

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za elektrotehniko



NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA

Tadej Kotnik

*javno predavanje
24. oktobra 2014*



NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA

Strela v rokah bogov



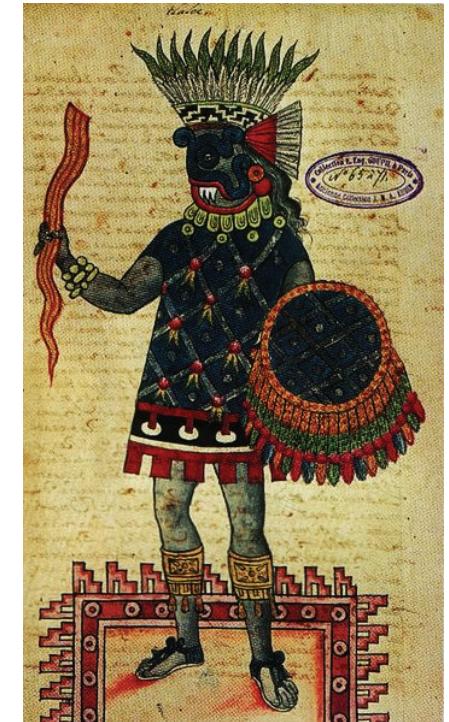
Baal s strelo
Ugarit, Sirija,
ok. 1750 pr.n.št.;
Louvre, Pariz



Zeus napada Tifona s streliami
Halkidiki, ok. 540 pr.n.št.; Staatliche
Antikensammlung, München



Jupiter s strelo
Smirna, ok. 150 n.št.; Louvre, Pariz



Tlalok s strelo,
Mehika, ok. 1560 n.št.,
Bibliothèque nationale de
France, Pariz



NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA

Strela v rokah narave



Strele na fotografiji nevihte z 10-minutno izpostavitvijo
Veliki kanjon, Arizona, ZDA, 28. junija 2013, © Walllike Photos

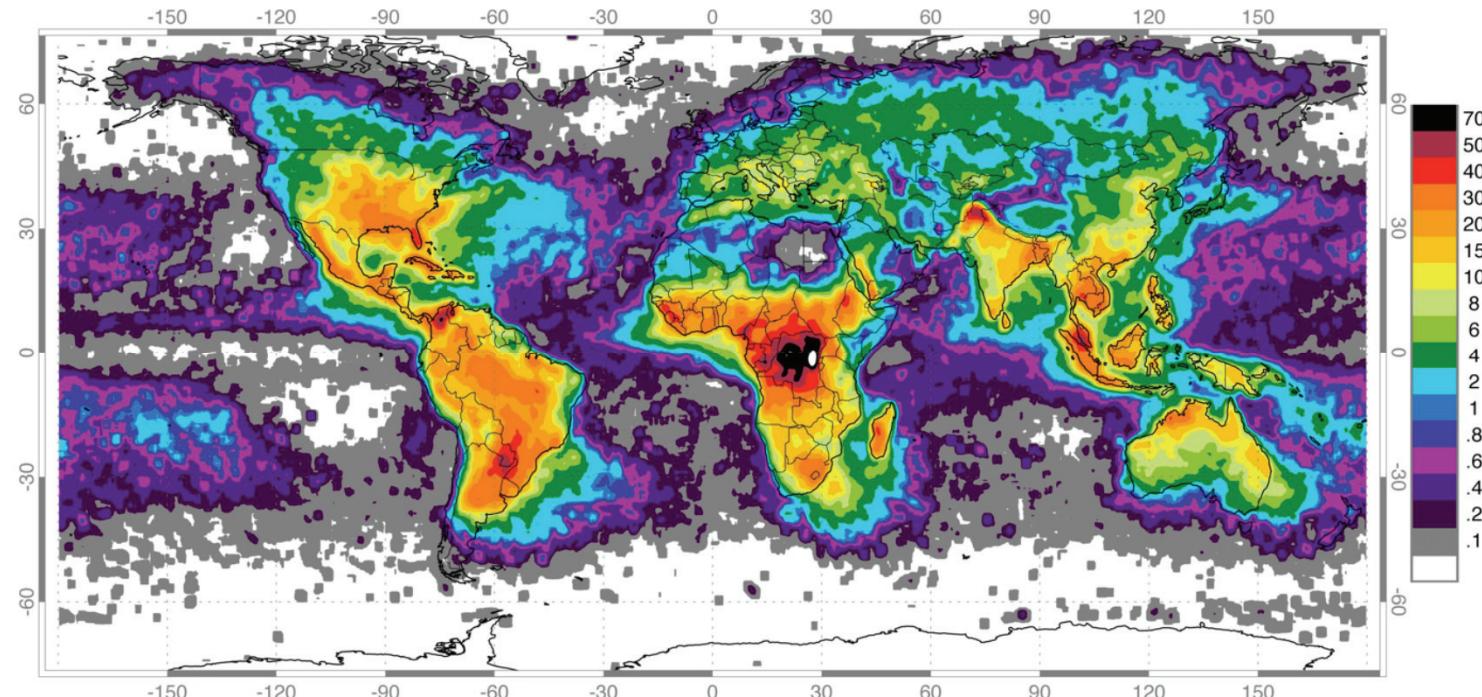


NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA

Strela v rokah narave

- **v povprečju na Zemlji hkrati poteka ~2000 neviht**
- **letno na Zemljo udari ~3 milijarde strel (v povpr. ~100 na sekundo)**
- **strela pogosteje udari v trdna tla kot v morje, pogosteje v plitve kot v globlje vode in pogosteje s približevanjem ekvatorju**

Letno število strel
na km², izmerjeno
v projektu NASA
OTD/LIS v letih
1995-2003
© NASA 2003





NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA

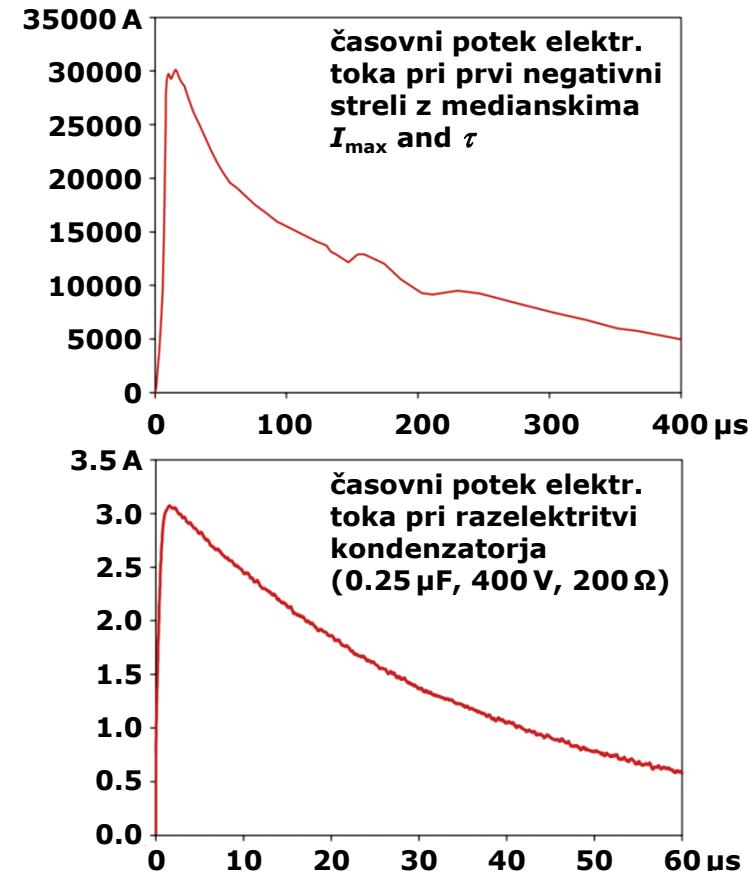
Strela v rokah narave

- nosilci naboja v strelah so pretežno elektroni;
- ~90% strel prenese elektrone iz oblaka v tla (negativna strela), ~10% pa iz tal v oblak (pozitivna strela)

	NEGATIVNE STRELE		POZITIVNE STRELE	
	I_{max}	τ	I_{max}	τ
95-ti pctil	14 kA	43 μ s	4.6 kA	36 μ s
mediana	31 kA	110 μ s	35 kA	320 μ s
5-ti pctil	80 kA	290 μ s	250 kA	2.8 ms

Berger in sod, *Electra* **41**:23-37, 1975

Chowdhuri in sod., *IEEE T Power Deliver* **20**:346-358, 2005



Marjanovič in Kotnik,
Bioelectrochemistry **94**:79-86, 2013



Elektroporacija in elektrotransformacija

- **1958:** prvo poročilo, da izpostavitev kratkim pulzom visoke napetosti privede do začasnega povečanja prepustnosti celične membrane
- **1967:** prvo poročilo o iztekanju DNA iz celic zaradi električnih pulzov
- **1972:** prva sistematična študija reverzibilnih in irreverzibilnih sprememb prepustnosti membrane ter njihove odvisnosti od jakosti el. polja
- **1982:** prvo poročilo o vnosu DNA v celico z električnimi pulzi in izražanju genov vnešene DNA; prva uporaba izraza "elektroporacija"
- **1987:** prvo poročilo o vnosu DNA v bakterijo in izražanju genov; pri bakterijah se vnešena DNA deduje

Stämpfli, *An Acad Brasil Ciens* **30**:57-63, 1958

Hamilton in Sale, *Biochim Biophys Acta* **148**:789-800, 1967

Neumann in Rosenheck, *J Membrane Biol* **10**:279-290, 1972

Wong in Neumann, *Biochem Biophys Res Commun* **107**:584-587, 1982

Neumann in sod., *EMBO J* **1**:841-845, 1982

Chassy in Flickinger, *FEMS Microbiol Lett* **44**:173-177, 1987

The EMBO Journal Vol.1 No.7 pp.841 – 845, 1982

Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields

E.Neumann*, M.Schaefer-Ridder, Y.Wang, and P.H.Hofschneider

Max-Planck-Institut für Biochemie, D-8033 Martinsried/München, FRG

Communicated by E.Neumann

Received on 30 June 1982

Electric impulses (8 kV/cm, 5 μ s) were found to increase greatly the uptake of DNA into cells. When linear or circular plasmid DNA containing the herpes simplex thymidine kinase (TK) gene is added to a suspension of mouse L cells deficient in the TK gene and the cells are then exposed to electric fields, stable transformants are formed that survive in the HAT selection medium. At 20°C after the application of three suc-

When circular or linear DNA carrying the thymidine kinase (TK) gene is added to a culture of mutant mouse cells (LTK⁻ cells) deficient in this gene, which is then subjected to a sequence of electric field pulses at 20°C the LTK⁻ cells take up large amounts of the plasmid DNA within a period of ~10 min after pulsing. The newly acquired TK activity is demonstrated by the survival of the transformed cells in a selection medium (Pellicer *et al.*, 1978). The first electric field experiments with LTK⁻ cells and DNA containing the TK gene showed that there is enhanced colony formation after pulsing (Wong and Neumann, 1982). However, the number of stable transformants in these first experiments was rather low.

FEMS Microbiology Letters **44** (1987) 173-177
Published by Elsevier

FEM 02905

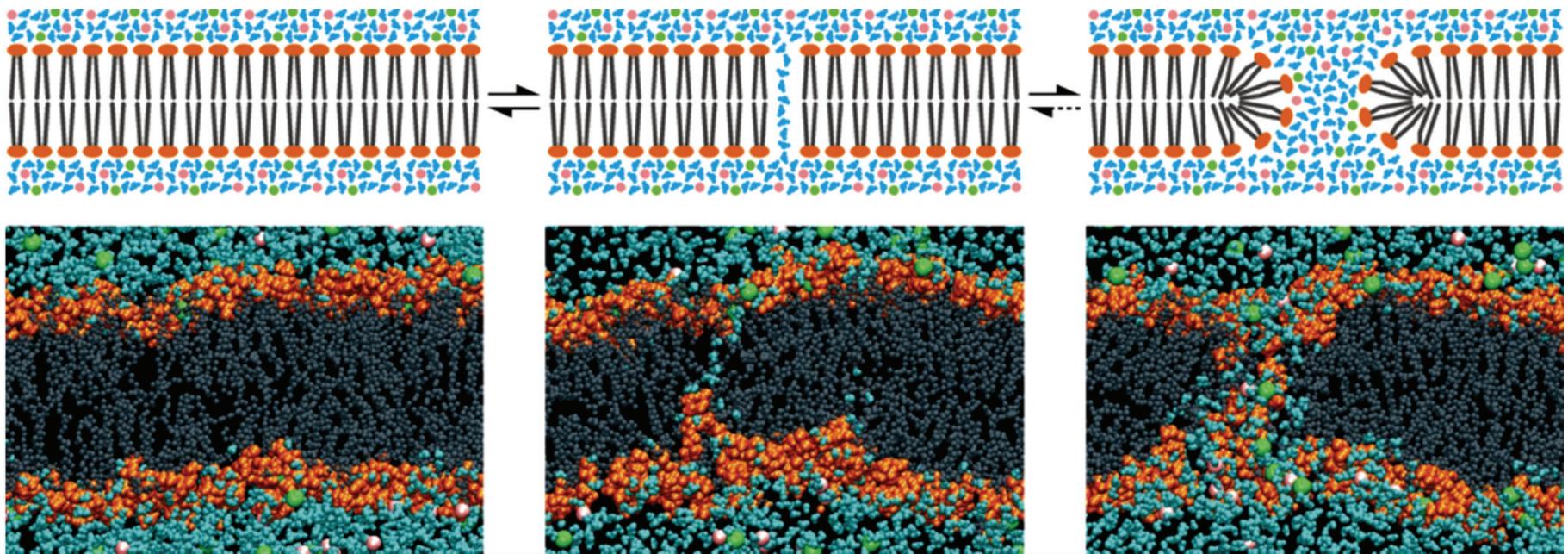
Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation

Bruce M. Chassy and Jeannette L. Flickinger

Laboratory of Microbiology and Immunology, NIDR/NIH, Bethesda, MD 20892, U.S.A.



Elektroporacija in elektrotransformacija



ob začetku izpostavitve membrane
polju jakosti 4 MV/cm

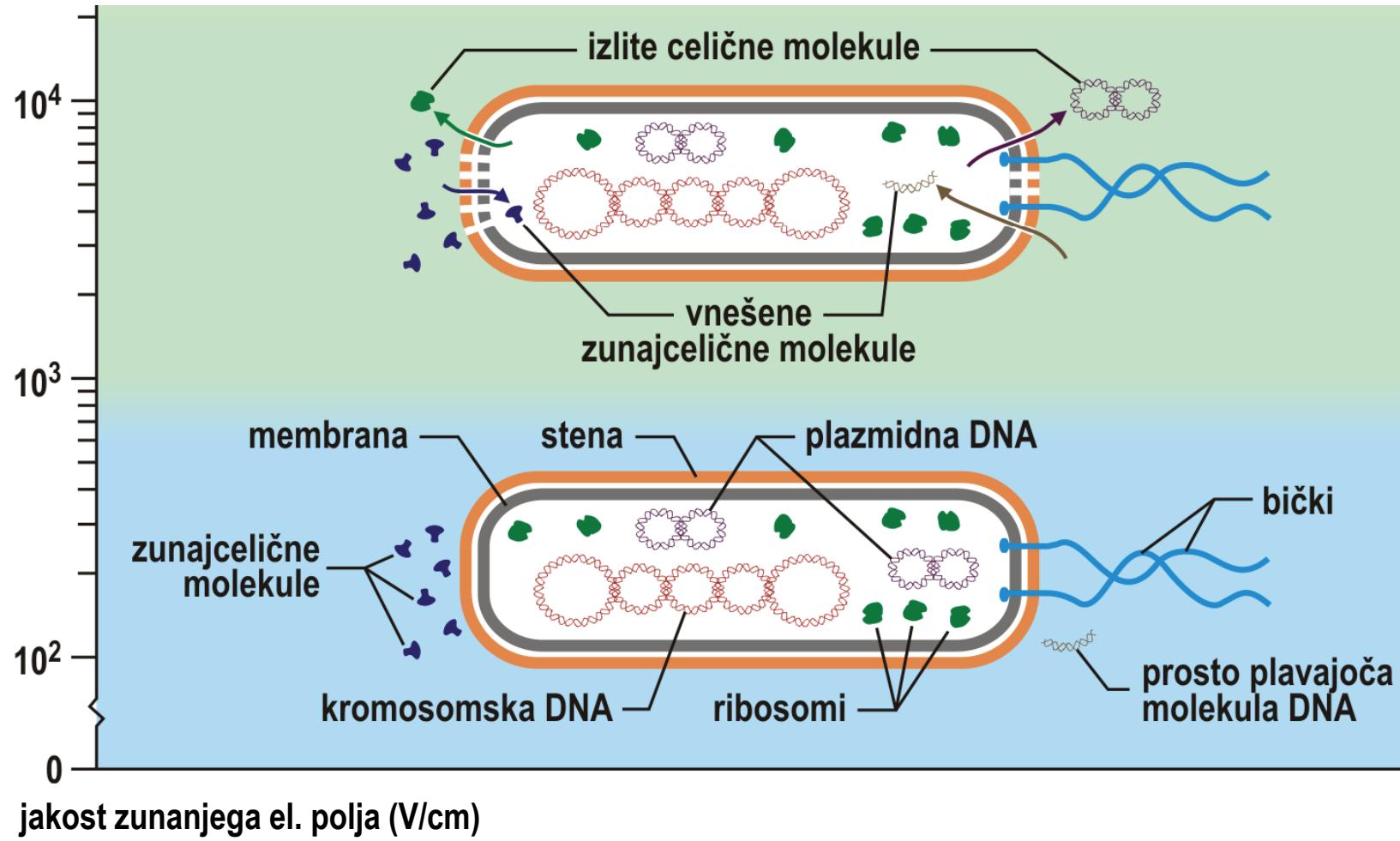
po 0.15 ns izpostavitve

po 0.50 ns izpostavitve

Kotnik, Kramar, Pucihar, Miklavčič in Tarek, *IEEE El Insul Mag* **28(5)**:14-23, 2012
Yarmush, Golberg, Miklavčič, Kotnik in Serša, *Annu Rev Biomed Eng* **16**:295-320, 2014

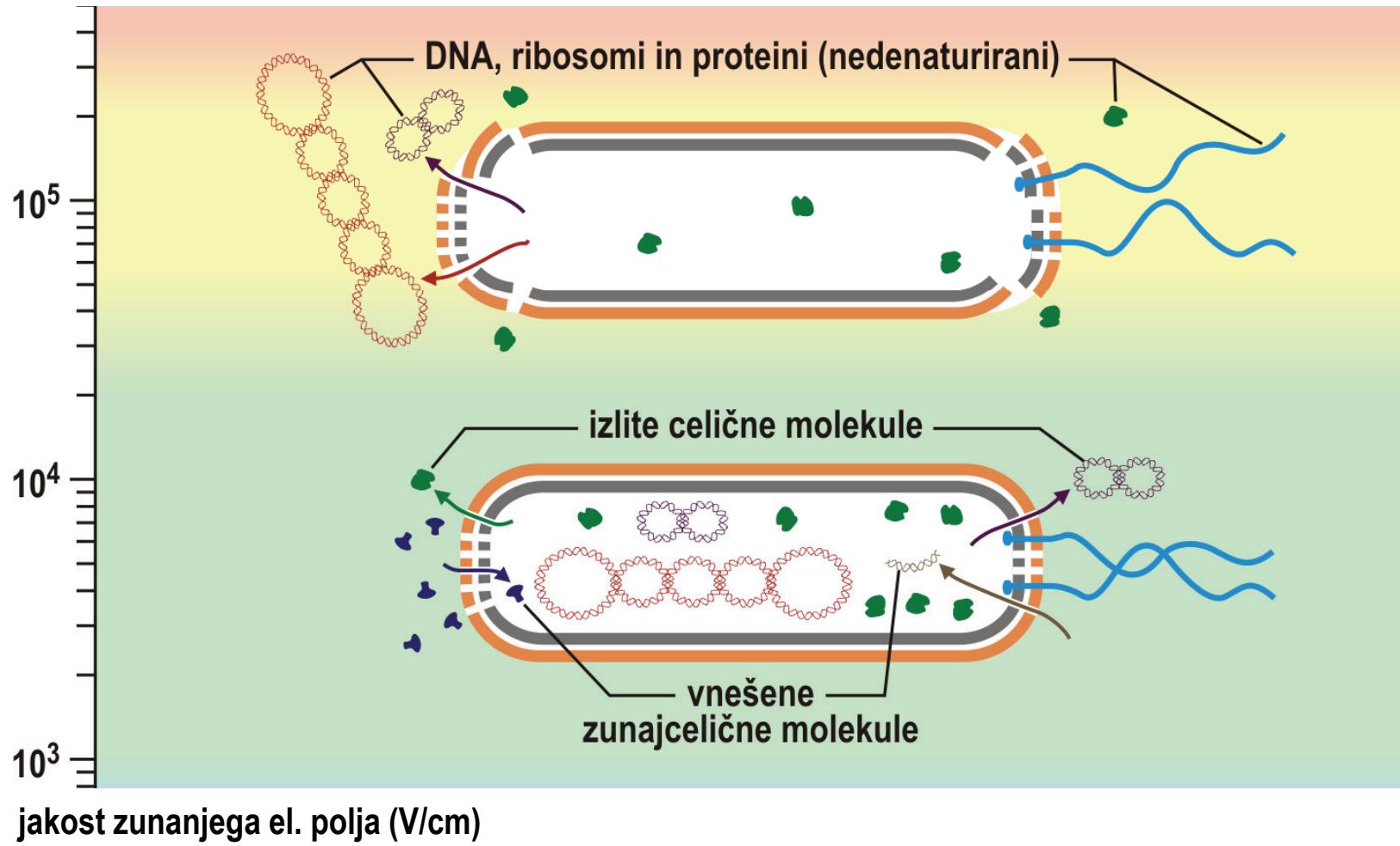


Elektroporacija in elektrotransformacija





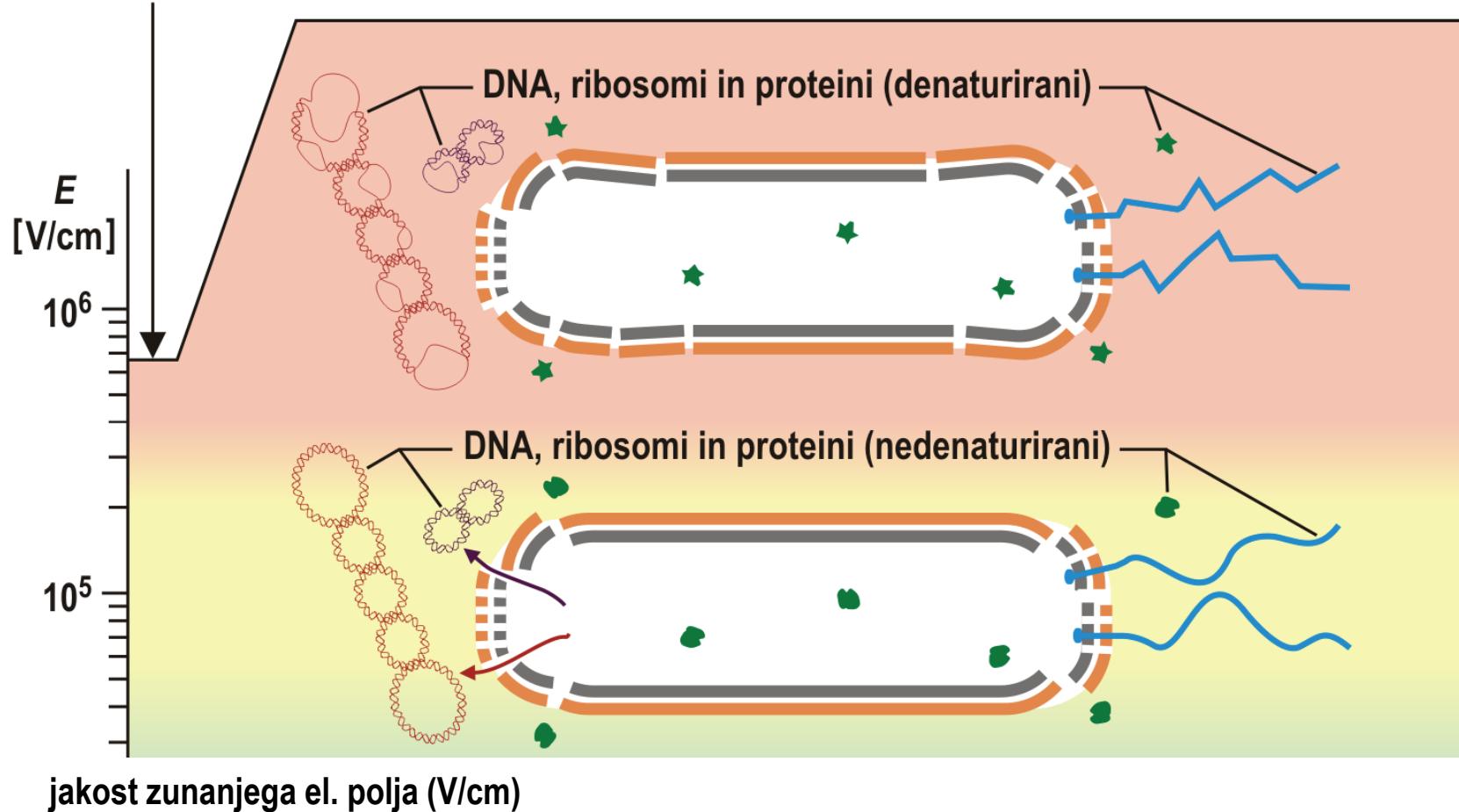
Elektroporacija in elektrotransformacija





Elektroporacija in elektrotransformacija

električna porušitev vode

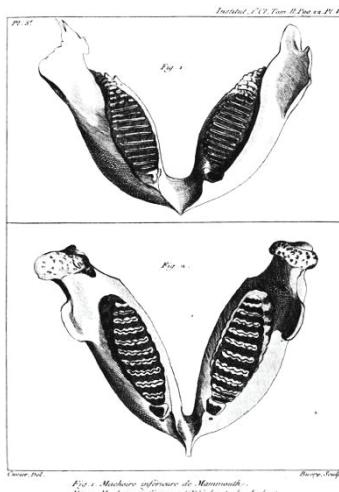


jakost zunanjega el. polja (V/cm)



Evolucija razumevanja biološke evolucije

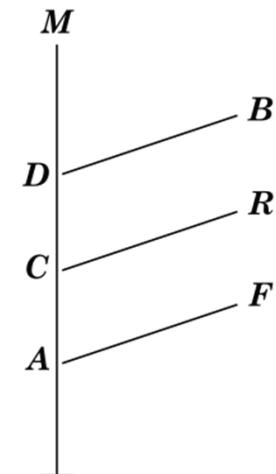
- **1796: Georges Cuvier primerja izkopana okostja mamutov z okostjem današnjih slonov in ugotovi, da gre za drugačno, danes izumrlo vrsto**
- **1809: Jean-Baptiste Lamarck postavi hipotezo o prilagajanju živih bitij okolju, prenosu prilagoditev na potomce in s tem postopnem nastajanju novih vrst z "razvejanim zaporedjem"**
- **1844: Robert Chambers (anonimno) objavi teorijo o skupnem predniku živalskih vrst in njihovi postopni divergenci**



Cuvier, *Espèces des éléphants*, 1796, str. 16

Je ne veux pas dire pour cela que les animaux qui existent forment une série très-simple , et partout également nuancée ; mais je dis qu'ils forment une série rameuse , irrégulièrement graduée , et qui n'a point de discontinuité dans ses parties

Lamarck, *Phylosophie Zoologique*,
1809, str. 59



Chambers, *Vestiges of the Natural History of Creation*, 1844, str. 212

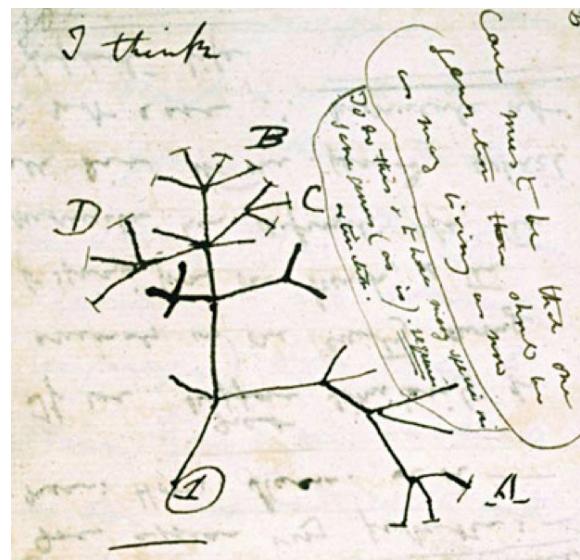


Evolucija razumevanja biološke evolucije

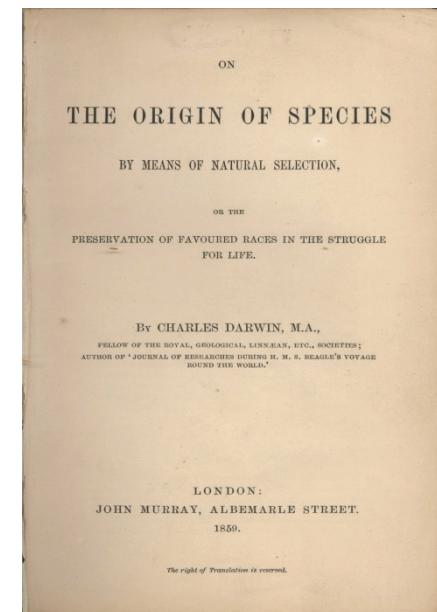
- **1859: Charles Darwin objavi knjigo *On the Origin of Species*, v kateri opiše teorijo evolucije, temelječe na dednih spremembah (nastajanju novih vrst) in naravni selekciji (izumiranju manj prilagojenih vrst)**



Charles Darwin, 1855



Darwinovi zapiski, 1837:
prva skica
filogenetskega drevesa
("drevesa življenja")

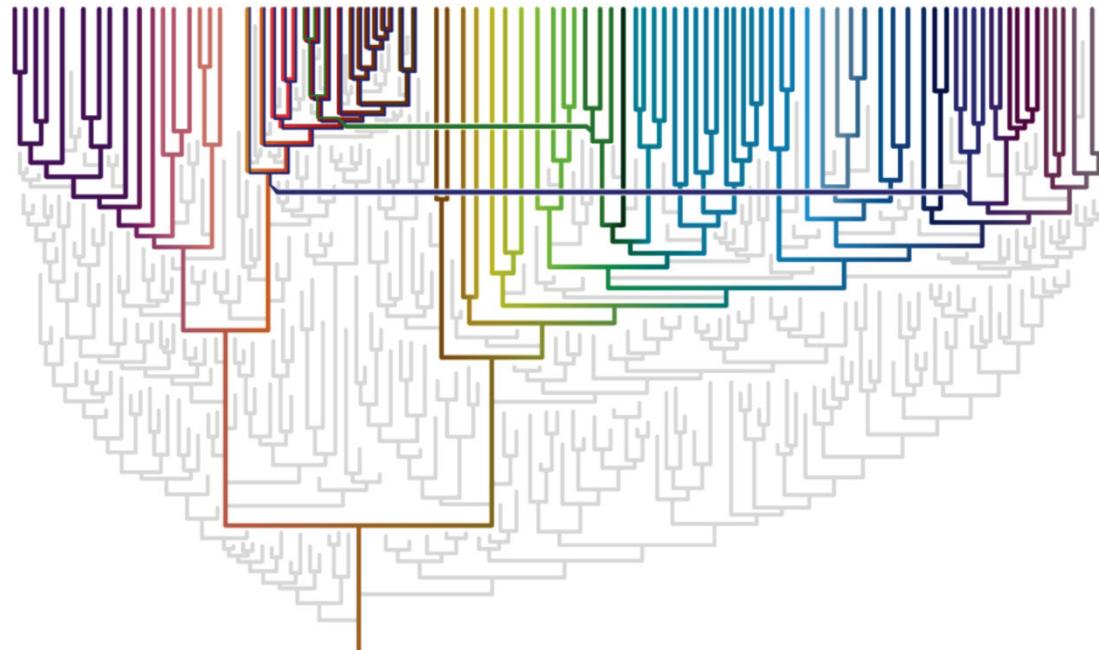


Naslovница prve izdaje
knjige *On the Origin of
Species*, 1859



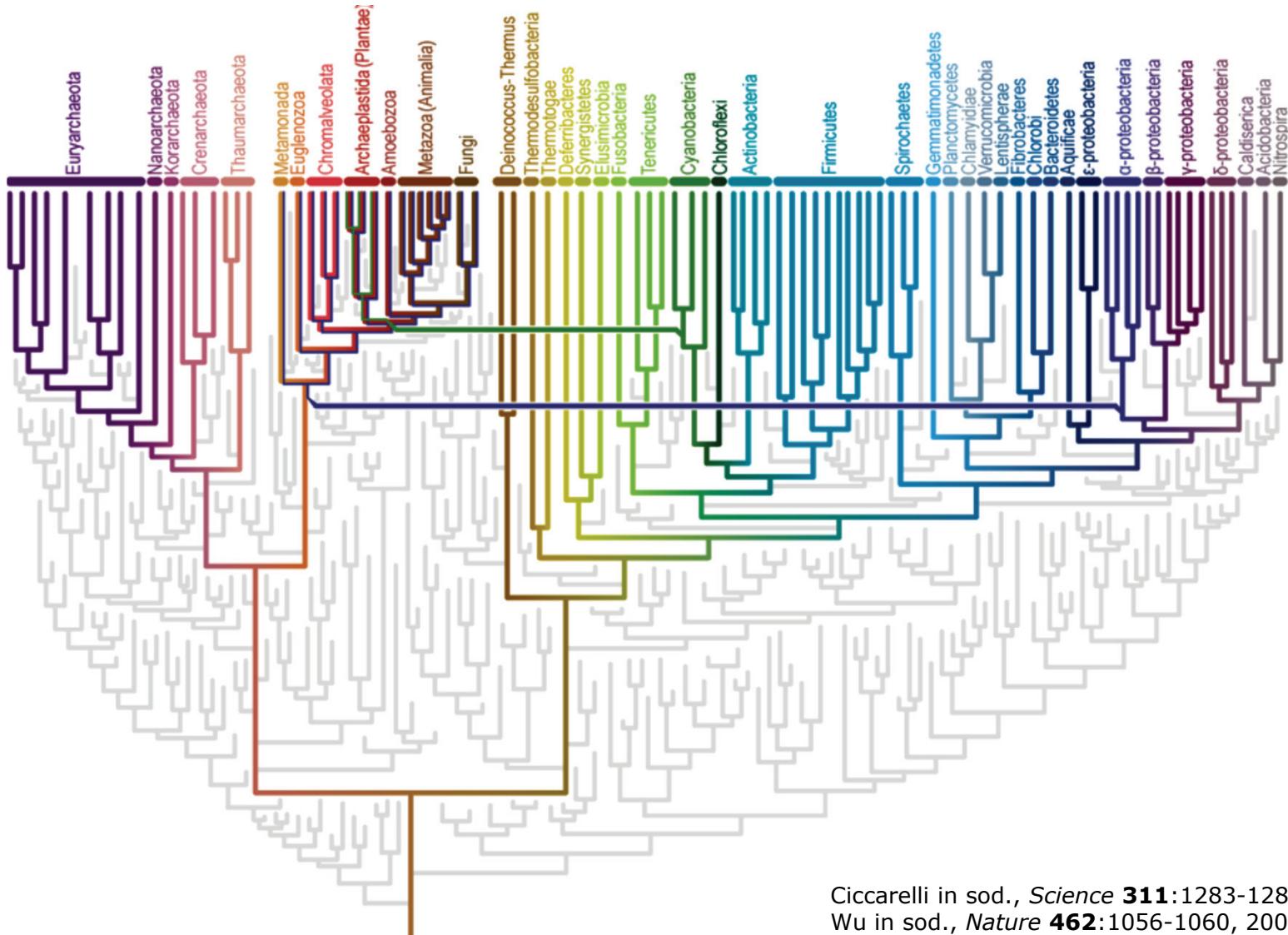
Evolucija razumevanja biološke evolucije

- od 1860-ih do 1980-ih: skiciranje filogenetskega drevesa s primerjavo fenotipa (zgradbe in razvoja organizma), omejeno predvsem na današnje vrste, z redkimi vpogledi v preteklost skozi fosile in izkopanine
- od 1990-ih do danes: hiter napredek pri rekonstrukciji filogenetskega drevesa na osnovi primerjav genomov in strukture posameznih genov





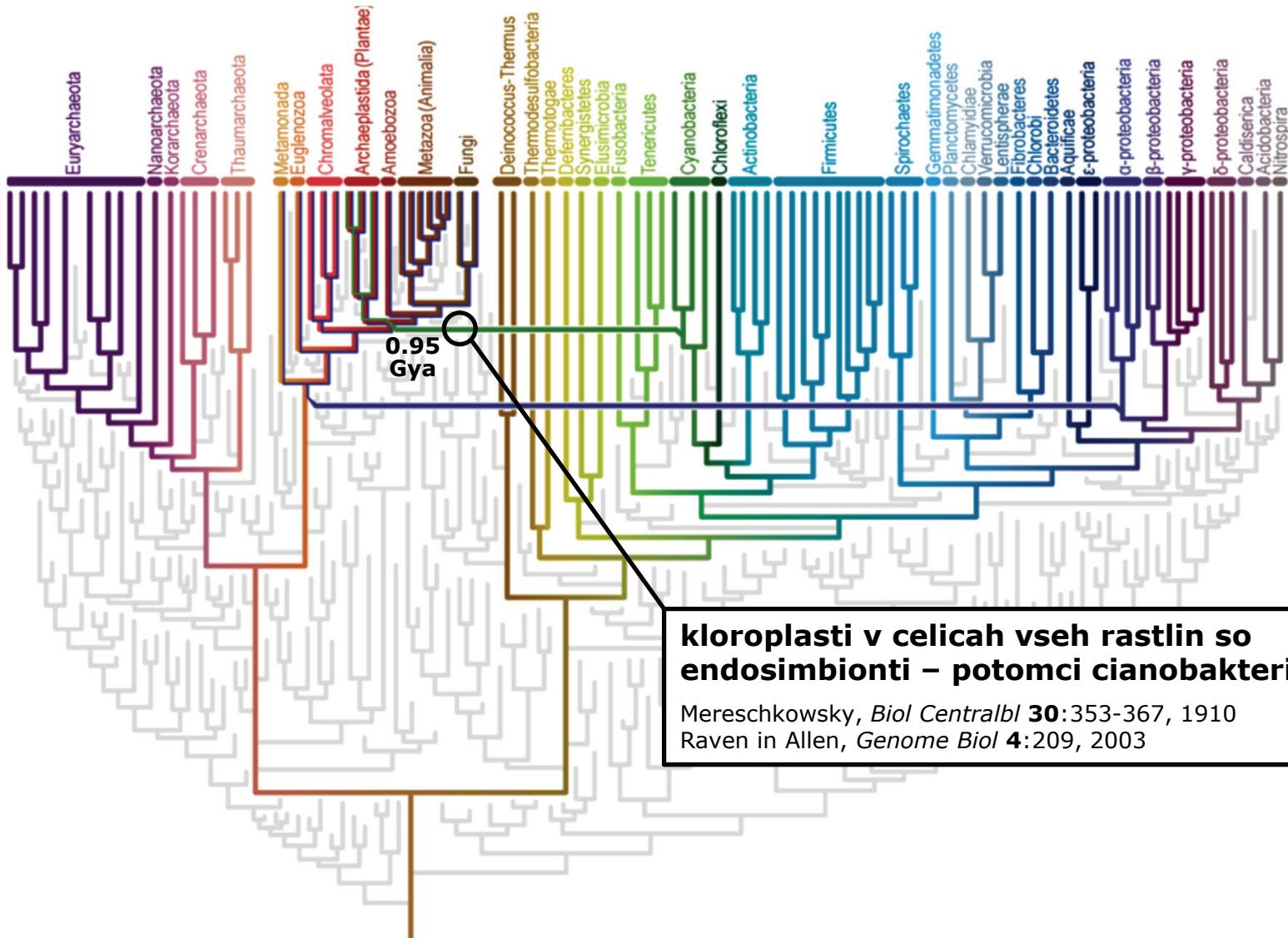
NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA



Ciccarelli in sod., *Science* **311**:1283-1287, 2006
Wu in sod., *Nature* **462**:1056-1060, 2009
Kotnik, *Phys Life Rev* **10**:351-370, 2013

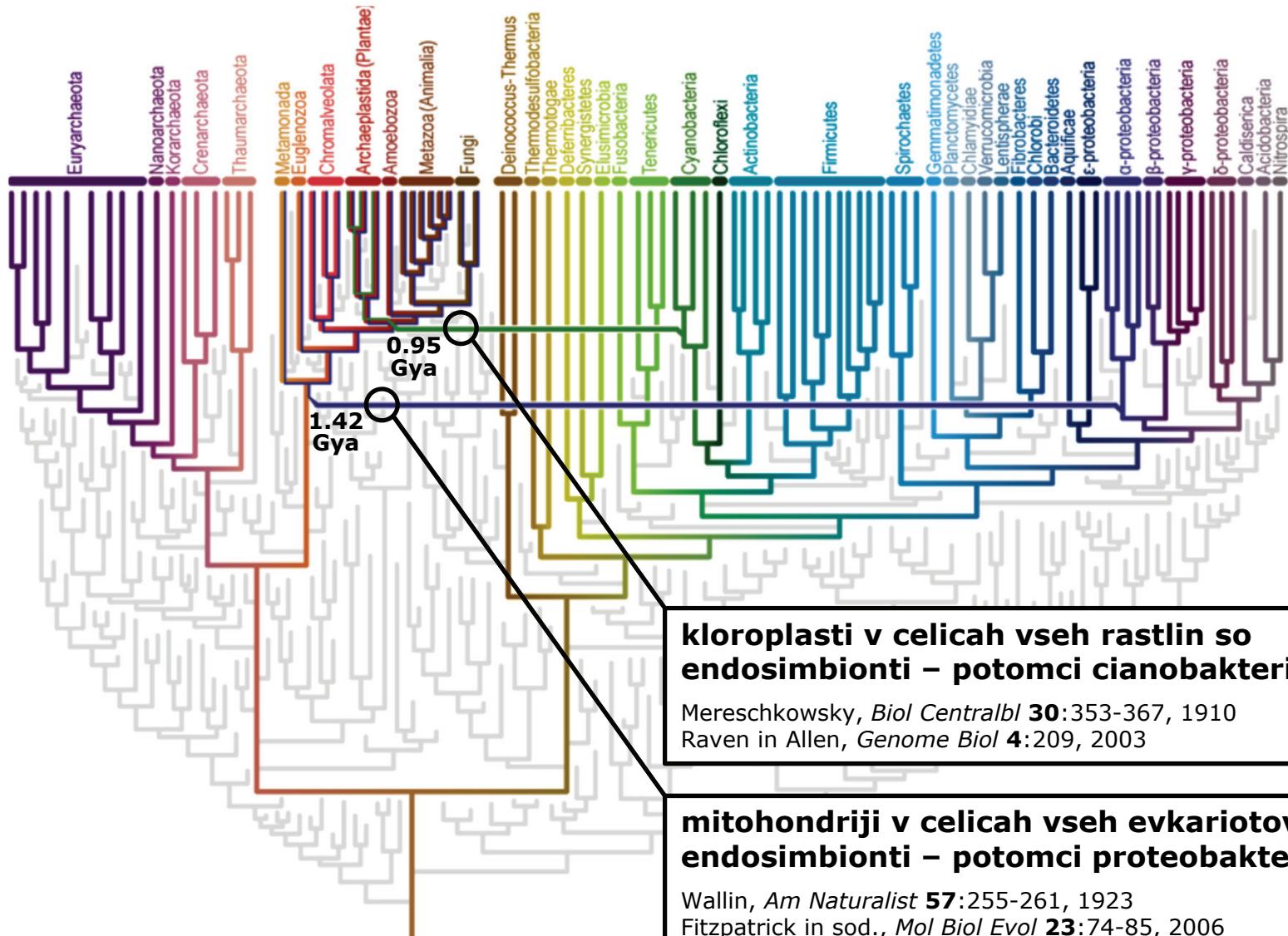


NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA



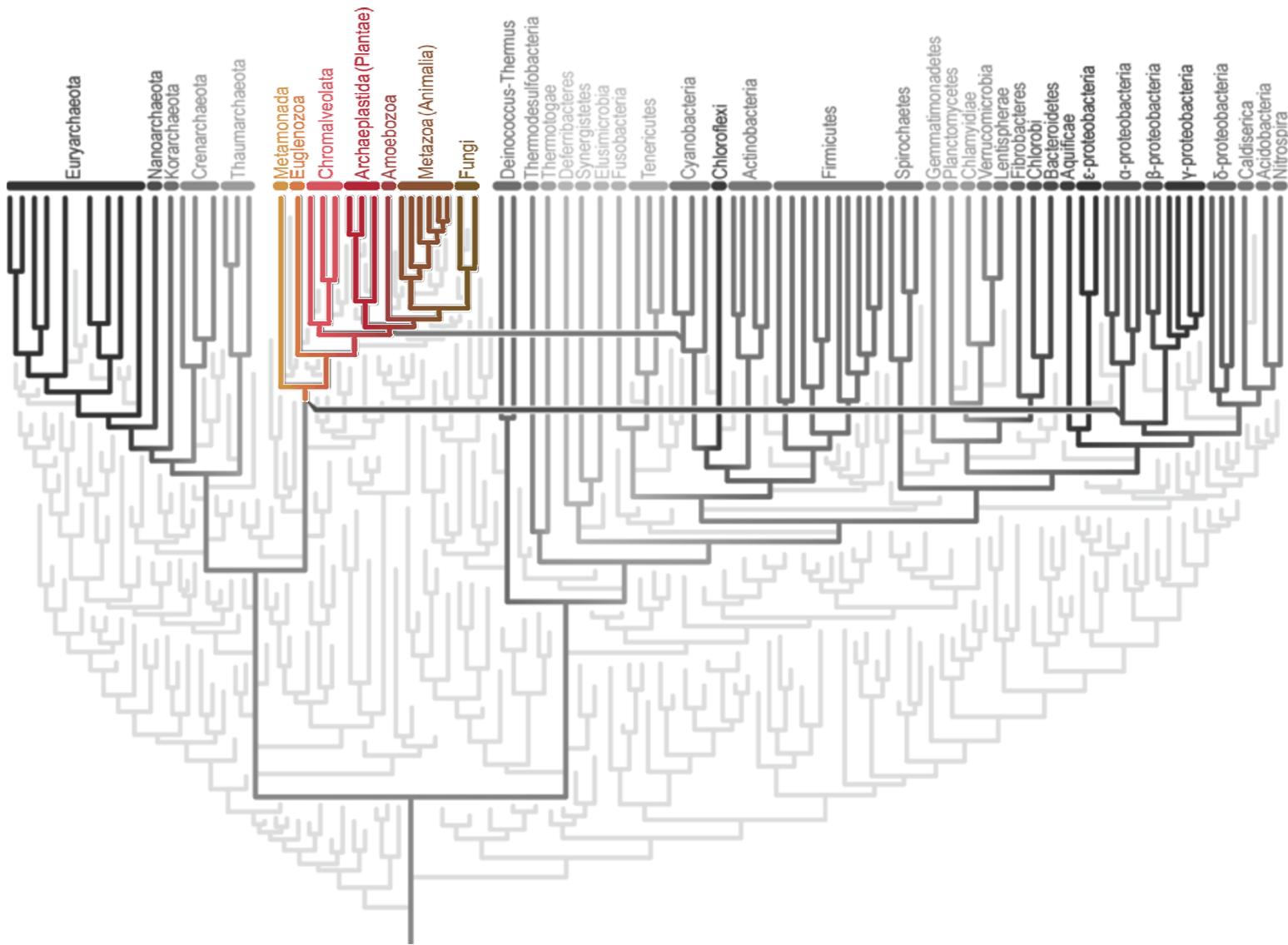


NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA



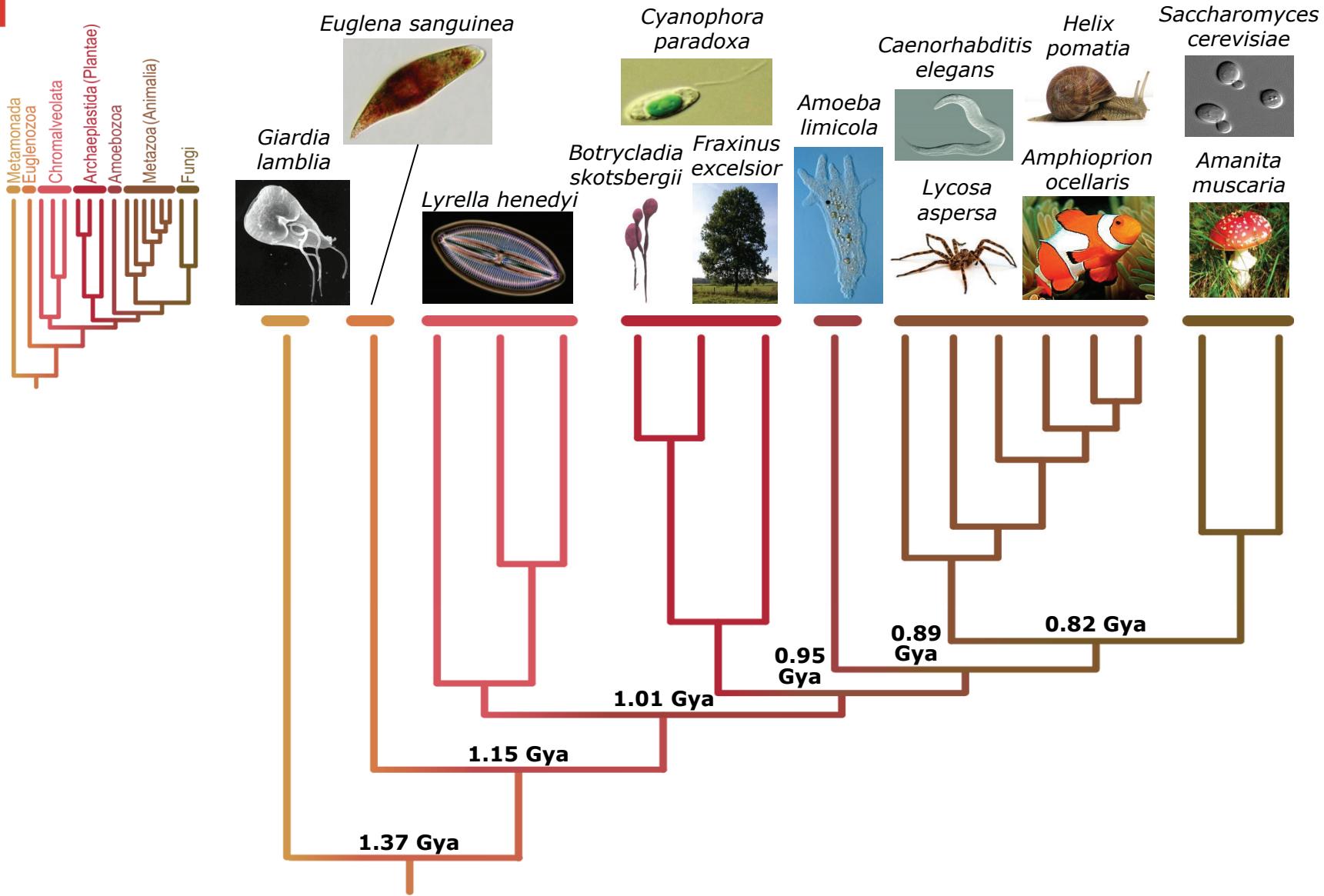


NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA





NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA





NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA

Metzoa (Animalia)

Xestospongia muta



Aplysina archeri



Porifera (spužve)

Hydra viridissima



Chrysaora colorata



Cnidaria (ožigalkarji)

C. elegans



T. mimicus



L. aspersa



Protostomia (gliste, črvi, mehkužci, členonožci)

Eumetazoa (pravi mnogoceličarji)

Bilateria (dvostransko simetrične živali)

Deuterostomia

Chordata (strunjarji)

F. milleporella



P. lividus



H. cinerascens



Echinodermata (iglokožci)

P. spinifera

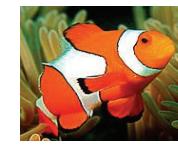


B. lanceolatum



Protochordata (plaščarji, brezglavci)

A. ocellaris



B. periglenes



M. musculus



N. naja



C. albus



Vertebrata (vretenčarji)

558 Mya

635 Mya

609 Mya

542 Mya

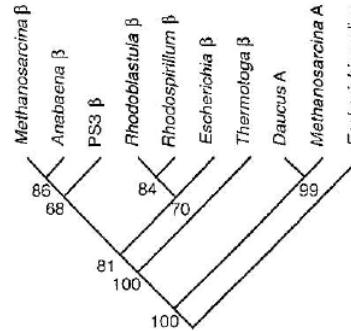
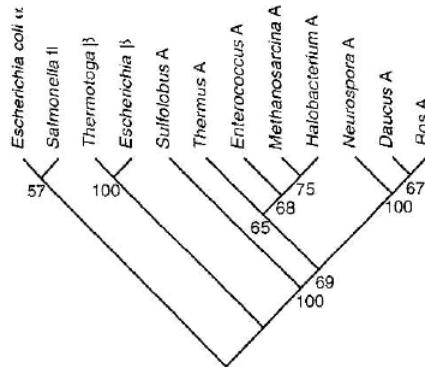
525 Mya



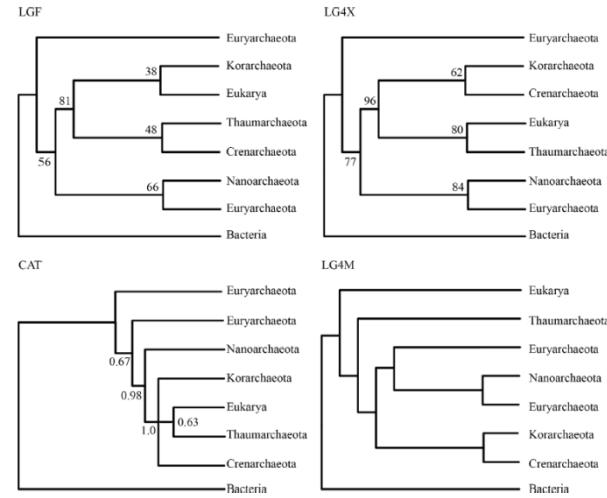
NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA

Težave na vidiku: drevo ni navadno drevo ...

- **evkariotski organizmi imamo nekatere gene, ki jih imajo tudi bakterije, evkariotom evolucijsko bližje arheje pa ne**
- **primerjava podobnosti celotnega genoma da drugačno "drevo" kot primerjave podobnosti strukture posameznih genov**
- **tudi primerjave podobnosti različnih genov dajejo različne rezultate**



Hilario in Gogarten, *Biosystems* **31**:111-119, 1993



Lasek-Nesselquist in sod., *Mol Phylogen Evol* **69**:17-38, 2013



NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA

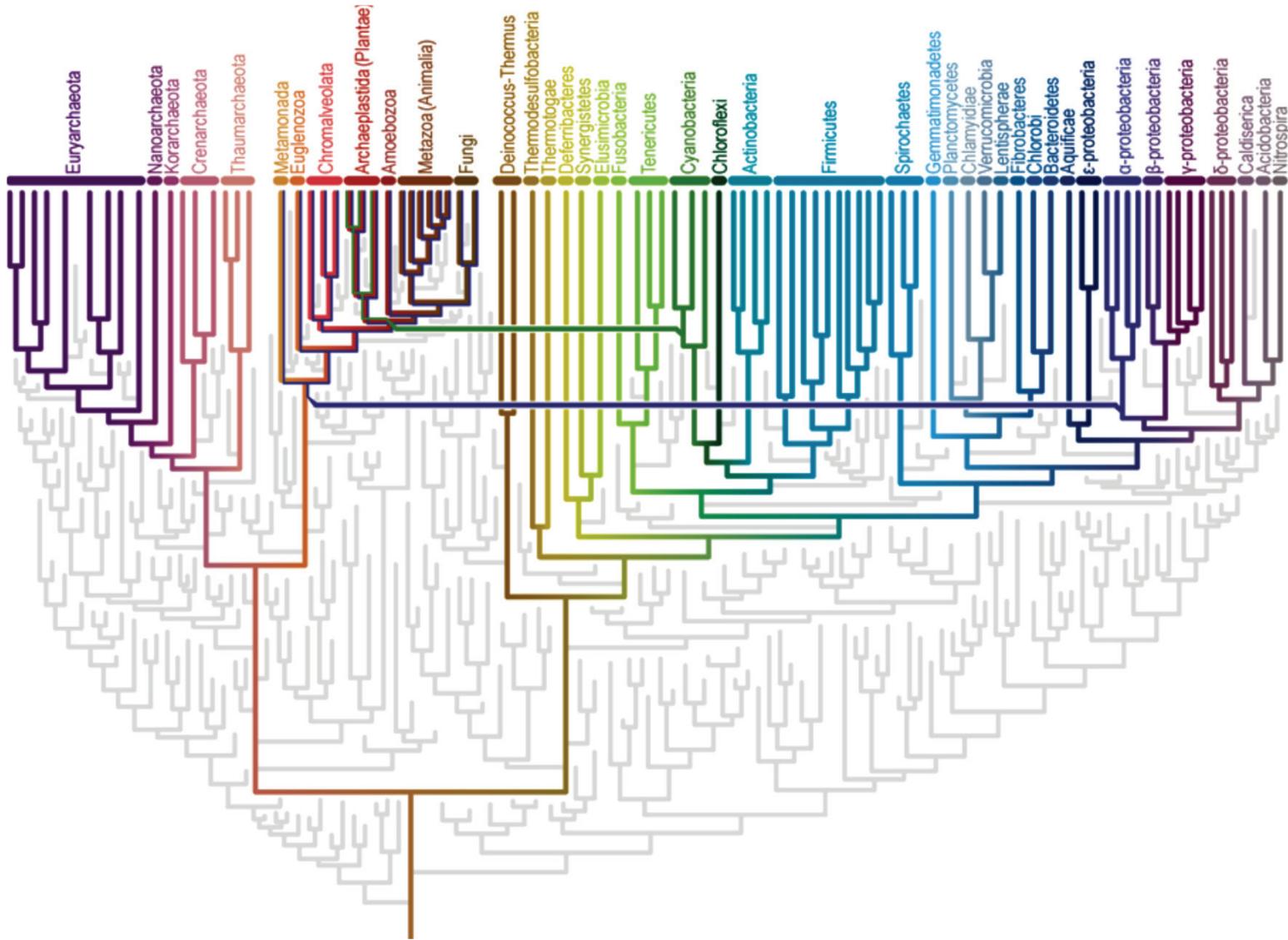
Težave na vidiku: drevo ni navadno drevo ...



Ficus benghalensis

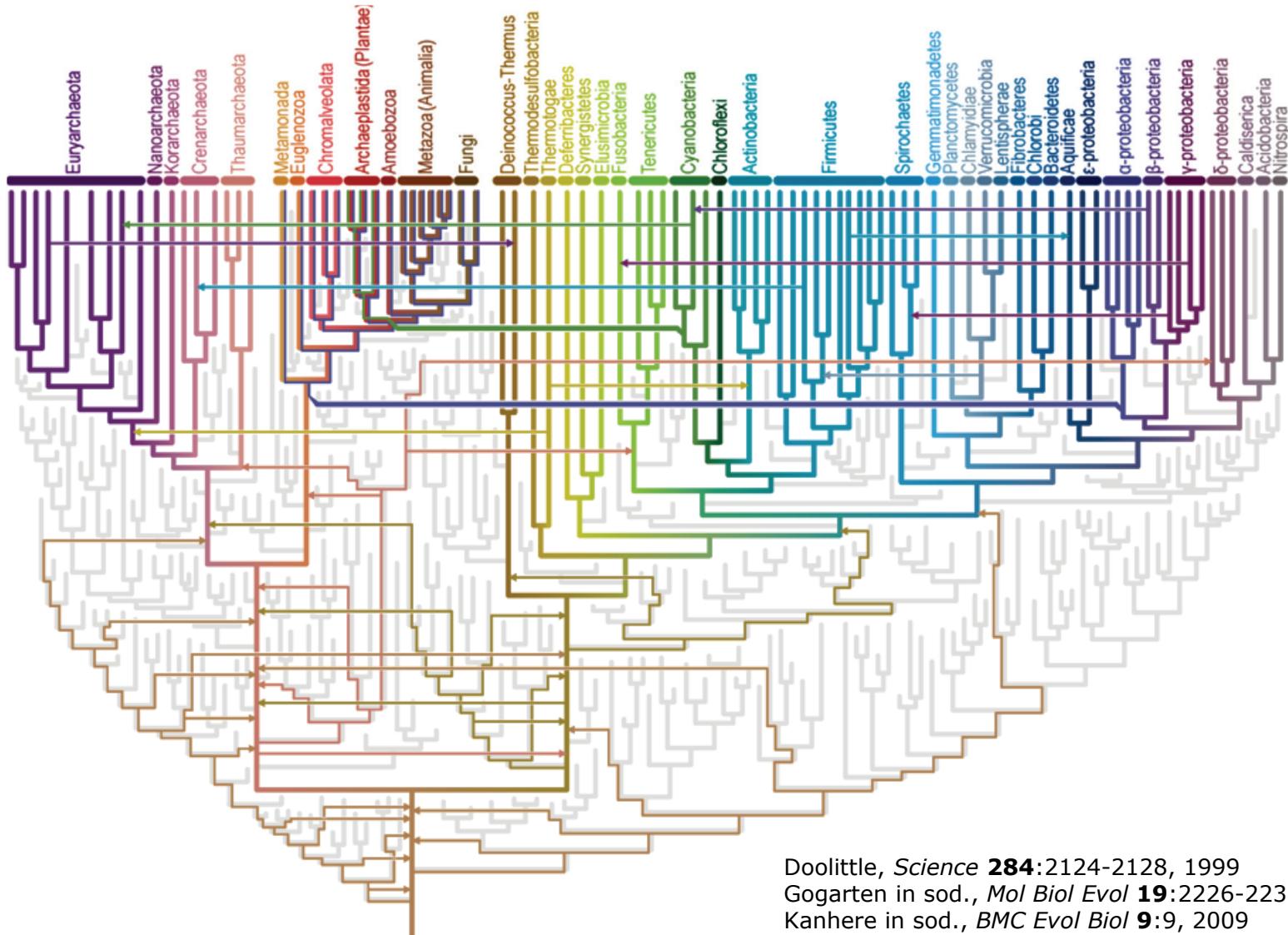


NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA





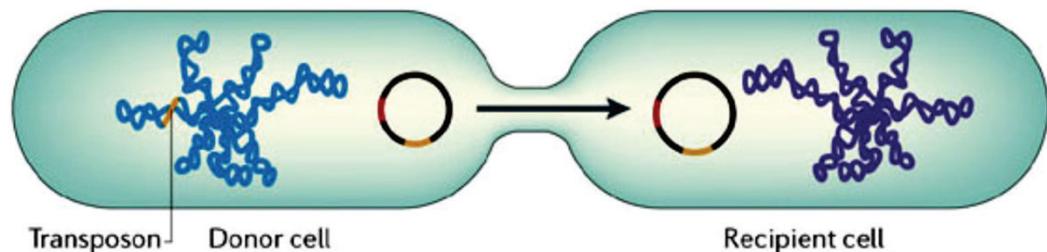
NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA



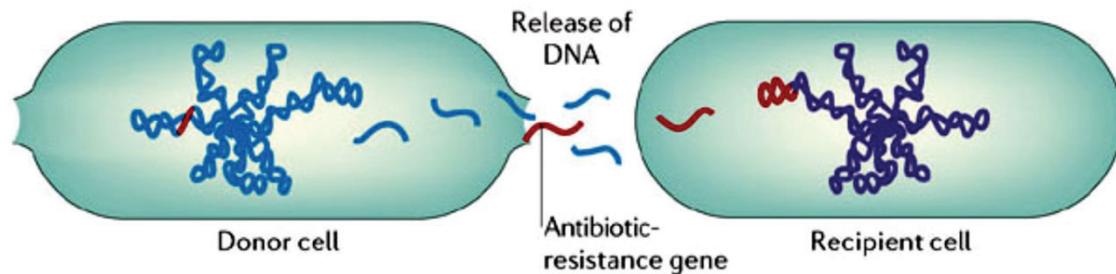


Trije biokemični mehanizmi prenosa genov

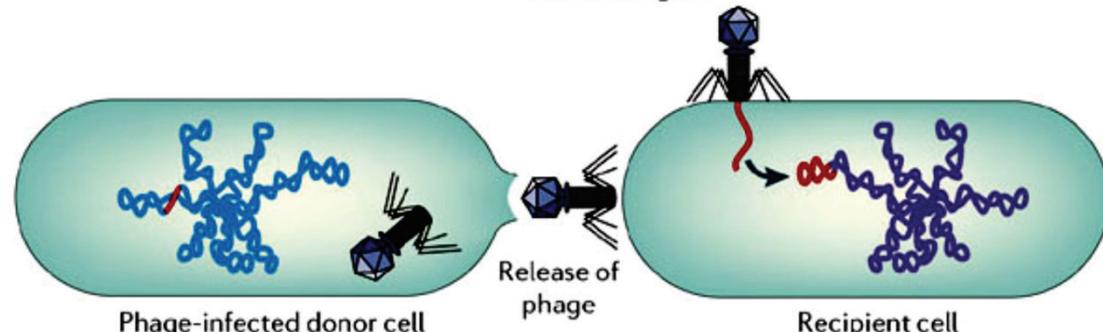
- **konjugacija:** prenos DNA med dvema prokariotoma prek neposrednega stika



- **kompetenca:** zmožnost vnosa prosto plavajoče DNA iz okolice



- **transdukcija:** prenos DNA iz enega organizma v drugega prek okužbe z virusom (fagom)





NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA

So lahko ti mehanizmi povzročili vse prenose?

- vsak od treh biokemičnih mehanizmov temelji na specifičnih proteinih (konjugacija: filamenti tipa P in F; kompetenca: filamenti tipa IV in DNA translokaze; transdukcia: pritrditveni proteini virusnega repka in bazne ploščice), torej so tudi sami nastali šele med evolucijo
- celo med prokarioti mnogi niso ne zmožni konjugacije, ne kompetentni, fagi pa jih okužujejo selektivno (vsak le ozko skupino organizmov)
- vse več študij kaže, da so tudi mnogi pomembni geni evkariotov rezultat prenosa genov iz prokariotov, vendar pri evkariotih ni ne konjugacije ne kompetence, pa tudi bakteriofagi jih ne morejo okužiti

 Eukaryotic genes of archaeabacterial origin are more important than the more numerous eubacterial genes, irrespective of function

Cotton in sod., *Proc Natl Acad Sci* **107**:17252-17255, 2010

 Insights & Perspective

Horizontal gene transfer in eukaryotes: The weak-link model

Huang, *Bioessays* **35**:868-875, 2013

 Review

 Horizontal gene transfer between bacteria and animals

Dunning Hotopp, *Trends Genet* **27**:157-163, 2011

 PROCEEDINGS
OF
THE ROYAL
SOCIETY B

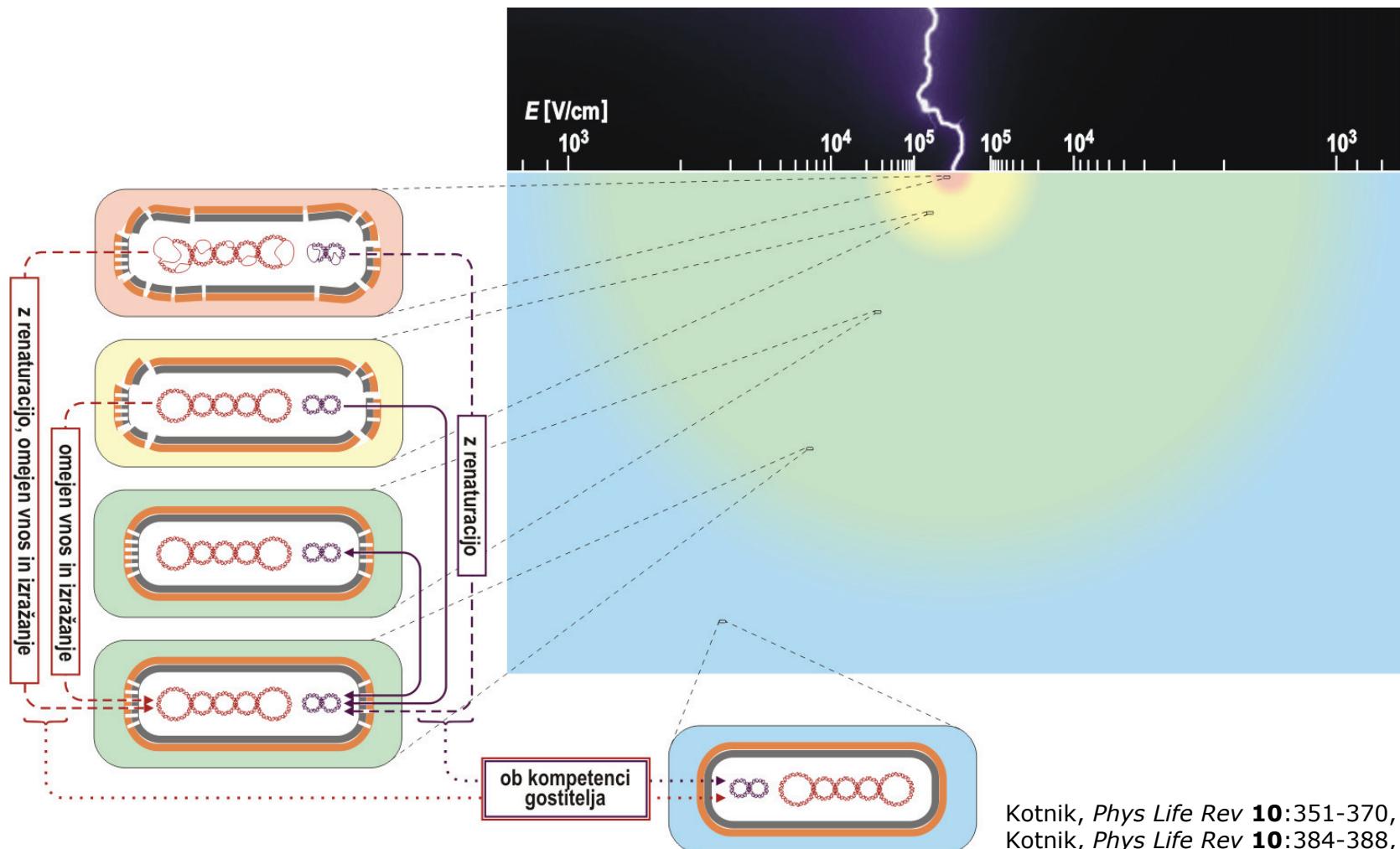
Horizontal gene transfer in the acquisition of novel traits by metazoans

Luis Boto, *Proc R Soc B* **281**:20132450, 2014



NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA

Bi lahko ostale prenose genov povzročile nevihte?



Kotnik, *Phys Life Rev* **10**:351-370, 2013
Kotnik, *Phys Life Rev* **10**:384-388, 2013



NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA

Bi lahko ostale prenose genov povzročile nevihte?

		RADIALNA RAZDALJA OD TOČKE VSTOPA MEDIANSKIE STRELE ($I_{\max} \approx 30 \text{ kA}$, $\tau \approx 100 \mu\text{s}$) V VODNI MEDIJ			
medij	učinek	deževnica (0.1 mS/cm)	potok (0.5 mS/cm)	jezero (1 mS/cm)	morje (10 mS/cm)
$\Delta T = 70^\circ\text{C}$		15 cm	10 cm	8 cm	4.6 cm
$\Delta T = 30^\circ\text{C}$		18 cm	12 cm	10 cm	5.7 cm
$E = 30 \text{ kV/cm}$		40 cm	18 cm	13 cm	4.0 cm
$E = 10 \text{ kV/cm}$		69 cm	31 cm	22 cm	6.9 cm
$E = 3 \text{ kV/cm}$		126 cm	56 cm	40 cm	13 cm

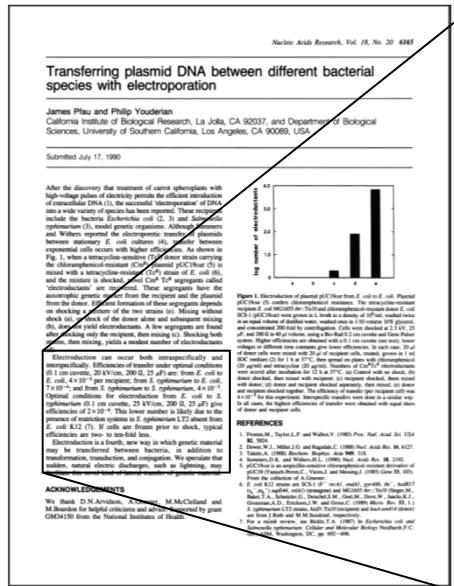
Kotnik, *Phys Life Rev* **10**:351-370, 2013



NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA

Bi lahko ostale prenose genov povzročile nevihte?

- marec 1990: Summers in Withers izpostavita mešanico dveh sojev bakterije *Escherichia coli* enemu pulzu (12 kV/cm, 4.6 ms) in zaznata prenos DNA med sojema pri eni na vsakih $\sim 10^6$ bakterij**
- julij 1990: Pfau in Youderian izpostavita mešanico bakterij *Escherichia coli* in *Salmonella typhimurium* enemu pulzu (20-25 kV/cm, 5 ms) in zaznata prenos DNA pri eni na vsakih ~ 1500 (iz *S. typhimurium* v *E. coli*) oziroma na vsakih ~ 500000 bakterij (iz *E. coli* v *S. typhimurium*)**



Electroporation can occur both intraspecifically and interspecifically. Efficiencies of transfer under optimal conditions (0.1 cm cuvette, 20 kV/cm, 200 Ω , 25 μ F) are: from *E. coli* to *E. coli*, 4×10^{-5} per recipient; from *S. typhimurium* to *E. coli*, 7×10^{-4} ; and from *S. typhimurium* to *S. typhimurium*, 4×10^{-3} . Optimal conditions for electroporation from *E. coli* to *S. typhimurium* (0.1 cm cuvette, 25 kV/cm, 200 Ω , 25 μ F) give efficiencies of 2×10^{-6} . This lower number is likely due to the presence of restriction systems in *S. typhimurium* LT2 absent from *E. coli* K12 (7). If cells are frozen prior to shock, typical efficiencies are two- to ten-fold less.

Electroporation is a fourth, new way in which genetic material may be transferred between bacteria, in addition to transformation, transduction, and conjugation. We speculate that sudden, natural electric discharges, such as lightning, may facilitate this novel kind of lateral transfer of genetic material.

Summers and Withers, *Nucleic Acids Res* **18**:2192, 1990

Pfau and Youderian, *Nucleic Acids Res* **18**:6165, 1990

Kilbane and Bielaga, *Biotechniques* **10**:354-365, 1991

Trevors, Antonie van Leeuwenhoek **67**:315-324, 1995

Demanèche et al, *Appl Environ Microbiol* **67**:3440-3444, 2001

Cérémonie et al, *Appl Environ Microbiol* **72**:2385-2389, 2006



NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA

Bi lahko ostale prenose genov povzročile nevihte?

PNAS

Origin of first cells at terrestrial, anoxic geothermal fields

PNAS PLUS

Armen Y. Mulkidjanian^{a,b,1}, Andrew Yu. Bychkov^c, Daria V. Dibrova^{a,d}, Michael Y. Galperin^e, and Eugene V. Koonin^{e,1}

^aSchool of Physics, University of Osnabrück, D-49069 Osnabrück, Germany; ^bA. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology and Schools of ^cGeology and ^dBioengineering and Bioinformatics, Moscow State University, Moscow 119992, Russia; and ^eNational Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20894

Edited* by Norman H. Sleep, Stanford University, Stanford, CA, and approved January 17, 2012 (received for review October 28, 2011)

All cells contain much more potassium, phosphate, and transition metals than modern (or reconstructed primeval) oceans, lakes, or rivers. Cells maintain ion gradients by using sophisticated, energy-dependent membrane enzymes (membrane pumps) that are embedded in elaborate ion-tight membranes. The first cells could possess neither ion-tight membranes nor membrane pumps, so the concentrations of small inorganic molecules and ions within protocells and in their environment would equilibrate. Hence, the ion composition of modern cells might reflect the inorganic ion

generated habitats (4). The reduced state of the cytoplasm indicates that the major biochemical pathways were fixed before the atmosphere became oxygenated as a result of the activity of cyanobacteria approximately 2.4 Gyr ago (5), so that substantial modification of these pathways in response to the oxygenation of the atmosphere was impossible. Instead, cellular life forms have evolved numerous energy-requiring membrane transport systems to sustain redox and (electro)chemical gradients between their interior and the environment.

Mulkidjanian in sod., *Proc Natl Acad Sci* **109**:E821-E830, 2012



NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA

Bi lahko ostale prenose genov povzročile nevihte?



Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

Physics of Life Reviews 10 (2013) 351–370

**PHYSICS of LIFE
reviews**

www.elsevier.com/locate/plrev

Review

Lightning-triggered electroporation and electrofusion as possible contributors to natural horizontal gene transfer

Tadej Kotnik *

Department of Biomedical Engineering, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, Tržaška 25, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

Received 9 April 2013; accepted 6 May 2013

Available online 9 May 2013

Communicated by E. Di Mauro

Abstract

Phylogenetic studies show that horizontal gene transfer (HGT) is a significant contributor to genetic variability of prokaryotes, and was perhaps even more abundant during the early evolution. Hitherto, research of natural HGT has mainly focused on three mechanisms of DNA transfer: conjugation, natural competence, and viral transduction. This paper discusses the feasibility of a

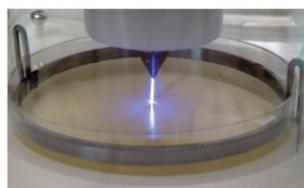
Kotnik, *Phys Life Rev* 10: 351–370, 2013



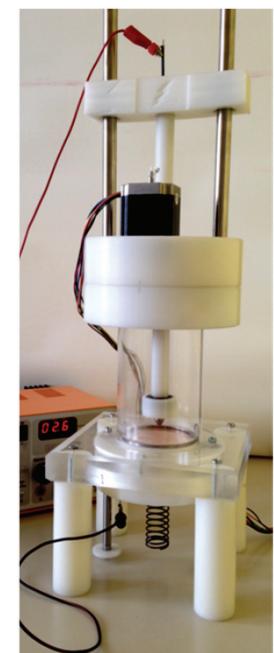
NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA

Eksperimentalno preizkušanje hipoteze

- **avtentični pulzi:** tok je lahko zmanjšan po amplitudi, saj to le zmanjša radialno razdaljo, na kateri sta doseženi določeni vrednosti ΔT in E , po časovnem poteku pa mora biti podoben toku strele; to dosežemo z razelektritvijo kondenzatorja ustrezne kapacitivnosti skozi zračno režo
- **avtentično razširjanje toka:** za radialno razširjanje mora biti sprejemna elektroda oblike obroča (2D) ali polkrogelne lupine (3D)



Marjanovič in Kotnik,
Bioelectrochemistry **94**:79-86, 2013

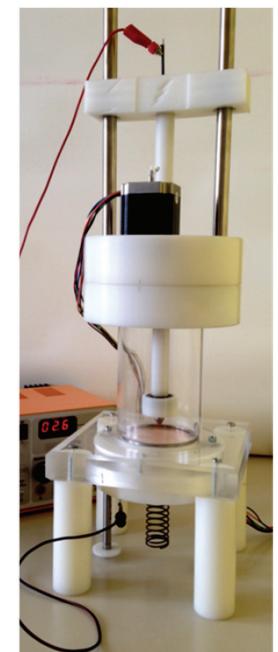
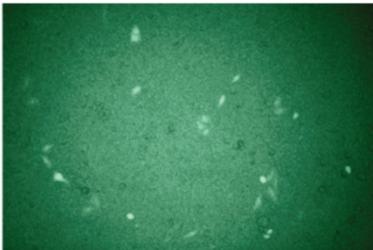
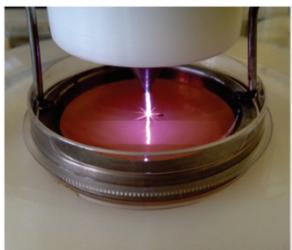




NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA

Eksperimentalno preizkušanje hipoteze

- **avtentični pulzi:** tok je lahko zmanjšan po amplitudi, saj to le zmanjša radialno razdaljo, na kateri sta doseženi določeni vrednosti ΔT in E , po časovnem poteku pa mora biti podoben toku strele; to dosežemo z razelektritvijo kondenzatorja ustrezne kapacitivnosti skozi oblok
- **avtentično razširjanje toka:** za radialno razširjanje mora biti sprejemna elektroda oblike obroča (2D) ali polkrogelne lupine (3D)





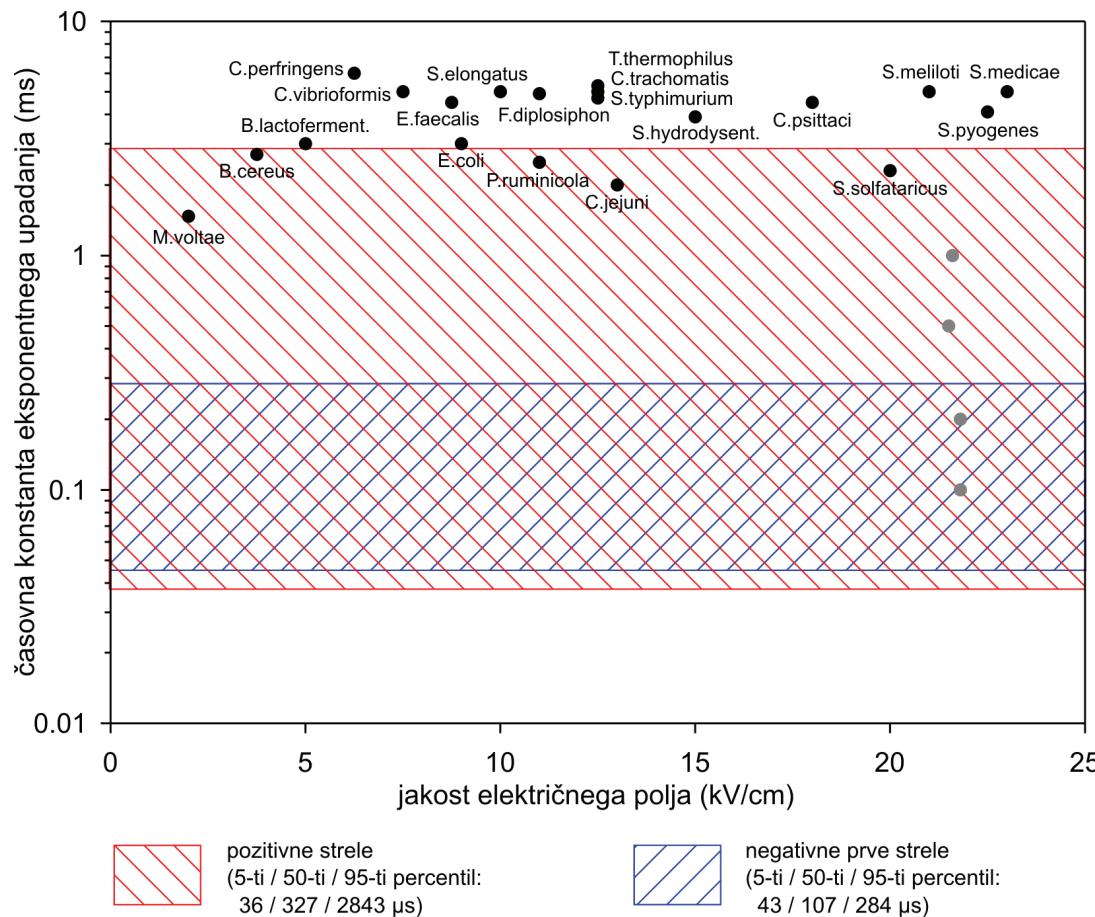
Eksperimentalno preizkušanje hipoteze

- ***avtentični pulzi:*** tok je lahko zmanjšan po amplitudi, saj to le zmanjša radialno razdaljo, na kateri sta doseženi določeni vrednosti ΔT in E , po časovnem poteku pa mora biti podoben toku strele; to dosežemo z razelektritvijo kondenzatorja ustrezne kapacitivnosti skozi oblok
- ***avtentično razširjanje toka:*** za radialno razširjanje mora biti sprejemna elektroda oblike obroča (2D) ali polkrogelne lupine (3D)
- ***avtentični organizmi:*** smiselnost se je osredotočiti predvsem na organizme, ki jih strela lahko doseže v njihovem naravnem habitatiju
- ***avtentična DNA:*** zanimiva je tako plazmidna kot kromosomska DNA, a ne sme biti predhodno obdelana z namenom povečane prenosljivosti in/ali izražanja, ali z namenom upočasnjenje degradacije
- ***avtentično okolje:*** medij mora biti čim bolj podoben naravnemu habitatiju organizma, brez modifikatorjev osmolarnosti in prevodnosti, stabilizatorjev DNA in pospeševalcev prenosljivosti



NEVIHTE, ELEKTROPORACIJA IN EVOLUCIJA

Eksperimentalno preizkušanje hipoteze





Univerza v Ljubljani
Fakulteta za elektrotehniko



Hvala za pozornost!