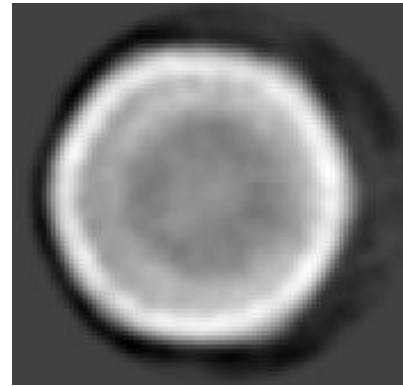
## ... un minorākas BDD klases



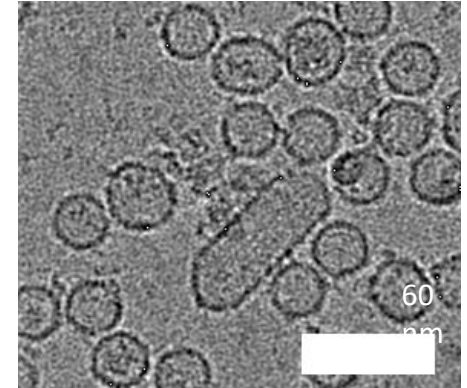
0.7% pT=4  
atvasinātas  
trijstūrainas  
daļiņas



0.3% pT=4, Q=8  
daļiņas ar diviem  
papildus  
heksamēru  
gredzeniem



0.2% ikosahedrālas  
daļiņas ar pT=7 vai  
pT=9 kvazi-simetriju

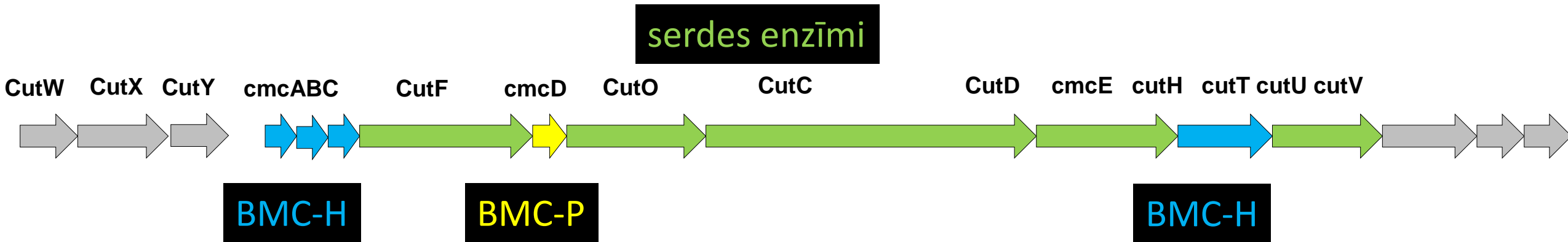


<0.1% pT=4, pT=7 vai  
pT=9 atvasinātas daļiņas  
ar vairāk kā diviem  
papildus heksamēru  
gredzeniem

- Čaula ir elastīga, un ir iespējami vairāki veidi, kā palielināt tās izmērus.



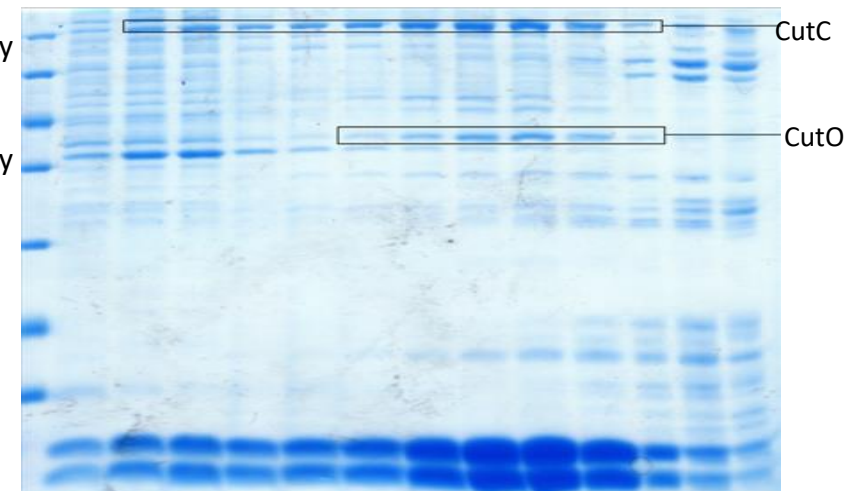
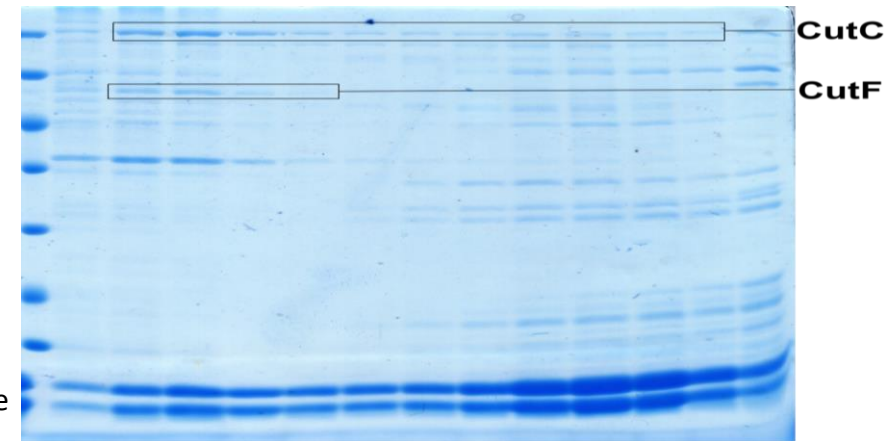
# *Klebsiella pneumoniae* GRM2 lokuss



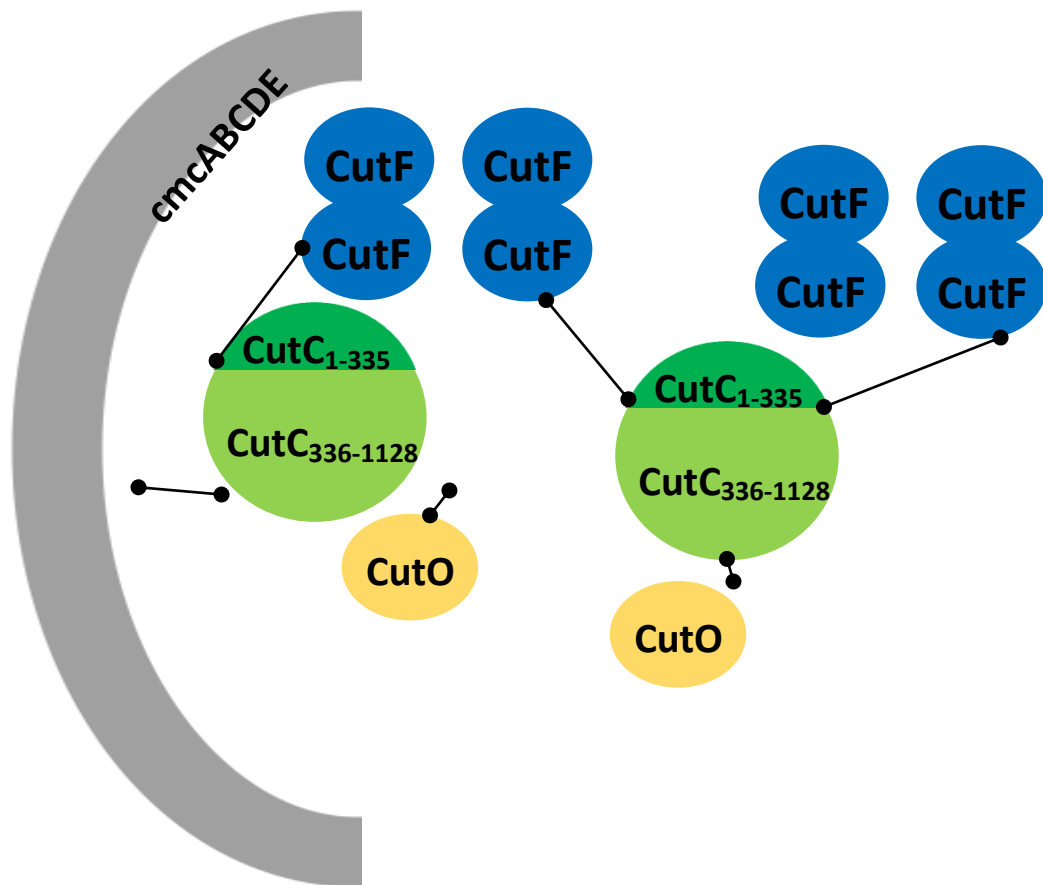
- Kā tiek iepakoti GRM2 serdes enzīmi?
- Noteiktu serdes enzīmu ko-ekspressijā ar BDD veidojošu gēnu komplektu noteiktās kombinācijās ir novērojama iepakojšanās.

pET-Duet-1 T7-1	pET-Duet-1 T7-2	pRSF-Duet-1 T7-1 <sub>1</sub>	pRSF-Duet-1 T7-2 <sub>1</sub>	pRSF-Duet-1 T7-1 <sub>2</sub>	pRSF-Duet-1 T7-2 <sub>2</sub>	Results
cmcABC'	cmcD	CutC	–	–	–	CutC in all zones
cmcABC'	cmcD	CutF	–	–	–	No encapsulation observed
cmcABC'	cmcD	CutO	–	–	–	No encapsulation observed
cmcABC'	cmcD	CutH	–	–	–	No encapsulation observed
cmcABC'	cmcD	CutC	cmcE	–	–	CutC in all zones
cmcABC'	cmcD	CutF	cmcE	–	–	No encapsulation observed
cmcABC'	cmcD	CutO	cmcE	–	–	No encapsulation observed
cmcABC'	cmcD	CutH	cmcE	–	–	No encapsulation observed
cmcABC'	cmcD	CutC <sub>1–325</sub>	–	–	–	No encapsulation observed
cmcABC'	cmcD	CutC <sub>336–1128</sub>	–	–	–	CutC <sub>336–1128</sub> in all zones
cmcABC'	cmcD	CutC <sub>336–1128</sub>	CutO	–	–	CutO and CutC <sub>336–1128</sub> in all zones
cmcABC'	cmcD	CutC <sub>336–1128</sub>	CutF	–	–	CutC <sub>336–1128</sub> in all zones
cmcABC'	cmcD	CutC	CutO	–	–	CutO and CutC in all zones
cmcABC'	cmcD	CutC	CutF	–	–	CutC in all zones, CutF predominantly in large type particle zone
cmcABC'	cmcD	CutC	CutH	–	–	CutC in all zones
cmcABC'	cmcD	CutC	CutF	CutO	–	CutC, CutF, and CutO predominantly in large type particle zone
cmcABC'	cmcD	CutC	CutF	CutO	CutH	CutC, CutF, and CutO predominantly in large type particle zone
cmcC'	cmcD	CutC	–	–	–	CutC predominantly in small type particle zone
cmcC'	cmcD	CutC	CutF	CutO	–	No encapsulation observed
cmcC	cmcD	CutC	–	–	–	CutC predominantly in small type particle zone
cmcC	cmcD	CutC	CutF	CutO	–	No encapsulation observed

- Serdes enzīmu ko-  
migrācija gēlfiltrācijā ar  
čaulas proteīniem



# GRM2 hierarhiskais enzimatiskās serdes iepakošanas mehānisms



- Iepakošana ir hierarhiska, un CutC enzīms, visticamāk, kalpo arī kā centrālais adaptors serdes iepakošanai.
- CutC N-terminālais domēns kopā ar CutF aldehīda dehidrogenāzi pārbīda serdes enzīmu iepakošanas līdzsvaru uz lielākām daļiņām – palielina enzimatiskās serdes izmērus?



# Nepublicēti dati iepakotas CutO alkohola dehidrogenāzes aktivitātes mērījumiem

	NAD <sup>+</sup>				Ethanol
	Vmax [μmol*min <sup>-1</sup> per mg] total	Vmax [μmol*min <sup>-1</sup> per mg] of CutO component	NAD km [mM]	Kcat [s <sup>-1</sup> ] of CutO component	Ethanol km [mM]
<b>cmcABC`+D+CutC+CutO</b>	12,7	454,5	100,3	318,0	8,8
<b>cmcABC`+D</b>	3,9	-	-	-	-
<b>H6-CutO</b>	306,0	306,0	151,9	214,1	22,3

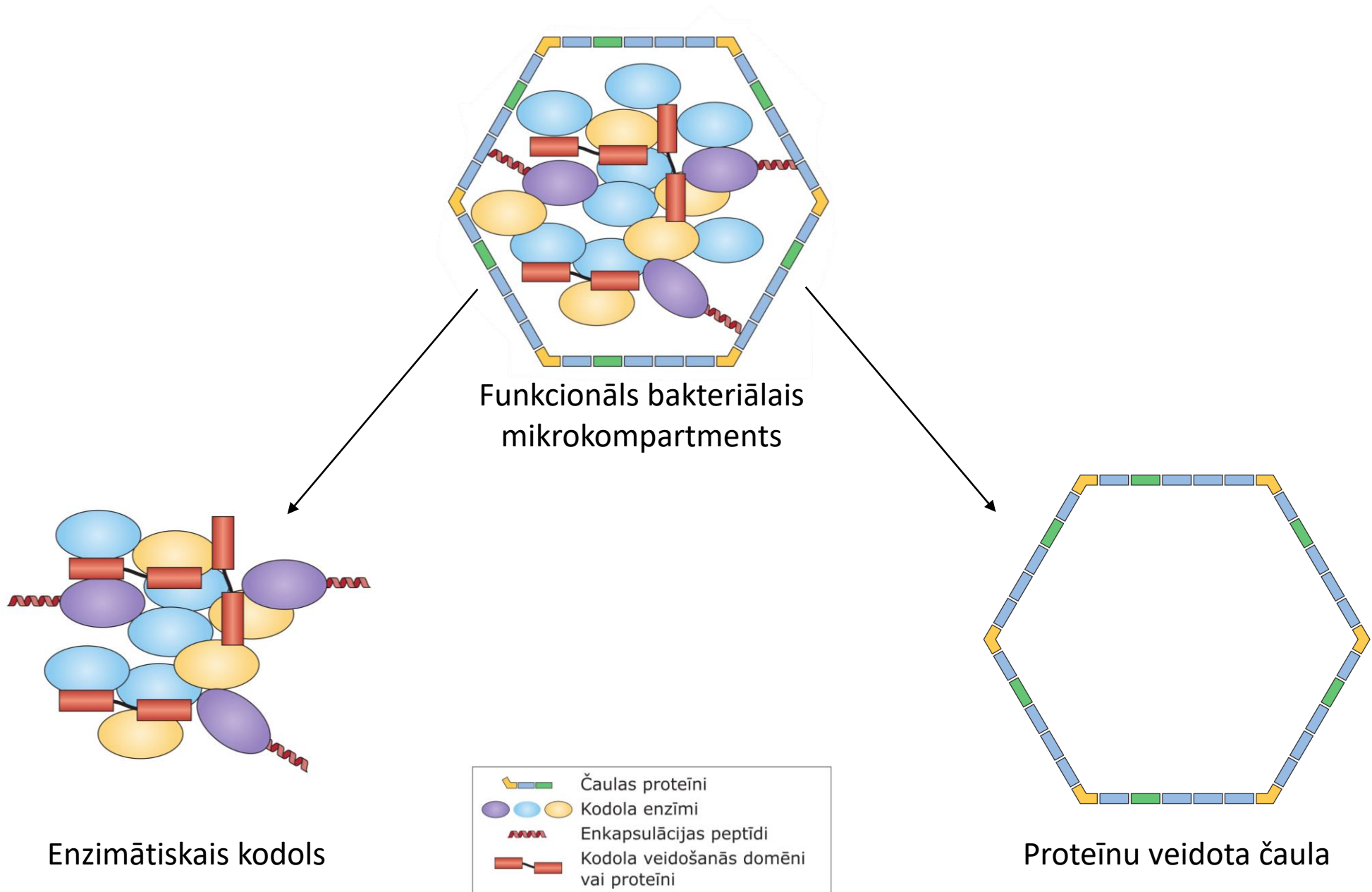


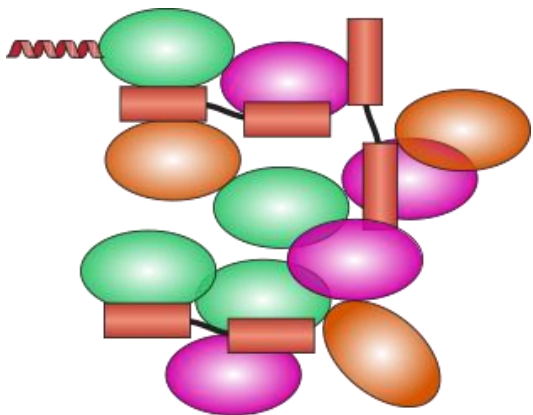
Latvijas Biomedicīnas  
pētījumu un studiju centrs  
biomedicīnas pētījumi un izglītība no gēniem līdz cilvēkam

# Enzīmu iepakojšanas stratēģija mikrokompartmentos

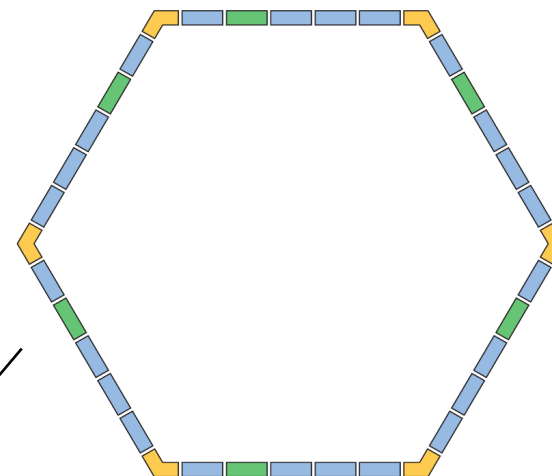
Eva Emīlija Česle



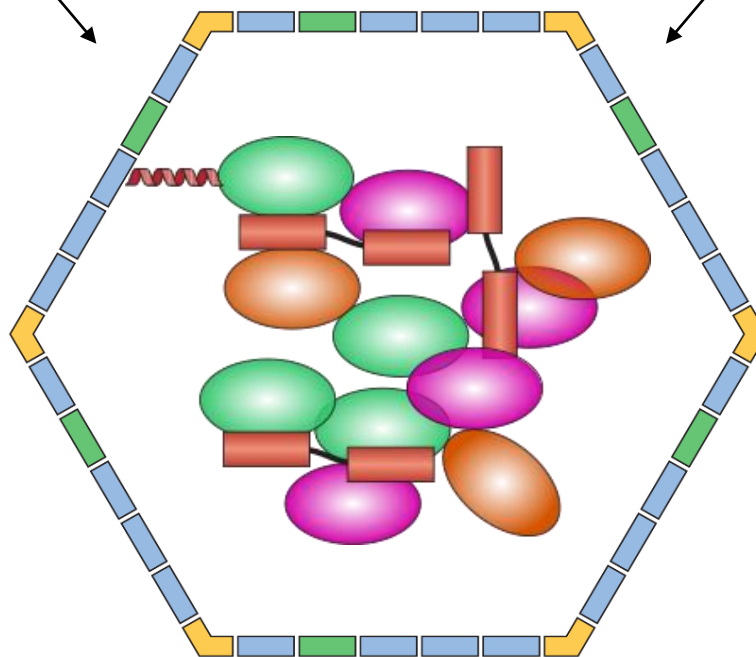




Mākslīgs enzimatiskais kodols



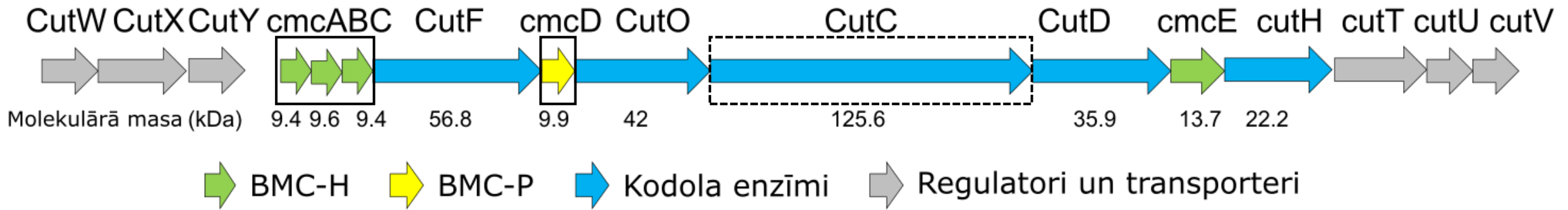
Proteīnu veidota čaula



## Darba mērķis

Analizēt GRM2 tipa bakteriālo mikrokompartmentu čaulas formu daudzveidību un iespējas tajā iepakot heterologus enzīmus.

# GRM2 lokusā kodētie proteīni

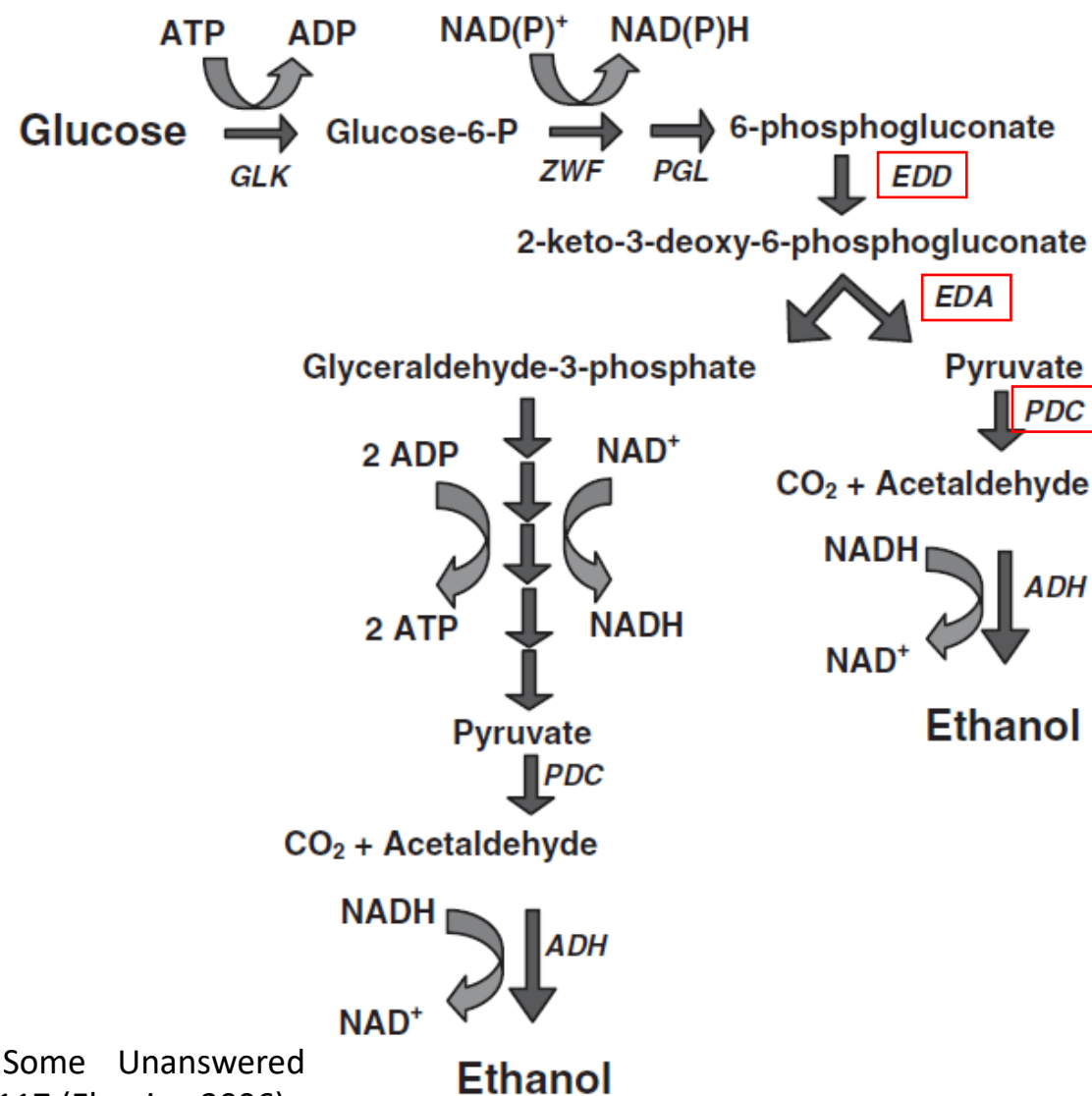


# Nenatīvu enzīmu iepakošana BMC čaulā

Izvēlēti trīs enzīmi no *Zymomonas mobilis* Entnera-Dudorova ceļa (etanola producēšana)

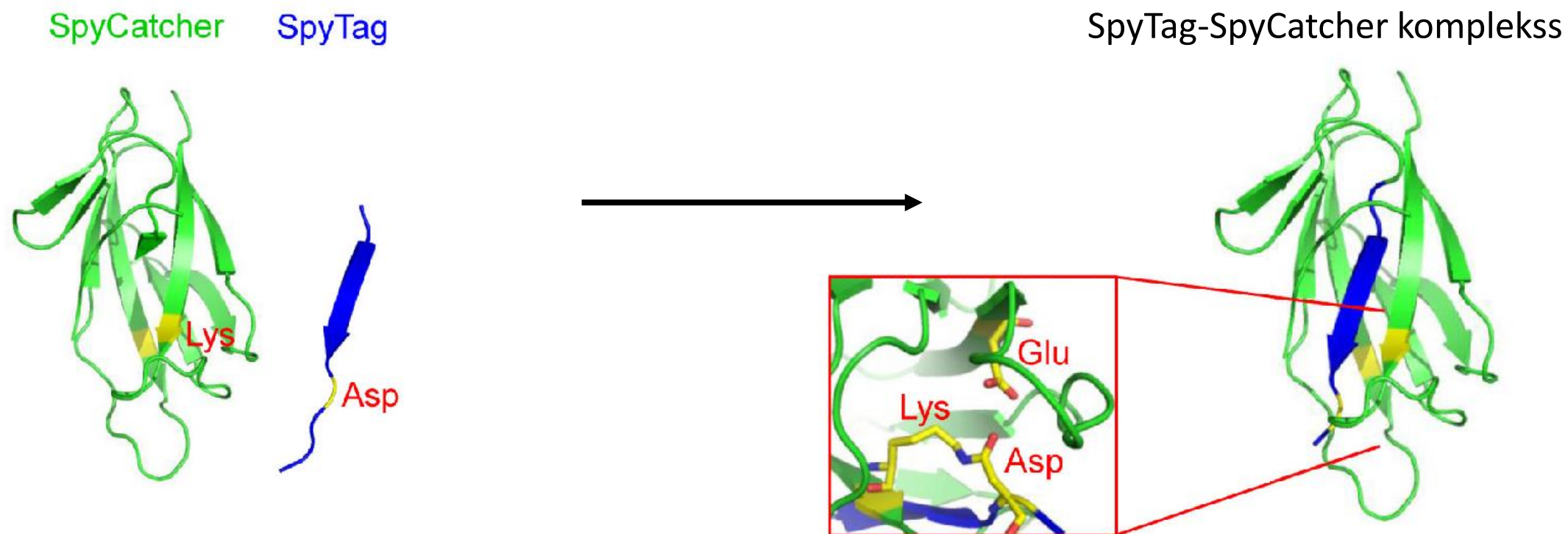
- 6-fosfoglukonāta dehidratāze (EDD);
- 2-keto-3-deoksi-6-fosfoglukonāta (KDPG) aldolāze (EDA);
- piruvāta dekarboksilāze (PDC).

Iepakošanas metode- *SpyTag/SpyCatcher* adhezīnu sistēma.



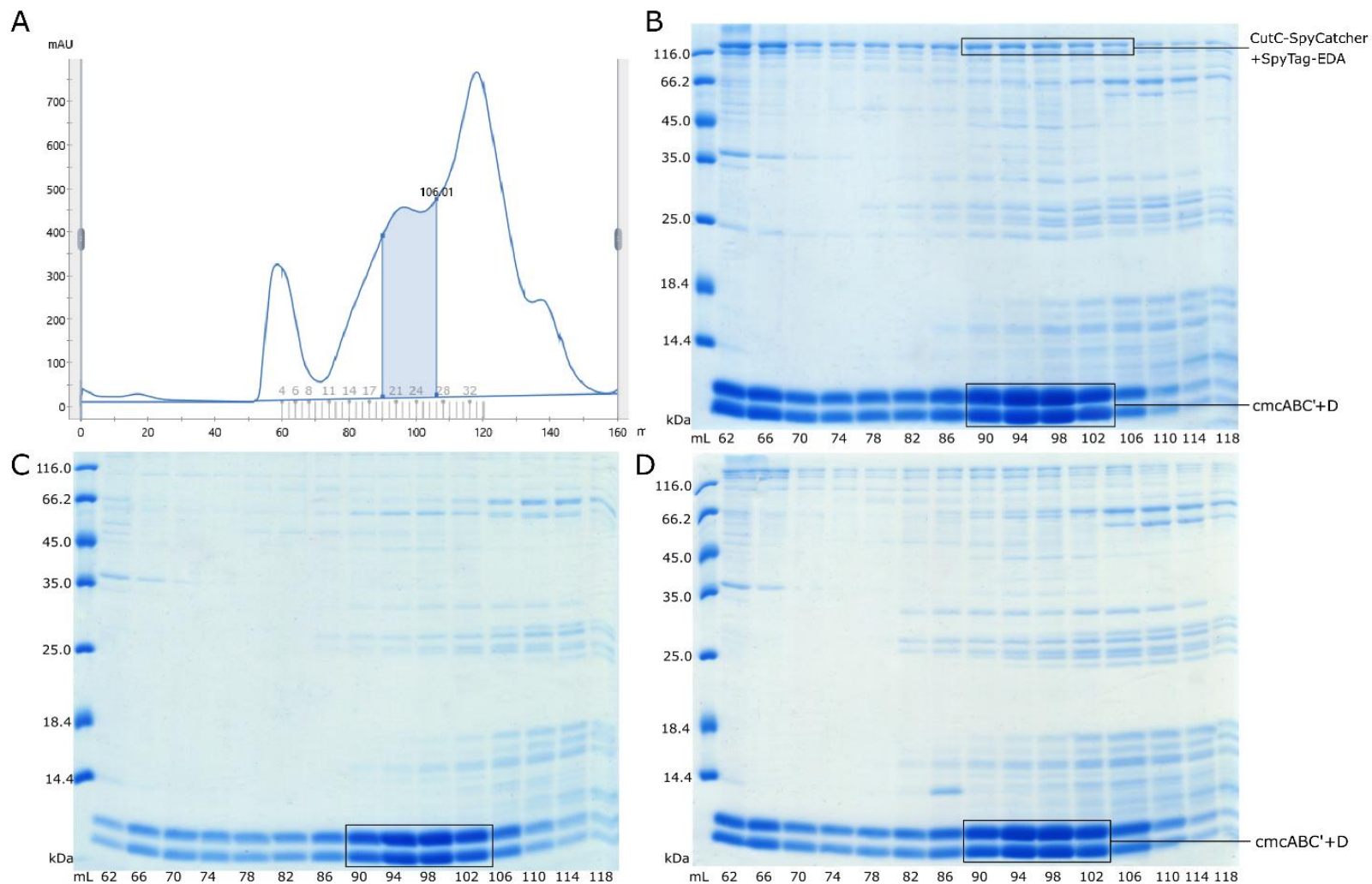


# SpyTag-SpyCatcher sistēma



# Nenatīvu enzīmu iepakojšana BMC čaulā Izmantojot CutC

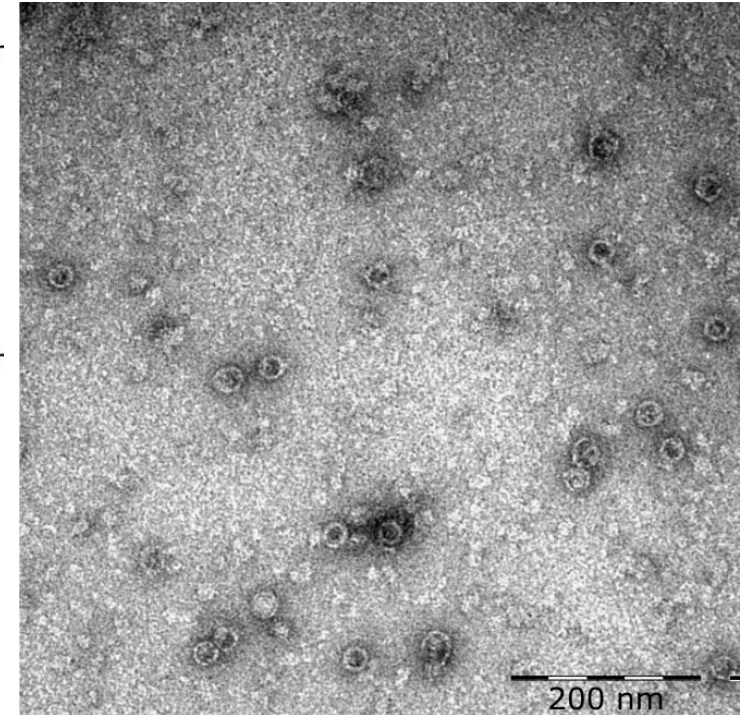
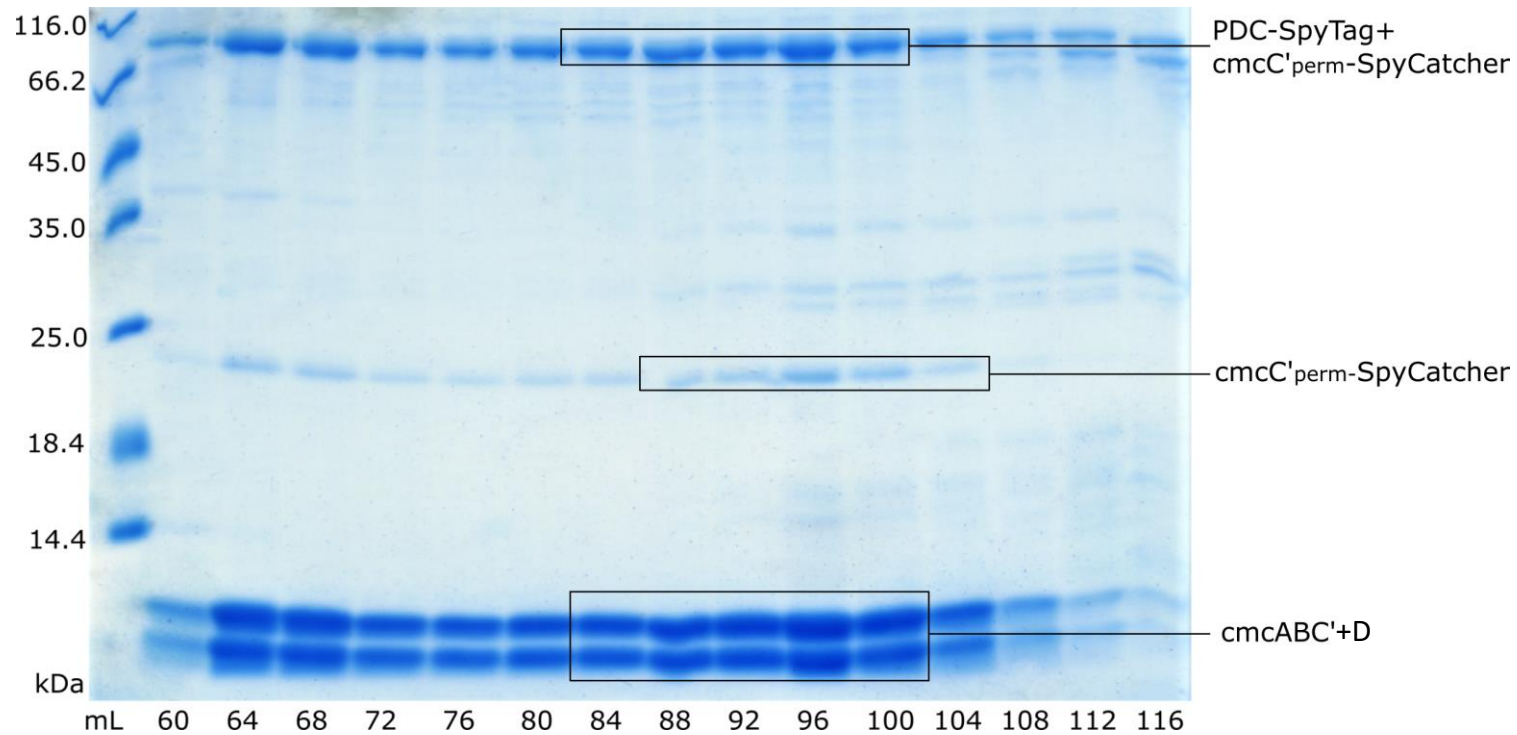
CutC- *Klebsiella pneumoniae* GRM2 tipa BMC raksturenzīms, bakalaura darbā konstatēta spēcīga mijiedarbība ar čaulas proteīniem



# Nenatīvu enzīmu iepakojšana BMC čaulā Izmantojot permutētu čaulas proteīnu

## Čaulas proteīns $\text{cmcC}'_{\text{perm}}$ - ar galiem uz iekšu

PDC

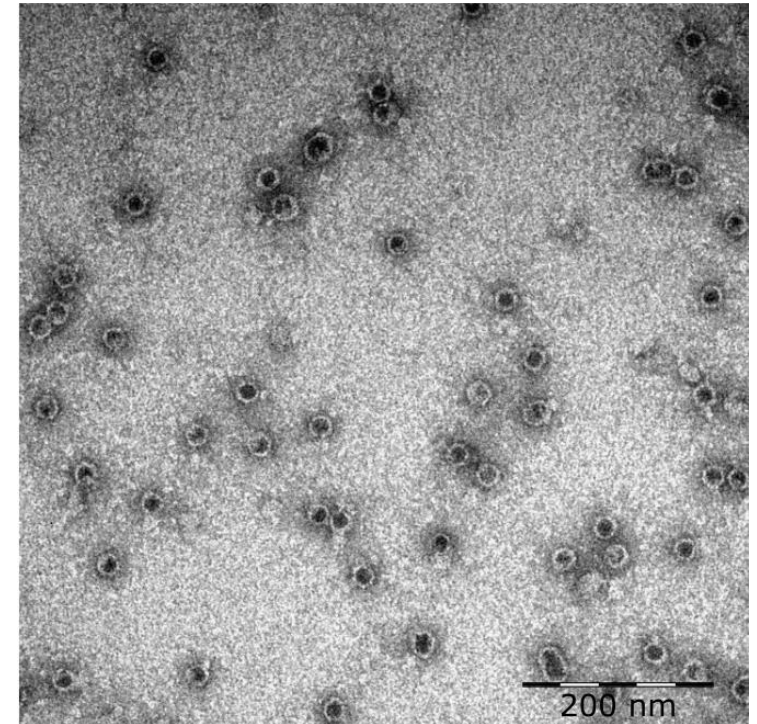
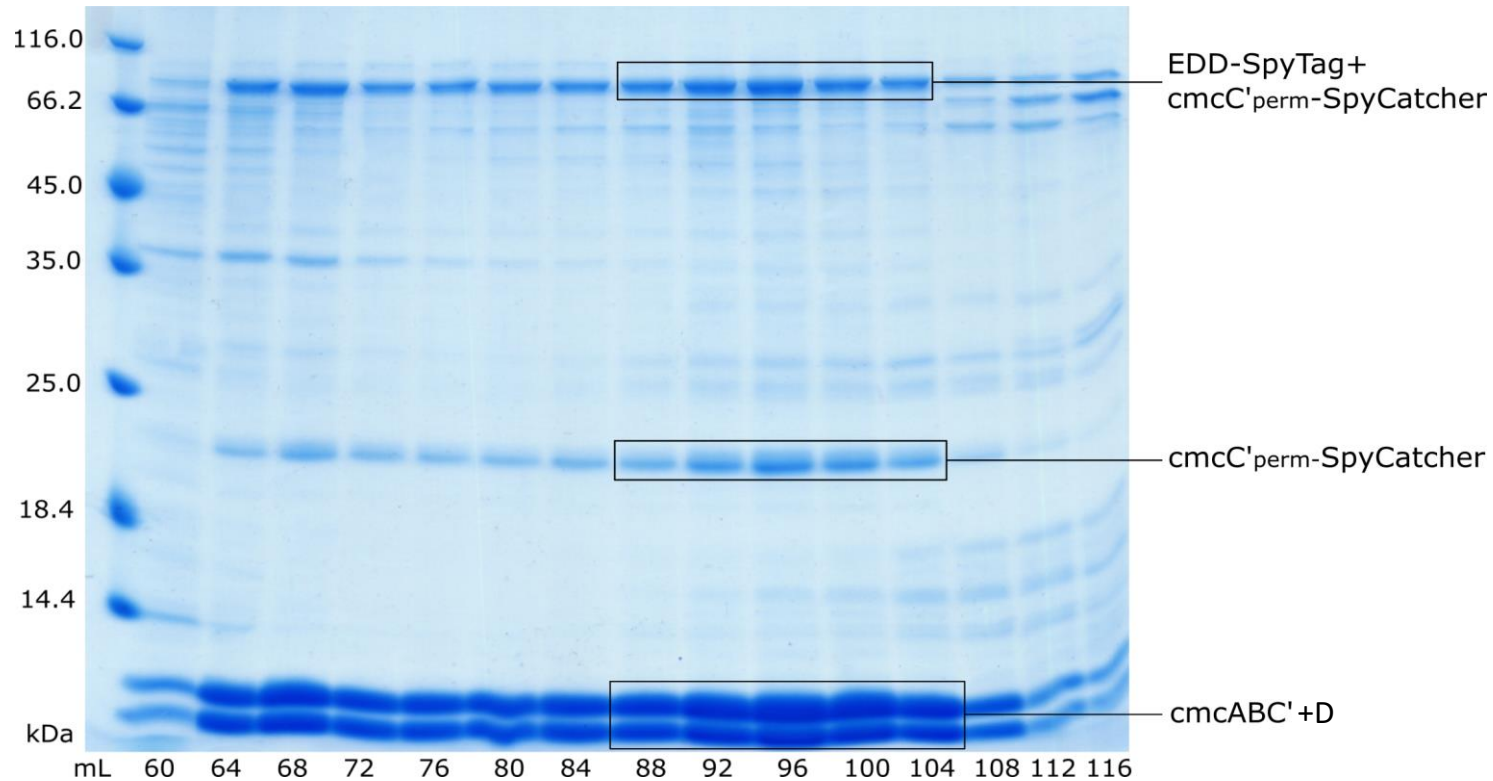




# Nenatīvu enzīmu iepakšana BMC čaulā Izmantojot permutētu čaulas proteīnu

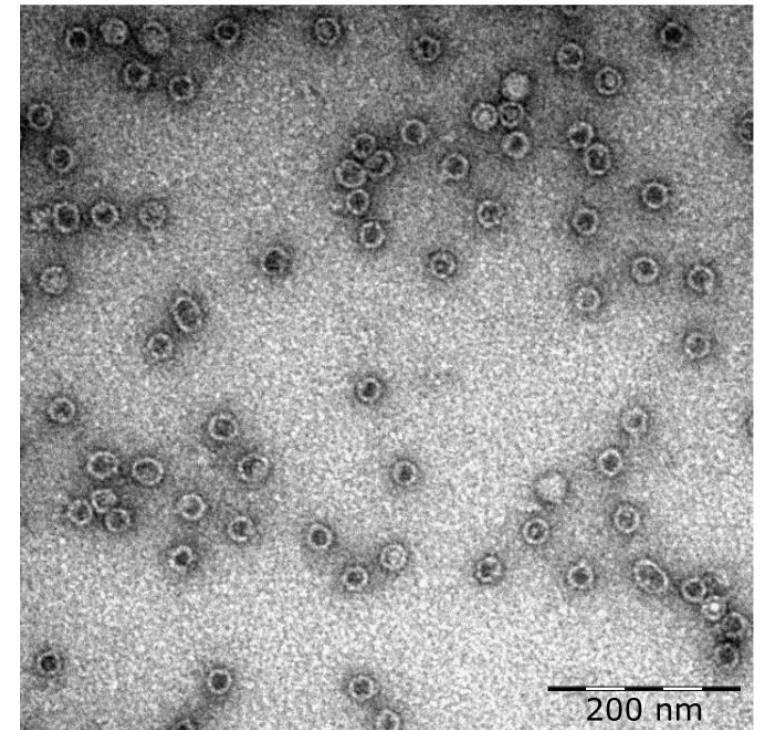
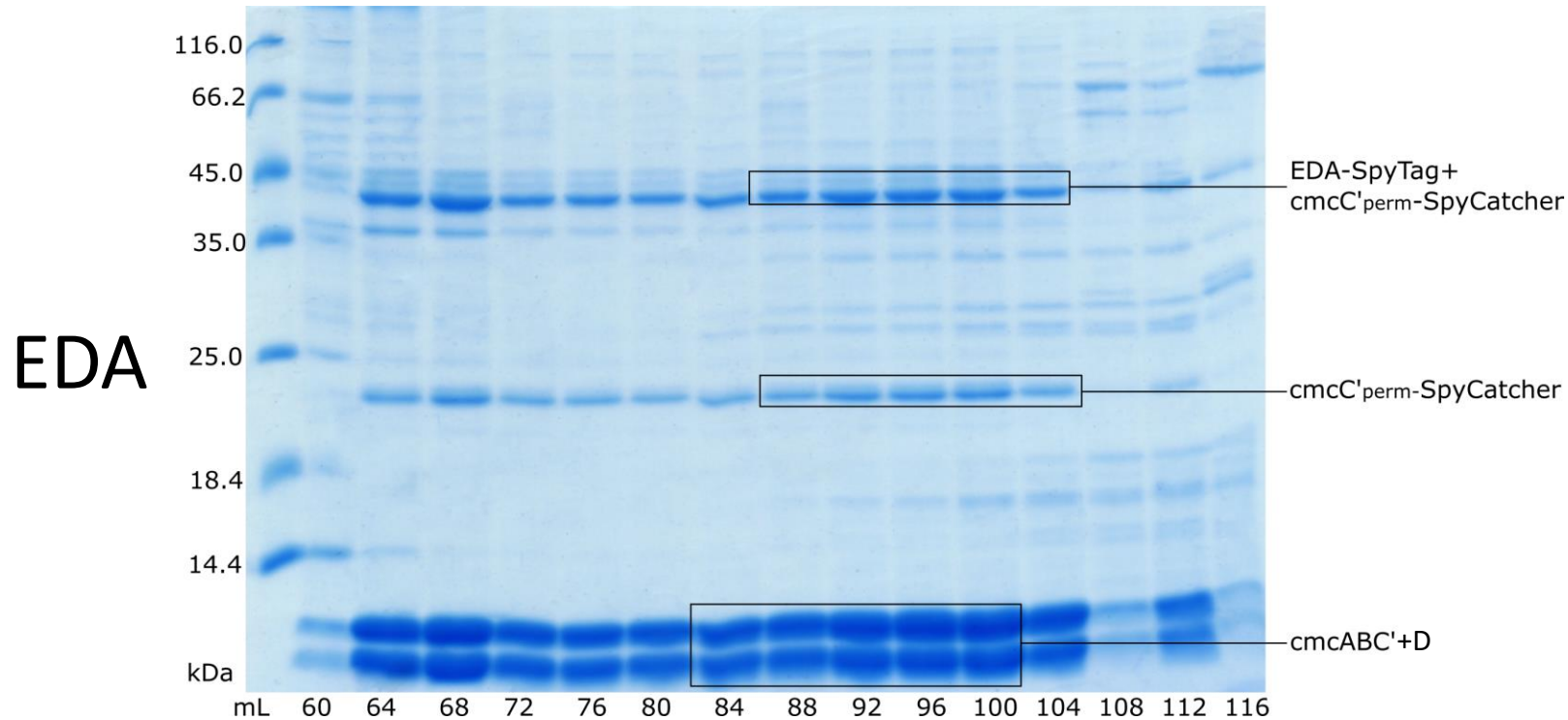
## Čaulas proteīns $cmC'_{perm}$ - ar galiem uz iekšu

EDD



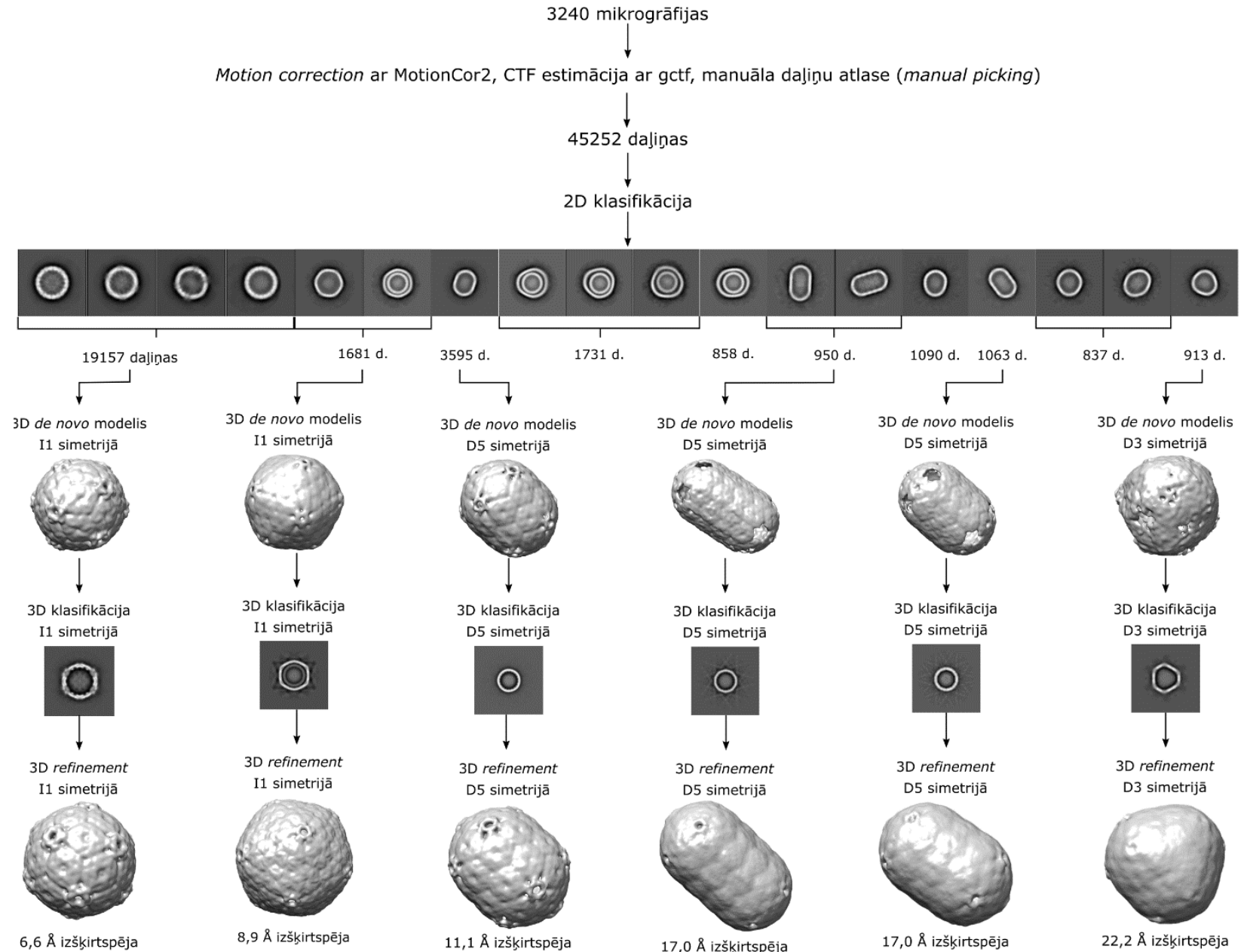
# Nenatīvu enzīmu iepakojšana BMC čaulā Izmantojot permutētu čaulas proteīnu

## Čaulas proteīns $cmcC'_{perm}$ - ar galiem uz iekšu



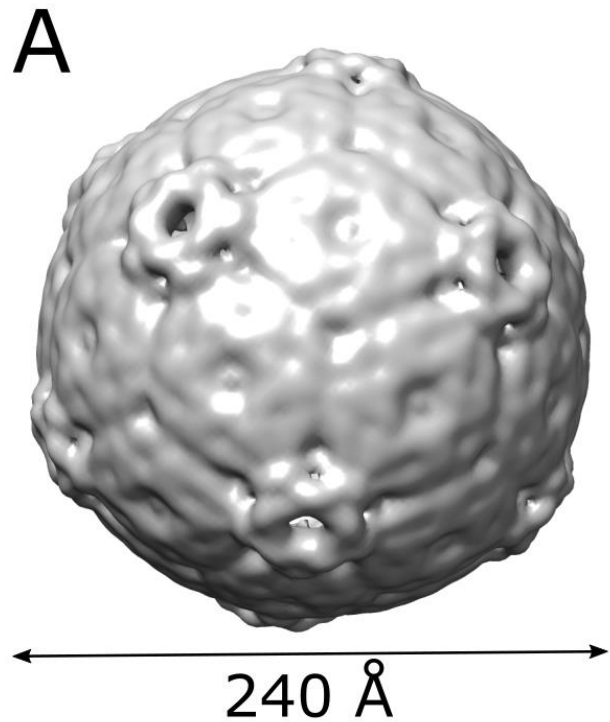


# BMC čaulas *Cryo-EM* struktūru noteikšana

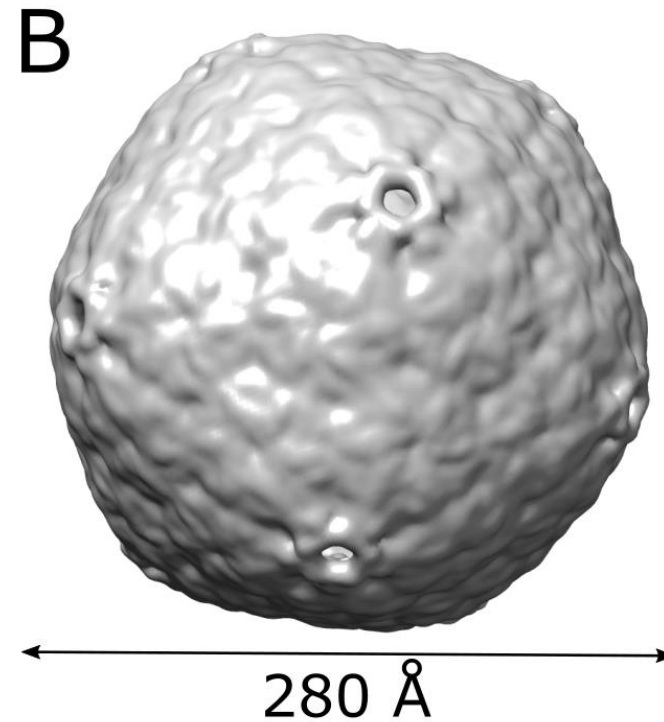


Krioelektronmikroskopijas  
(*cryo-EM*) struktūras  
cmcABC'+D ar CutC un AlcDH  
6,6-22,2 Å izšķirtspējā

Augstākās izšķirtspējas struktūras – pT=4 un pT=7 dextro ikosaedriskām  
BMC daļiņām

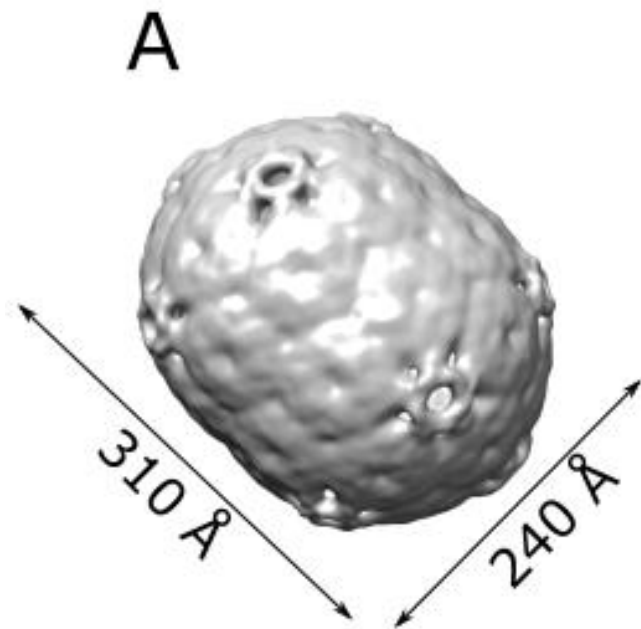


6,6 Å izšķirtspēja

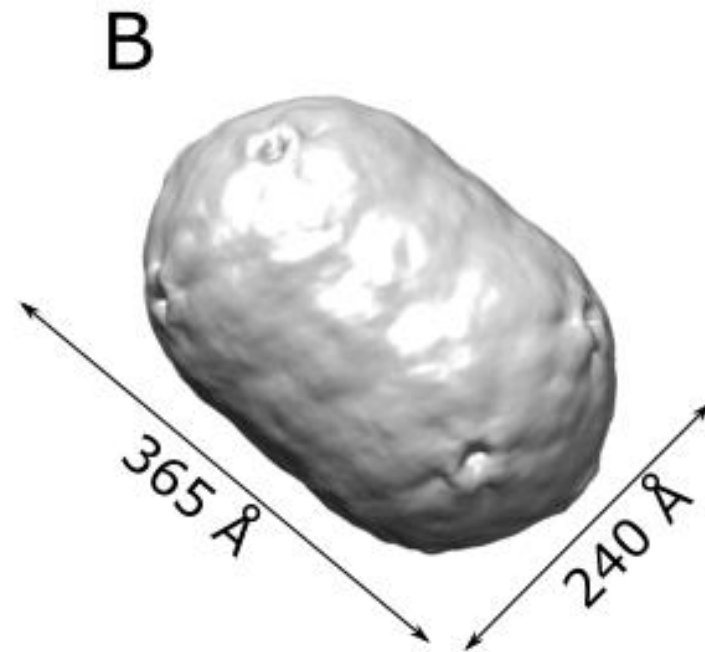


8,9 Å izšķirtspēja

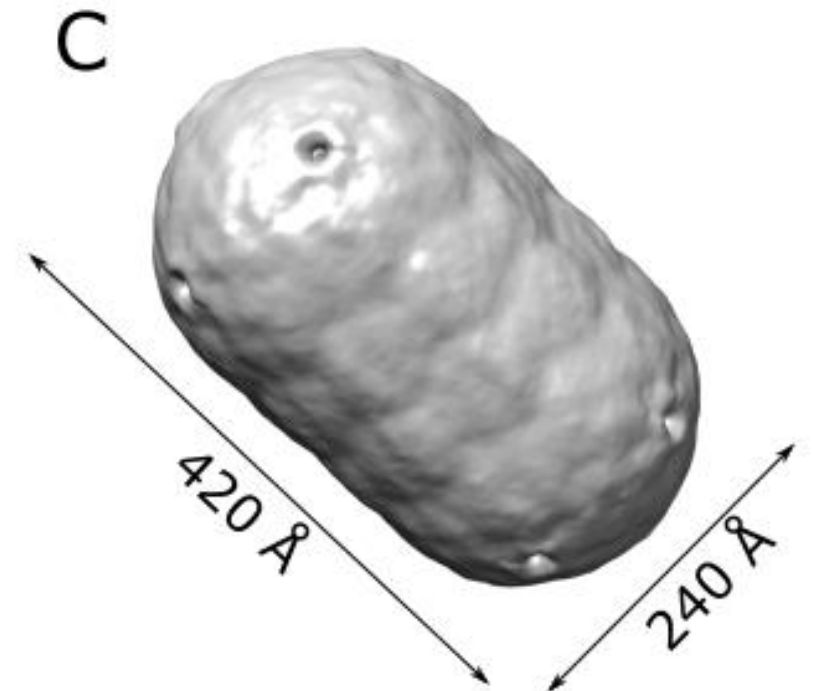
Trīs no struktūrām redzamas pagarinātas BMC daļiņas – veidojas,  $\rho T=4$  daļiņām pievienojot papildu heksamēru gredzenus.



+1 BMC-H gredzens (kopā 2)  
 $\rho T=4$ ,  $Q=6$   
11,1 Å izšķirtspēja



+2 BMC-H gredzeni (kopā 3)  
 $\rho T=4$ ,  $Q=8$   
17,0 Å izšķirtspēja



+3 BMC-H gredzens (kopā 4)  
 $\rho T=4$ ,  $Q=10$   
17,0 Å izšķirtspēja

# Secinājumi / tālākais virziens

- *SpyTag/SpyCatcher* sistēma veiksmīgi izmantojama nenatīvu enzīmu iepakojšanai.
- Permutēta čaulas proteīna izmantošana ļauj iepakot visus trīs analizētos heterologous enzīmus.
- Krioelektronmikroskopijā novērotā daļiņu daudzveidība liecina par spēju iepakot dažāda izmēra enzīmātiskā kodolu.
- Nepieciešams apstiprināt iepakoto enzīmu aktivitāti.
- Nākamais solis – vairāku enzīmu vienlaicīga iepakojšana.



LATVIJAS UNIVERSITĀTES  
FONDS



LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
**MIKROBIOĻĢIJAS  
UN BIOTEHNOĻĢIJAS  
INSTITŪTS**

*Mikro***Tik**



Latvijas Biomedicīnas  
pētījumu un studiju centrs  
biomedicīnas pētījumi un izglītība no gēniem līdz cilvēkam



**Paldies!**  
Laiks jautājumiem!