

Μοριακή Μικροβιακή Οικολογία


*Μοριακή αποτύπωση μικροβιακή κοινότητας
Μοριακές μέθοδοι υψηλής απόδοσης και
ανάλυσης*

Μοριακές μέθοδοι αποτύπωσης *Ενδιάμεσης Ανάλυσης*

- **DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)**
- **TRFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)**
- **A-RISA (Automated - Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)**
- **Βιβλιοθήκες κλώνων**

Μοριακή Μικροβιακή Οικολογία

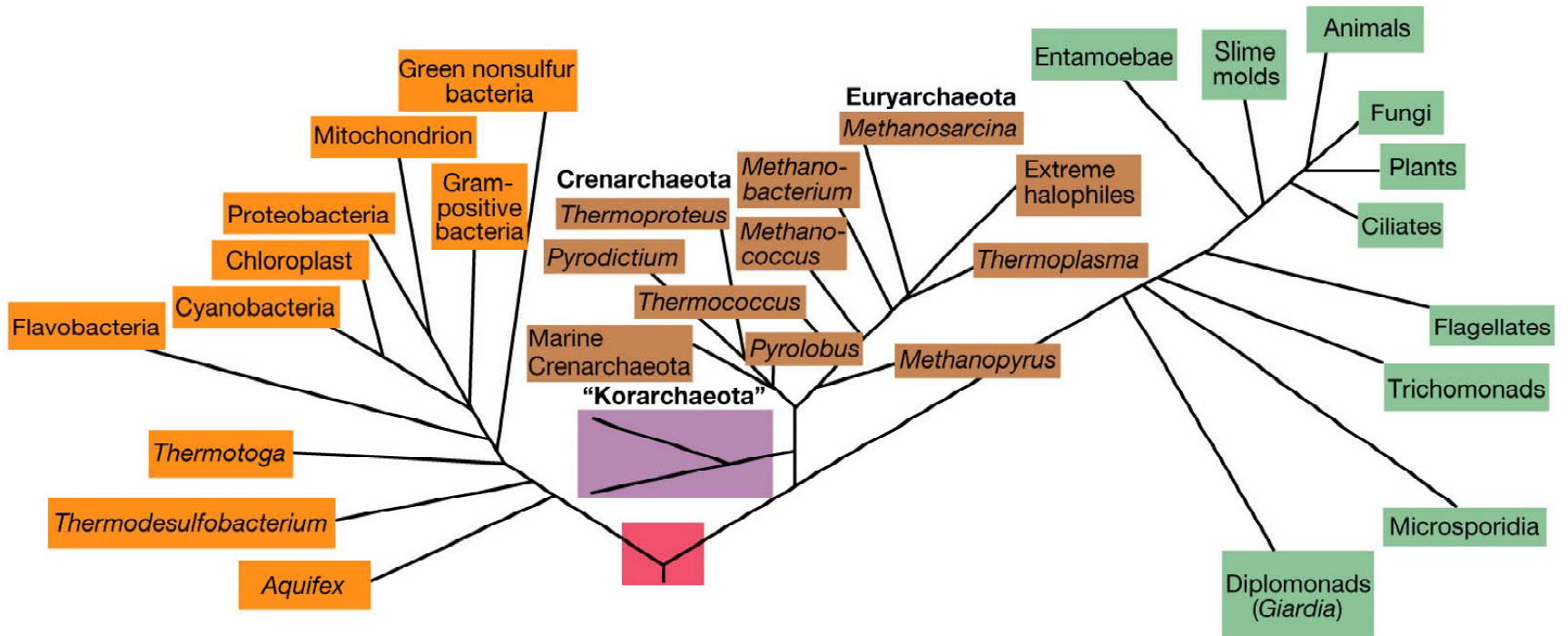
Τι μας προσφέρει η μοριακή μικροβιακή οικολογία;

- Διεύρυνε την εικόνα που είχαμε για την μικροβιακή ποικιλότητα στο περιβάλλον (1-10%  95-100%)
- Οδήγησε στην ανακάλυψη νέων οικογενειών και φύλλων που δεν γνωρίζαμε ότι υπήρχαν πχ. *Acidobacteria*, *Archaea*
- Οδήγησε σε επανάσταση στην ταξινομική διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών όπως οι Δενδρόμορφοι Μυκορριζικοί Μύκητες του Φύλλου *Glomeromycota*

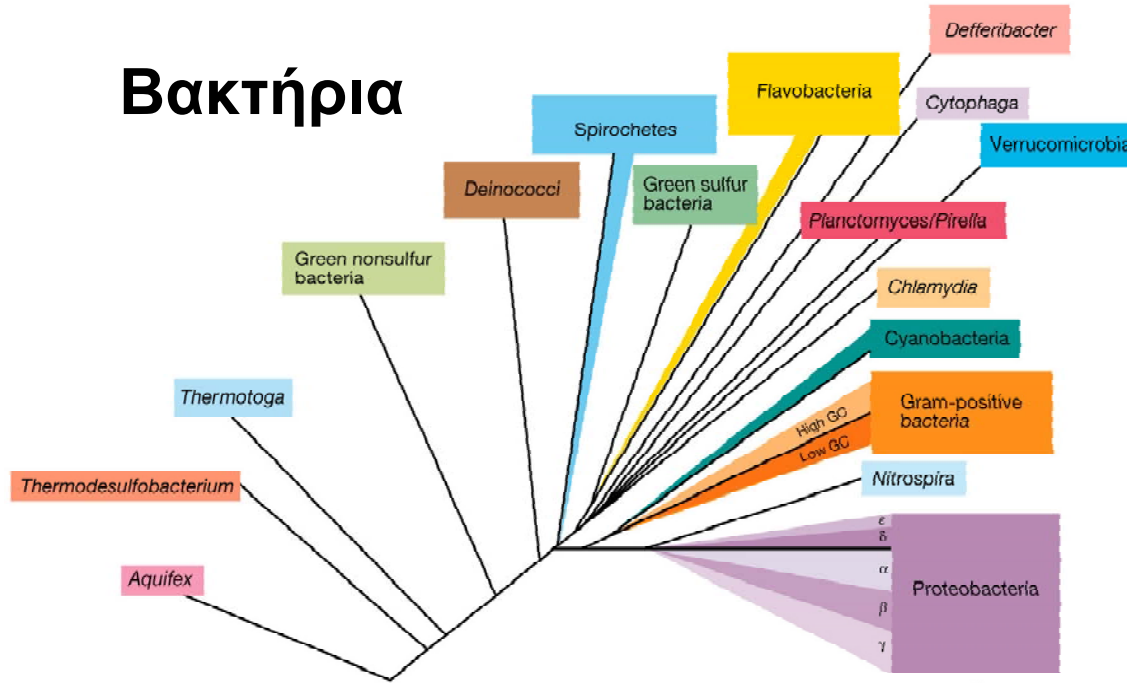
Bacteria

Archaea

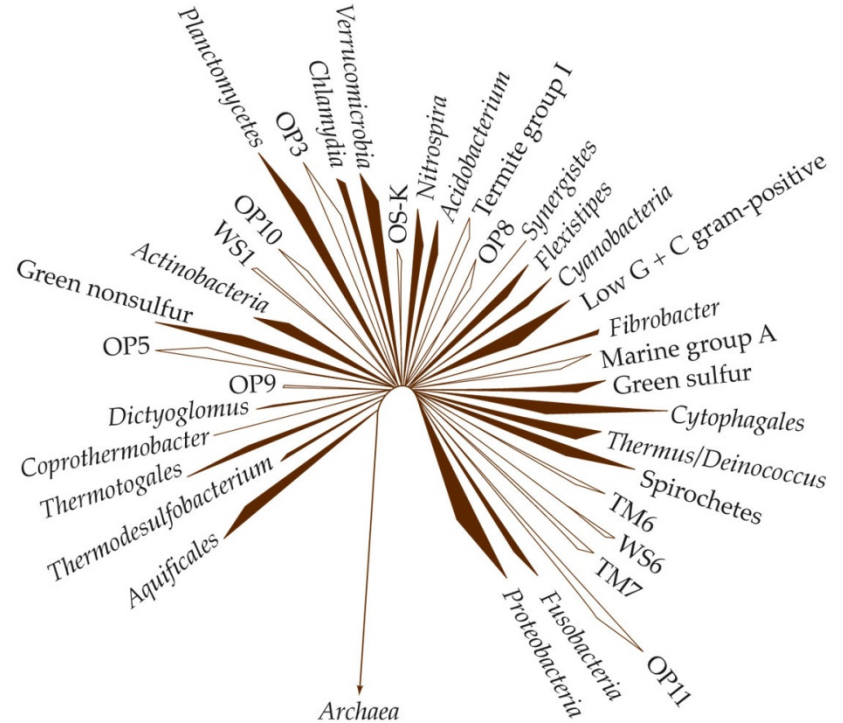
Eukarya

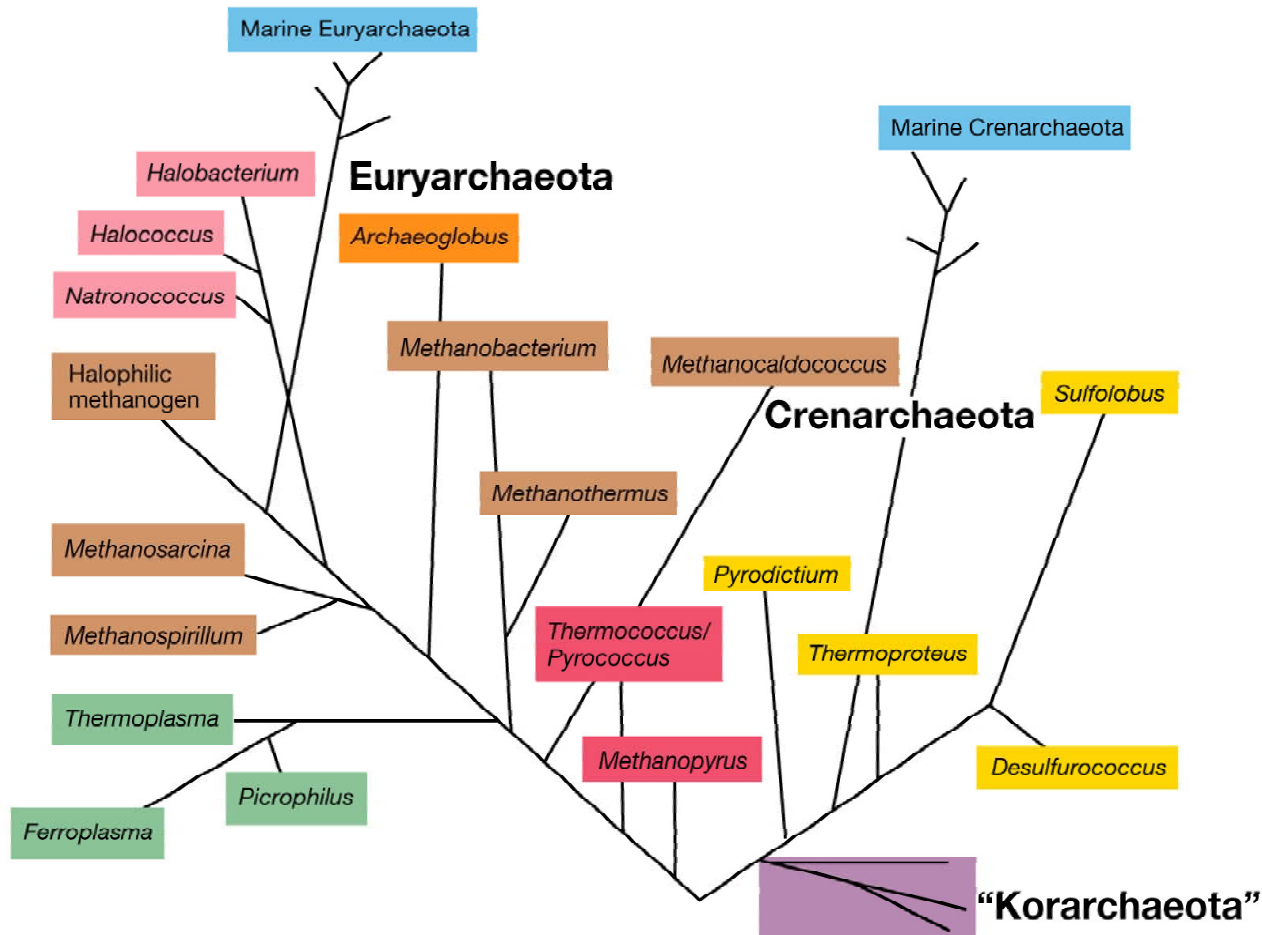


Βακτήρια



Με σκούρες καφέ γραμμές φύλλα για τα οποία δεν υπάρχει αντιπρόσωπος που να έχει καλλιεργηθεί ως σήμερα σε θρεπτικά μέσα

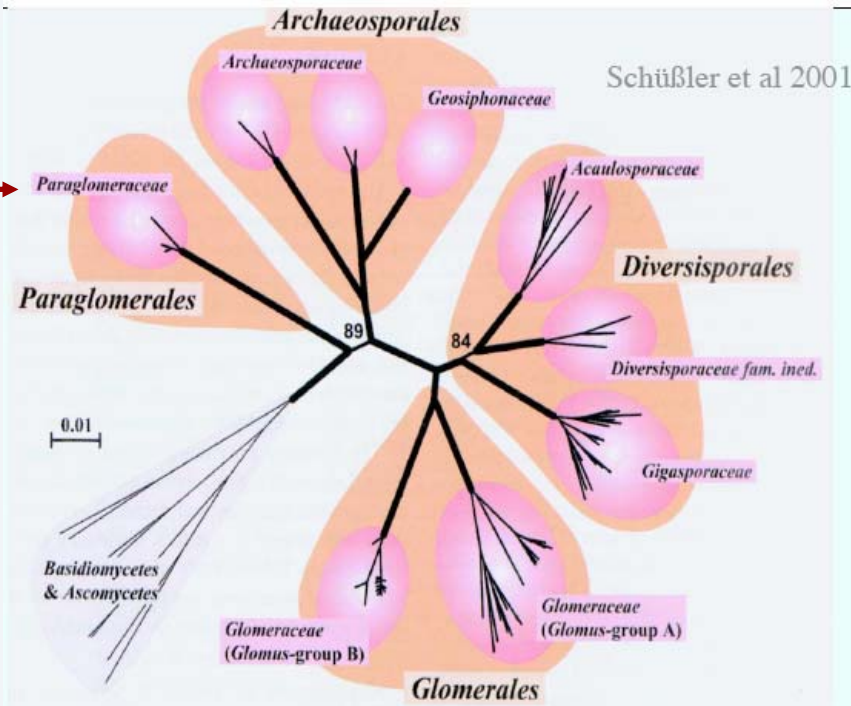
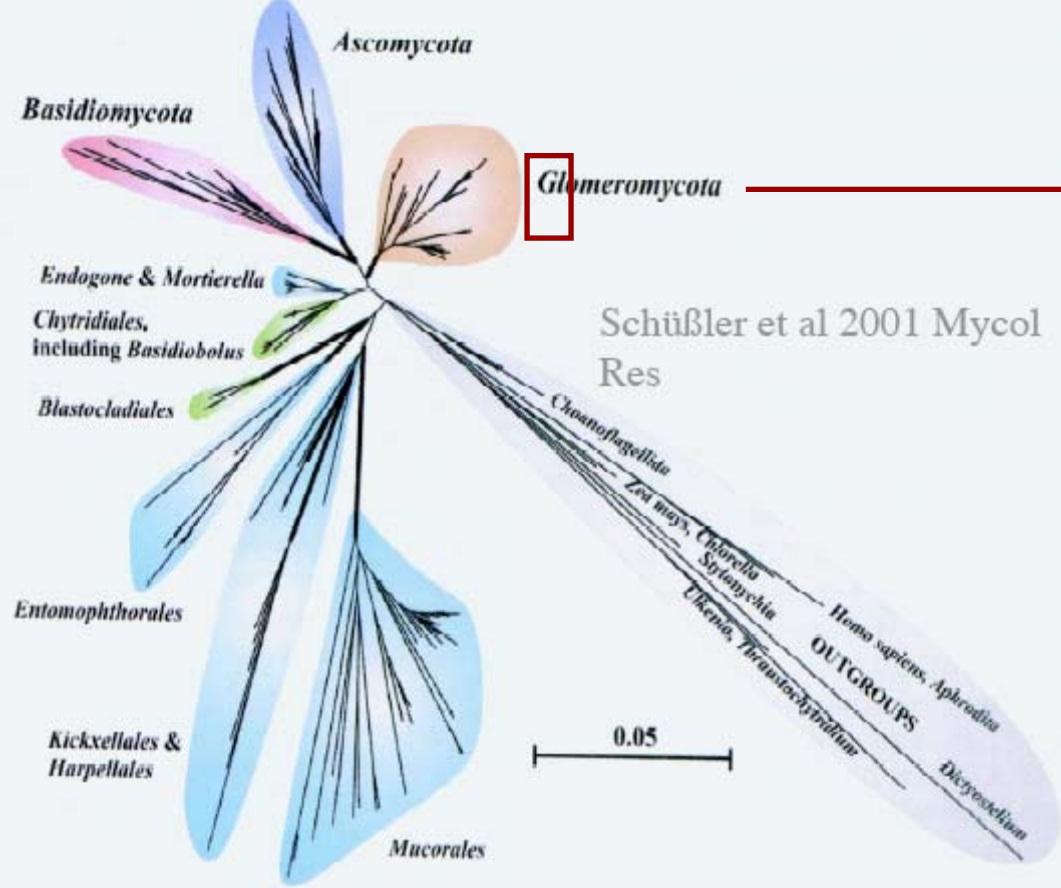




Crenarchaeota: Θερμόφιλα κυρίως που χρησιμοποιούν θειούχες ουσίες ως δότες ή δέκτες ηλεκτρονίων

Euryarcheota: μεθανιογόνα, αλοφιλα, θερμόφιλα

Korarcheota: Σε θερμές πηγές κανένα δεν έχει καλλιεργηθεί ως σήμερα

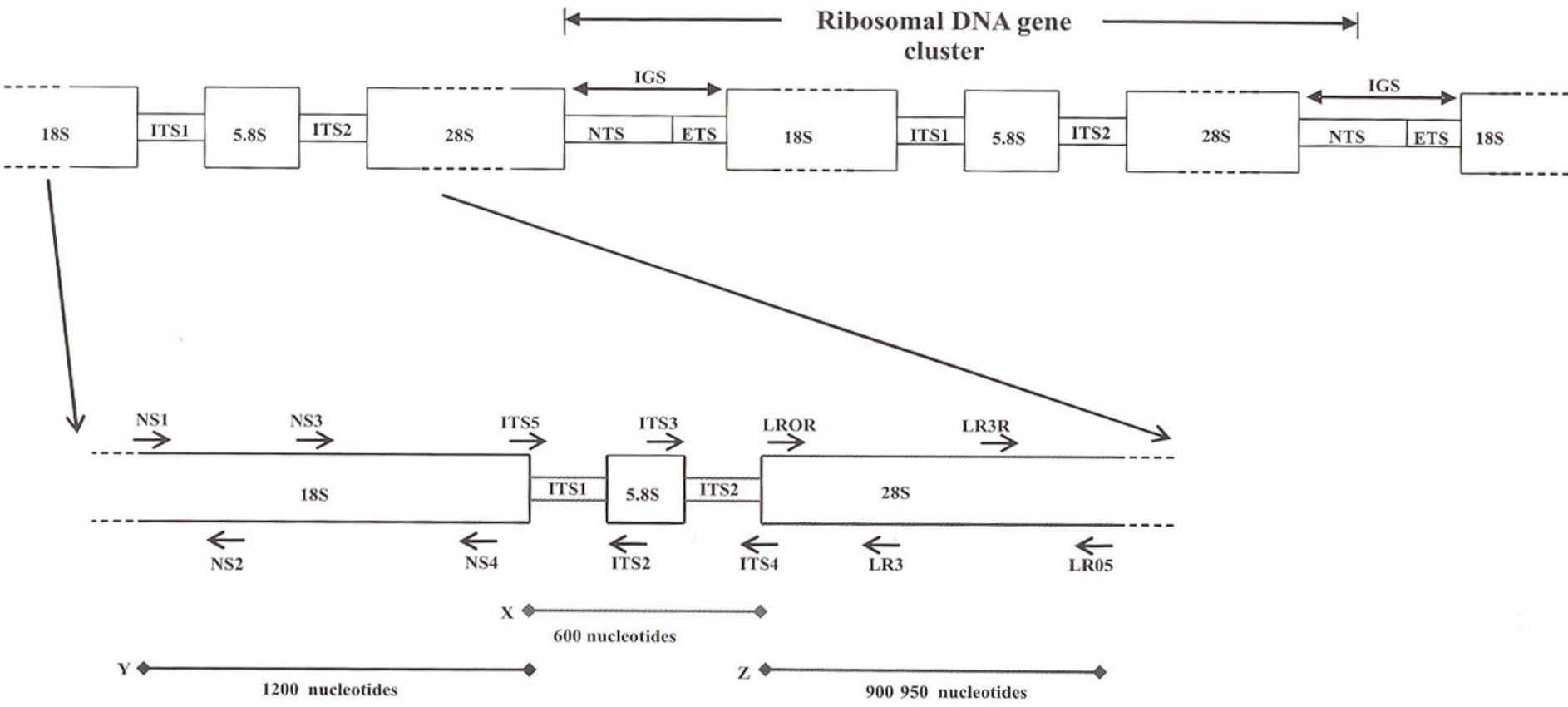


Όλες οι μυκόρριζες είναι μύκητες και ιδιαίτερα οι δενδρόμορφες μυκόρριζες που ανήκουν όλες στην τάξη Glomeromycota

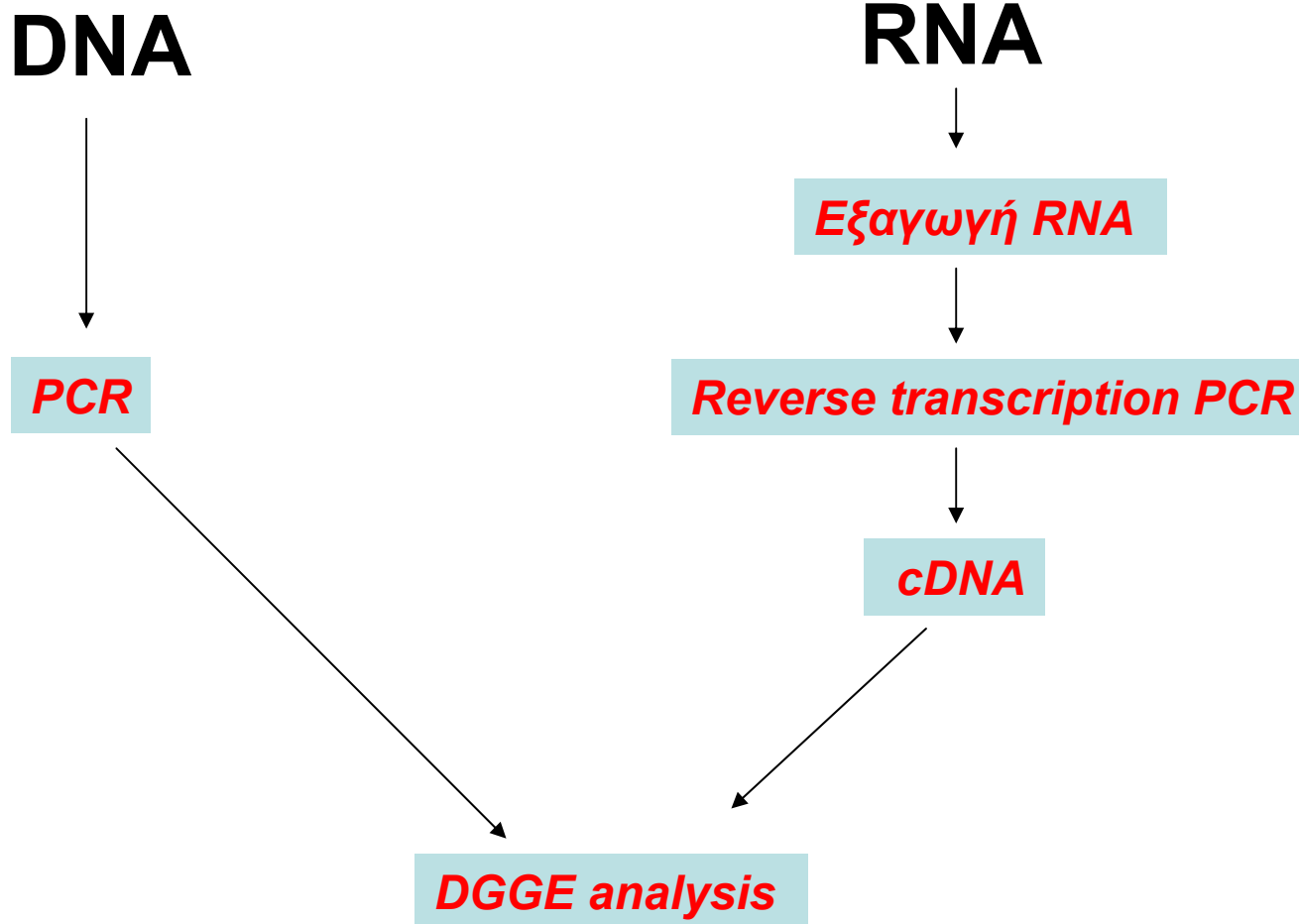
Το πιο σημαντικό βήμα



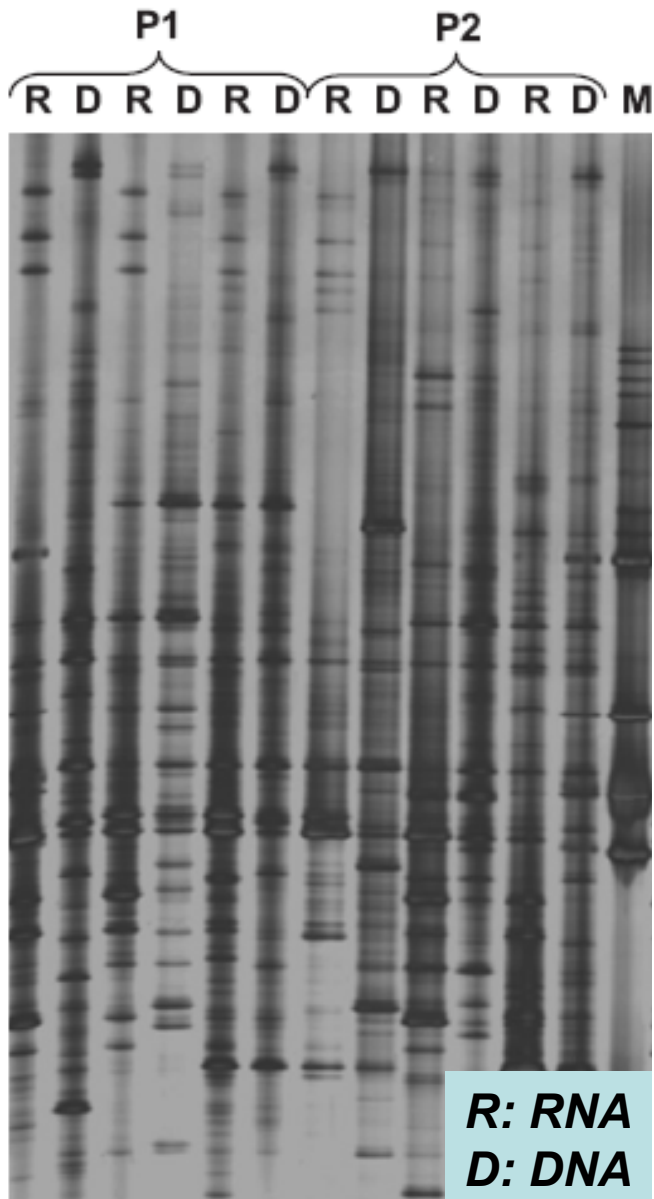
Φυλογενετικές πληροφορίες για την ταυτότητα των μικροοργανισμών (ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών) λαμβάνουμε από συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος όπως είναι οι **ριβωσμικές υπομονάδες (γονίδια 18S, 16S - 23S, 28S)** καθώς και οι περιοχές **ITS** και **IGS**



Μπορούμε να στοχεύσουμε μόνο στο DNA;



Διαφορά στην μοριακή ανάλυση μεταξύ DNA και RNA



RNA: η ανάλυση αναφέρεται στα δραστήρια μέλη της μικροβιακής κοινότητας που αναπτύσσονται καθώς ο αριθμός των αντιτύπων rRNA είναι ανάλογος με τον ρυθμό ανάπτυξης του κάθε μικροοργανισμού

DNA: η ανάλυση περιλαμβάνει και ζωντανούς και νεκρούς μικροοργανισμούς των οποίων το DNA δεν έχει ακόμη αποσυντεθεί

Επιλογή εκκινητών για PCR

- **Universal Εκκινητές** για το γονίδιο 16s rRNA βακτηρίων (8f – 1512r ή 63f-1087)
ριβωσωμική περιοχή των μυκήτων (ITS1F – ITS4)
- **Universal Εκκινητές** για την ITS

Επιλογή εκκινητών για PCR

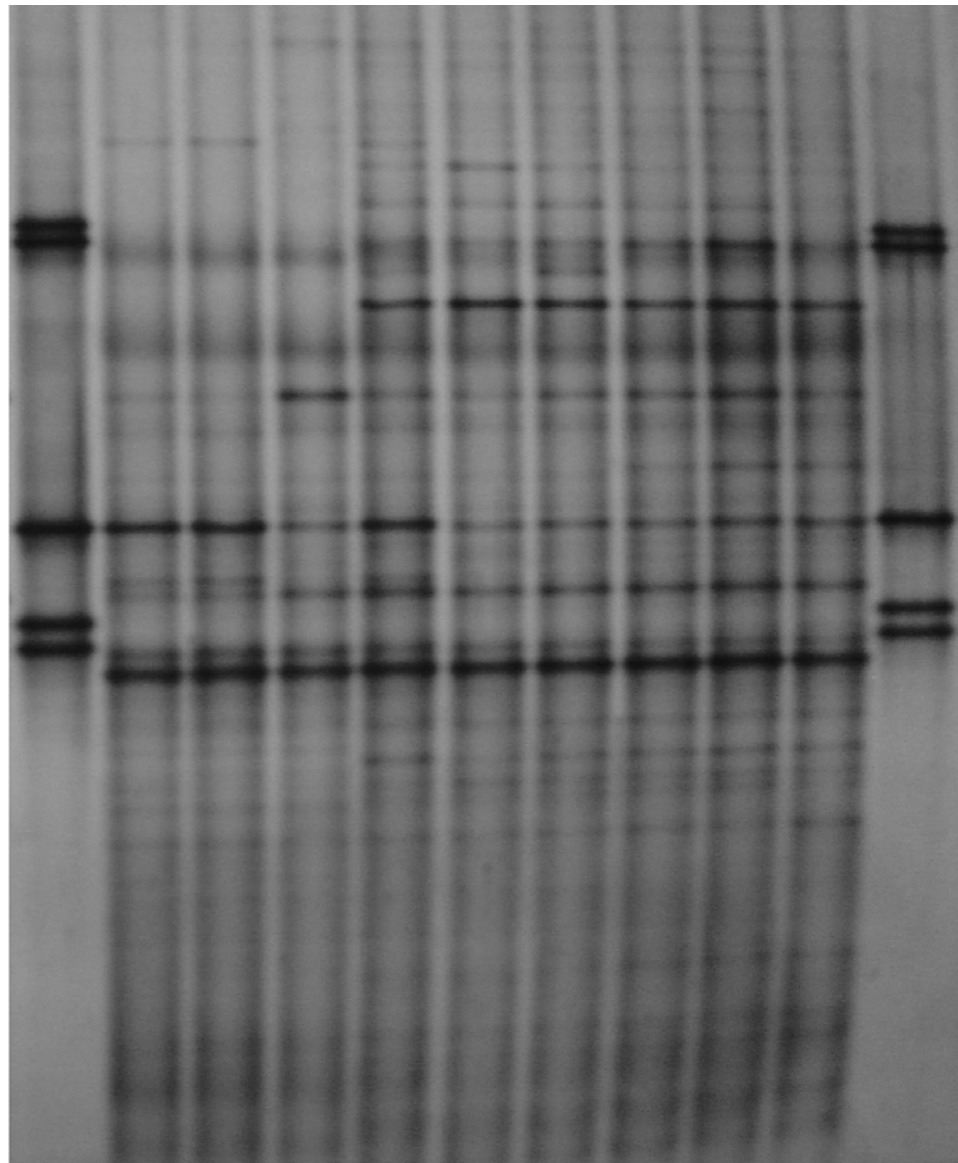
Εξειδικευμένοι εκκινητές για ομάδες μικροοργανισμών που βασίζονται είτε στο **16S rRNA** ή σε **γονίδια λειτουργικά** (*nifH*, *amoA*)

Primers

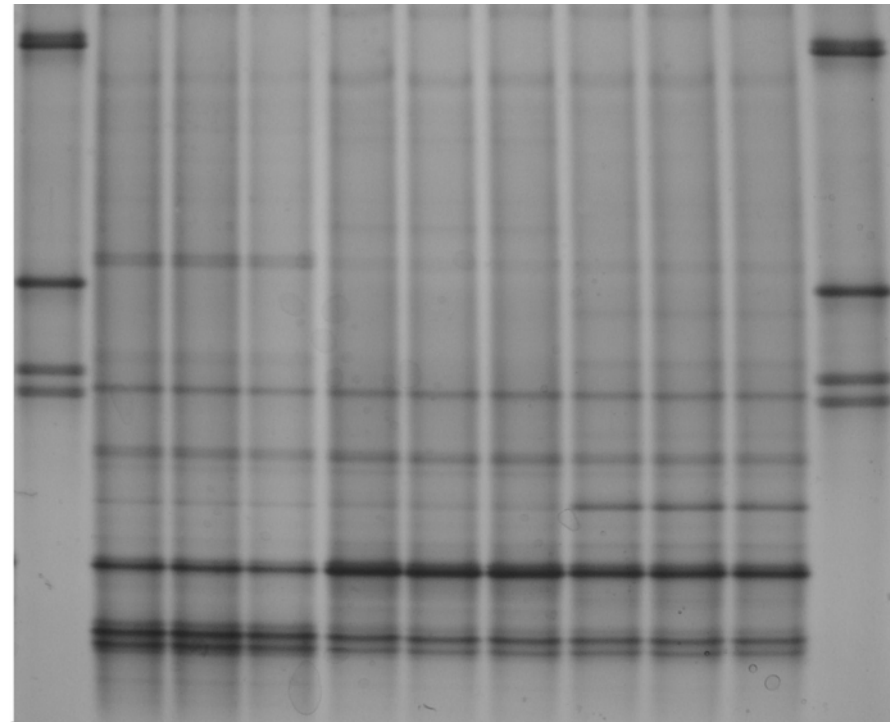
Microbial group

CTO189f ABC – CTO654r (13)	Ammonia-oxidizing bacteria
F243 – 513r (14)	Actinomycetes
Sphingo108f – Sphingo420r (15)	Sphingomonas
ITS1F – ITS4B (16)	Basidiomycetes
ITS1F – ITS4A (17)	Ascomycetes
NS31 – AM1 (18) and NS31 – Glo1 (19)	Arbuscular mycorrhiza fungi (AMF)

**Συνολική βακτηριακή κοινότητα
PCR με universal εκκινητές**



**Κοινότητα νιτροποιητικών
βακτηρίων**



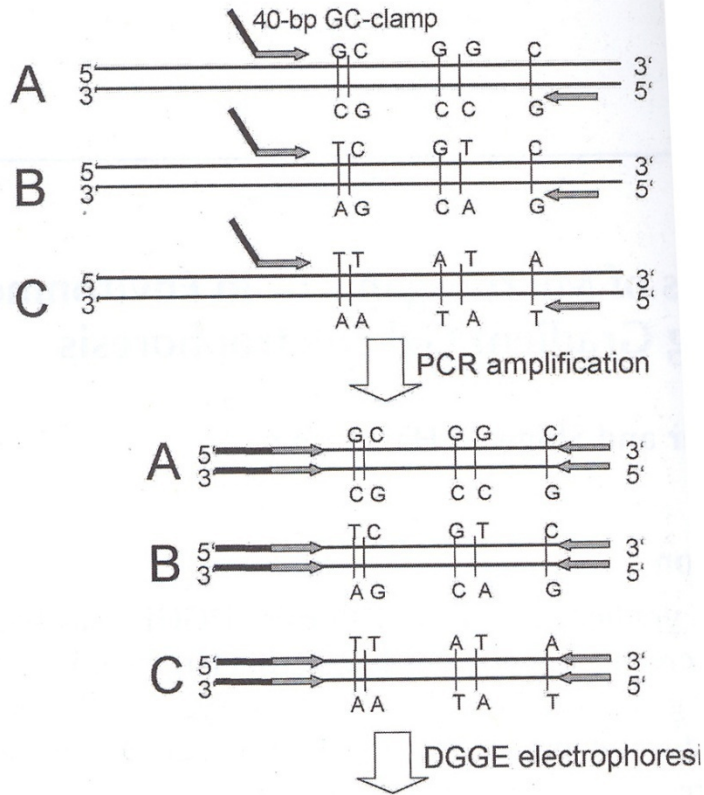
Μοριακές μέθοδοι αποτύπωσης της μικροβιακής ποικιλότητας

- **DGGE**
- TRFLP
- A-RISA
- Βιβλιοθήκες κλώνων

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

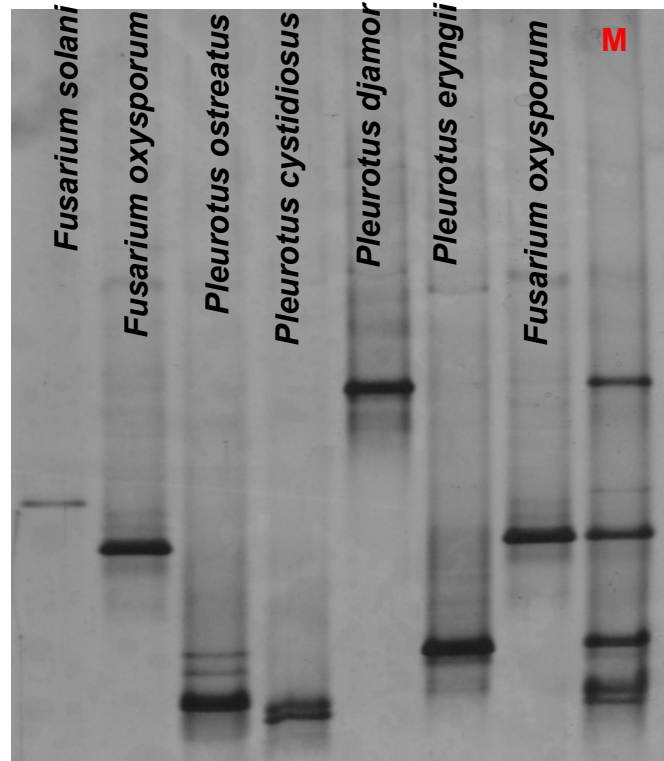
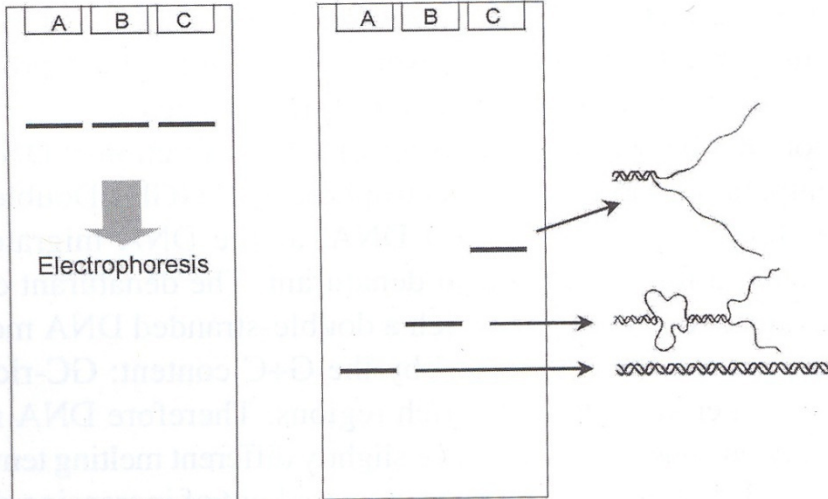
Ηλεκτροφόρηση με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών

- Διαχωρίζει θραύσματα DNA/RNA ιδίου μήκους (<600 bp) που ανήκουν σε διάφορα μέλη της μικροβιακής κοινότητας με βάση διαφορές στην αλληλουχία τους σε ένα περιβάλλον ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμίδης **με αυξανόμενη συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών**
- Αναπτύχθηκε αρχικά για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων σε διάφορα γονίδια και εφαρμογές αλλά οι *Muyzer et al., (1993)* το χρησιμοποίησαν για πρώτη φορά στην μοριακή μικροβιακή οικολογία



PCR όπου ο ένας εκκινητής κατέχει μια ουρά (clamp) 40 βάσεων εμπλουτισμένη σε GC

5' - CGCCCGCCGCGCGCGGCG
GGCGGG GCGGGGGGCACGG GGGG
 -GCCTACGGGAG
 GCAGCAG-3'



Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

Ηλεκτροφόρηση με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών

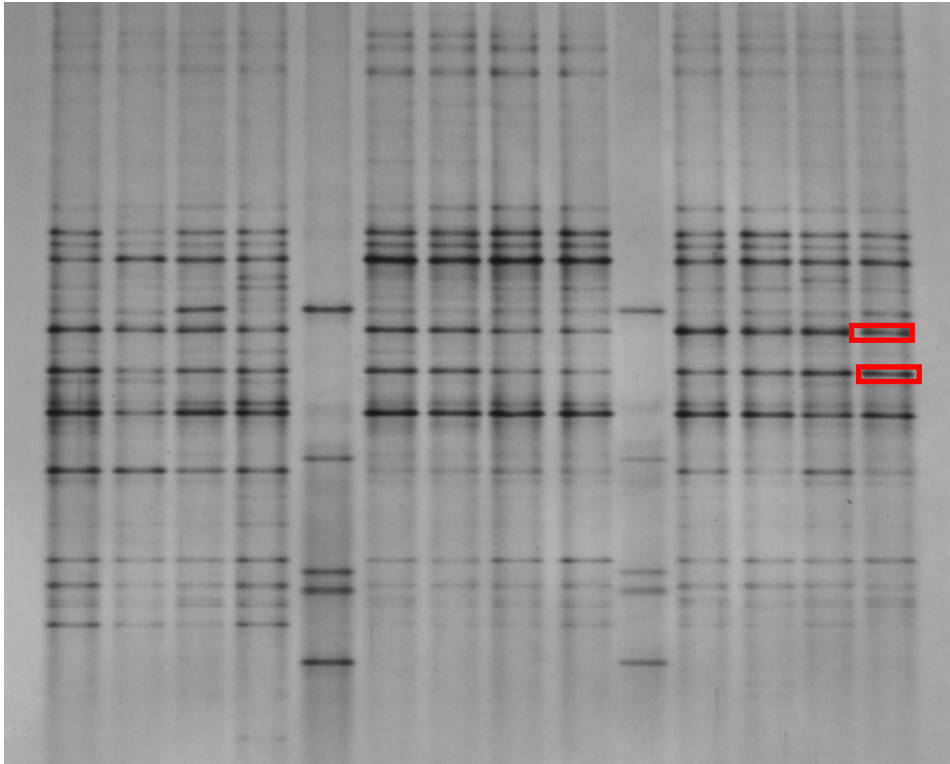
Θεωρητικά η μέθοδος DGGE:

1. Ανιχνεύει και μέλη της μικροβιακής κοινότητας που αποτελούν >1% της μικροβιακής κοινότητας **(ΝΑΙ ή ΌΧΙ;)**
2. Κάθε ζώνη στο αποτύπωμα αντιστοιχεί σε ένα μικροοργανισμό **(ΝΑΙ ή ΌΧΙ;)**
3. Κάθε μικροοργανισμός δίνει μια μόνο ζώνη στο μοριακό αποτύπωμα **(ΝΑΙ ή ΌΧΙ;)**
4. Παρέχει μόνο μερικώς ποσοτική ανάλυση της μικροβιακής κοινότητας (Ένταση ζώνης δεν σημαίνει απαραίτητα και υψηλό πυκνότητα του μικροοργανισμού που αντιστοιχεί σε αυτή την ζώνη)

Εφαρμογές DGGE

- Αξιολόγηση μεταβολών στην μικροβιακή κοινότητα από έκθεση σε εξωγενείς καταπονήσεις (ρύπανση)
- Αξιολόγηση χρονοεξαρτώμενων μεταβολών στην ριζόσφαιρα φυτών
- Αξιολόγηση μεταβολών στην μικροβιακή κοινότητα από ελευθέρωση κάποιου βιολογικού παράγοντα
- Αξιολόγηση αποτελεσματικότητας μεθόδων εξαγωγής DNA/RNA
- Αξιολόγηση μεταβολών στην μικροβιακή κοινότητα κατά την διάρκεια απομόνωσης μικροοργανισμών με συγκεκριμένο φαινότυπο

Μπορούμε να βρούμε την ταυτότητα των μικροοργανισμών που αντιστοιχούν στις ζώνες;



Προβλήματα

1. Μικρό τμήμα (<300 bp) που δίνει περιορισμένες φυλλογενετικές πληροφορίες για την ταυτότητα του μικροοργανισμού
2. Χρονοβόρα και επίπονη διαδικασία καθαρισμού και επιβεβαίωσης της ζώνης

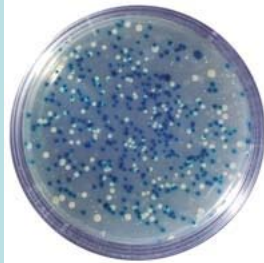
- Αποκοπή των ζωνών από την πηκτή
- Καθαρισμός
- Αλληλούχιση

Μπορούμε να βρούμε την ταυτότητα των μικροοργανισμών που αντιστοιχούν στις ζώνες;

Εξαγωγή DNA από τα περιβαλλοντικά δείγματα

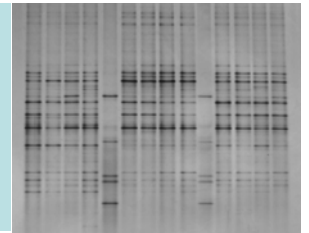
PCR με επιλεγμένους εξειδικευμένους εκκινητές

Δημιουργία βιβλιοθήκης κλώνων
Ένθεση –
Μετασχηματισμός –
colony PCR



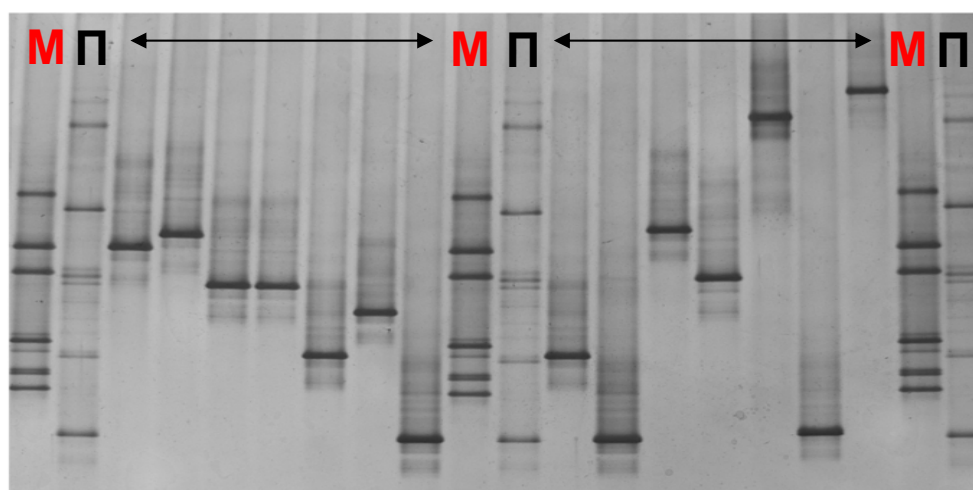
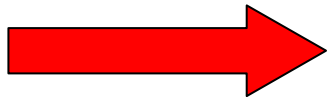
Αξιολόγηση κλώνων σε DGGE

DGGE
περιβαλλοντικών
δειγμάτων

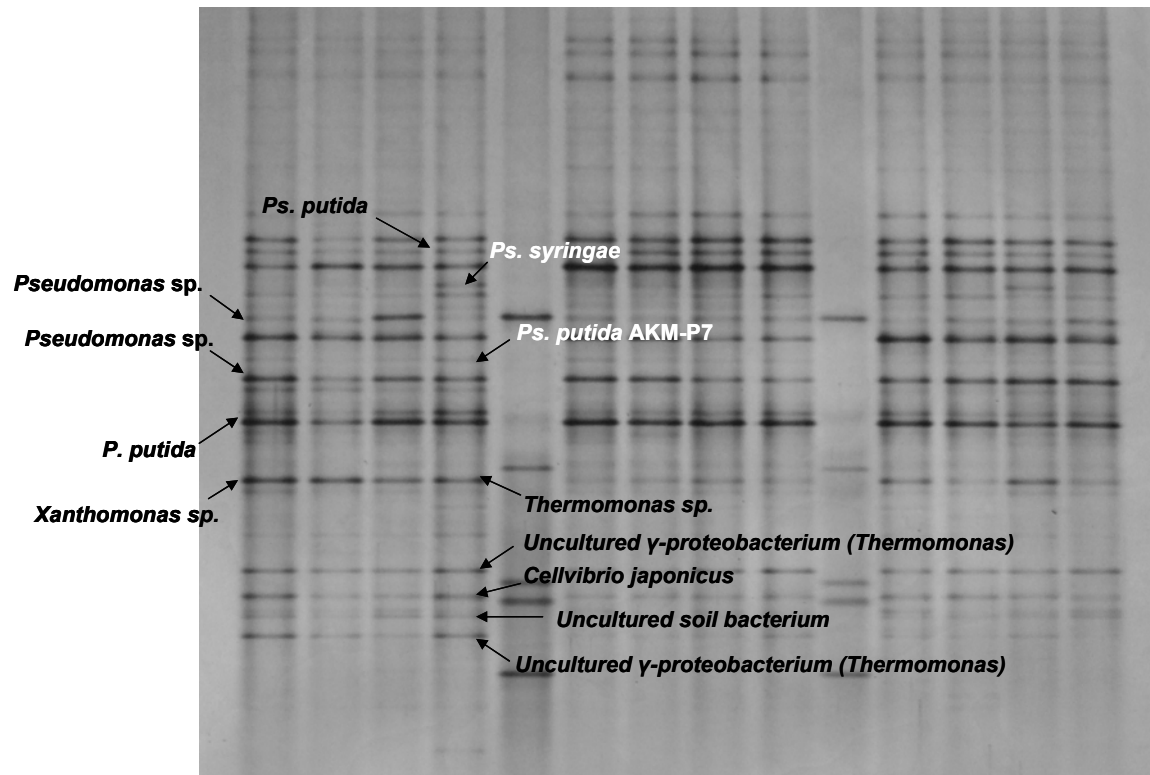


Αλληλούχιση επιλεγμένων κλώνων που παρουσιάζουν ταυτόσημη ηλεκτροφορητική κινητικότητα με ζώνες στο περιβαλλοντικό αποτύπωμα

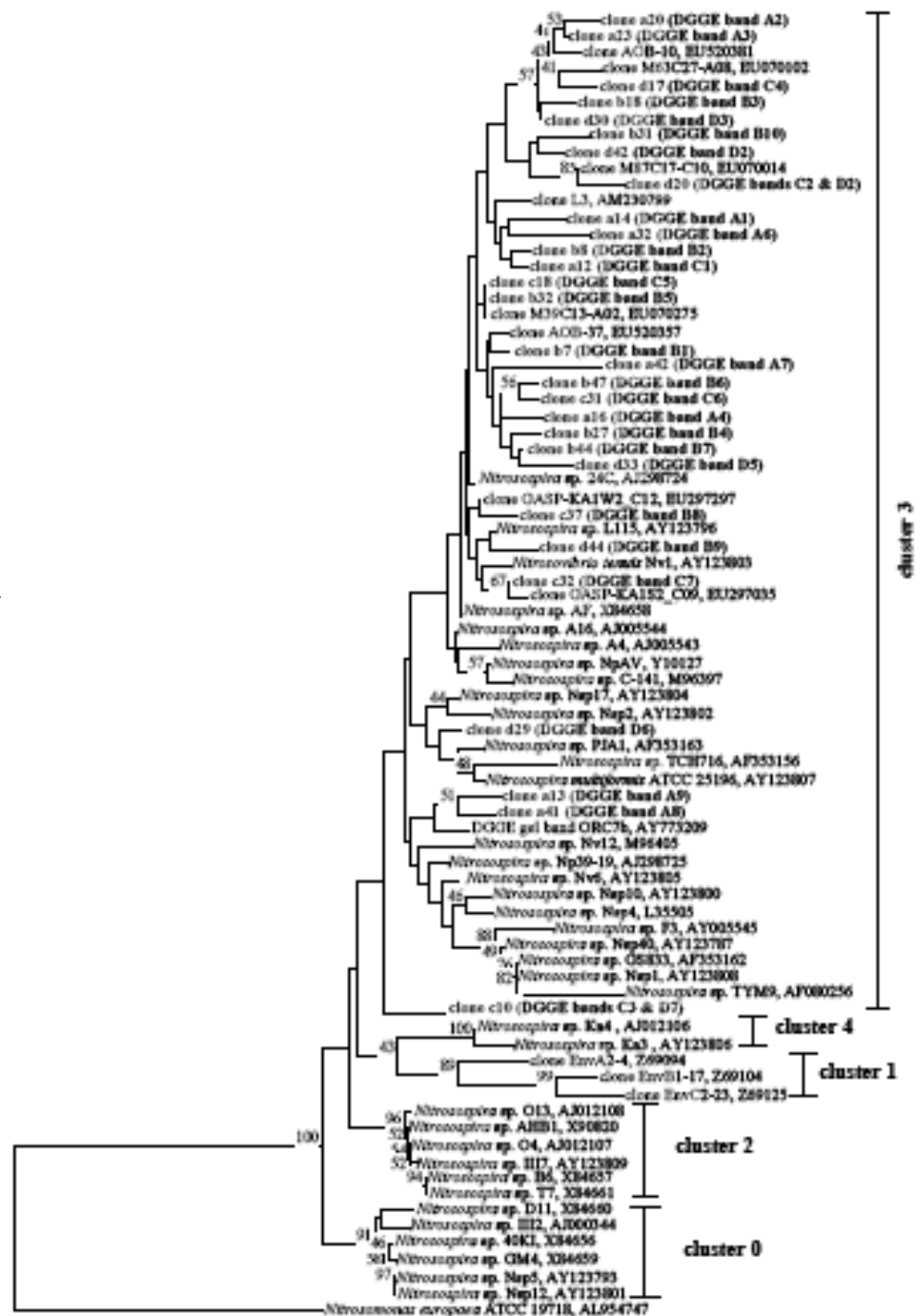




Αλληλούχιση επιλεγμένων κλώνων



0.02



Πλεονεκτήματα DGGE

- Προσφέρει μια γρήγορη αποτύπωση της σύστασης της μικροβιακής κοινότητας
- Επιτρέπει την αξιολόγηση εξωγενών επιδράσεων στην μικροβιακή κοινότητα με ψηφιοποίηση και στατιστική ανάλυση των αποτυπωμάτων
- Επιτρέπει σε συνδυασμό με βιβλιοθήκες κλώνων την δυνατότητα ταυτοποίησης μελών της μικροβιακής κοινότητας
- Επιτρέπει την μελέτη εξειδικευμένων μικροβιακών ομάδων με την επιλογή κατάλληλων εκκινητών

Μειονεκτήματα DGGE

- Επιτρέπει την ανίχνευση μόνο των κυριάρχων μελών της μικροβιακής κοινότητας (10^6 κυττάρα/g εδάφους)
- Μια ζώνη μπορεί να αντιστοιχεί σε περισσότερους από έναν μικροοργανισμούς
- Δεν μπορεί να παρέχει ποσοτικές πληροφορίες για την μικροβιακή κοινότητα

Μοριακές μέθοδοι αποτύπωσης της μικροβιακής ποικιλότητας

- DGGE
- **TRFLP**
- Βιβλιοθήκες κλώνων

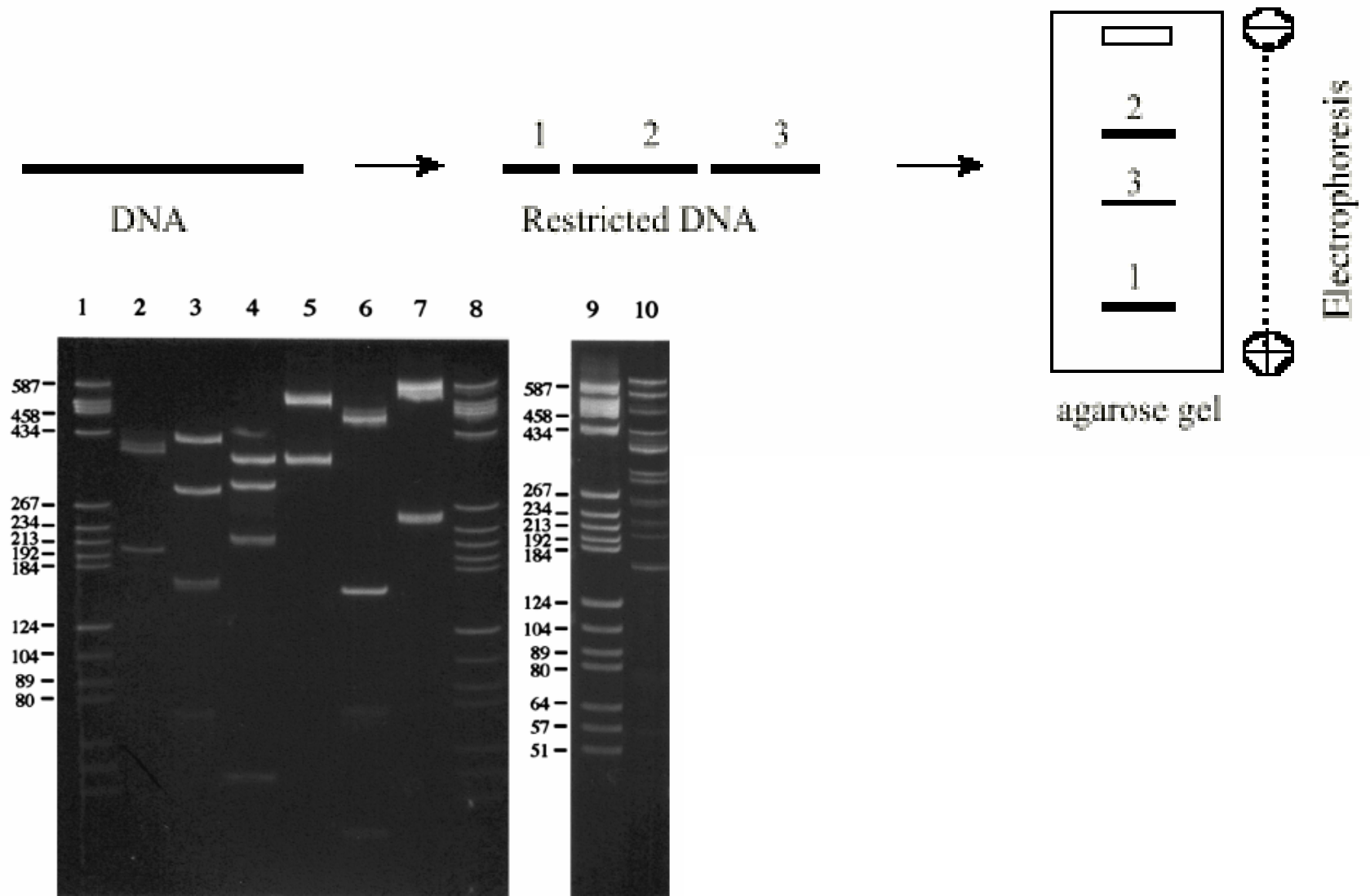
Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

- Στηρίζεται στην ίδια αρχή με τα **RFLPs** με την διαφορά ότι στα Terminal RFLPs ό ένας εκ των δύο εκκινητών είναι σημασμένος με **χρωστική**
- Πέψη με περιοριστικά ένζυμα και ανάλυση σε αυτόματο αναλυτή αλληλουχιών (sequencer) εμφανίζονται μόνο τα θραύσματα DNA που είναι σημασμένα με την χρωστική

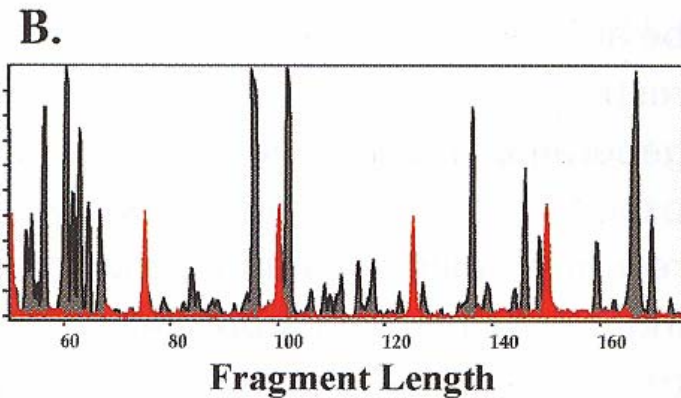
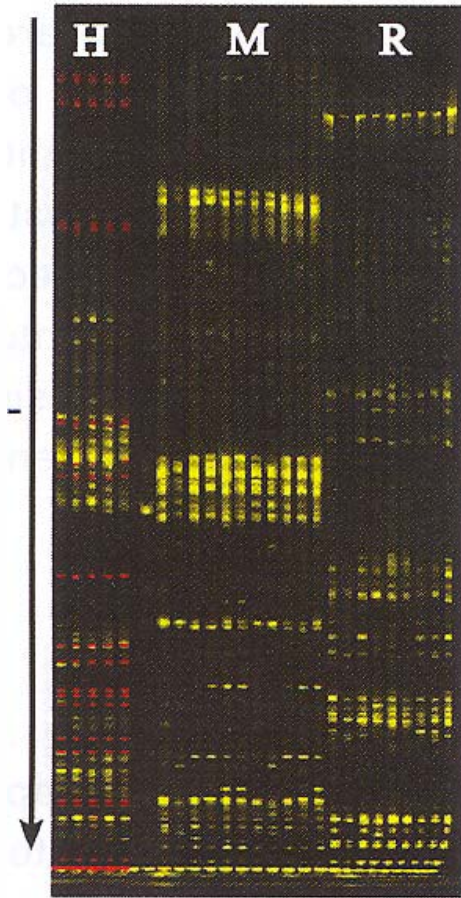
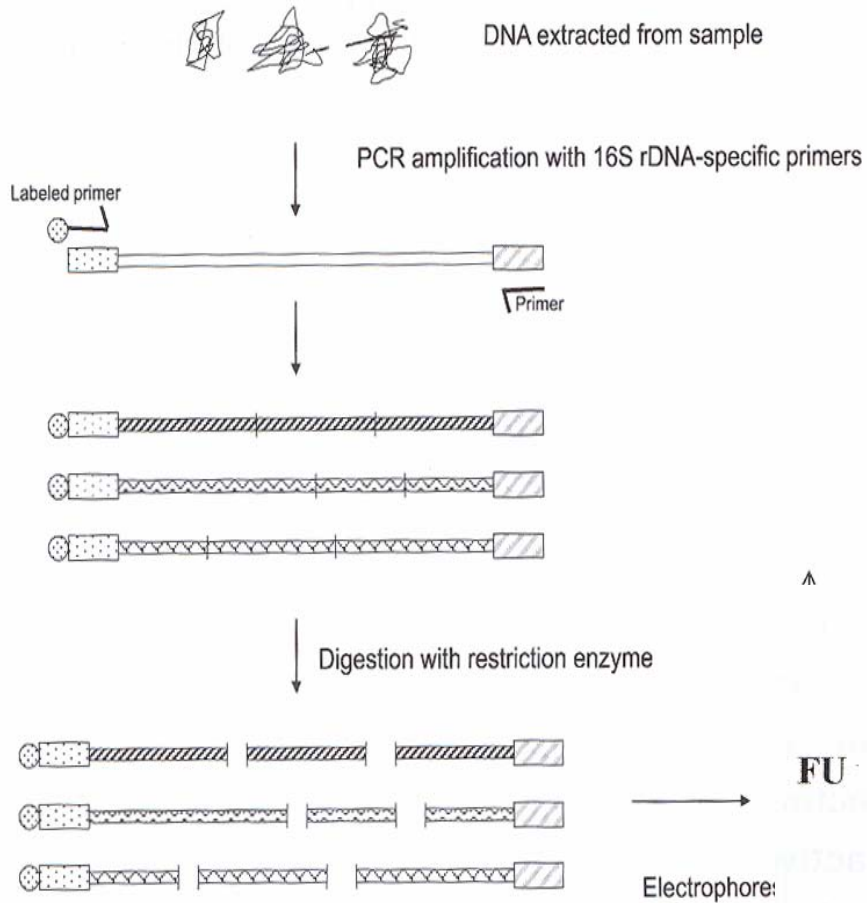
Χρωστικές:

FAM (μπλε), NED (κίτρινη), VIC (πράσινη), PET (κόκκινη)

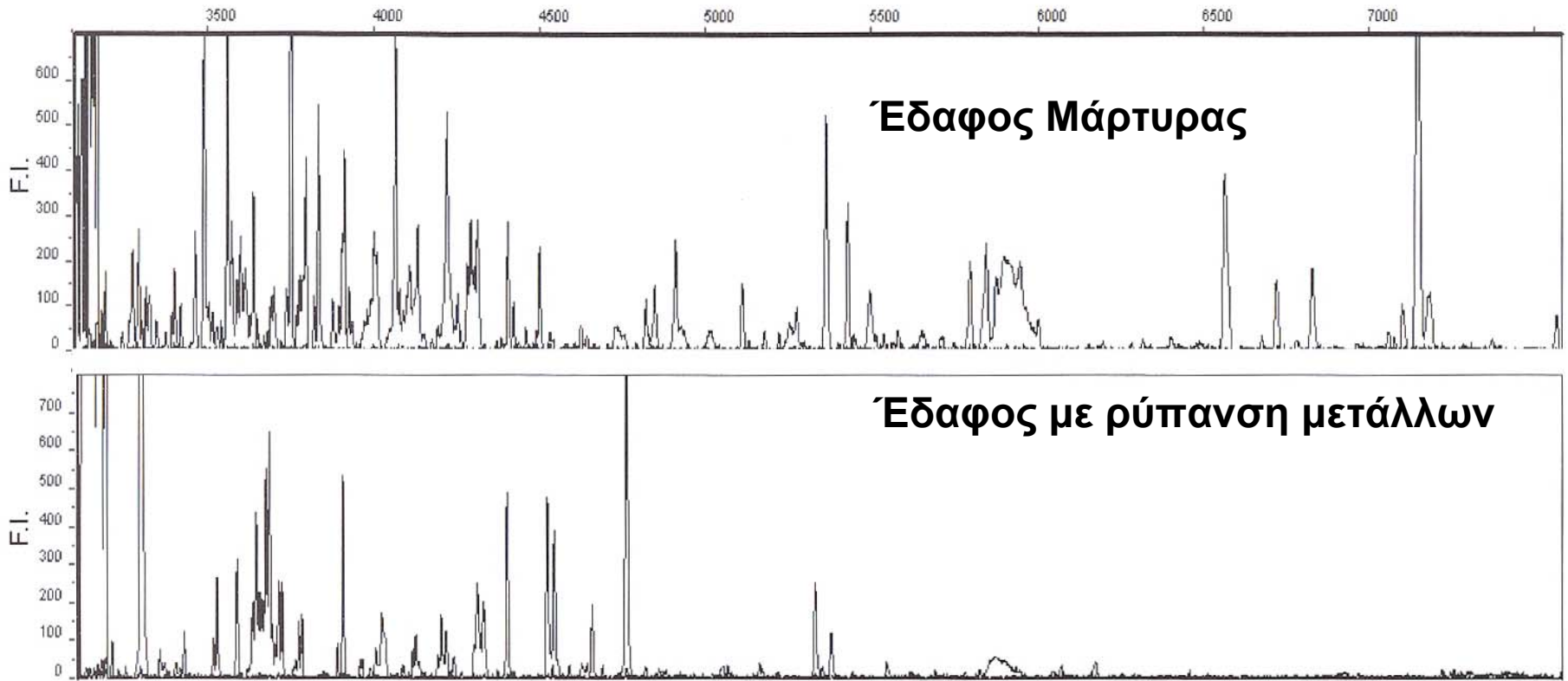
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism



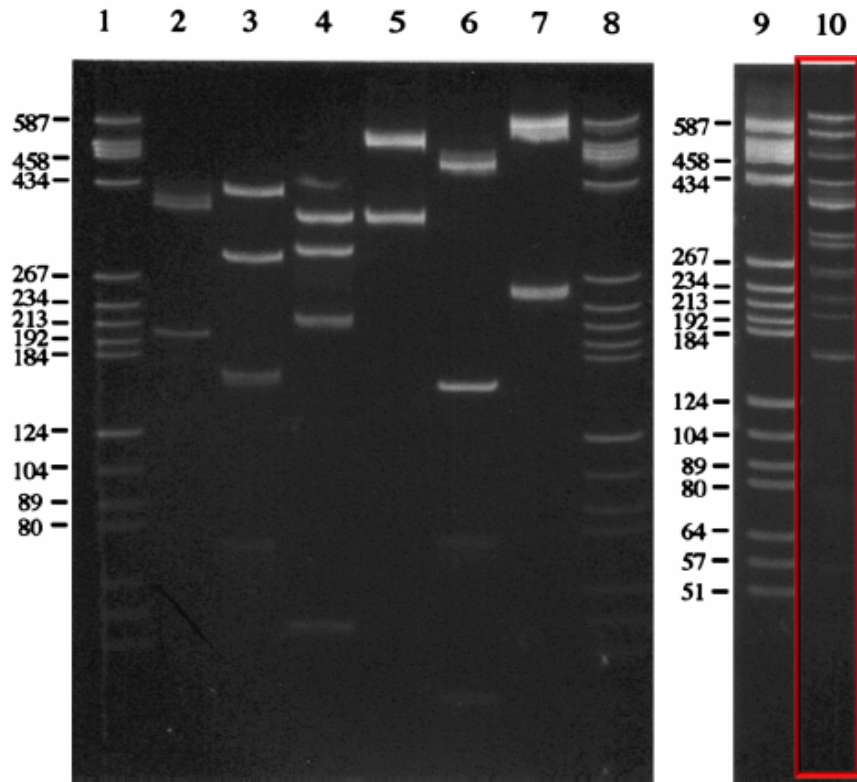
Terminal RFLPs



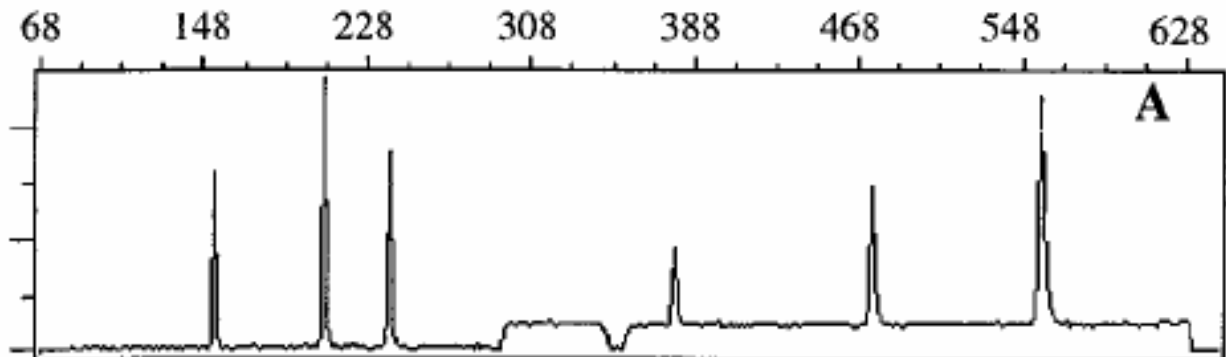
Εφαρμογή TRFLP



Χαμηλότερη ποικιλότητα βακτηρίων (λιγότερες κορυφές)
στο έδαφος όπου παρουσιάζεται ρύπανση μετάλλων



Terminal restriction fragment length (bases)

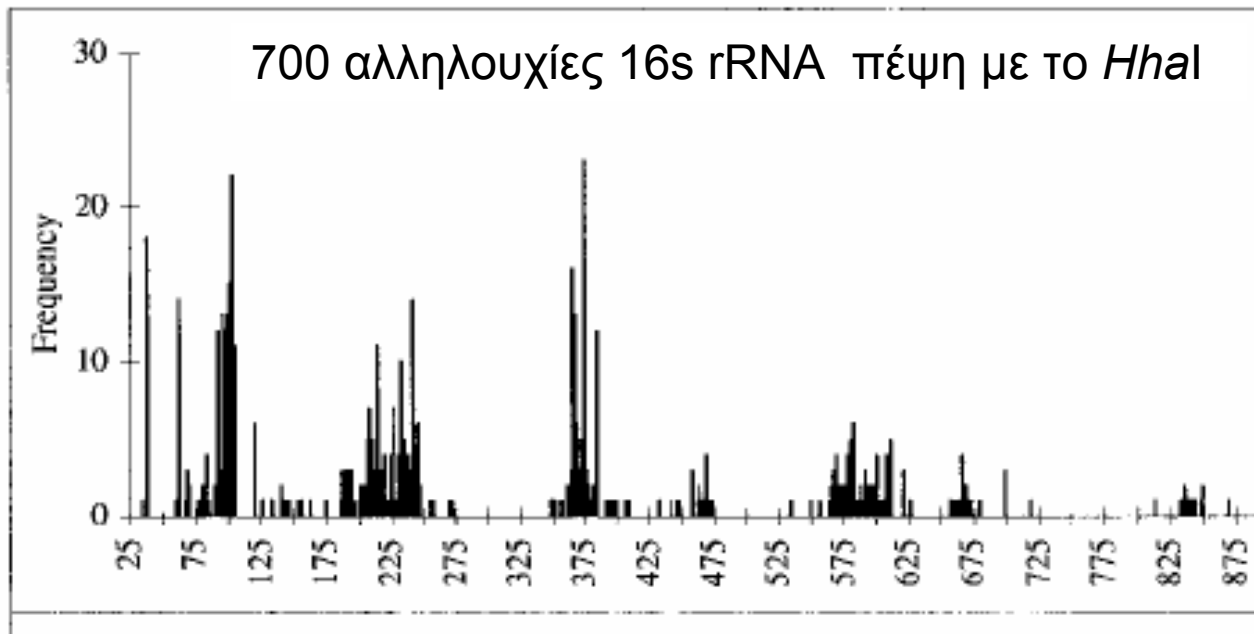


TRFLPs

- *Κάθε κορυφή θεωρητικά μπορεί να ανήκει σε ένα μικροοργανισμό (ΝΑΙ ή ΟΧΙ;)*
- *Απαιτείται συνήθως να πραγματοποιηθούν πέψεις με δύο ή και τρία διαφορετικά ένζυμα*
- Παρέχει ποσοτική **και ποιοτική** αξιολόγηση της ποικιλότητας της μικροβιακής κοινότητας (διαφορά με DGGE!!)
- Αυτοματοποιημένη τεχνική που δεν περιλαμβάνει ηλεκτροφόρηση και όλα τα προβλήματα που συνεπάγονται (διαφορά με DGGE!!)

Κάθε κορυφή θεωρητικά μπορεί να ανήκει σε ένα μικροοργανισμό;

- Θεωρητικά NAI στην πραγματικότητα σε πολύπλοκες κοινότητες είναι ιδιαίτερα δύσκολο



Κάθε κορυφή θεωρητικά μπορεί να ανήκει σε ένα μικροοργανισμό;

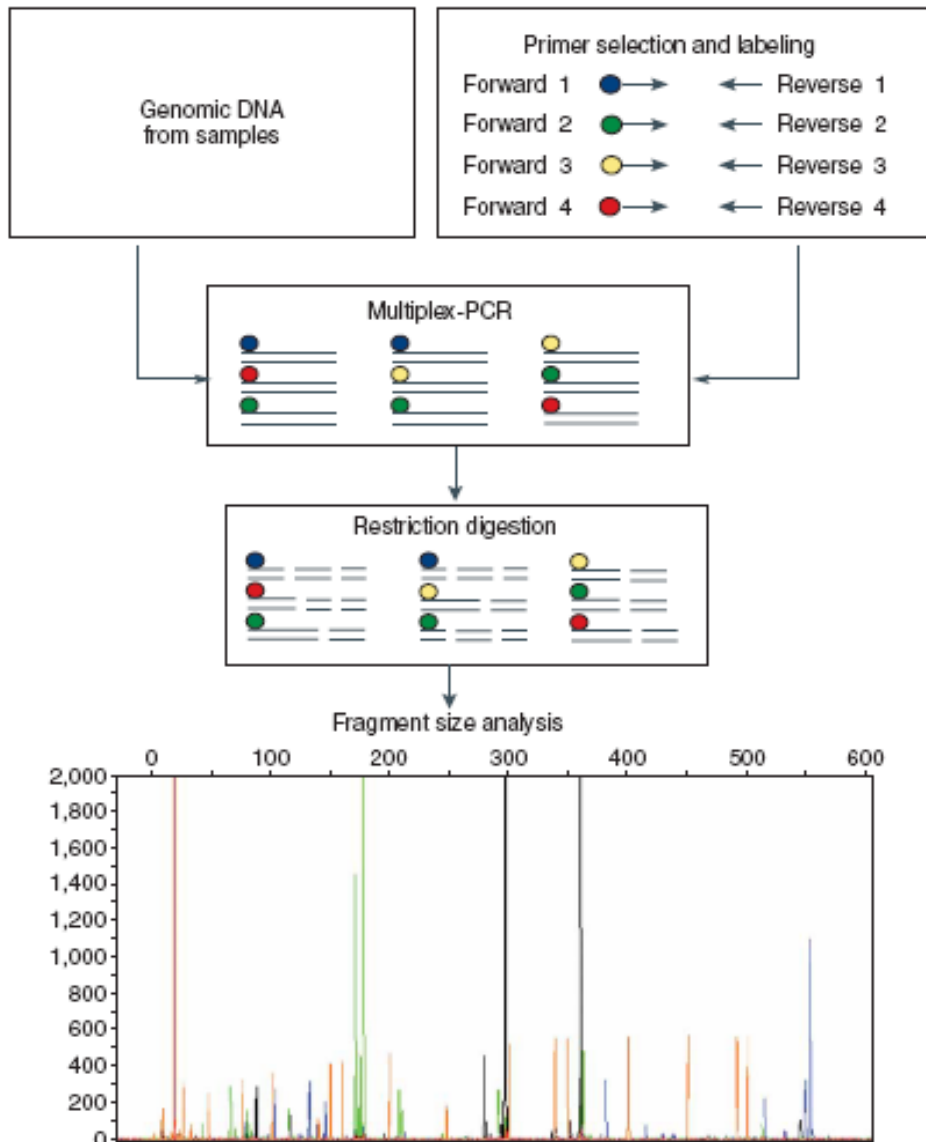
Πλέον υπάρχουν τόσο στην RDB αλλά και άλλα on-line tools που παρέχουν την δυνατότητα για *in silico* πέψεις

1. Προεπιλογή καταλληλότερων ενζύμων πέψης
2. Επεξεργασία των TRFs που θα προκύψουν για την εξαγωγή φυλογενετικών πληροφοριών (ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους ή τάξης)

Online tools TRFLP

- MiCA (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>)
- REMA (<http://www.macauley.ac.uk/rema>)
- TAP TRFLP (Ribosomal Database Project
web site [http://www.cme.msu.edu/RDP
/html/analyses.html](http://www.cme.msu.edu/RDP/html/analyses.html))

Multiplex TRFLPs



Εκκινητές για 3 διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών στην ίδια PCR αντίδραση:

- Βακτήρια
- Μύκητες
- Αρχαία

σημασμένοι με τρεις διαφορετικές χρωστικές, μια για κάθε ομάδα μικροοργανισμών

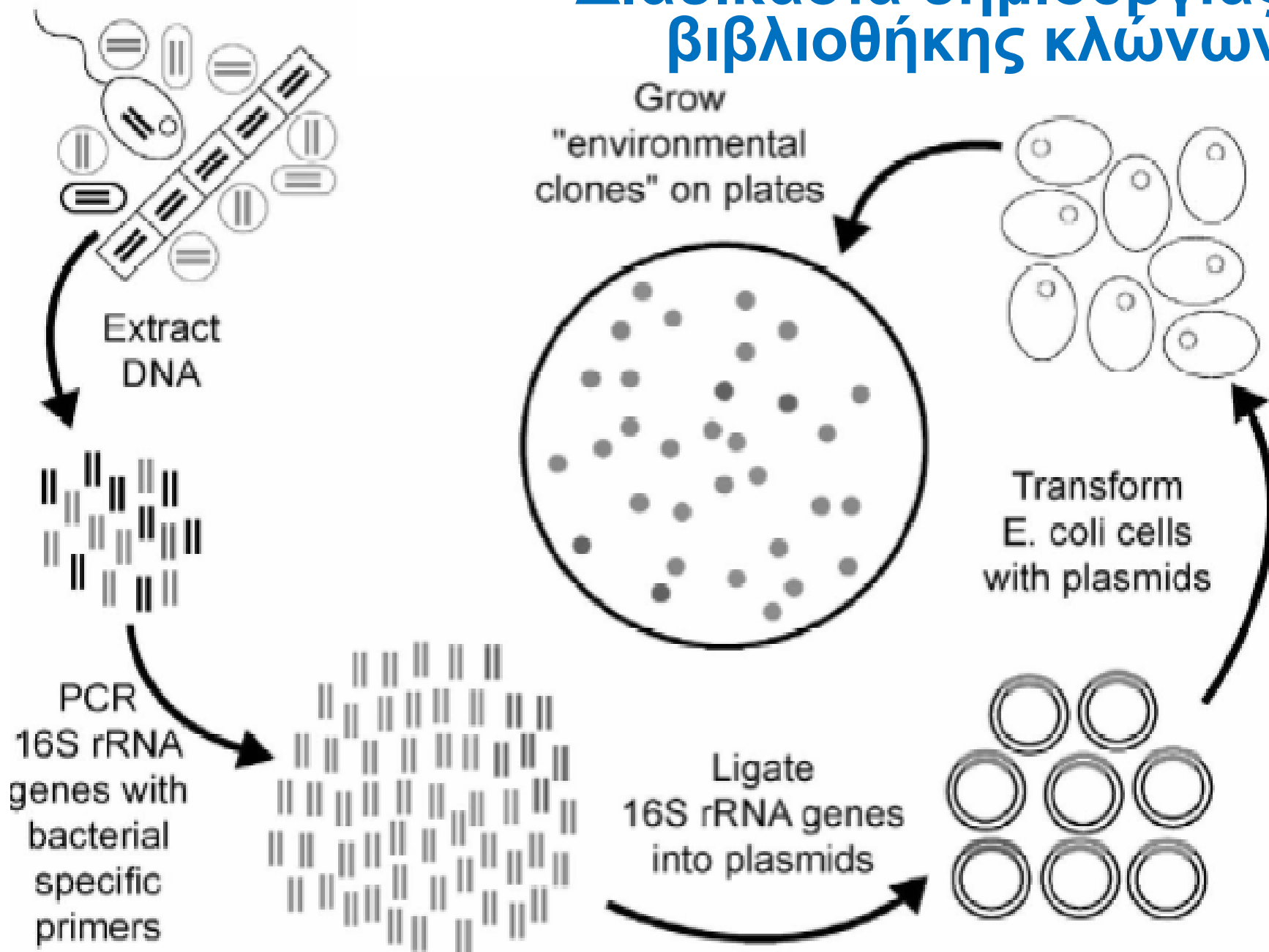
Μοριακές μέθοδοι αποτύπωσης της μικροβιακής ποικιλότητας

- DGGE
- TRFLP
- **Βιβλιοθήκες κλώνων**

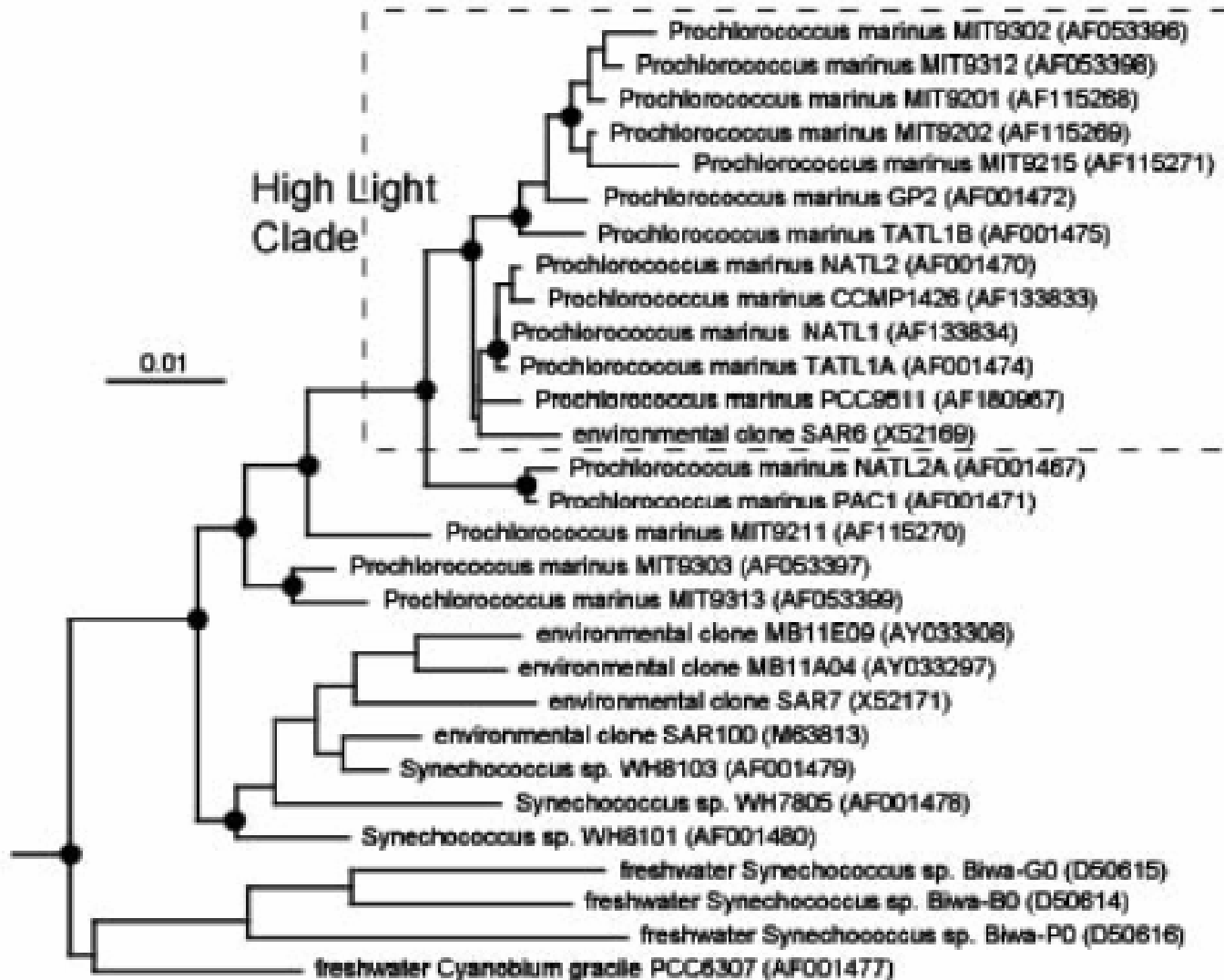
Δημιουργία βιβλιοθηκών κλώνων

Αναλόγα με τον αριθμό των κλώνων που περιλαμβάνουν παρέχουν μια λεπτομερή φυλλογενετική ανάλυση της ποικιλότητας των μικροοργανισμών σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα

Διαδικασία δημιουργίας βιβλιοθήκης κλώνων



Link Environmental Gene Clones With Microbes of Known Characteristics



Βιβλιοθήκες κλώνων

Πλεονεκτήματα

- Παρέχει φυλογενετικές πληροφορίες για την ποικιλότητα και τη ταυτότητα των μελών της μικροβιακής κοινότητας

Μειονεκτήματα

- Υψηλό κόστος
- Δεν παρέχει πληροφορίες για την λειτουργία των μελών της μικροβιακής κοινότητας
- Απαιτεί μεγάλο αριθμό κλώνων για πολύπλοκες κοινότητες

Μοριακές μέθοδοι στην μικροβιακή οικολογία - Υψηλής Ανάλυσης

- **Μικροσυστοιχίες**
- Μεταγονιδιωματική (*Structure and Function*)
- Stable Isotope Probing (*Structure and Function*)

Μικροσυστοιχίες

Μικρο-τσιπ που μπορεί να έχουν στην επιφάνεια τους έως και 500000 probes για υβριδοποίηση με αντίστοιχα γονίδια μικροοργανισμών που βρίσκονται σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα



Μικροσυστοιχίες



Εφαρμόζεται και στην μοριακή μικροβιακή οικολογία και παρέχει υψηλής ανάλυσης πληροφορίες:

1. Μικροβιακή ποικιλότητα σε περιβαλλοντικά δείγματα

(Στόχος: 16S rRNA - PhyloCHIP)

2. Λειτουργική μικροβιακή ποικιλότητα σε περιβαλλοντικά

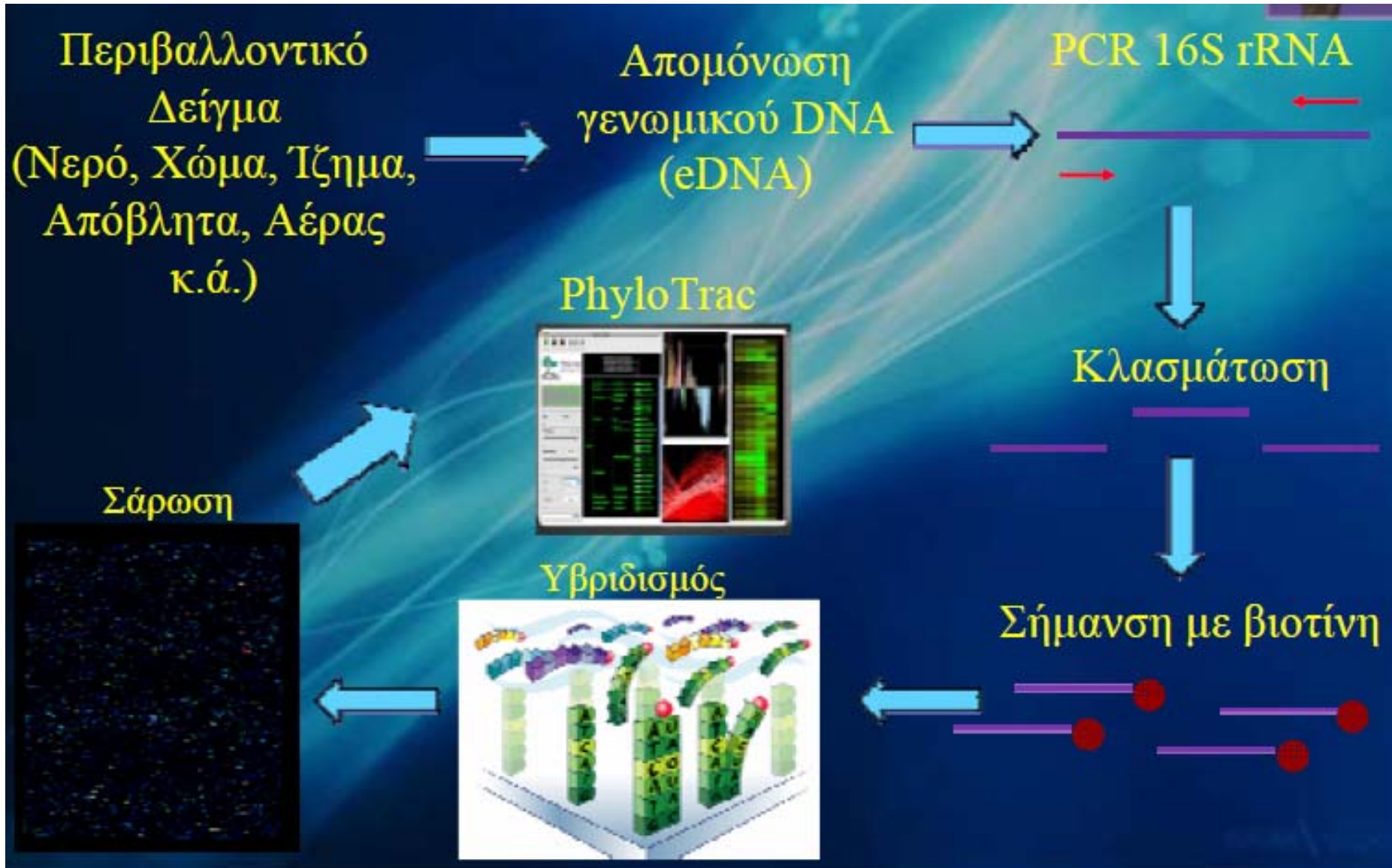
δείγματα **(Στόχος: γονίδια που συμμετέχουν σε**

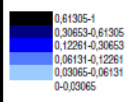
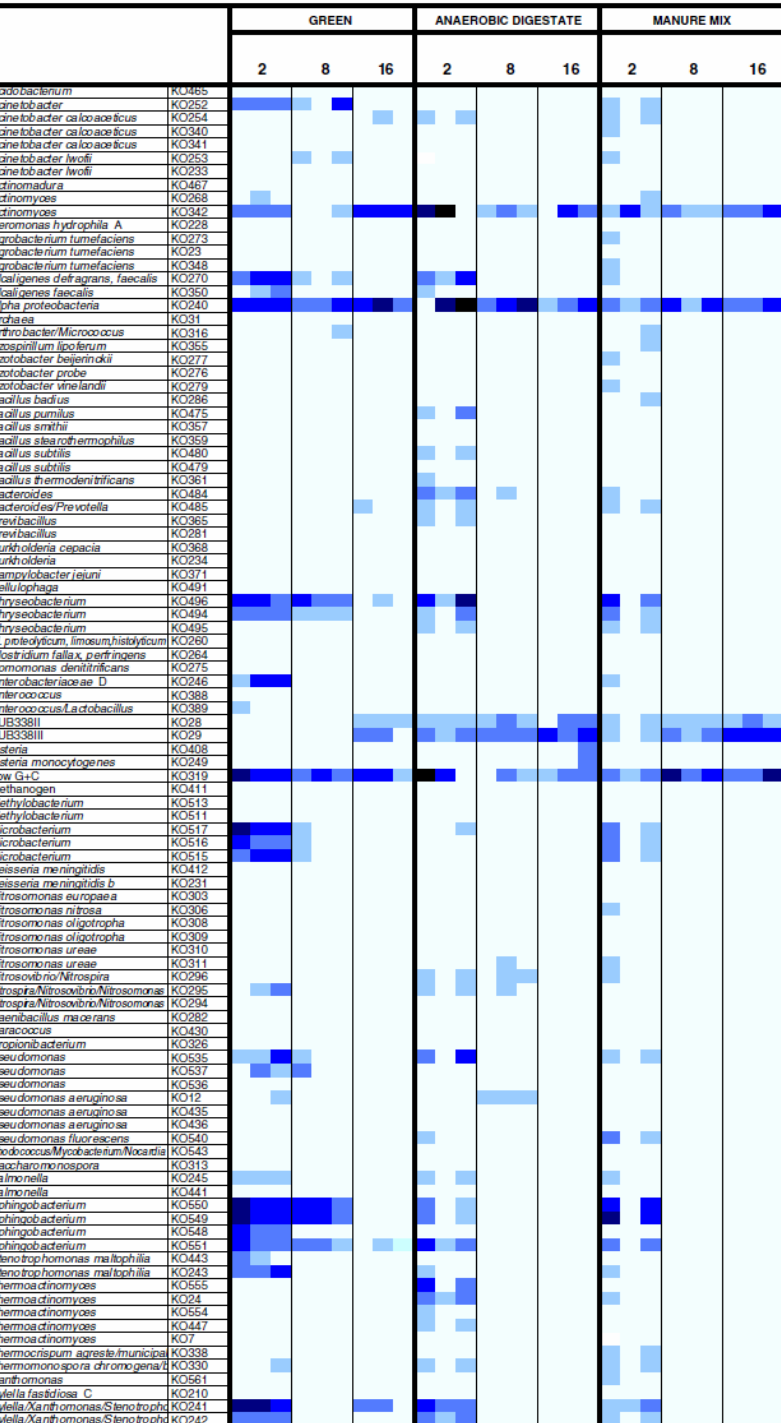
γεωχημικούς κύκλους - GeoCHIP)

Τύποι Microchip στην μικροβιακή οικολογία

- **PhyloCHIP:** 500,000 16S rRNA probes για όλα τα περιβαλλοντικά δείγματα
- **CompoCHIP:** 369 16S rRNA probes για βακτήρια που ανιχνεύονται συχνά σε compost
- **GeoCHIP:** 24250 probes για >10,000 γονίδια από 150 λειτουργικές ομάδες βακτηρίων που συμμετέχουν σε γεωχημικούς κύκλους

Διαδικασία





CompoCHIP

Υψηλότερη ένταση υβριδοποίησης

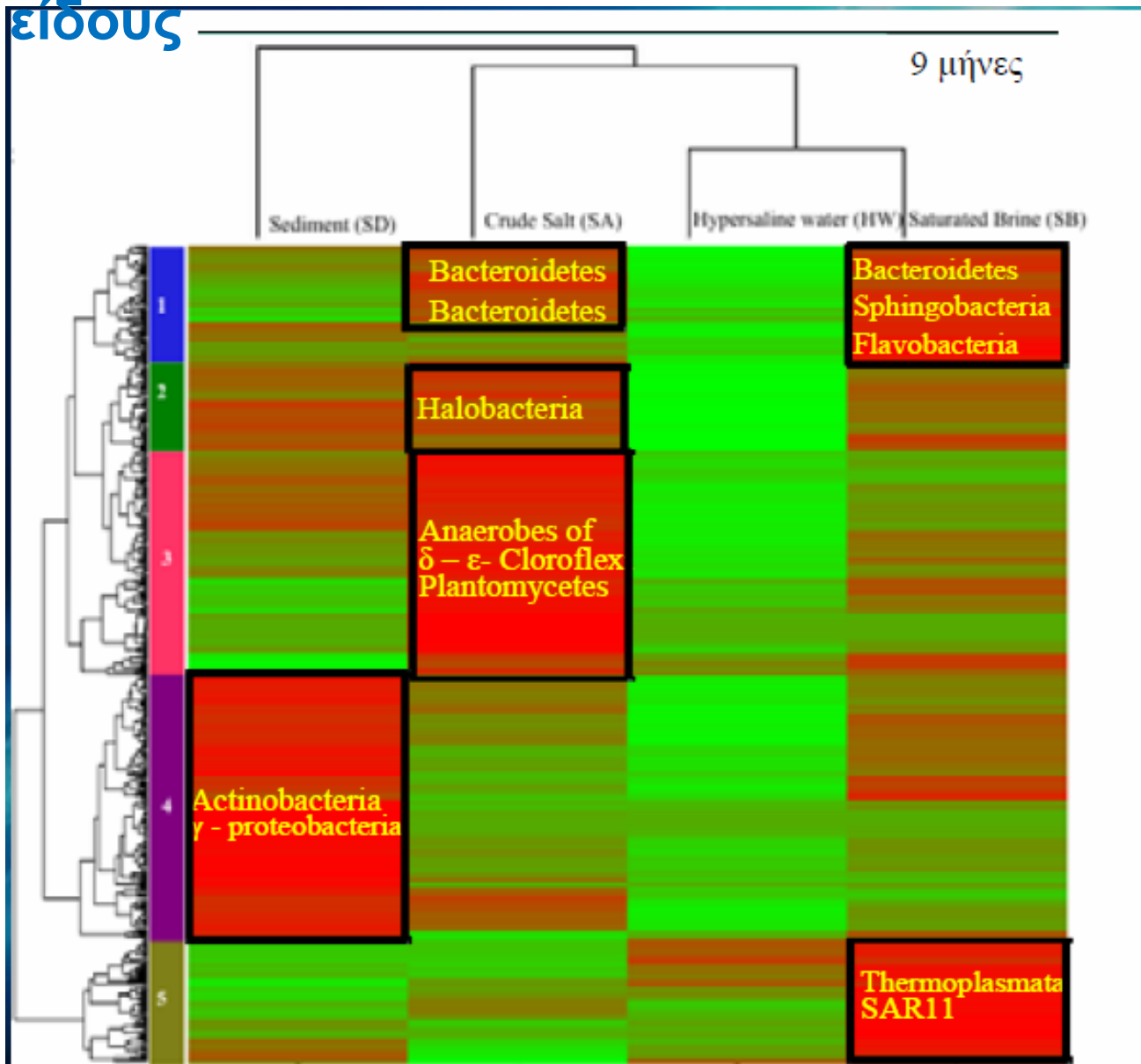
δεν αποτελεί πάντα και ασφαλή

κριτήριο πυκνότητας πληθυσμού για

κάποιο μικροοργανισμό ή ομάδα

μικροοργανισμών

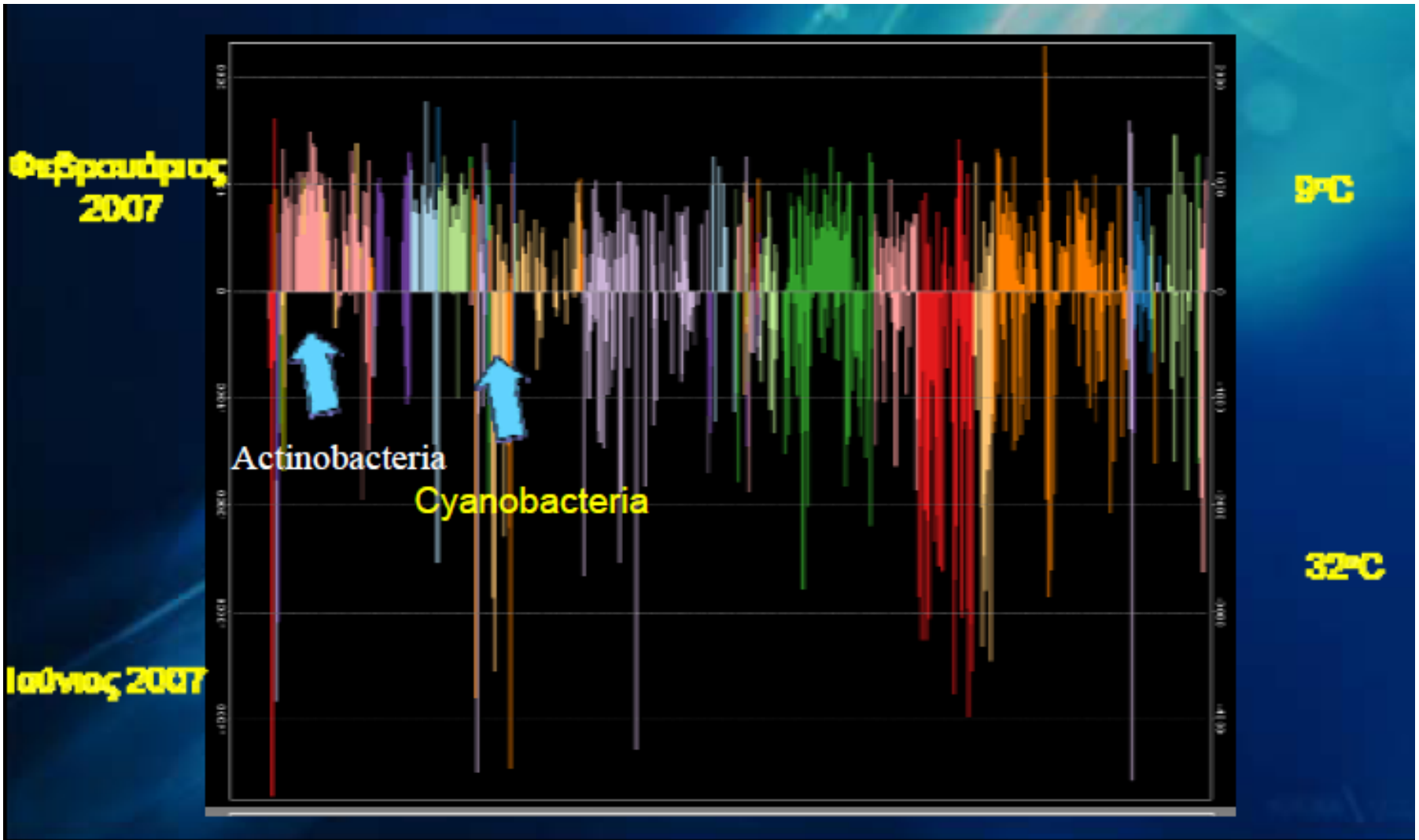
Οι πληροφορίες που παίρνουμε είναι σε επίπεδο γένους, οικογένειας ή φύλλου και όχι σε επίπεδο είδους



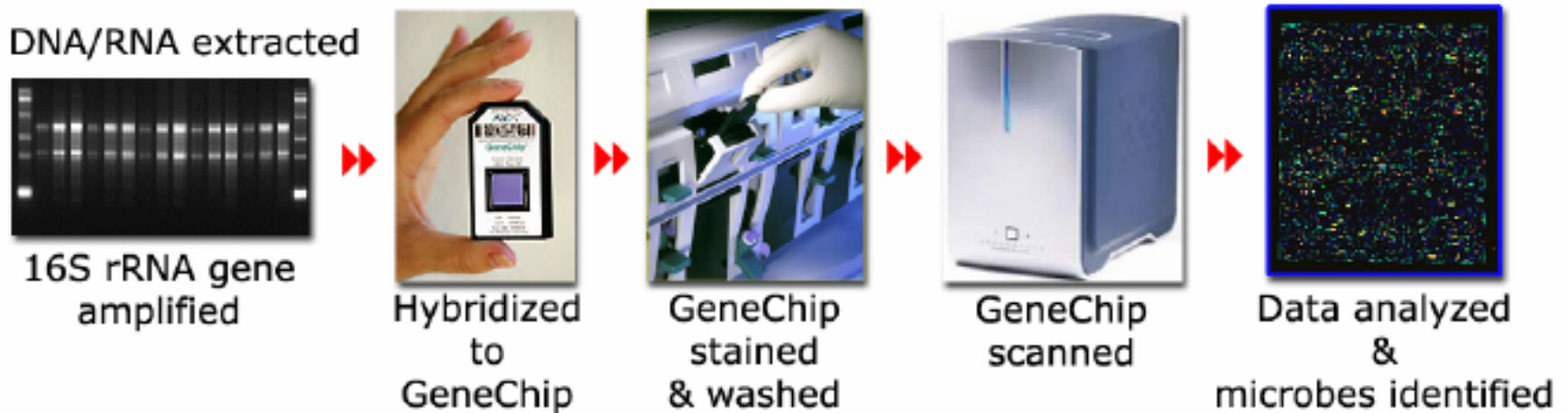
Ανάλυση της
ποικιλότητας σε
διάφορα ακραία
υδάτινα
περιβάλλοντα από
την Ελλάδα με την
χρήση του
PhyloCHIP

Tsiamis G.,
Bourtzis C., et al.
(2008)

Συγκριτική αξιολόγηση ποικιλότητας του νερού του Αιτωλικού σε βάθος 5 μ τον Φεβρουάριο και τον Ιούνιο 2007 με την χρήση **PhyloCHIP**



Η ανάπτυξη μικροσυστοιχιών για την μελέτη της ποικιλότητας των μυκήτων καθυστερεί λόγω της περιορισμένης συγκριτικά βάσης δεδομένων σε σχέση με τα βακτήρια



Μοριακές μέθοδοι στην μικροβιακή οικολογία - Υψηλής Ανάλυσης

- Μικροσυστοιχίες
- **Μεταγονιδιωματική**
- Stable Isotope Probing

Μεταγονιδιωματική ανάλυση στην μικροβιακή οικολογία

Μπορεί να είναι και **μεταμεταγραφική ανάλυση** ή και **μεταπρωτεομική ανάλυση** ανάλογα αν χρησιμοποιούμε DNA, mRNA ή πρωτεΐνες για να καταγράψουμε την μικροβιακή ποικιλότητας

Επίπεδο πληροφοριών

- **Ανάλυση της μικροβιακής ποικιλότητας** όταν ο στόχος είναι ριβοσωμικές περιοχές του γονιδιώματος των μικροοργανισμών όπως 16S rRNA, 18S rRNA, ITS
- **Ανάλυση της λειτουργικής μικροβιακής ποικιλότητας** όταν η ανάλυση επεκτείνεται σε όλο το γονιδίωμα που κλωνοποιήθηκε και περιλαμβάνει και γονίδια που εμπλέκονται σε βασικές λειτουργίες

Διαδικασία δημιουργίας μεταγονιδωματικής βιβλιοθήκης

- Εξαγωγή DNA από περιβαλλοντικά δείγματα
- Κλωνοποίηση σε κατάλληλους φορείς όπως τεχνητά βακτηριακά χρωμοσώματα (BCAs), Cosmids, Phosmids
- Μεταγονιδωματική ανάλυση της βιβλιοθήκης
 - *High-throughput* ανάλυση (*pyrosequencing, ILLUMINA*)
 - Υβριδισμός ή *PCR*
 - Αξιολόγηση για έκφραση διαφόρων φαινοτύπων