

SEKUNDARNI METABOLIZAM

prof. dr. sc. Anita Slavica

sekundarni metabolizam (1)

- je li sekundarni metabolizam:
 - izbacivanje „nepotrebnih” međuspojeva primarnog metabolizma iz stanice ?
 - proizvodnja „neprirodnih” spojeva u stanicama koje u određenim uvjetima ne mogu više regulirati svoj metabolizam ?
 - detoksikacija, pohranjivanje, „prazan hod” ili „skretanje” preopterećenog metabolizma ?
 - diferencijacija stanica ?
 - pohranjivanje (suviška) supstrata iz okoline ?
 - medijacija ekoloških interakcija ?
 - „pomoć” biokemijskoj evoluciji?

Sir Alexander Fleming (1881.-1955.)

- okarakterizirao je antibiotsku supstancu lizozim i izolirao je antibiotik penicilin iz

Penicillium notatum;

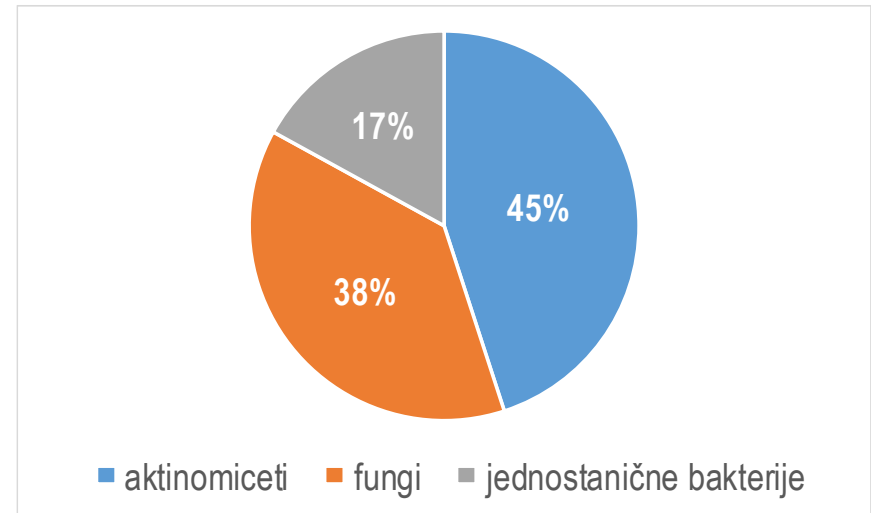
- dobio 1945. godine Nobelovu nagradu

- (filamentozni) fungi, kvasci (*S. cerevisiae*) i bakterije - *cell factories*



sekundarni metabolizam (3)

- bakterije - *Actinomycetes*
- Selman Waksman (1888.-1973.)
 - 1952. Nobelova nagrada, streptomycin
 - genus *Streptomyces*
- Arnold Demain



- gotovo većina živih organizama može proizvesti sekundarni metabolit
- do danas (2017.) je okarakterizirano je 22500 sekundarnih metabolita
- samo oko 100 sekundarnih metabolita se koristi
- aktinomiceti su glavni industrijski proizvođači sekundarnih metabolita

sekundarni metabolizam (4)

- osim penicilinskih antibiotika, najviše se proizvode i u upotrebi su ovi fungalni sekundarni metaboliti:
 - statini,
 - griseofulvin i
 - imunospresivi.

sekundarni metabolizam (5)

- sekundarni metaboliti:

antibiotici;

drugi lijekovi;

(miko)toksini;

pesticidi;

insekticidi;

herbicidi;

životinjski i biljni faktori rasta i

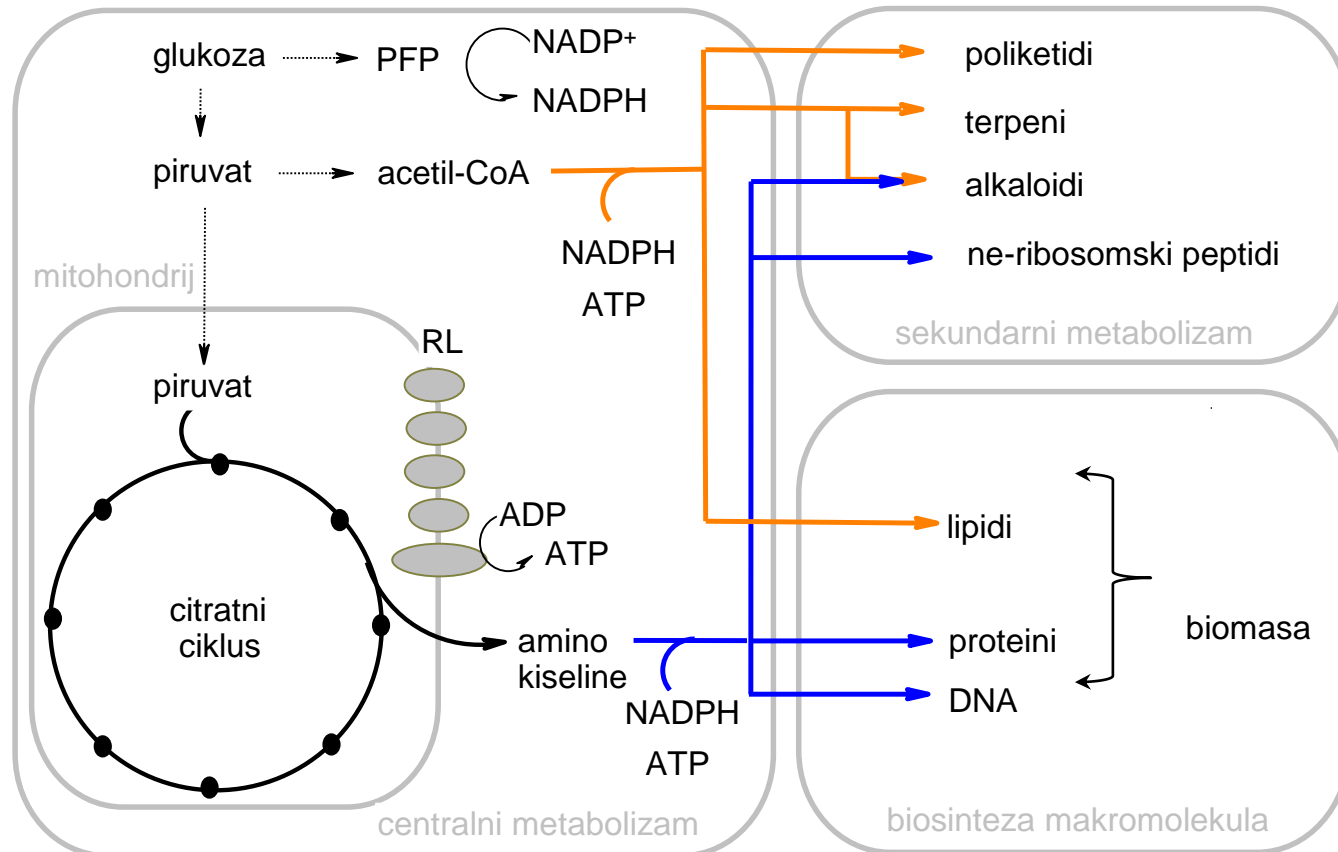
drugi spojevi.

sekundarni metabolizam (6)

- reakcije sekundarnog metabolizma smatraju se modifikacijama reakcija primarnog metabolizma;
- proizvodi sekundarnog metabolizma nisu nužni za rast stanice;
- sekundarni metaboliti imaju vrlo različite kemijske strukture i vrlo različitu biološku aktivnost;
- kemijska struktura i aktivnost sekundarnih metabolita ovisi o vrsti mikroorganizma koji proizvodi ovaj metabolit;
- set specifičnih gena jednog genoma kodira za enzime ovih metaboličkih puteva i njihova ekspresija regulira se posebnim mehanizmima i to kroz određeno vrijeme i različitim nivoima ekspresije ovih gena;
- mehanizmi regulacije proizvodnje sekundarnih metabolita jako su dobro integrirani u fiziologiju (mikro)organizma proizvođača sekundarnih metabolita;
- transfer gena između različitih (mikro)organizama doprinosi evoluciji sekundarnog metabolizma;
- razvoj i hibridizacija različitih analitičkih metoda bitno su doprinijeli pojašnjavaњу metaboličkih putova i reakcija koje se pribrajaju u sekundarni metabolizam;

sekundarni metabolizam (7)

- biosinteza sekundarnih metabolita iz preteča centralnog metabolizma (fungi)
- sekundarni metaboliti proizvode se karakterističnim biosintetskim putovima iz međuspojeva primarnog metabolizma



- niski prinosi sekundarnih metabolita (suboptimalni rast industrijskog mikroorganizma)
- biosinteza sekundarnih metabolita „natječe” se za međuspojeve centralnog metabolizma sa sintezom biomase (suboptimalan rast);
- primjena metaboličkog inženjerstva

- rezistencija proizvođača na sekundarne metabolite: specifični transporteri,
 kompartmentacija (vezikule),
 rezistentni enzimi.

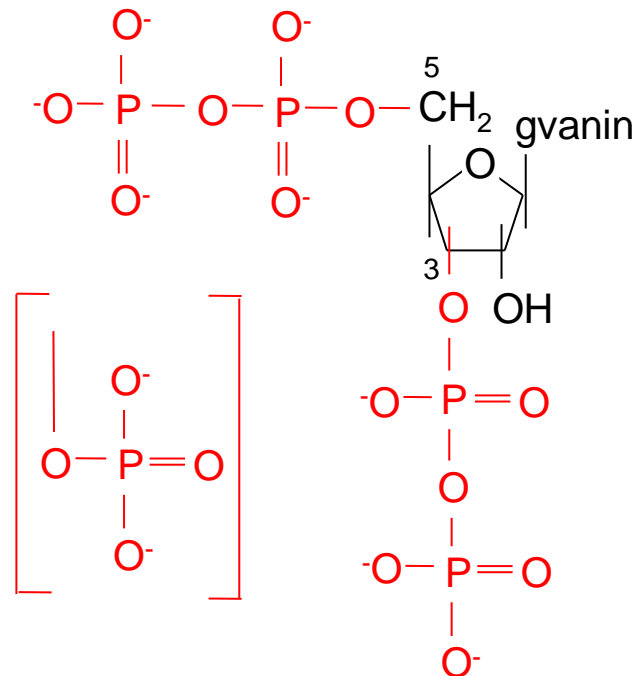
- *Streptomyces* sp. - Gram-pozitivne bakterije koje formiraju micelij
 - vrlo značajni proizvođači sekundarnih metabolita, npr. anti-infektivnih i anti-tumorskih spojeva i drugih spojeva sa primjenom u medicini;
 - biološka funkcija većine sekundarnih metabolita koje mogu proizvesti *Streptomyces* sp. je nepoznata;
 - nemaju tzv. adaptivnu ekološku ulogu;
 - tijekom površinskog rasta biosinteza sekundarnih metabolita obično započinje u fazi formiranja hifa ili čak malo prije;
 - pri submerznom rastu biosinteza sekundarnih metabolita je karakteristična za stacionarnu fazu rasta *Streptomyces* sp. i povezuje se sa limitacijom određenog supstrata;
 - ekspresiju gena (svaki preko 100 kb), koji kodiraju proteine/enzime uključene u sekundarni metabolizam, kontroliraju različiti regulatorni proteini koji se sintetiziraju nakon pobude i to različitim vanstaničnim i unutarstaničnim signalnim putovima;

Streptomyces sp.

- neki geni, koji kodiraju proteine/enzime koji sudjeluju u sekundarnom metabolizmu, uključeni su i u proces formiranja zračnih hifa i spora;
- smanjenje brzine rasta *Streptomyces* sp. signal je za sekundarni metabolizam;

Streptomyces sp. – unutarstanični signal

- smatra se da je visoko-fosforilirani guanozin [(p)ppGpp] jedna od signalnih molekula za sekundarni metabolizam

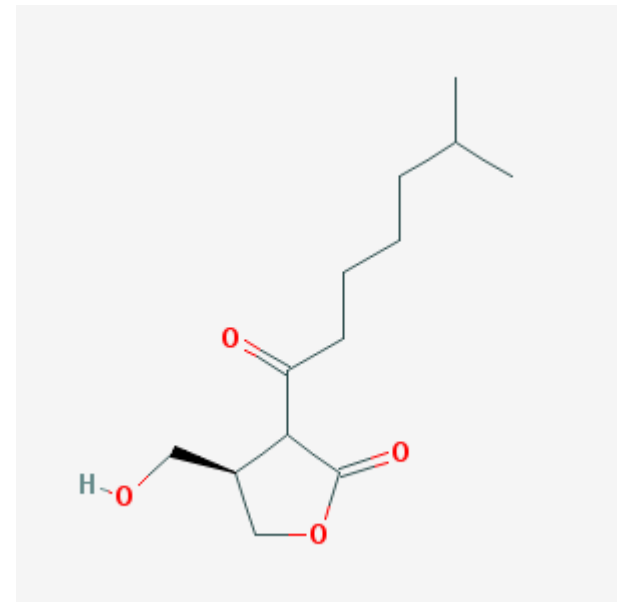


Streptomyces sp. – unutarstanični signal

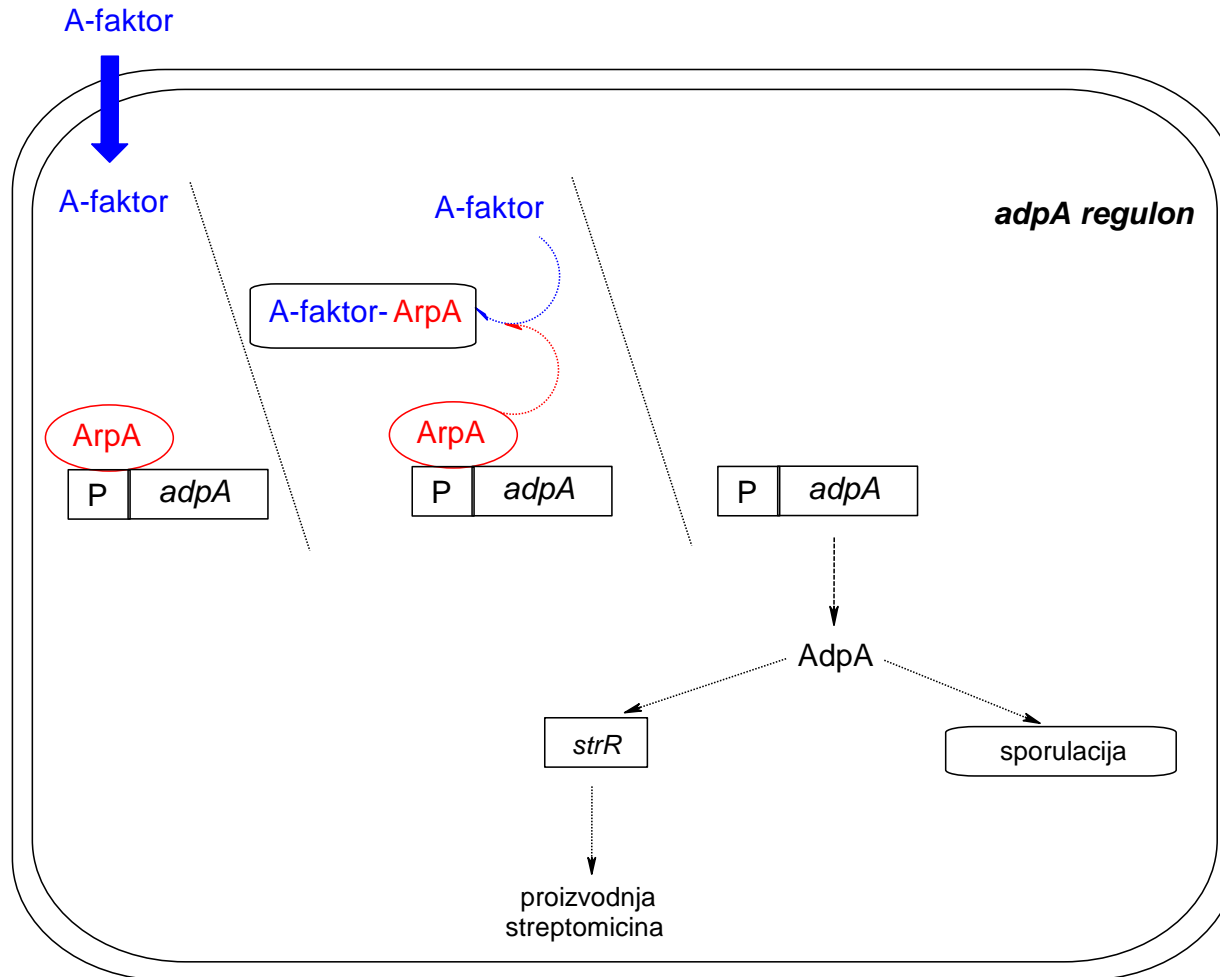
- aktivnost ribosomske (p)ppGpp sintetaze RelA potrebna je za sintezu antibiotika i to u uvjetima limitacije dušikom (*S. coelicolor* i *S. clavuligerus* - cefamicin C);
- nije sasvim jasna uzročno-posljedična veza između djelovanja ppGpp tj. RelA i sinteze antibiotika pri usporenom rastu *Streptomyces* sp.;
- ppGpp promovira transkripciju gena, koji kodiraju za proteine/enzime uključene u biosintezu antibiotika ili je transkripcija ovih gena indirektna posljedica redukcije brzine rasta vrsta *Streptomyces* zbog inhibicije rRNA sinteze pomoću ppGpp;
- ppGpp se veže na RNA polimerazu, mijenja joj konformaciju i ovako promijenjena RNA polimeraza „prepisuje” gene za sekundarni metabolizam, a ne „prepisuje” gene za primarni metabolizam;
- mehanizam djelovanja RelA i/ili ppGpp do danas nije u cjelosti pojašnjen;

Streptomyces sp. – vanstanični signal

- γ -butirolaktoni: A-faktor (2-izokaprioloil-3*R*-hidroksimetil- γ -butirolakton; *S. griseus*)
- potreban za biosintezu streptomicina i morfološku diferencijaciju



sekundarni metabolizam (14)



- poliketidi

- biosinteza slična sintezi masnih kiselina

- za razliku od biosinteze masnih kiselina: vrlo različiti acili preteče u sintezi poliketida i

djelomični ili potpuni izostanak reakcije redukcije β -keto grupe nakon produženja lanca (zbog toga su poliketidni lanci više oksidirani i mogu sudjelovati u više različitih reakcija od masnih kiselina, npr. u reakcijama kondenzacija - aromatski i/ili makrolidni sekundarni metaboliti)

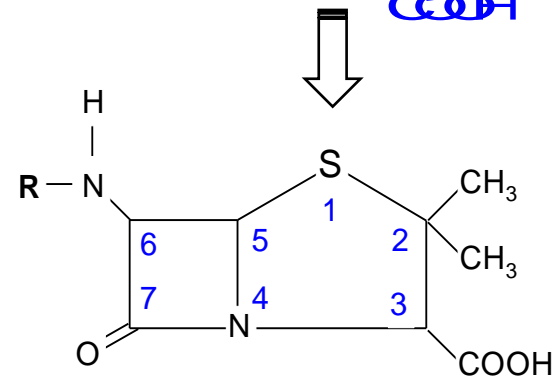
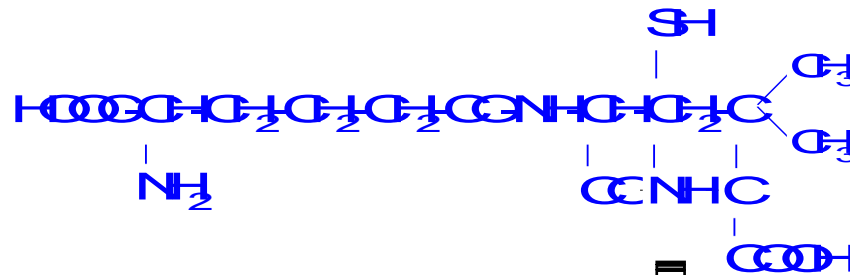
sekundarni metabolizam (16)

- β -laktamski sekundarni metaboliti

Lys \rightarrow L- α -amino adipinska kiselina



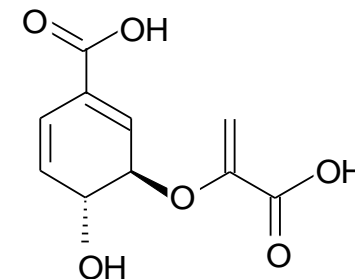
α -amino adipinska kiselina + L-Cys + D-Val \rightarrow α -amino adipil-L-cisteinil-D-valin (ACV)



sekundarni metabolizam (17)

- korizmati

korizmična kiselina je „raskršće” u biosintezi aromatskih spojeva
(amino kiselina i sekundarnih metabolita – npr. kloramfenikola)



- perspektiva
 - bioinformatika (omics integration);
 - set specifičnih gena jednog genoma kodira za enzime sekundarnog metabolizma i oni se obično ne eksprimiraju u standardnim laboratorijskim uvjetima (sir A. Fleming !);
 - kako aktivirati ove latentne setove gena/metaboličkih putova (sekundarni metabolom) ?
 - sintetska biologija: sinteza cijelih setova gena sa odgovarajućim promotorima i njihov transfer u stanice pogodnog (industrijskog) (mikro)organizma (*Saccharomyces cerevisiae*).

REGULACIJA METABOLIZMA

regulacija metabolizma

- jednostanični mikroorganizmi: stanice rastu i dijele se brzinom koju određuju ekološki uvjeti
- višestanični organizmi: diferencirane stanice, rast i umnažanje pojedinih vrsta stanica u funkciji opstanka (makro)organizma
- osim selektivnog pritiska, preduvjet opstanka bilo kojeg organizma je **fiziološka ekonomičnost**
- generacijsko vrijeme industrijskih mikroorganizama t_g od 10 min do nekoliko sati, dana, ...
 - vremenski period tijekom kojeg iz jedne stanice nastanu dvije stanice
 - za nastanak dviju stanica treba sintetizirati nekoliko tisuća malih, srednjih i makromolekula u nekoliko tisuća enzimskih reakcija i to u odgovarajućim omjerima
- pri tome stanica mora biti spremna prilagoditi se svim mogućim promjenama u svojoj okolini
- stoga sve enzimske reakcije, koje zajedno čine sveukupni metabolizam stanice, moraju biti djelotvorno **REGULIRANE**
- signali iz okoline i iz unutrašnjosti stanice potiču prilagodbu metabolizma na te promjene, i to na nekoliko razina

razine regulacije metabolizma

1. TRANSKRIPCIJA (DNA → mRNA)

2. TRANSLACIJA (mRNA → proteini)

3. POST-TRANSLACIJSKE PROMJENE PROTEINA

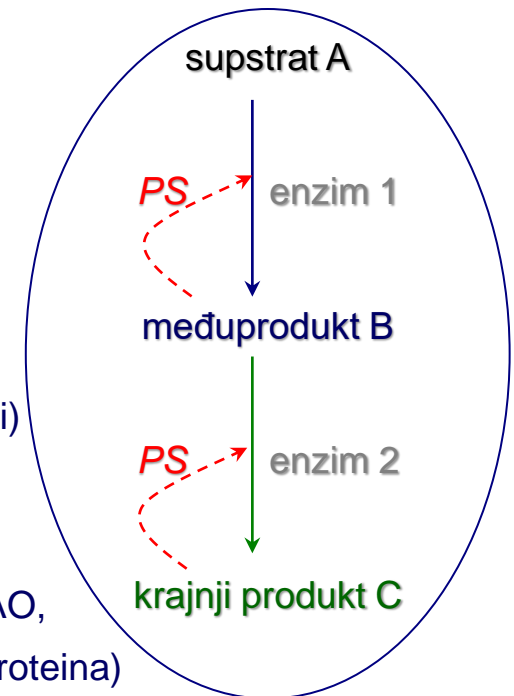
3.1. KOMPETITIVNA INHIBICIJA

3.2. ALOSTERIČKA REGULACIJA (nekovalentna)

- povratna sprega (PS, anabolizam)
- unaprijedna regulacija (katabolizam)

3.3. KOVALENTNE PROMJENE

- fosforilacija (osmoregulacija kod *E. coli*, porini)
- metilacija (kemotaksija kod enterobakterija)
- acetilacija i acilacija
- proteoliza (peroksizomalna liza oksidirane DAO, peroksizomalna liza oksidiranog proteina)



razine regulacije metabolizma

4. KOMPARTMENTACIJA

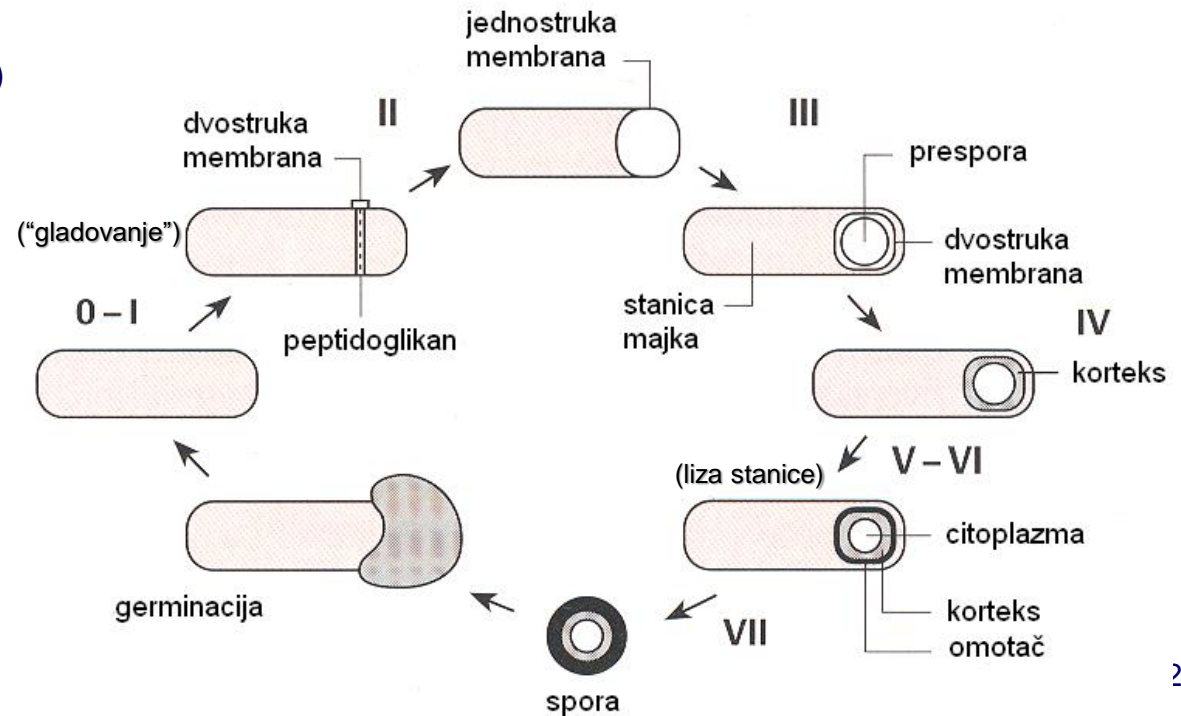
prokarioti – citosol, membrana, periplazma;

eukarioti – mitohondriji, plastidi, ER, vezikule, vakuole

5. SPECIFIČNA REKOMBINACIJA

· sporulacija

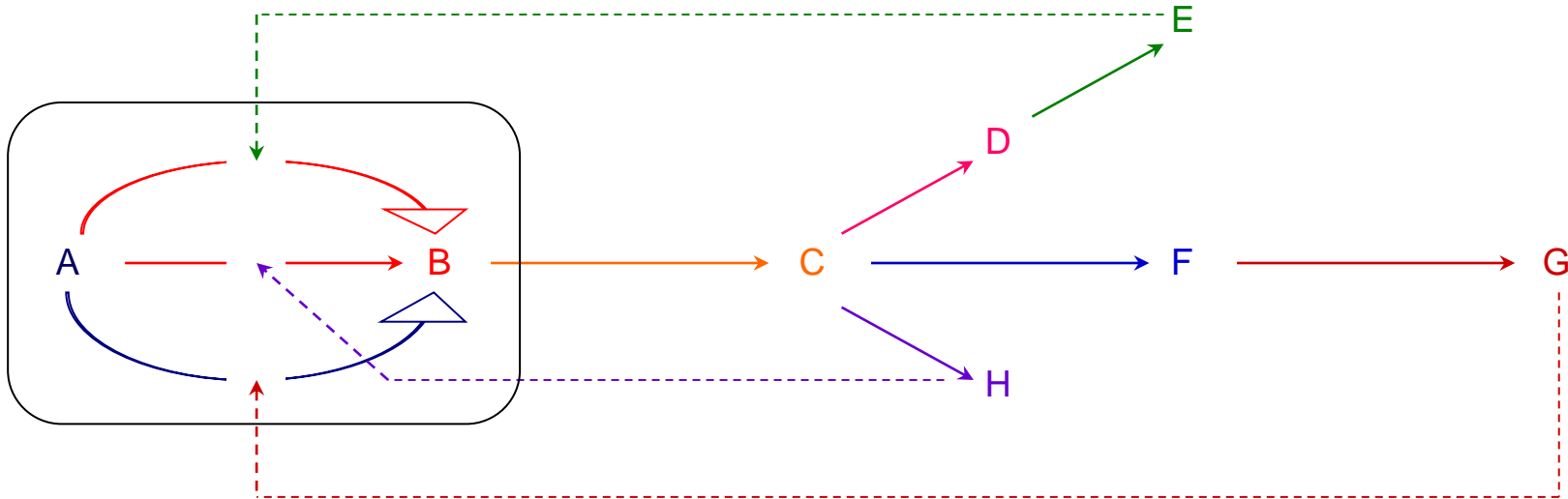
(*Bacillus subtilis*)



regulacija složenih metaboličkih puteva na razini aktivnosti enzima

1. IZOENZIMI

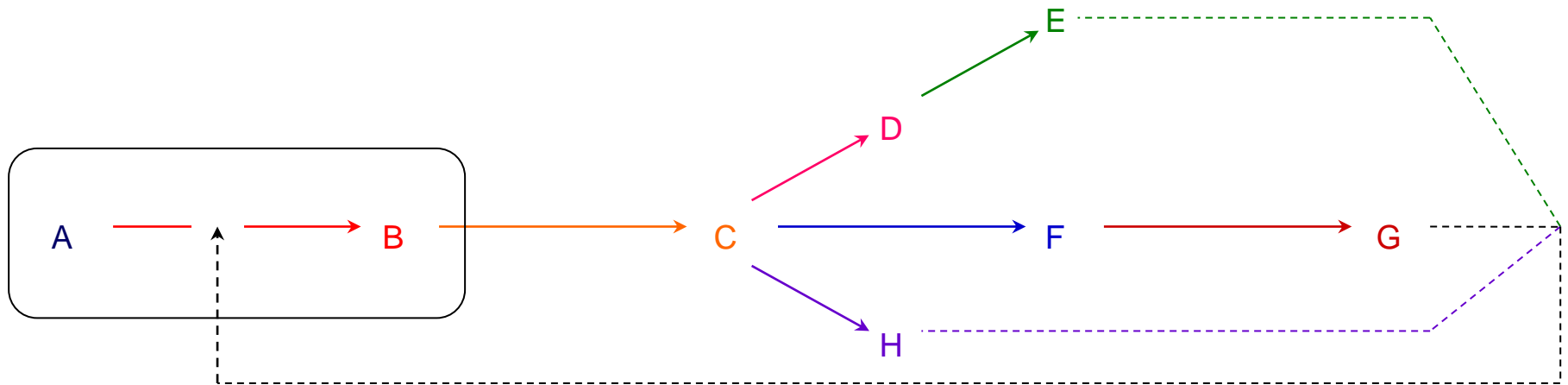
- dva ili više enzima koji kataliziraju istu reakciju, razlikuju se po strukturi (podjedinice i kofaktori) i načinu regulacije (aktivnost svakog enzima kontrolirana različitim krajnjim produktom)
- primjer: tri aspartat kinaze kod *E. coli*, aktivnost jedne kontrolirana lizinom, druge treoninom, treće kinaze metioninom



regulacija složenih metaboličkih puteva na razini aktivnosti enzima

2. USKLAĐENA (KOOOPERATIVNA, MULTIVALENTNA) REGULACIJA POVRATNOM SPREGOM

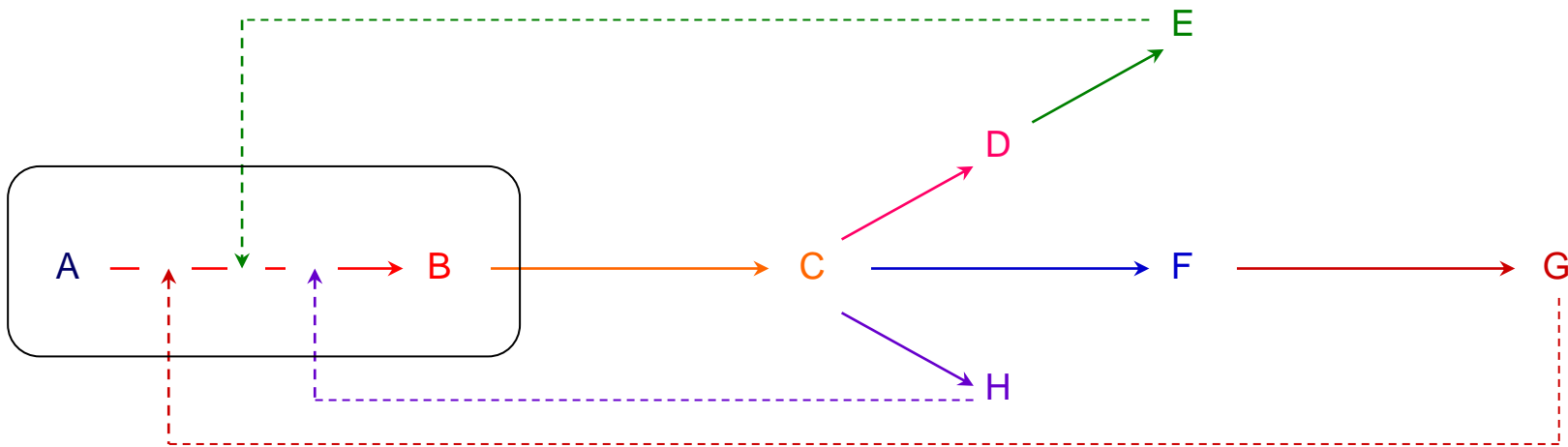
- jedan enzim čija je aktivnost regulirana sa više efektora
- primjer: sinteza Ile, Val, Leu i pantotenske kiseline kod bakterije *Salmonella typhimurium*



regulacija složenih metaboličkih puteva na razini aktivnosti enzima

3. KUMULATIVNA REGULACIJA

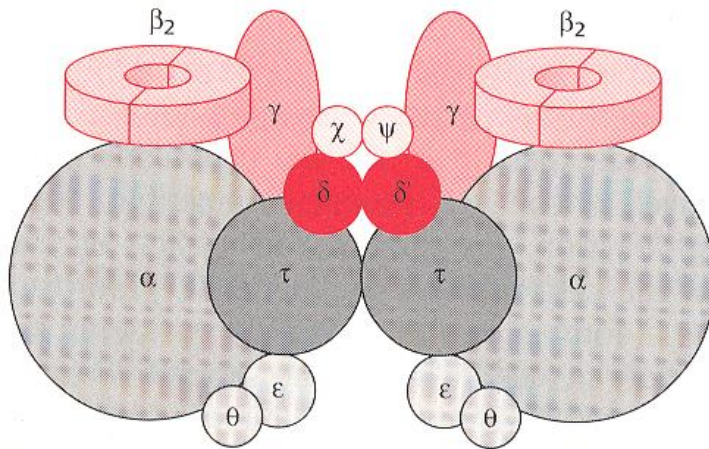
- svaki proizvod metaboličkog puta djeluje sam za sebe u određenom postotku na aktivnost enzima, učinak proizvoda kumulativan
- primjer: aktivnost glutamin sintetaze regulirana je sa osam različitih spojeva



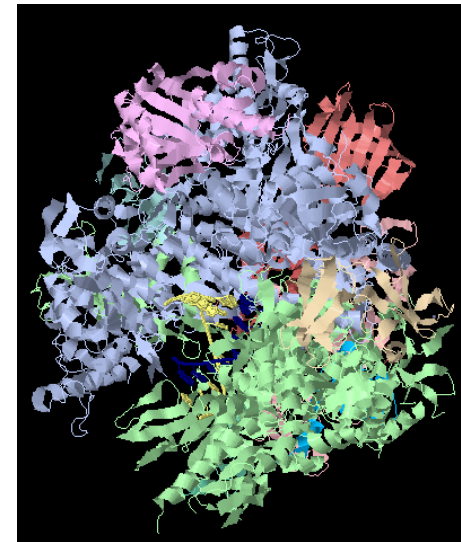
regulacija transkripcije kod bakterija

· DNA-zavisna-RNA-polimeraza (min. četiri podjedinice, “core” $\alpha_2\beta\beta'\sigma$)

2 α	2 x 36,000 (MW)	inicijacija
β	150,000	inicijacija, elongacija, terminacija (katalitička domena)
β'	160,000	inicijacija
σ	83,000	inicijacija (promotor!)
ρ (ro)	50,000	terminacija



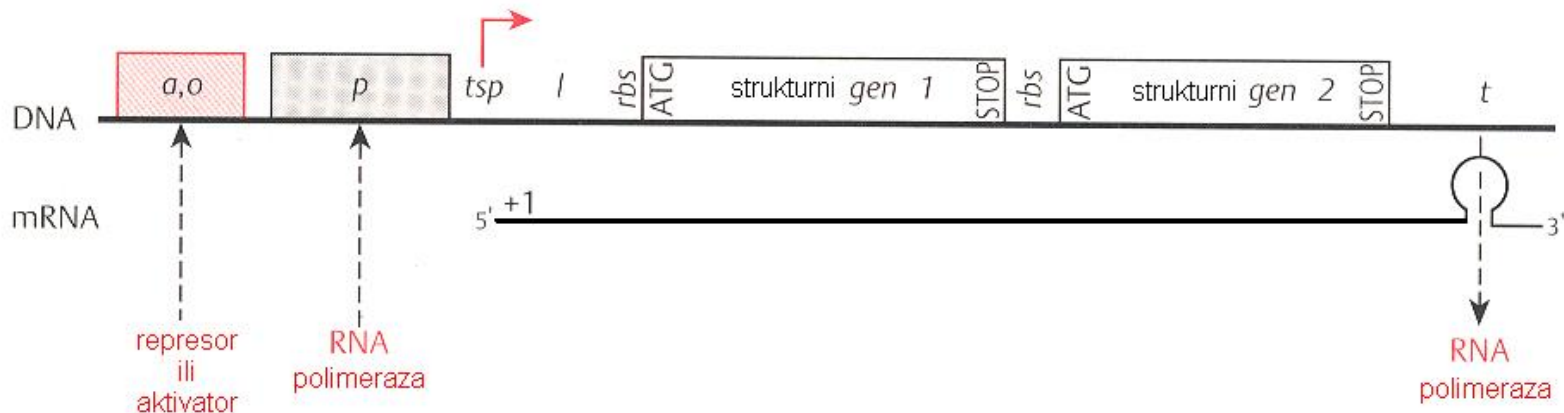
shematski prikaz prokariotske DNA-zavisne-RNA-polimeraze
(*E. coli*)



struktura **eukariotske** DNA-zavisne-RNA-polimeraze
(*S. cerevisiae*; rezolucija 1.3 Å) (<http://www.rcsb.org/pdb>)²⁷

regulacija transkripcije kod bakterija

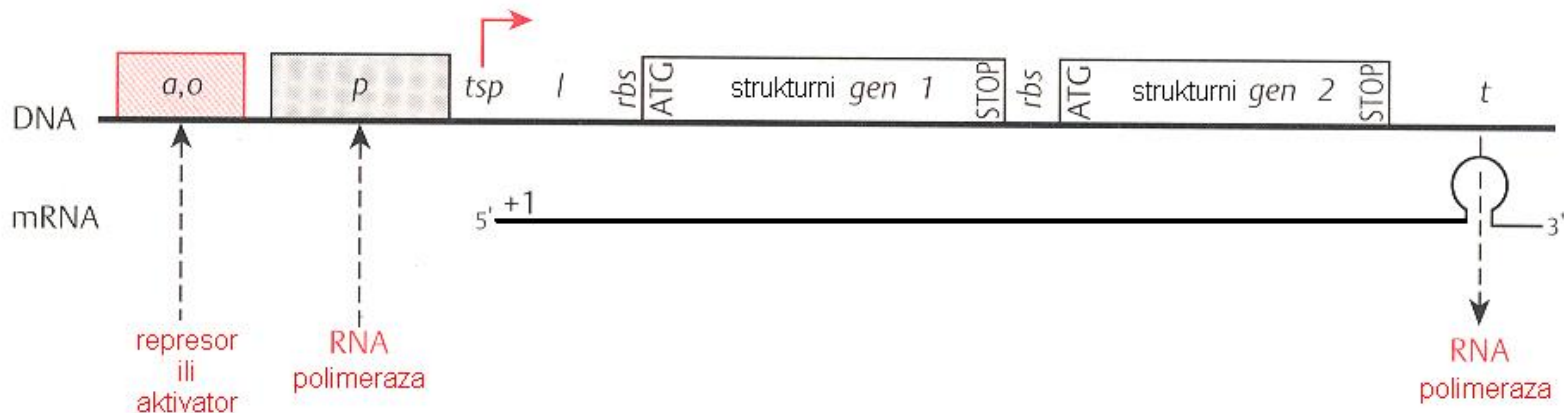
OPERON	funkcionalna genetička jedinica koja sadrži regulacijske i strukturne gene
a	aktivacijsko mjesto, mjesto vezanja aktivatora transkripcije
o	operator; mjesto vezanja aktivatora ili represora (protein), može se nalaziti i unutar strukturnog gena
r	gen represor kodira represor protein
p	promotor mjesto vezanja DNA-zavisne-RNA-polimeraze (mjesto početka transkripcije)
tsp	(eng. <u>t</u> ranscription <u>s</u> tart <u>p</u> oint) start transkripcije



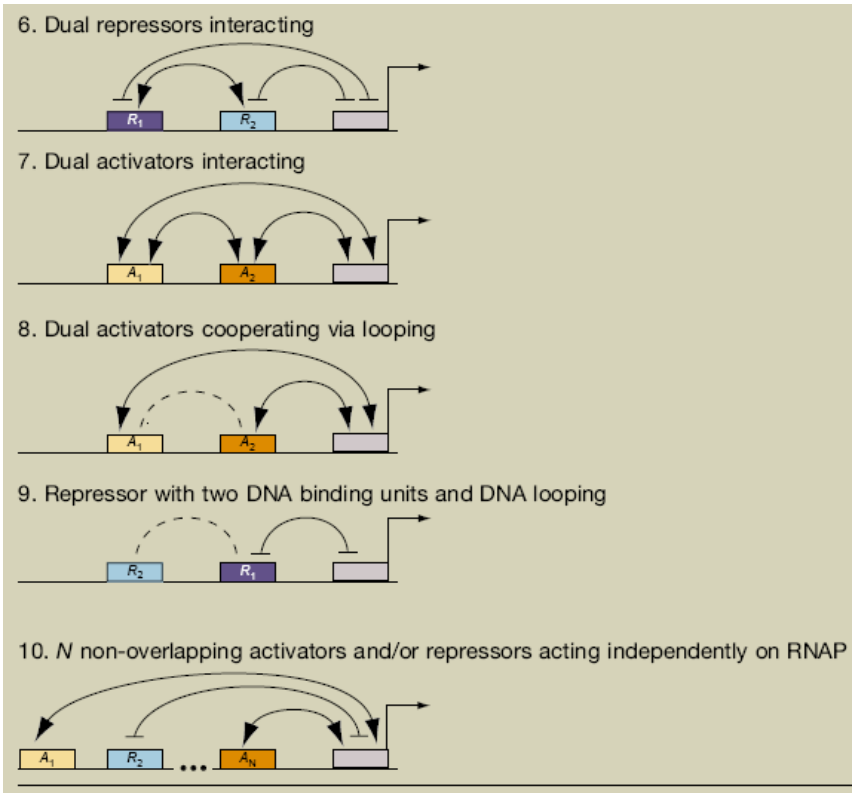
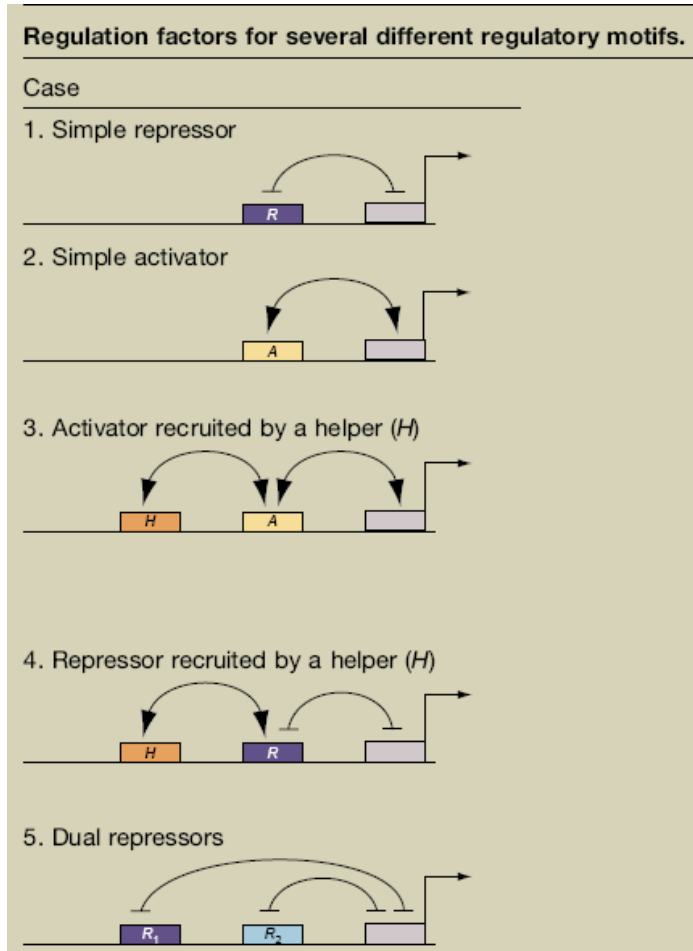
regulacija transkripcije kod bakterija

OPERON funkcionalna genetička jedinica koja sadrži regulacijske i strukturne gene

l (eng. leader sequence) može sadržavati ORF za mali tzv. *leader peptide*
rbs (eng. ribosome binding site) mjesto vezanja ribosoma na mRNA (pet pretežno purinskih nukleotida)
s strukturni geni
cistron strukturni gen koji kodira protein
ATG start kodon (Met)
stop kodon TAA/TAG/TGA
t signal za terminaciju transkripcije



regulacija transkripcije kod bakterija



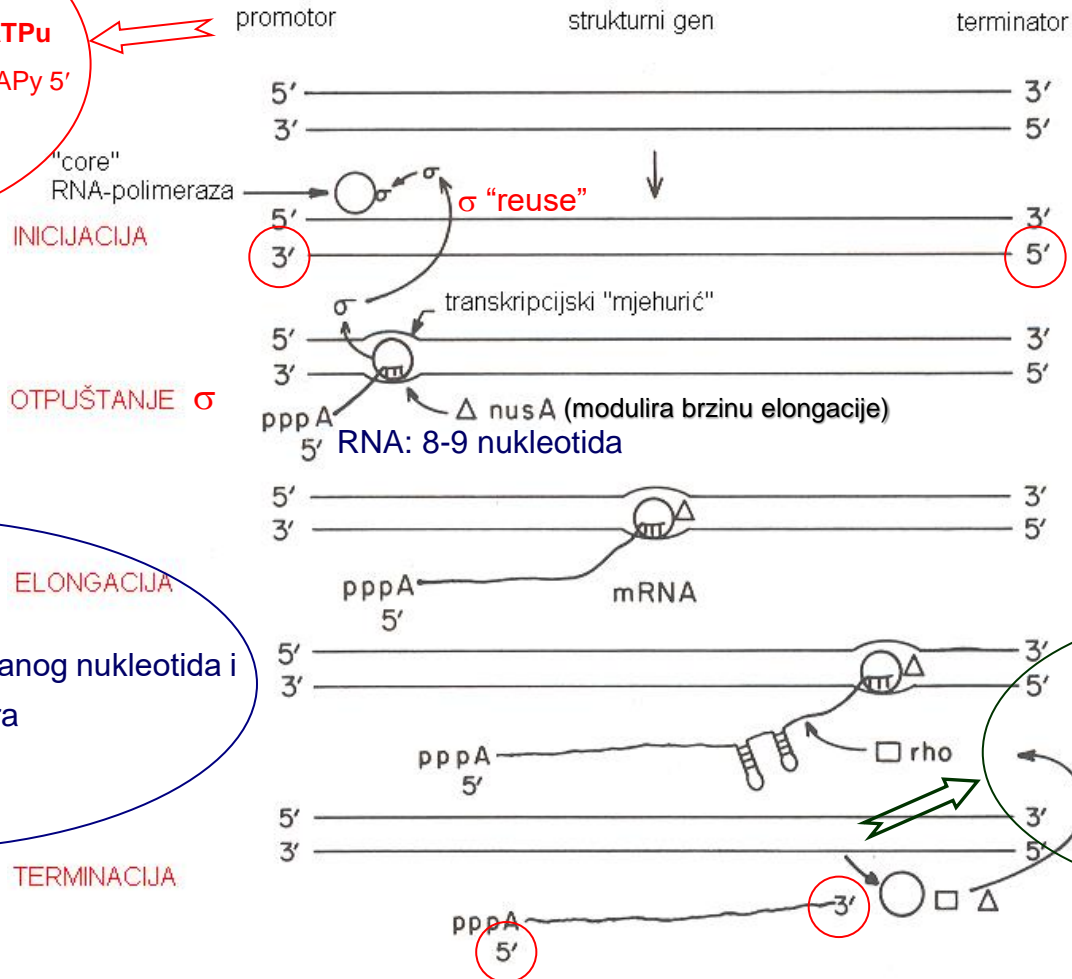
regulacija transkripcije kod bakterija

· prepisivanje genetičke informacije iz DNA u mRNA pomoću DNaz-RNAP

-35 i -10 bp "upstream" od starta (+1)

5' TTGACA **5' TATAATPu**
 AACTGT 5' ATATTAPy 5'
 -35 bp -10 bp

mjesto prepoznavanja Pribnow



ELONGACIJA

- vezanje nukleotid trofosfata
- formiranje veze između dodanog nukleotida i 3'-OH RNA koja se sintetizira
- otpuštanje pirofosfata

TERMINACIJA

- prekid elongacije
- otpuštanje mRNA iz ternarnog kompleksa
- disocijacija DNaz-RNAP

regulacija transkripcije kod bakterija



animacije: **The Meselson-Stahl Experiment**

High-Throughput Sequencing

Construction of a DNA Library

www.sumanasinc.com/webcontent/animations/biology.htm

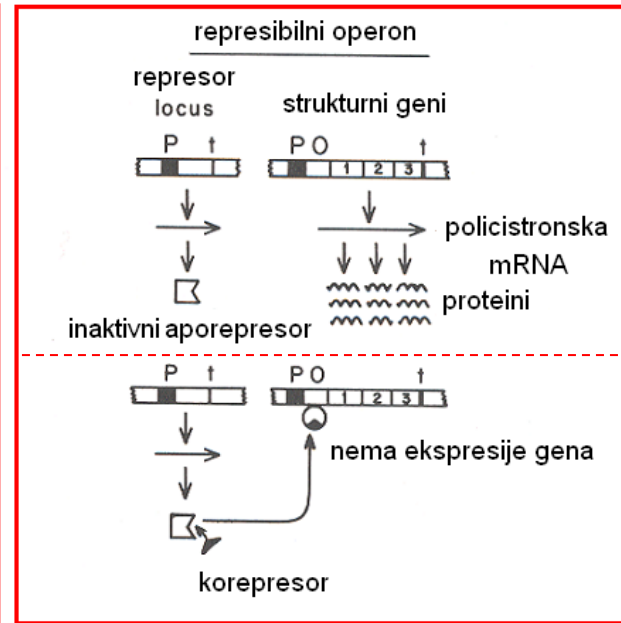
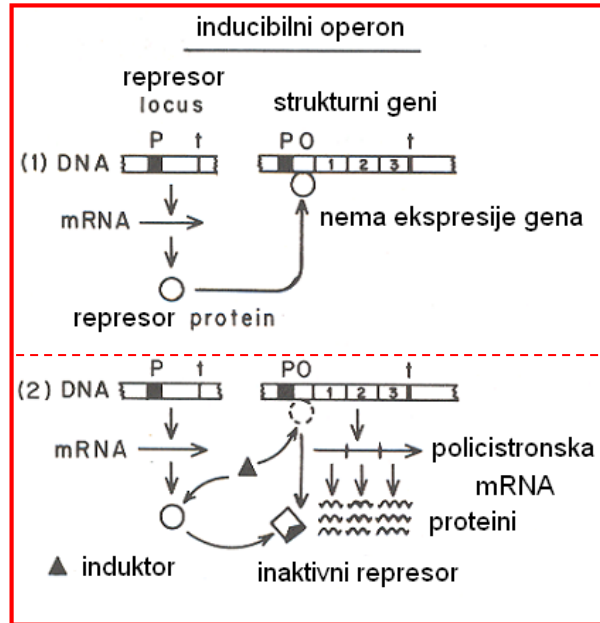
Lyfe Cycle of an mRNA

Translation

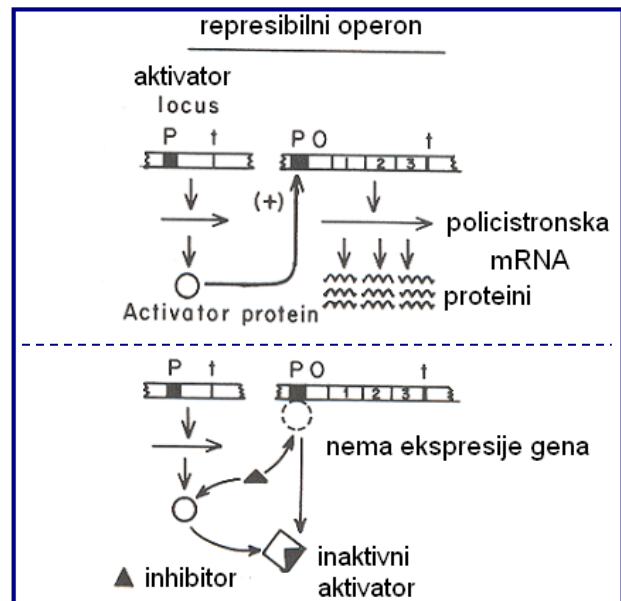
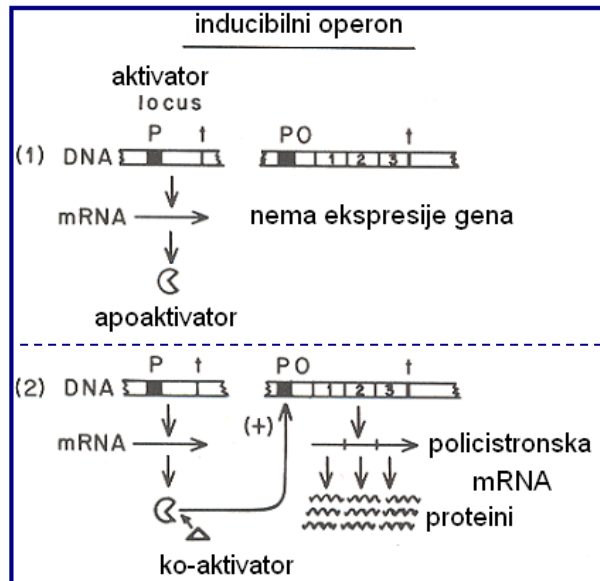
www.sumanasinc.com/webcontent/animations/molecularbiology.htm

kontrola operona

A. negativna kontrola



B. pozitivna kontrola



P promotor
 O operator
 t terminator

kontrola operona: negativna i pozitivna kontrola operona

način regulacije		regulatorni elementi		funkcija operona		ekspresija u odsutnosti proteina regulatora
		protein	efektor	radi	miruje	
neg	inducibilna	represor (R)	induktor (I)	R + I	R	konstitutivna konstitutivna
	represibilna	apo-represor (AR)	ko-represor(KR)	AR	AR + KR	
poz	inducibilna	apo-aktivator (AA)	ko-aktivator (KA)	AA + KA	AA	nema nema
	represibilna	aktivator (A)	inhibitor (I)	A	A + I	

proizvodni mutanti

- spontani ili inducirani mutanti koji su izgubili sposobnost regulacije određenog dijela metabolizma
- zbog mutacije “prekomjerno” proizvode određeni metabolit

1. regulacijski (ne-represibilni) mutanti

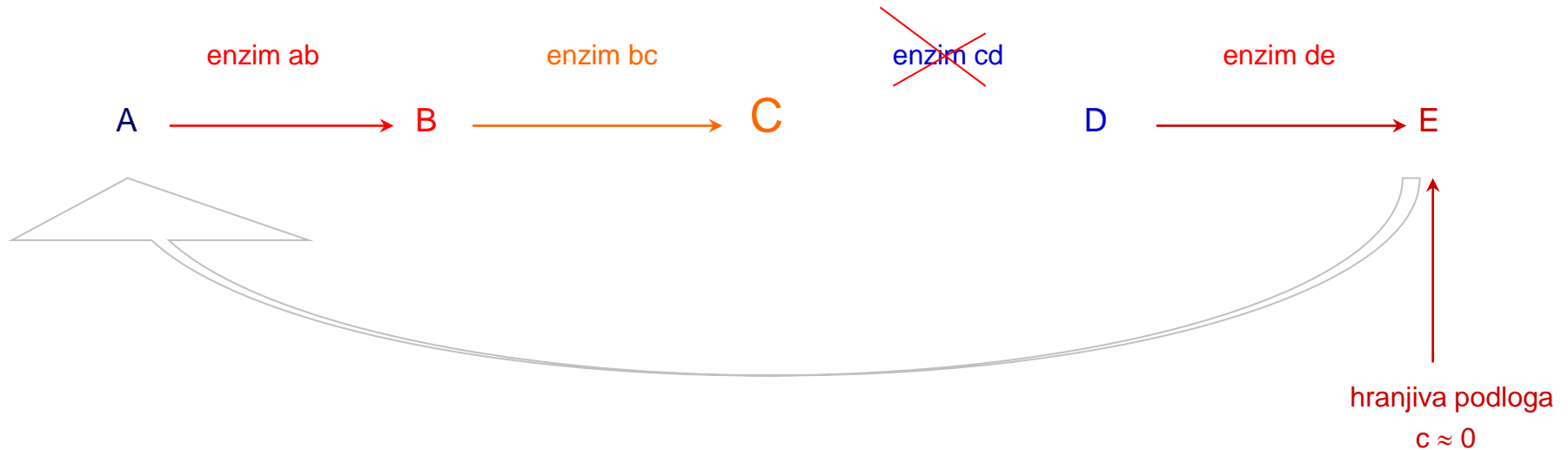
mutacija u genu regulatoru ili operatoru vodi ka “konstitutivnoj” ekspresiji određenog strukturnog gena

2. auksotrofni mutanti

mutanti za “izbjegavanje” regulacije

regulacijski mutanti - dobivanje nekih proizvoda

- uvođenje mutacija u cilju proizvodnje određenog proizvoda (auksotrofni mutanti)



proizvod	organizam	auksotrofni mutant	supstrat	γ (g L ⁻¹)
L-citrulin	<i>Bacillus subtilis</i>	arginin	glukoza	16
L-lizin	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	treonin, metionin	glukoza	50
L-fenilalanin	<i>Arthrobacter paraffineus</i>	tirozin	n-alkani	15
L-treonin	<i>Escherichia coli</i>	lizin	glukoza	20
L-valin	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	izoleucin	glukoza	11

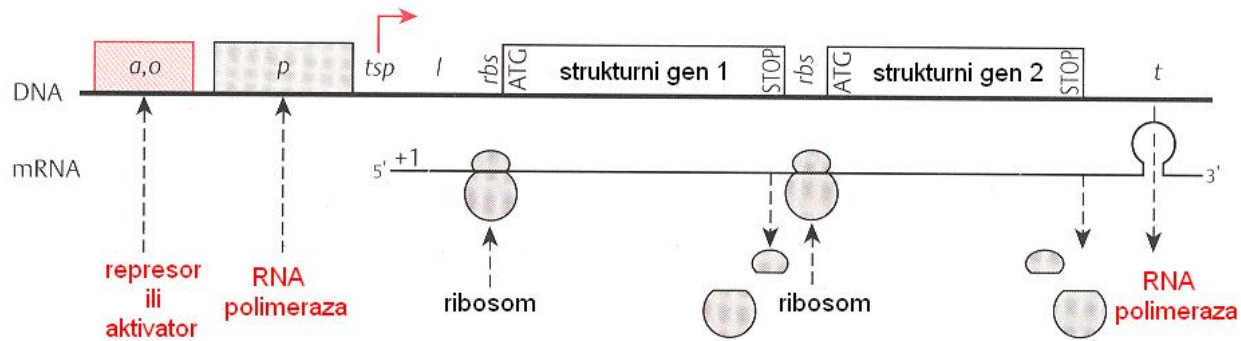
regulacijska mreža kod enterobakterija

- osnovni pojmovi

OPERON

osnovna transkripcijska jedinica iz koje se proizvodi jedna, u pravilu, policistronska mRNA sa pojedinačnog promotora

- primjer: *lac*-, *trp*-, *leu*-, *ara*-operon



- negativna kontrola katabolizma laktoze



regulacijska mreža kod enterobakterija

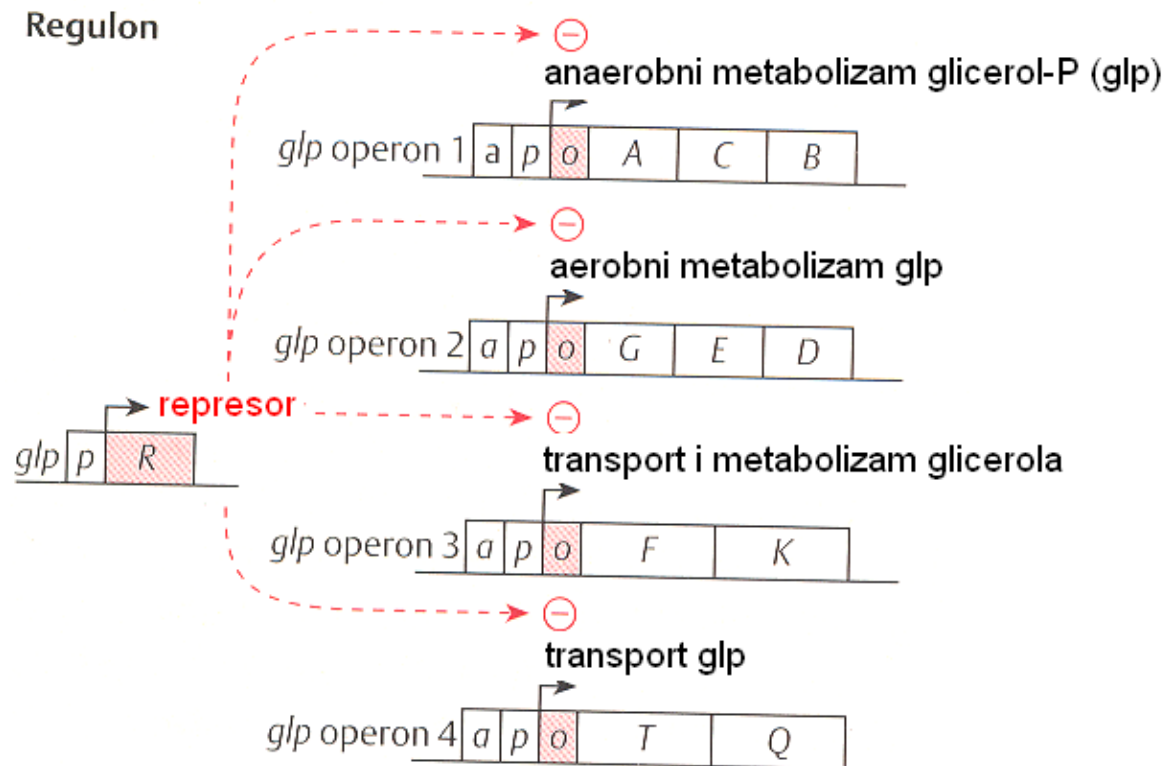
- osnovni pojmovi

REGULON

grupa operona koju kontrolira zajednički regulacijski protein

operoni koji čine regulon u pravilu su bez nekog reda razmješteni po genomu

- primjer: *glp*-regulon



regulacijska mreža kod enterobakterija

· osnovni pojmovi

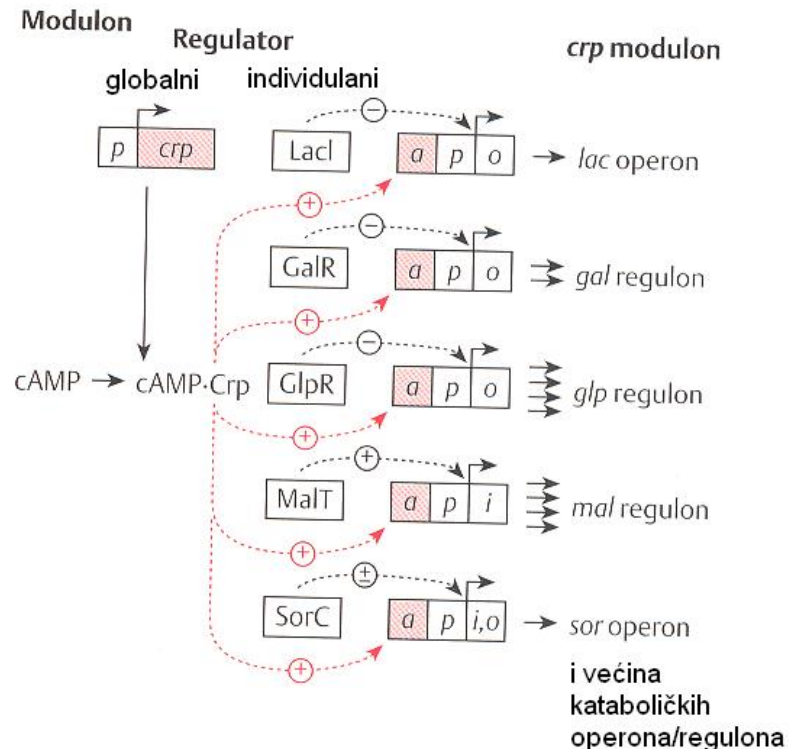
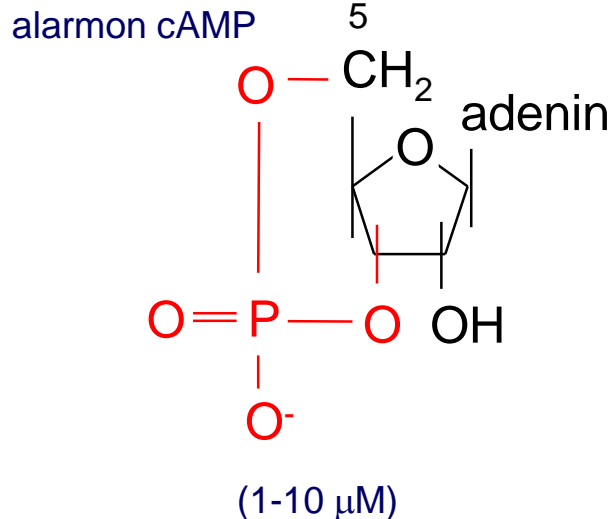
MODULON

grupa regulona i/ili operona u kojoj je svaki član grupe pod kontrolom zajedničkog globalnog proteina

ovaj je sustav **epistatički** tj. nadređen pojedinačnim regulatorima

mutacija u globalnom regulatoru daje pleiotropni efekt

· primjer: *crp*-modulon (eng. cyclo-AMP receptor protein ili catabolite repression protein)



regulacijska mreža kod enterobakterija

- osnovni pojmovi

ALARMON

mala molekula koja signalizira stresno stanje pa tako djeluje kao globalni regulator

- primjer: cAMP za katabolizam, ppGpp i pppGpp za anabolizam

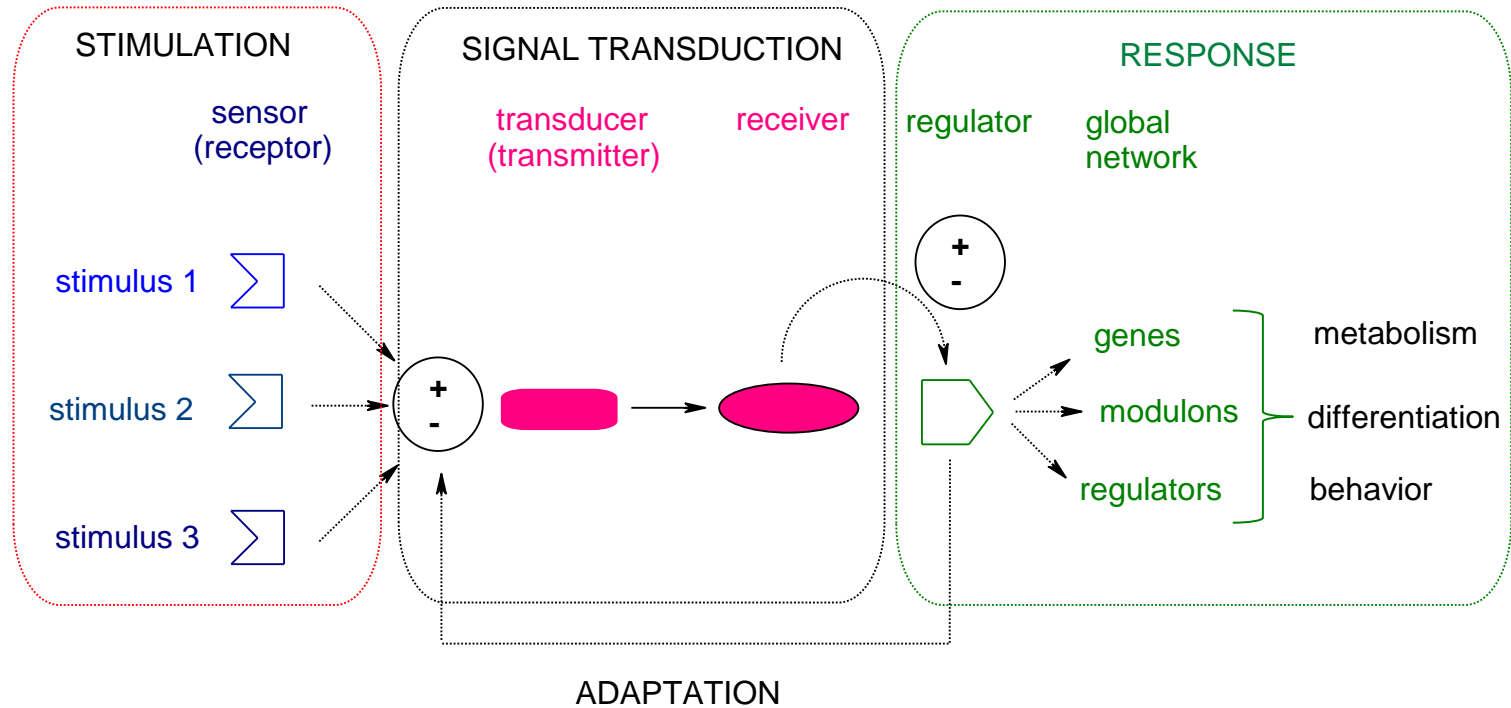
STIMULON

velika grupa operona koji reagiraju na istu pojedinačnu pobudu, a da pri tom nisu regulirani djelovanjem zajedničkog regulacijskog proteina

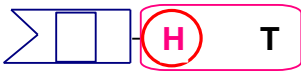

- primjer pobude: glad, toplinski šok, oštećenje DNA, infekcija fagom

- brojni regulacijski procesi u stanici udružuju se oko nekog zajedničkog cilja koji često premašuje složenost modulona i protežu se na stanicu (npr. dioba, sporulacija).
- opisana razina složenosti naziva se eng. **multigene family control**

prijenos signala kod prokariota – globalne regulacijske mreže (1)



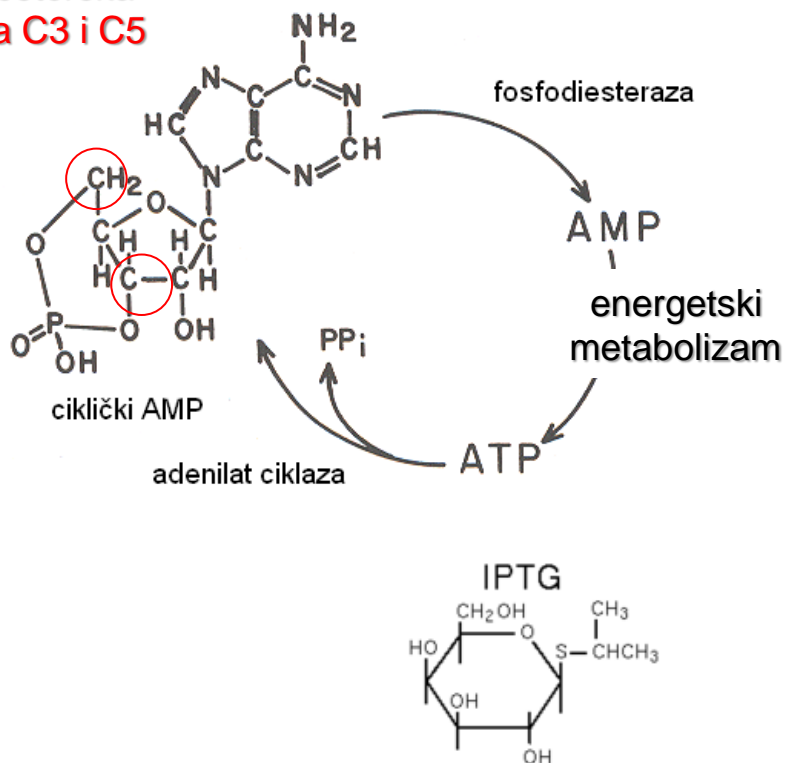
prijenos signala kod prokariota – globalne regulacijske mreže (2)

	sensor	response regulator
		
katabolicka represija izvorom ugljika (Glc)	PTS, IIA ^{Glc}	cAMP-Crp
katabolicka represija izvorom ugljika (Glc)	PTS, P-SerHPr	CcpA
sporulacija	KinA KinB	SpoOF, SpoOB SpoOA

cAMP i katabolička represija izvorom ugljika

- ne trošiti energiju za sintezu enzima za metabolizam laktoze ako je dostupna glukoza

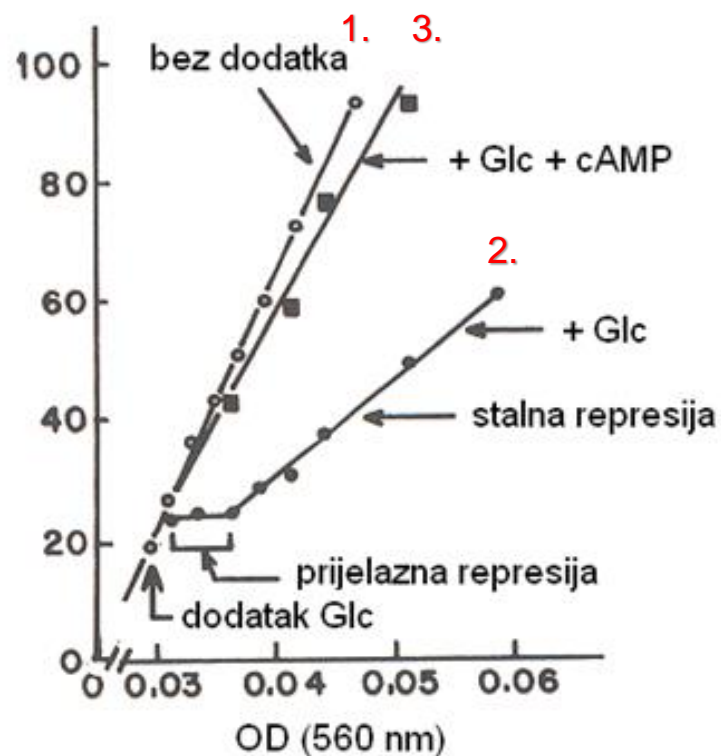
fosfodieterska
veza na C3 i C5
riboze



izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid

(nesvrhoviti induktor β-galaktozidaze tj. inducira transkripciju ovog enzima, ali nije supstrat za β-galaktozidazu)

E. coli / IPTG



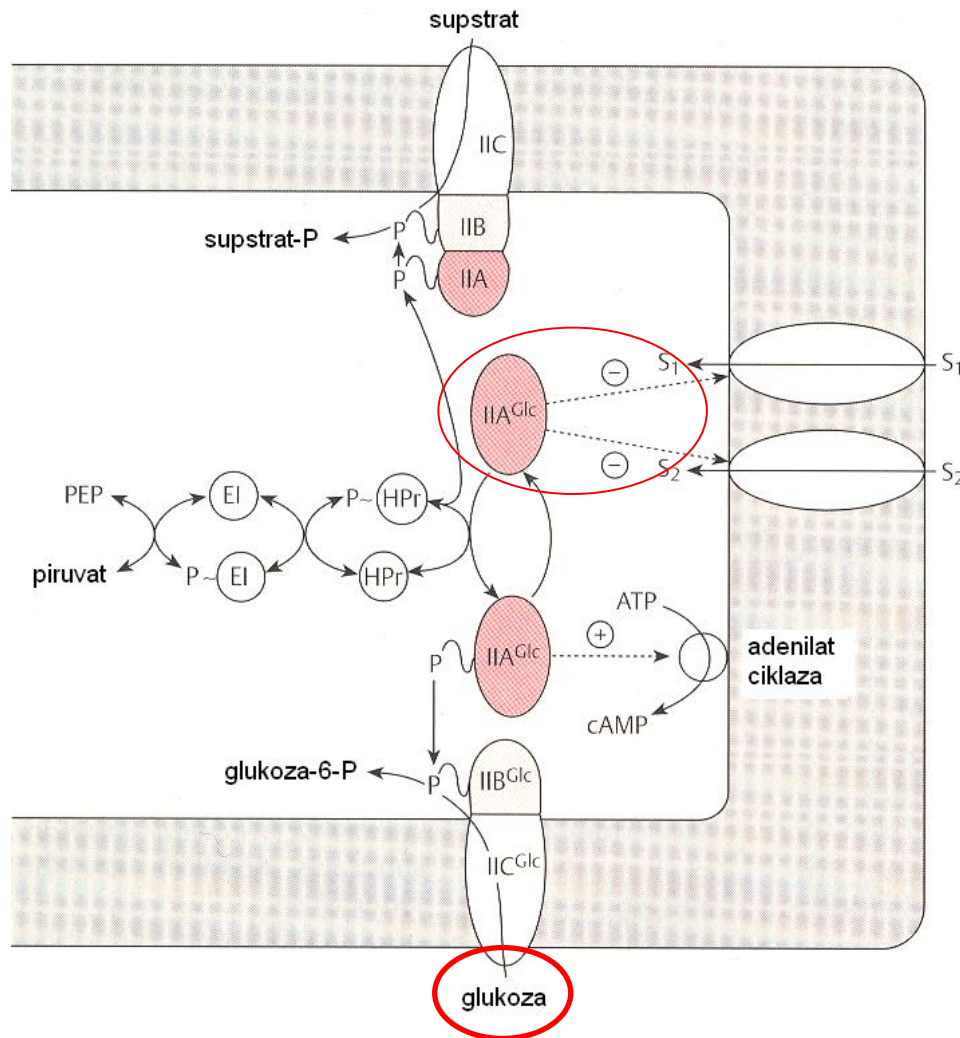
katabolička represija izvorom ugljika

- za enterobakterije karakteristični su brz rast na glukozi (“glukozni efekt”) diauksijski rast na glukozi i još jednom izvoru ugljika
- obje karakteristike manifestacije su KATABOLIČKE REPRESIJE IZVOROM UGLJIKA (KRIU) (eng. carbon catabolite repression)
- KRIU se javlja kada katabolizam prevlada anabolizam
- osjetilo za opisane uvjete je PTS
- PTS prenosi informaciju putem IIA^{Glc} proteina do adenilat-ciklaze i dalje putem cAMP pokreće *crp*-modulon
- Crp protein *crp*-modulona je globalni regulator i sudjeluje u prijelaznoj ili stalnoj kataboličkoj represiji

katabolička represija izvorom ugljika

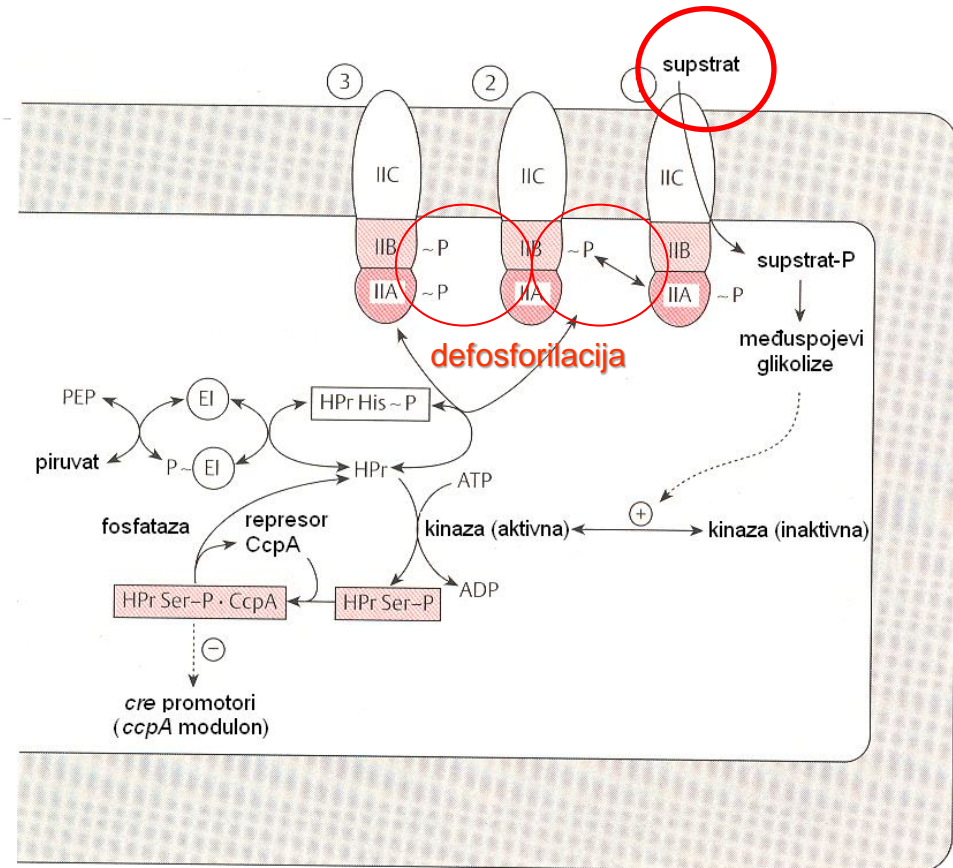
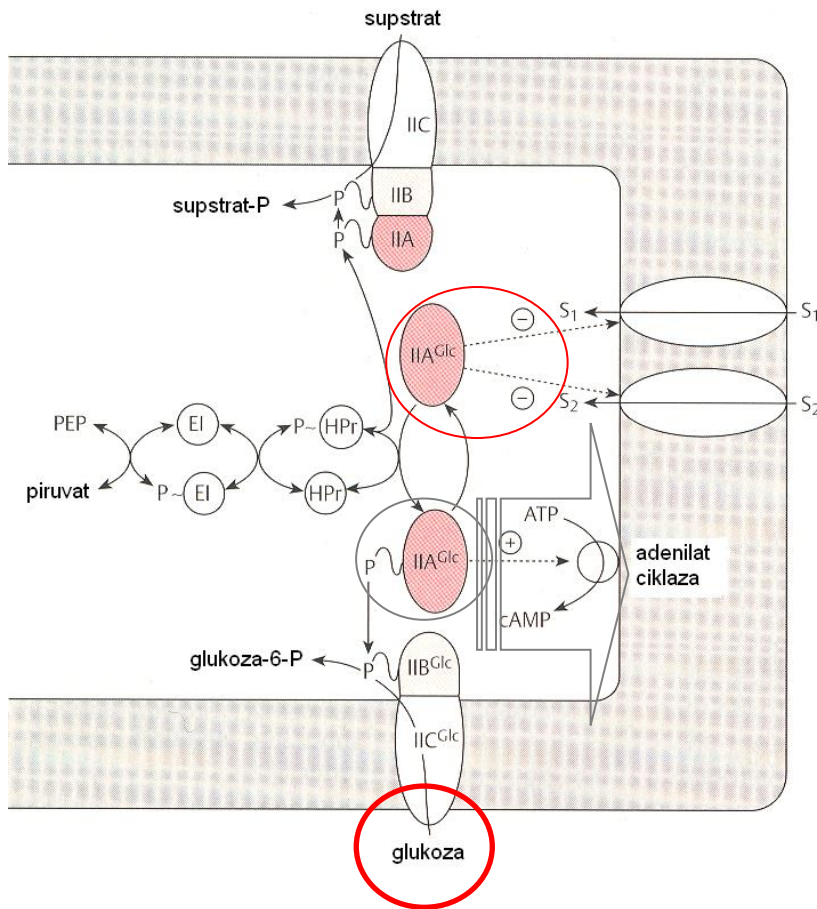
- kada stanica raste na supstratu koji se ne transportira PTS sustavom, tada su svi proteini PTS sustava fosforilirani (jer se ne troši PEP tj. P kod transporta supstrata PTS-om)
- fosforilirani oblik IIA^{Glc} proteina aktivira adenilat ciklazu i nastali cAMP u kompleksu sa Crp proteinom aktivira operone u sastavu *crp*-modulona
- kod rasta na glukozi transport supstrata se odvija PTS sustavom
- u ovom slučaju nefosforilirani oblik IIA^{Glc} proteina dominira nad fosforiliranim oblikom IIA^{Glc} proteina i to zbog trošenja PEP tj. prijenosa P na glukozu tijekom aktivnog transporta
- dvije su važne posljedice opisanog stanja:
 1. nema aktivacije adenilat ciklaze
koncentracija cAMP je niska
ne aktiviraju se operoni za druge izvore ugljika
 2. nefosforilirani IIA^{Glc} protein inhibira transportne sustave za druge izvore ugljika
onemogućen je ulaz potencijalnih induktora u stanicu (eng. inducer exclusion)

PTS i katabolička represija izvorom ugljika



S₁ i S₂ sustavi za transport npr. laktoze, melibioze, maltoze ili glicerola

PTS i katabolička represija izvorom ugljika



cre (eng. catabolite responsive elements)

S₁ i S₂ sustavi za transport npr. laktoze, melibioze, maltoze ili glicerola

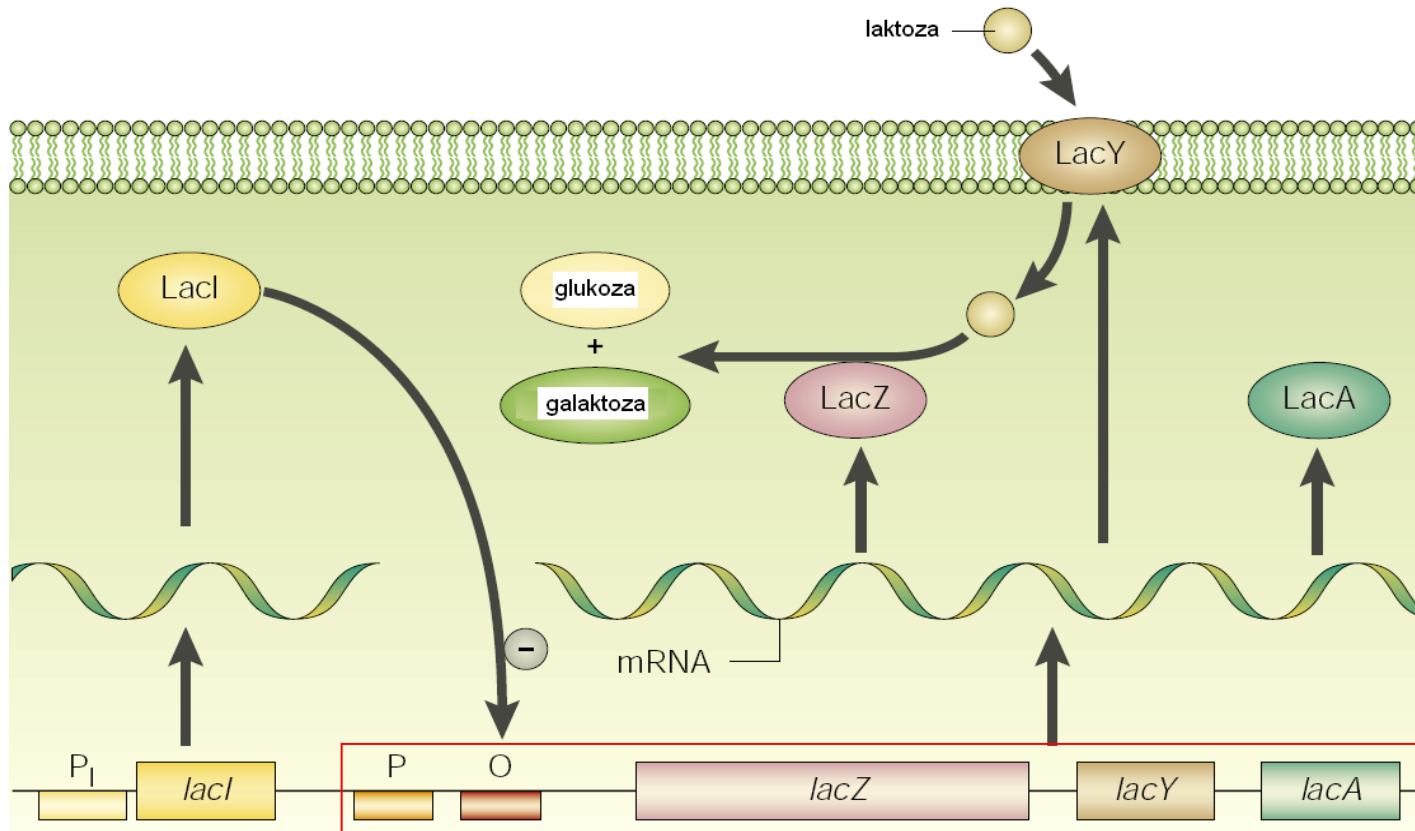
literatura

1. L. Bintu, N.E. Buchler, H.G. Garcia, U. Gerland, T. Hwa, J. Kondev, R. Phillips (2005) Transcriptional regulation by the numbers: models, *Current Opinion in Genetics & Development* **15**, 116-124.
2. Grupa autora: *Molecular biology of the cell*, B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson (eds.), Garland Publishing, Inc., New York (1983).
3. Grupa autora: *Biology of the procaryotes*, J.W. Lengeler, G. Drews, H.G. Schlegel (eds.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany (1999).
4. Grupa autora: *Applied Microbial Physiology*, P.M. Rhodes, P.F. Stanbury (eds.), IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK (1997).
5. G.J.G. Ruijter, P.W. Postma, K.van Dam (1990) Adaptation of *Salmonella typhimurium* mutants containing uncoupled enzyme II^{Glc} to glucose-limited conditions, *Journal of Bacteriology* **172**, 4783-4789.
6. D. Zhou, R. Yang (2006) Global analysis of gene transcription regulation in prokariotes, *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2260-2290.

lac operon bacterije *Escherichia coli*

lac operon *E. coli*

- sustav inkorporiran u genome gotovo svih eksperimentalnih mikroorganizama
- transkripcija regulirana lac I represorom, mutanti bez represora ekspimiraju operon konstitutivno



P_1 promotor *lac I* gena koji kodira lac I represor (protein)

P promotor *lac* operona

O operator

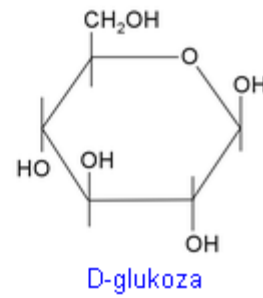
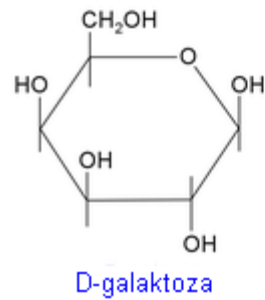
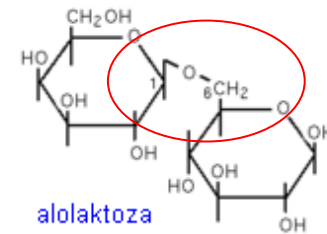
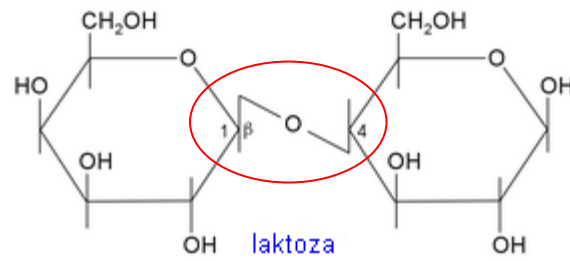
lacZ kodira citoplazmatsku β -galaktozidazu

lacY kodira membransku permeazu

lacA kodira galaktozid transacetilazu

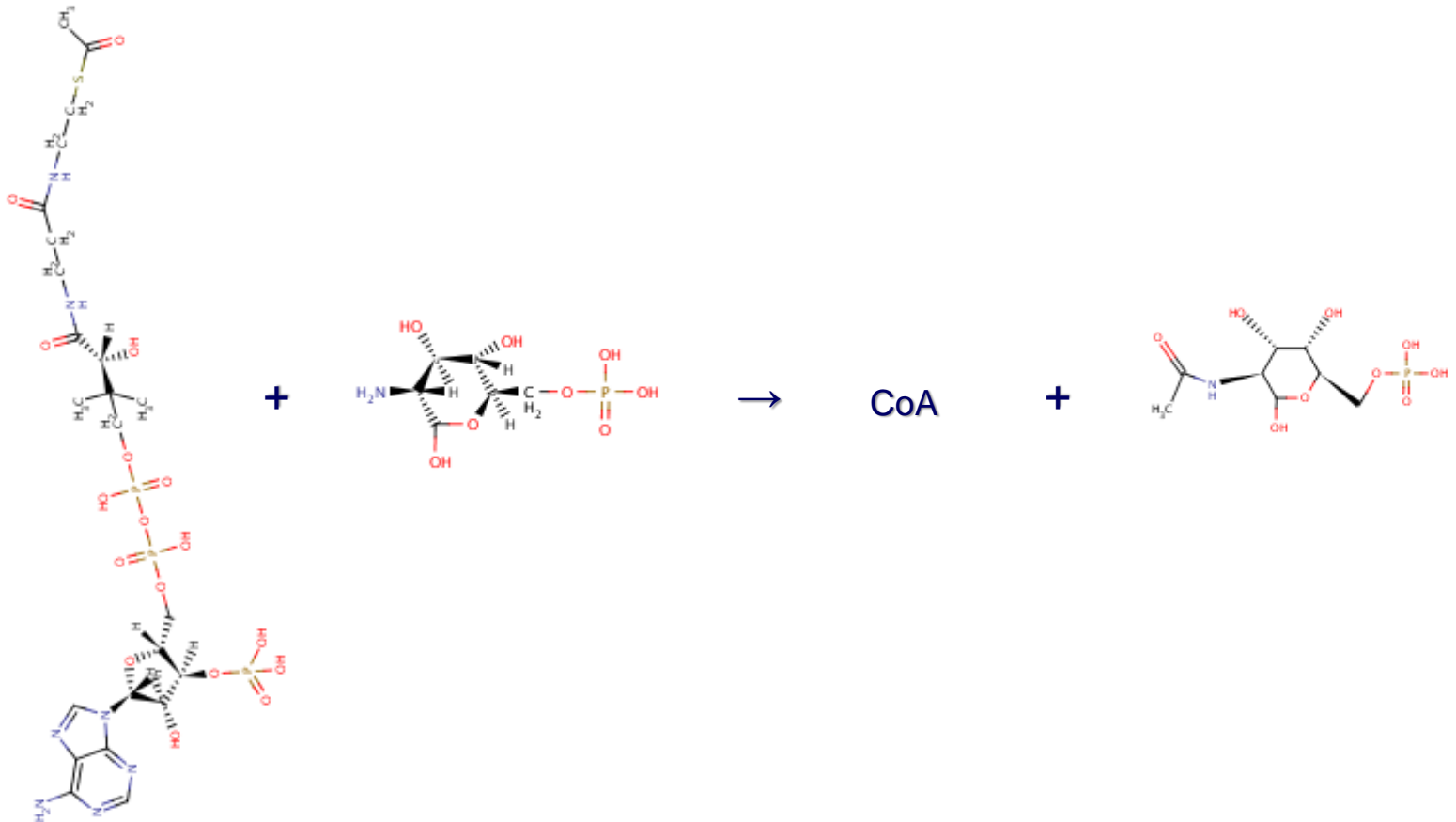
lac operon *E. coli*

· β -galaktozidaza



lac operon *E. coli*

- transacetilaza (acetil od acetil-CoA do galaktozida)



npr. acetil-CoA

+

D-glukozamin-6-P

→

CoA

+

N-acetil-D-glukozamin-6-P

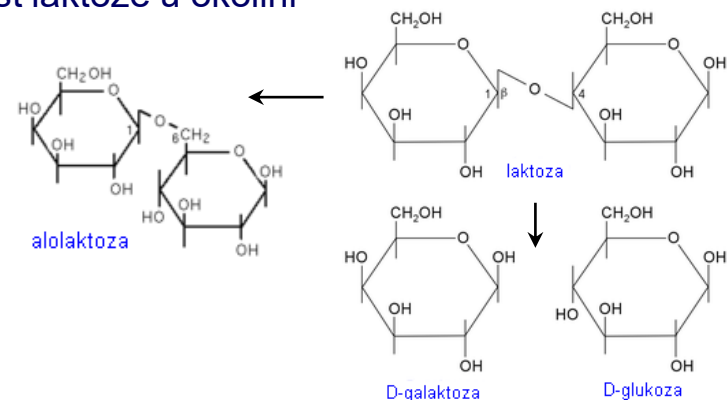
lac operon *E. coli*

- na gen *lac I* nastavlja se intercistronska regija (≈ 122 bp) koja regulira ekspresiju *lac ZYA* operona
- intercistronska regija sadrži
 - mjesto vezanja cAMP-CRP kompleksa kao aktivatora transkripcije
 - operator za vezanje produkta *lac I* gena (represora)
 - dva promotorska mjesta za vezanje RNA-polimeraze (P1 i P2)



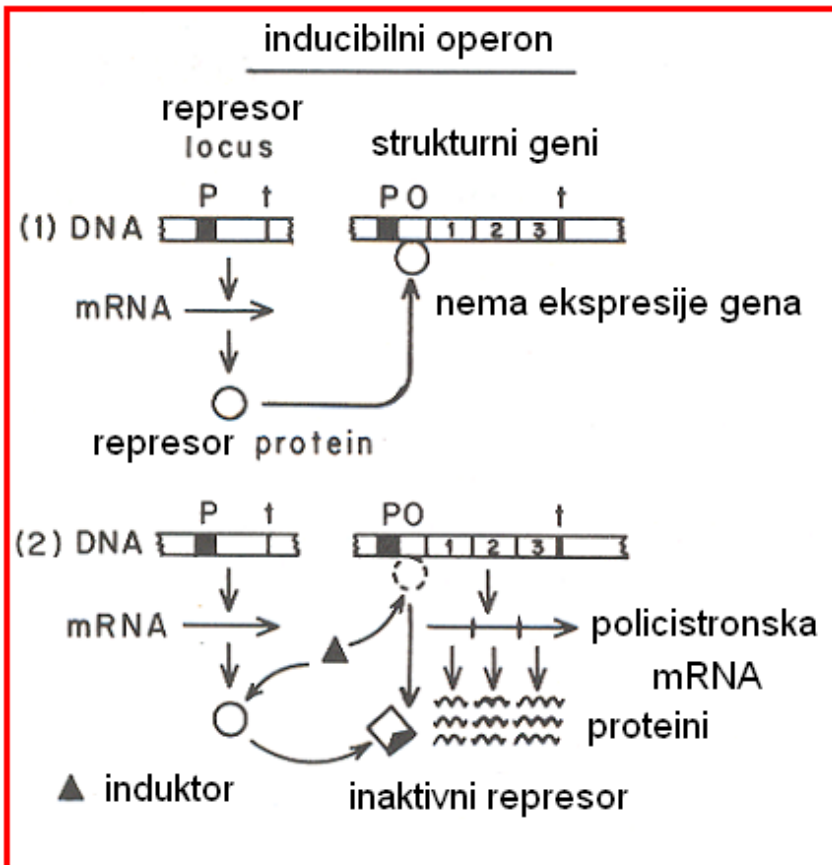
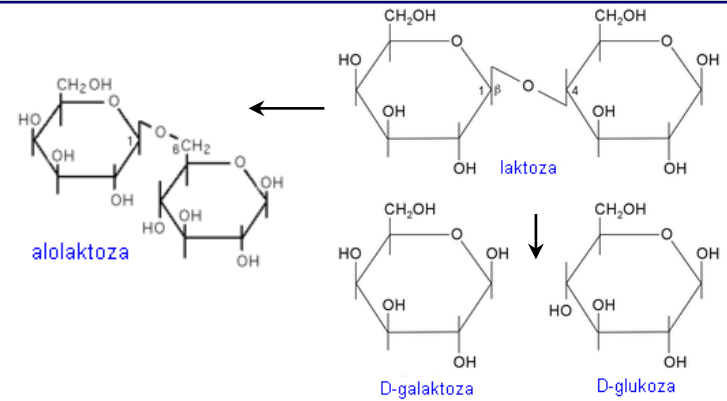
lac operon *E. coli*

- promotor P2 odgovoran je za bazalnu, konstitutivnu ekspresiju strukturnih gena *lac* operona
 - promotor P2 veže čvrsto RNA-polimerazu
 - inicijacija transkripcije je jako slaba
 - koncentracija β -galaktozidaze i laktoza permeaze u stanici je vrlo mala
- za potpunu indukciju operona potrebna su dva signala
 1. visoka koncentracija cAMP u stanici (“glad”)
 2. prisutnost laktoze u okolini stanice
- u ovom slučaju bazalna permeaza “uočava” prisutnost laktoze u okolini i transportira je u stanicu
- bazalna β -galaktozidaza održava trostranu ravnotežu između laktoze, alolaktoze i produkata hidrolize (glukoza i galaktoza)



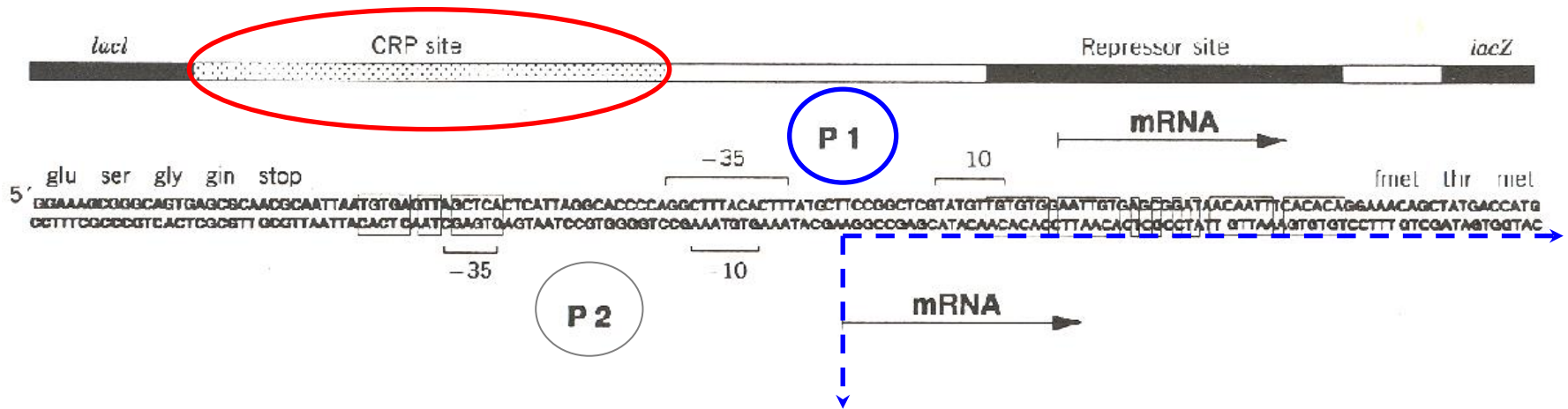
lac operon *E. coli*

- alolaktoza je izravni induktor koji prevodi represorski protein u inaktivnu formu



lac operon *E. coli*

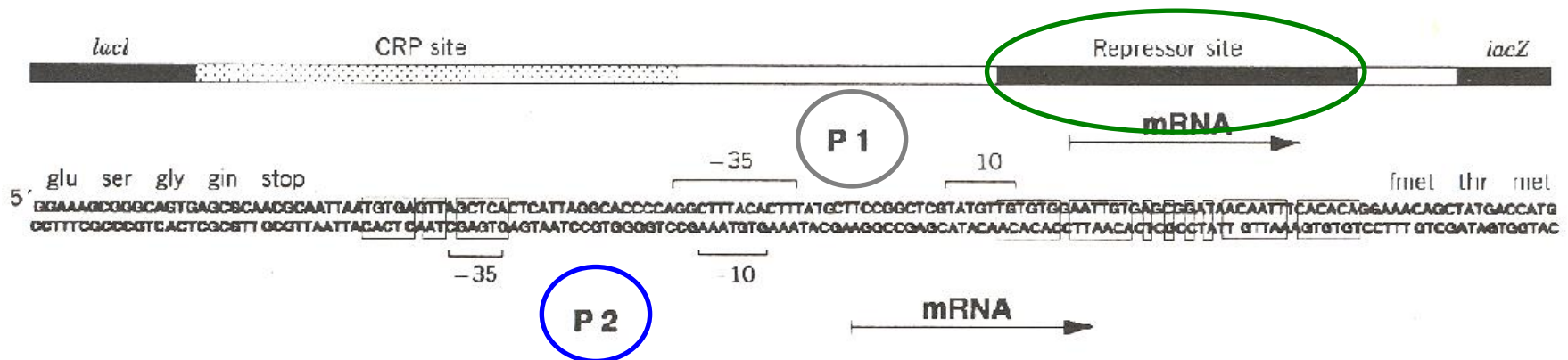
- istovremeno visoka koncentracija cAMP stimulira formiranje cAMP-CRP kompleksa kao aktivatora transkripcije
- cAMP-CRP kompleks se veže na *crp* mjesto vezanja (intercistronska regija) i time reprimira transkripciju sa P2 i aktivira transkripciju sa P1



- **pretpostavlja** se da CRP-kompleks savije DNA pod kutem od 90° tako da dolazi do izravne interakcije CRP-kompleksa i RNA-polimeraze

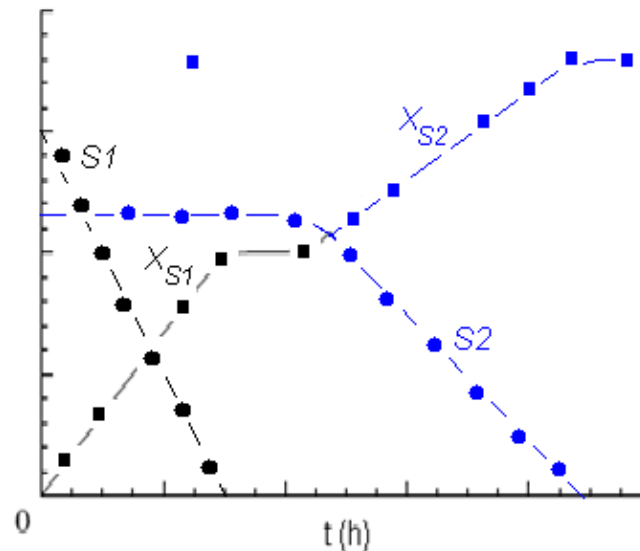
lac operon *E. coli*

- povećava se afinitet vezanja RNA-polimeraze na DNA
- istovremeno se lakše pokreće i nastavlja elongacija mRNA
- na ovaj se način višestruko povećava ekspresija strukturnih gena *lac* operona čime se omogućava rast na laktozi
- iscrpljivanjem laktoze u okolini stanice brzo se smanjuje i koncentracija laktoze u stanici
- zbog toga se smanjuje koncentracija alolaktoze (nestaje), koja je stvarni induktor
- “oslobođeni” represor protein veže se na operator i onemogućava transkripciju sa P1 pa preostaje samo bazalna transkripcija sa P2



lac operon *E. coli*

- slično će se dogoditi i kada se stanica nađe u podlozi koja sadrži i glukozu i laktozu
- glukoza je preferirani izvor ugljika i energije za *E. coli* kao i za mnoge druge (mikro)organizme
- *E. coli* može koristiti i druge ugljikohidrate (supstrate) kao izvore ugljika i energije, ali samo kad nema glukoze
- ako je uz glukozu u okolini stanice dostupan i drugi izvor ugljika npr. laktoza, bakterija će prvo isključivo koristiti glukozu, dok je ne iscrpi
- tek kad je glukoza iscrpljena, bakterija će koristiti drugi dostupan izvor ugljika tj. laktozu
- DIAUKSIJSKI RAST (Monod, 1941)

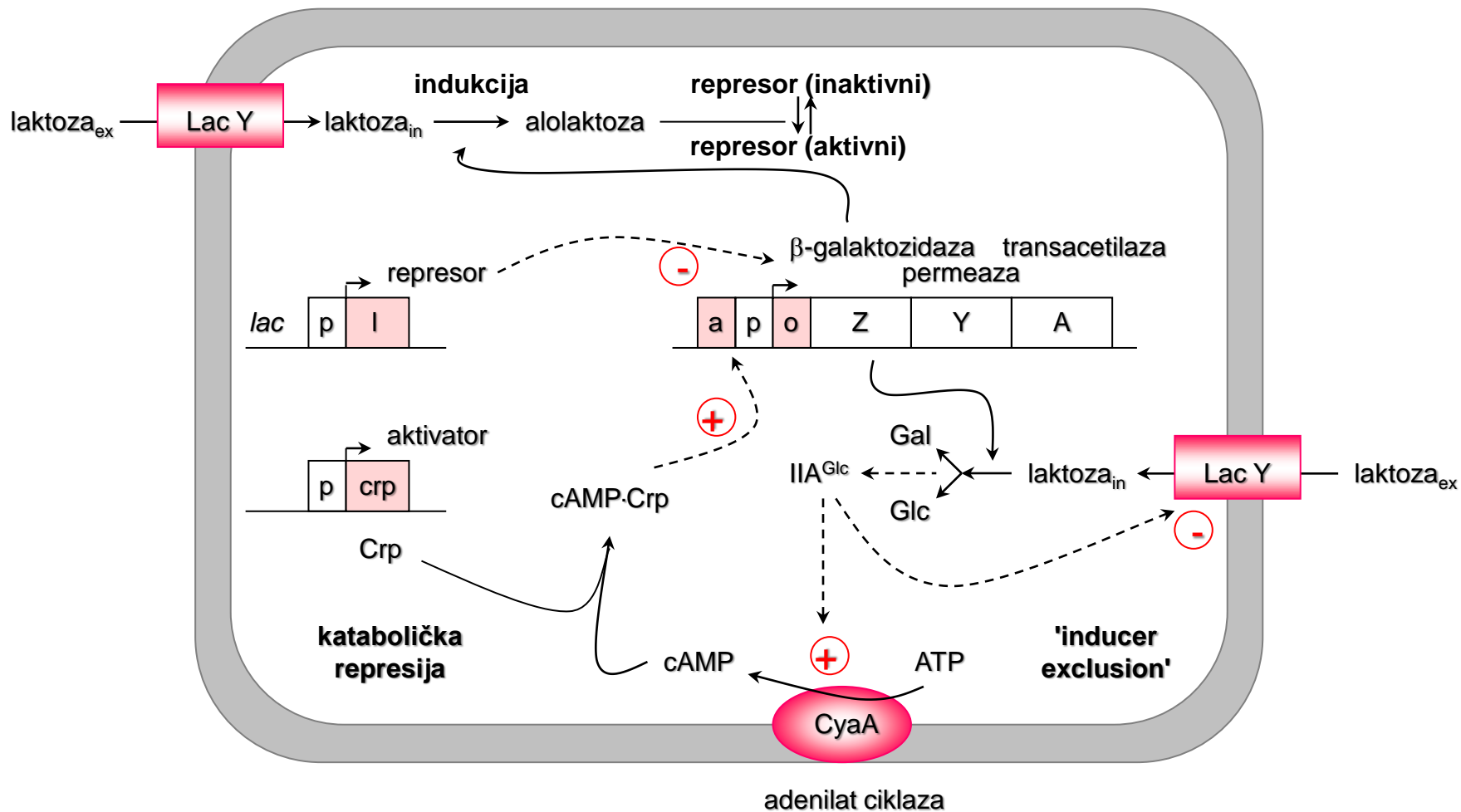


lac operon *E. coli*

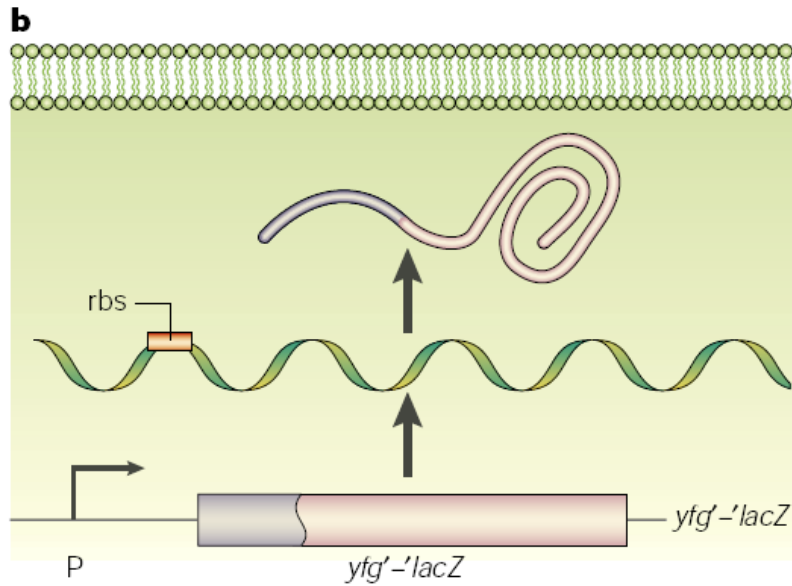
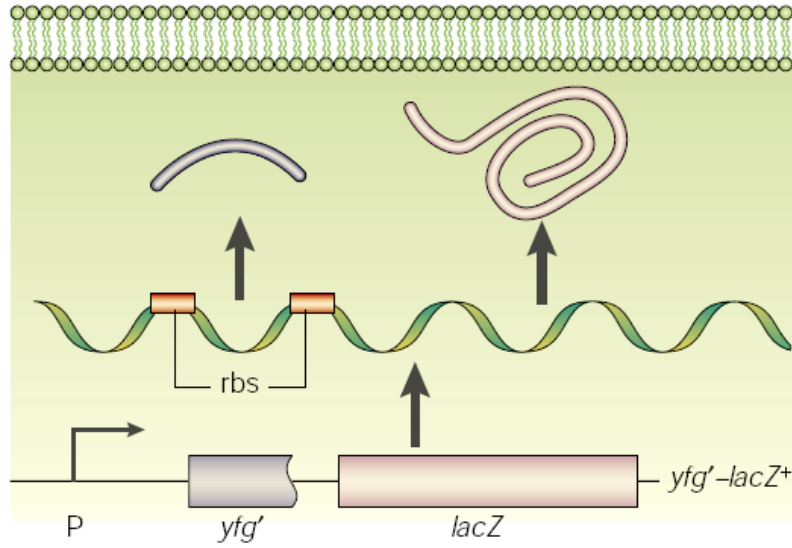
- u ovom slučaju glukoza se transportira u stanicu PTS sustavom za glukozu
- nefosforilirani oblik IIA^{Glc} proteina inhibira laktoza permeazu
- koncentracija cAMP se smanjuje, raspada se cAMP-CRP kompleks
- ovim se omogućava aktivacija transkripcije gena *lac* operona

- LAKTOZA NE INDUCIRA *lac* OPERON U PRISUTNOSTI GLUKOZE

primitivni sustav za 'sensing' i regulaciju: *lac* operon i metabolizam laktoze



fuzija gena s *lacZ*



katabolička represija kod Gram-pozitivnih bakterija

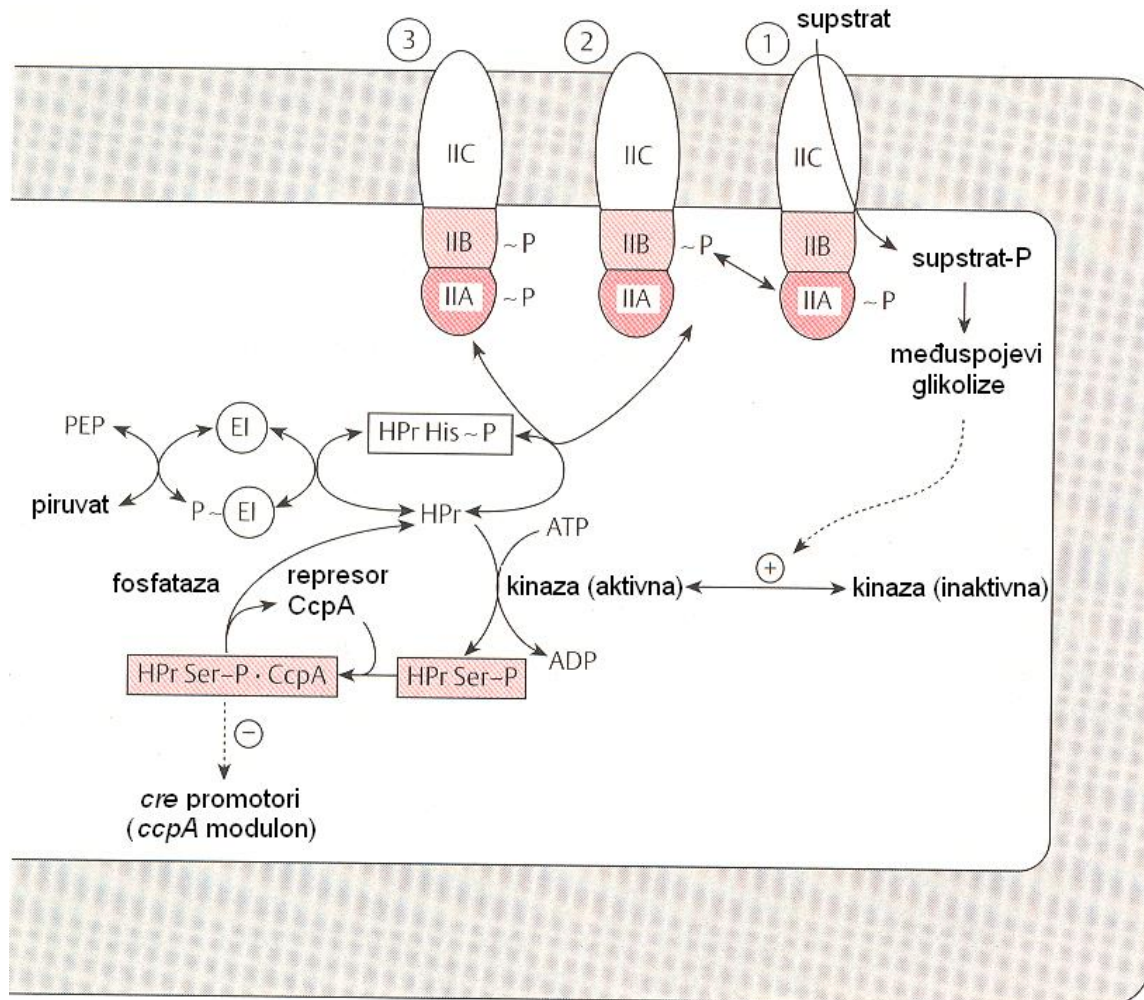
- Gram-pozitivne bakterije također imaju kataboličku represiju
- katabolička represija je povezana s PTS sustavom i fosforilacijskom kaskadom
- mehanizam je drugačiji jer ove bakterije
 - nemaju Crp protein
 - cAMP se u citoplazmi nalazi u tragovima
 - nemaju proteina IIA^{Glc}
- kod Gram-pozitivnih bakterija umjesto *crp* modulona djeluje *ccpA* modulon
- definirane su promotorske *cre* (eng. catabolite responsive elements) sekvence na koje djeluje CcpA protein (eng. catabolite control protein A) koji pripada obitelji Lac I regulatora transkripcije

katabolička represija kod Gram-pozitivnih bakterija

· regulacija se odvija na slijedeći način:

1. glukoza se transportira PTS sustavom.
2. međuspojevi glikolize (Fru-1,6-bP) aktiviraju specifičnu protein kinazu koja fosforilira HPr protein u položaju Ser46, za razliku od proteina EI koji fosforilira His u HPr proteinu.
3. HPr-Ser46 aktivira globalni represor CcpA koji djeluje na sve promotore što sadrže *cre* mjesta vezanja i dolazi do represije svih operona u sastavu *ccpA* modulona.
4. nestankom glukoze prestaje aktivacija protein kinaze, a specifična protein fosfataza odvaja fosfornu kiselinu s HPr-Ser46 proteina i time prestaje represija.

katabolička represija kod Gram-pozitivnih bakterija



literatura

1. Grupa autora: *Biology of the procaryotes*, J.W. Lengeler, G. Drews, H.G. Schlegel (eds.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany (1999).
2. H. Shuman, T.J. Silhavy (2003) The art and design of genetic screens: *Escherichia coli*, Nature **4**, 419-431.

četvrtak, 02.11.2023., prvi parcijalni pismeni ispit (PP-1) iz FIM-a

- student/ica koji/a **želi** polagati PP-1 treba **poslati e-poruku** na e-adresu aslavica@pbf.unizg.hr najkasnije **do 24:00 h u utorak, 31. 10. 2023.** i **doći u četvrtak, 02.11.2023., pisati PP-1,**

e-poruka:

želim polagati PP-1

Anita Slavica

00582xyzxyz

- student/ica koji/a **ne želi** polagati PP-1 **ne treba poslati e-poruku** na e-adresu aslavica@pbf.hr i **ne treba i doći u četvrtak, 02.11.2023., na FIM**

kontrola anabolizma

kontrola anabolizma

- staništa u kojima obitavaju različite bakterije karakterizira vrlo širok raspon ekoloških uvjeta (npr. bakterija *Deinococcus radiodurans* je izolirana iz nuklearnih reaktora)
- bakterije su izložene stalnim promjenama uvjeta staništa (npr. T, pH, osmolarnost, radijacija, koncentracija potencijalnih supstrata i toksina) u kojima obitavaju (stres)
- zbog toga su bakterije razvile sofisticirane načine prilagodbe na novonastale uvjete (npr. “otplivaju”)
- re-modeliranje proteinskih kompleksa, prenošenje signala fosforilacijom i proteoliza načini su prilagodbe i preživljavanja bakterija u različitim uvjetima
- sustavi za prenošenje signala utječu na regulone/modulone

kontrola anabolizma

- bakterije se razmnožavaju različitom brzinom ovisno o uvjetima u okolini (t_g od 20 min do jedan tjedan)
- tijekom sinteze proteina ribosomi uglavnom “rade” maksimalnom brzinom (≈ 16 aminokiselina s^{-1})
- brzina sinteze proteina može se povećati povećanjem broja ribosoma
- *E. coli* u “siromašnim” podlogama ($t_g > 3$ h) ima oko 2000 ribosoma po stanici
- *E. coli* u “bogatim” podlogama ($t_g \approx 20$ min) ima oko 20000 ribosoma po stanici

kontrola anabolizma: *shift-up* i *shift-down* eksperimenti

- ***shift-up* eksperiment** (“minimalna” podloga → “bogata” podloga)

 - sinteza DNA se uspori

 - sinteza RNA se ubrza

 - rezultat: stanice rastu u masi, ne razmnožavaju se

 - stanice postaju veće, izdužene,

 - stanice imaju veći broj ribosoma

- kada se sastav makromolekula u stanici prilagodi

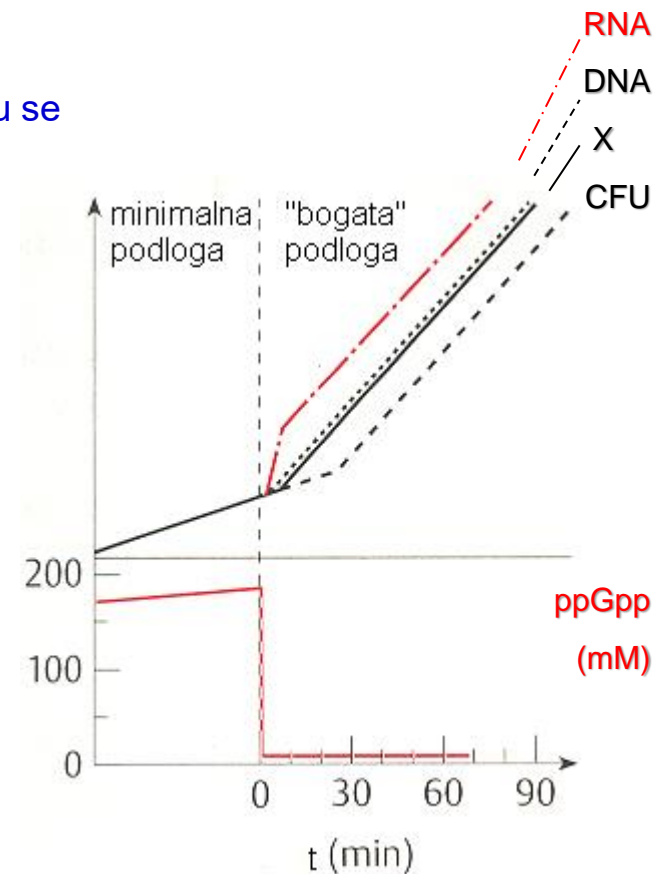
 - “novim” fiziološkim uvjetima, stanice se počinju

 - razmnožavati

- tada je t_g kraće

- unutarstanična koncentracija ppGpp se znatno smanji

 - ($c \approx 0$ mM)



kontrola anabolizma: *shift-up* i *shift-down* eksperimenti

- ***shift-down* eksperiment** (“bogata” podloga → “minimalna” podloga)

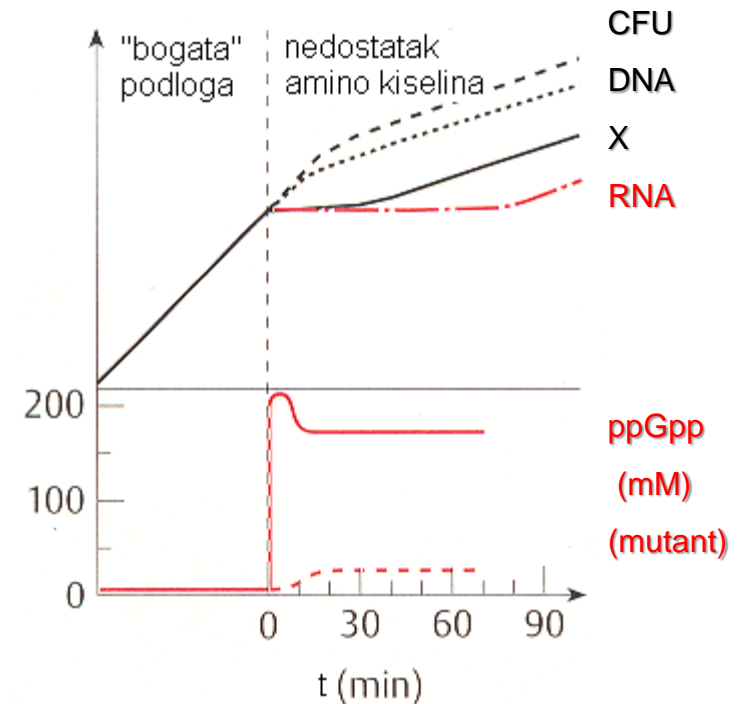
porast mase stanica trenutno prestaje

sinteza DNA se nastavlja kroz neko vrijeme

povećanje CFU se nastavlja kroz neko vrijeme

rezultat: manje i “lakše” stanice

- kada se sastav makromolekula u stanici prilagodi “novim” fiziološkim uvjetima, stanice se počinju razmnožavati
- tada je t_g dulje
- unutarstanična koncentracija ppGpp naglo poraste



kontrola anabolizma

- kompleksni odziv u kojem je uspostavljena regulacijska povezanost između
brzine rasta stanica
veličine stanica
broja ribosoma u stanici

naziva se “stroga” kontrola ili “strogi” odziv (eng. *stringent control or stringent response*)

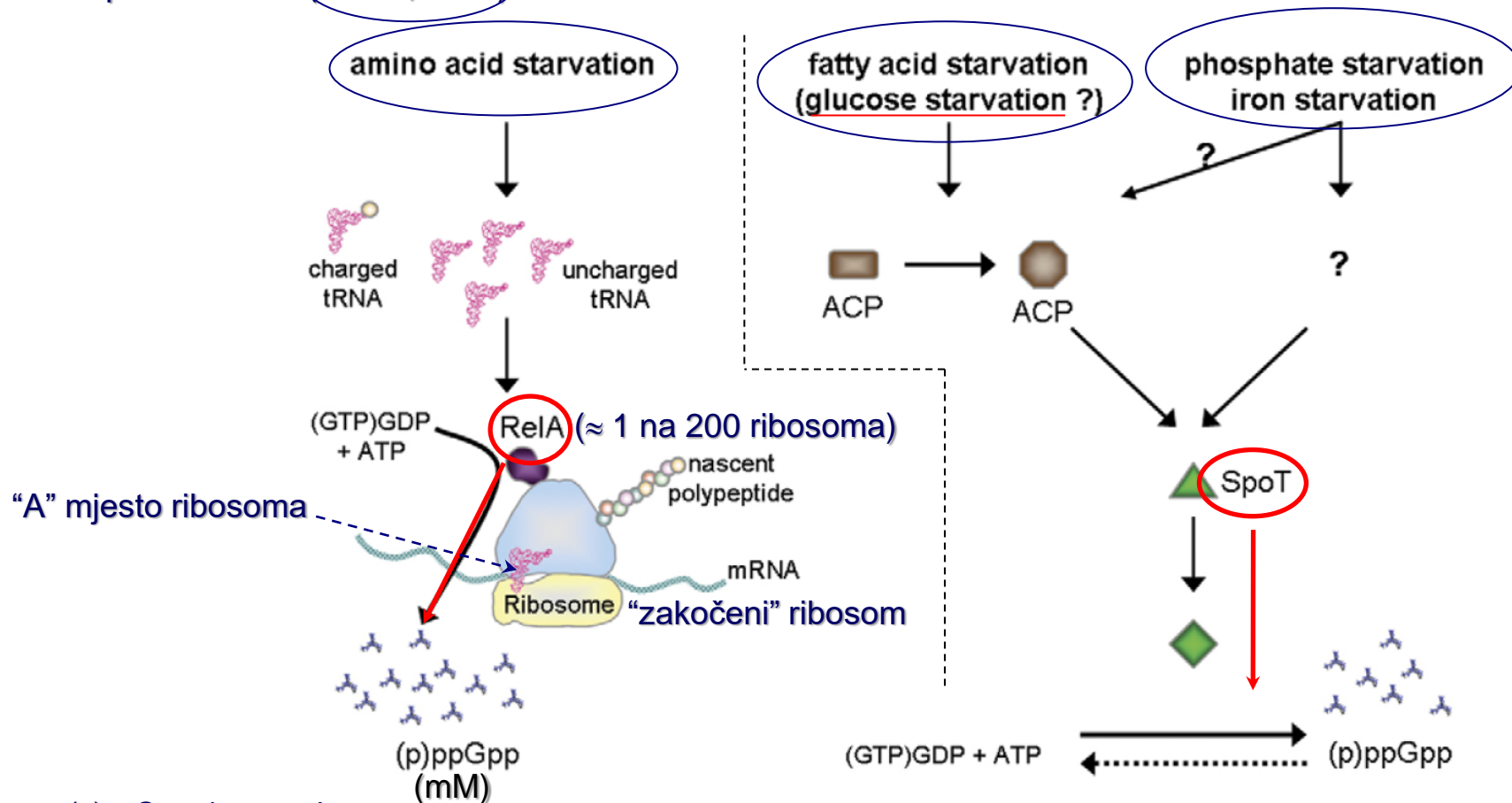
- dobiveni su mutanti kod kojih je “stroga” kontrola sinteze RNA postala “opuštena” kontrola (eng. *relaxed control*)

kontrola anabolizma: sinteza alarmona (p)ppGpp

· (p)ppGpp sudjeluje u regulaciji transkripcije, translacije i replikacije; regulira sintezu rRNA i tRNA

· RelA/SpoT modulon (*E. coli*, stres)

(bakterijske i biljne stanice)

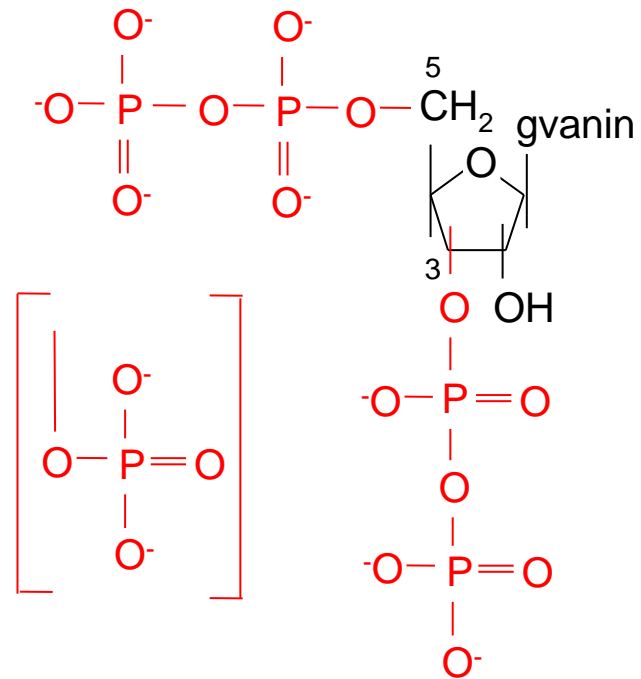


RelA (p)ppGpp sintetaza I

SpoT (p)ppGpp sintetaza/hidrolaza

ACP acyl carrier protein (β -oksidacija)

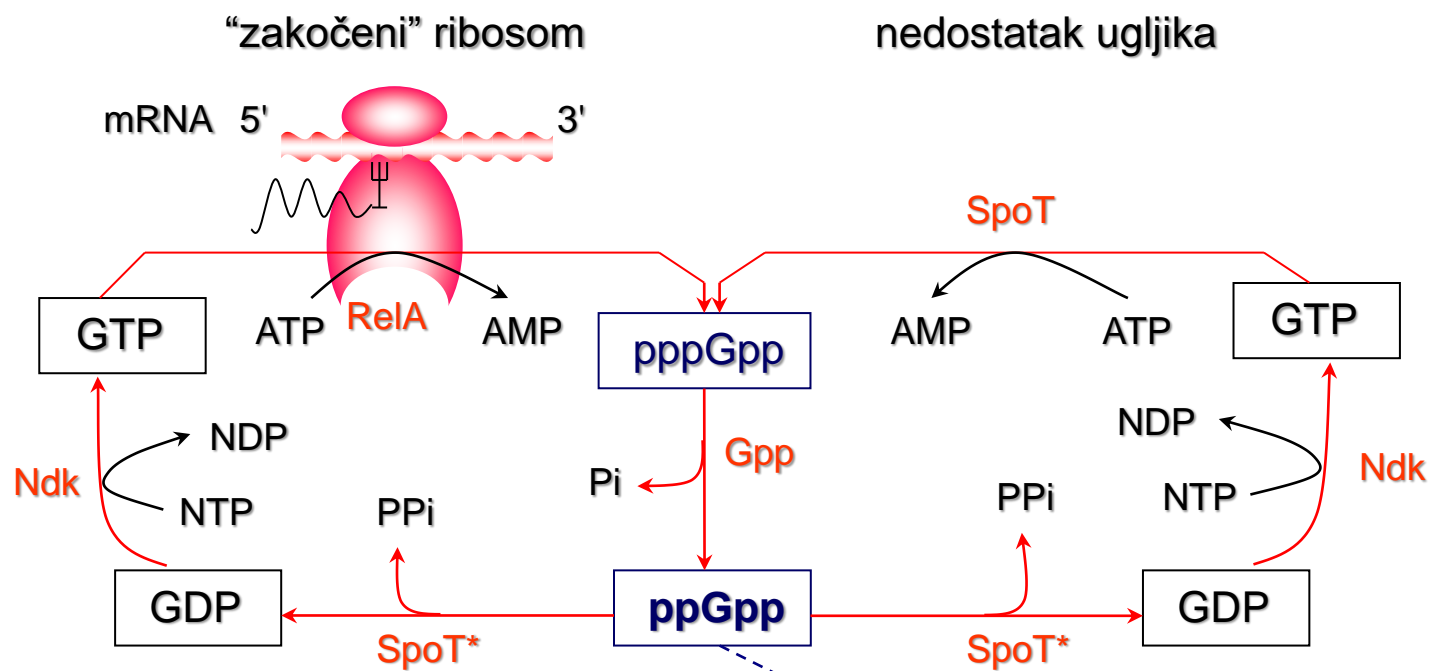
alarmon (p)ppGpp



kontrola anabolizma: sinteza alarmona (p)ppGpp

- *relA* gen kodira pppGpp sintetazu I (RelA protein/enzim)
- RelA vezan je na 50S podjedinicu ribosoma i to na L11 peptid
- ako se u citoplazmi “potroši” neka aminokiselina, prevladat će slobodna tRNA za ovu aminokiselinu
- tijekom sinteze proteina, kada ribosom dođe do kodona za ovu aminokiselinu na mRNA, na “A” mjesto ribosoma će se vezati slobodna tRNA
- vezanje slobodne tRNA dovest će do “zakočenja” ribosoma (eng. *stalled ribosome*)
- “zakočeni” ribosom aktivira pppGpp sintetazu I (RelA protein) koja iz GTP (energetski koenzim kod sinteze proteina) sintetizira pppGpp uz utrošak ATP
- slijedeći enzim u nizu je pppGpp-5'-fosfohidrolaza koja pppGpp prevodi u ppGpp
- ppGpp je alarmon za anaboličke reakcije i *stringent* kontrolu
- koncentracija alarmona ppGpp ovisi i o aktivnosti enzima SpoT ((p)ppGpp-3'-pirofosfohidrolaza) i Ndk (nukleozid-5'-difosfat kinaza)
- SpoT ima kompleksnu ulogu: sudjeluje u razgradnji ppGpp ((p)ppGpp-3'-pirofosfohidrolaza) i sintezi pppGpp (ppGpp sintetaza II)
- SpoT je odgovoran za drugi krug sinteze pppGpp koji djeluje na pobudu izazvanu nedostatkom izvora C

RelA/SpoT modulon kod enterobakterija



RelA protein

SpoT protein

Gpp

SpoT* protein

Ndk

pppGpp sintetaza I

ppGpp sintetaza II

pppGpp- 5'-fosfohidrolaza

(p)ppGpp-3'-pirofosfohidrolaza

nukleozid-5'-difosfat kinaza

anaboličke reakcije

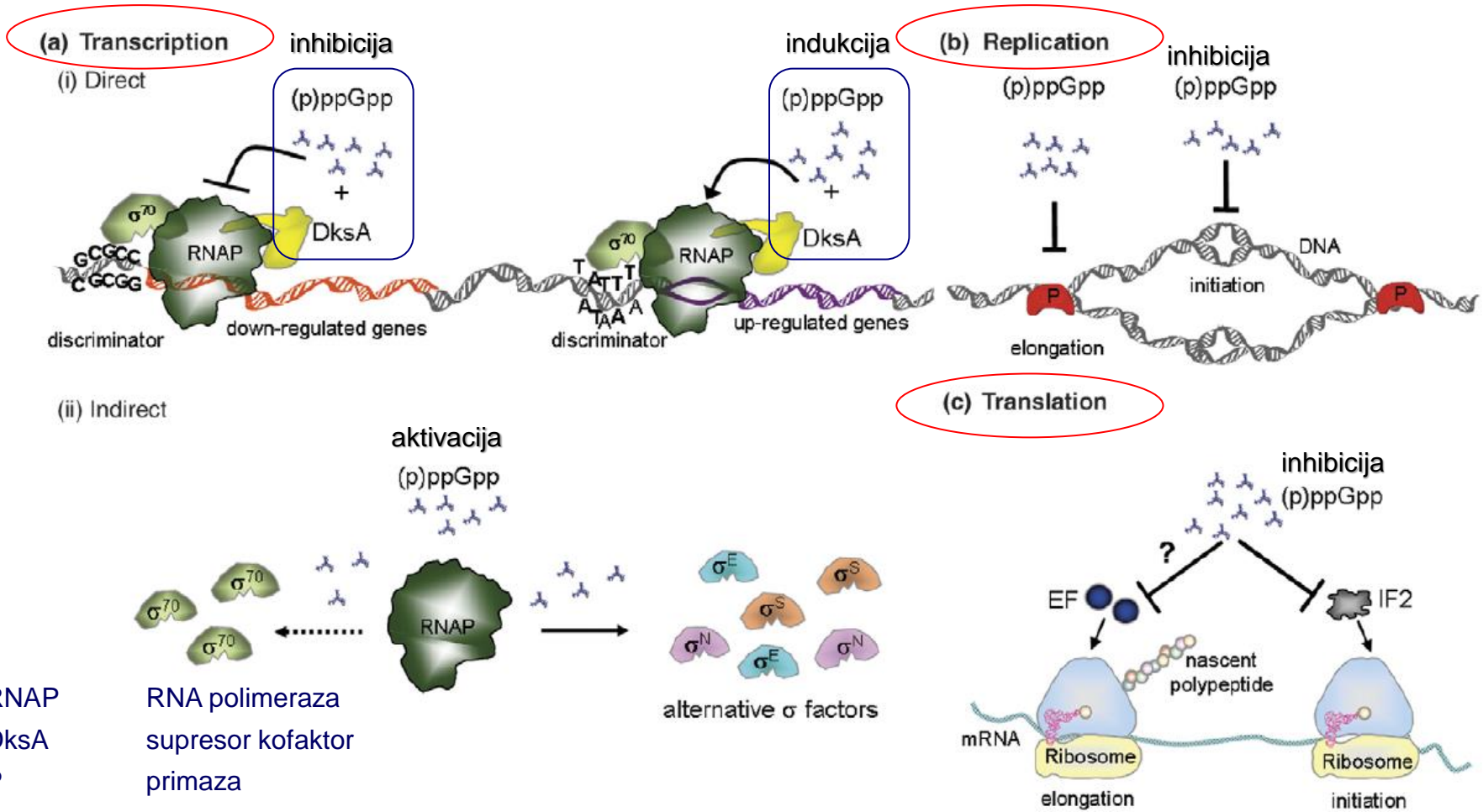
stringent kontrola

kontrola anabolizma

- povećanje koncentracije ppGpp u stanici dovodi do niza vrlo složenih regulacijskih učinaka
- pri tomu je vrlo teško razlučiti što je uzrok, a što posljedica pobude
- cilj: uskladiti brzinu rasta i makromolekulski sastav stanice prema uvjetima okoline
- neke uočene promjene:
 1. “zakočenje” brojnih ribosoma i prestanak sinteze proteina.
 2. inhibicija aktivnosti RNA-polimeraze vezanjem ppGpp na β podjedinicu.
 3. ne formiraju se nove replikacijske viljuške (prestanak sinteze DNA).
 4. inhibicija transkripcije gena za stabilne RNA molekule (tRNA i rRNA).
 5. akumulacija nedovršenih peptida u stanici aktivira “stres-proteine” koji potiču proteolizu čime se kratkotrajno nadoknađuje manjak aminokiselina.
 6. aktiviraju se biosintetski i katabolički operoni.

kontrola anabolizma

· (p)ppGpp regulira transkripciju, replikaciju i translaciju

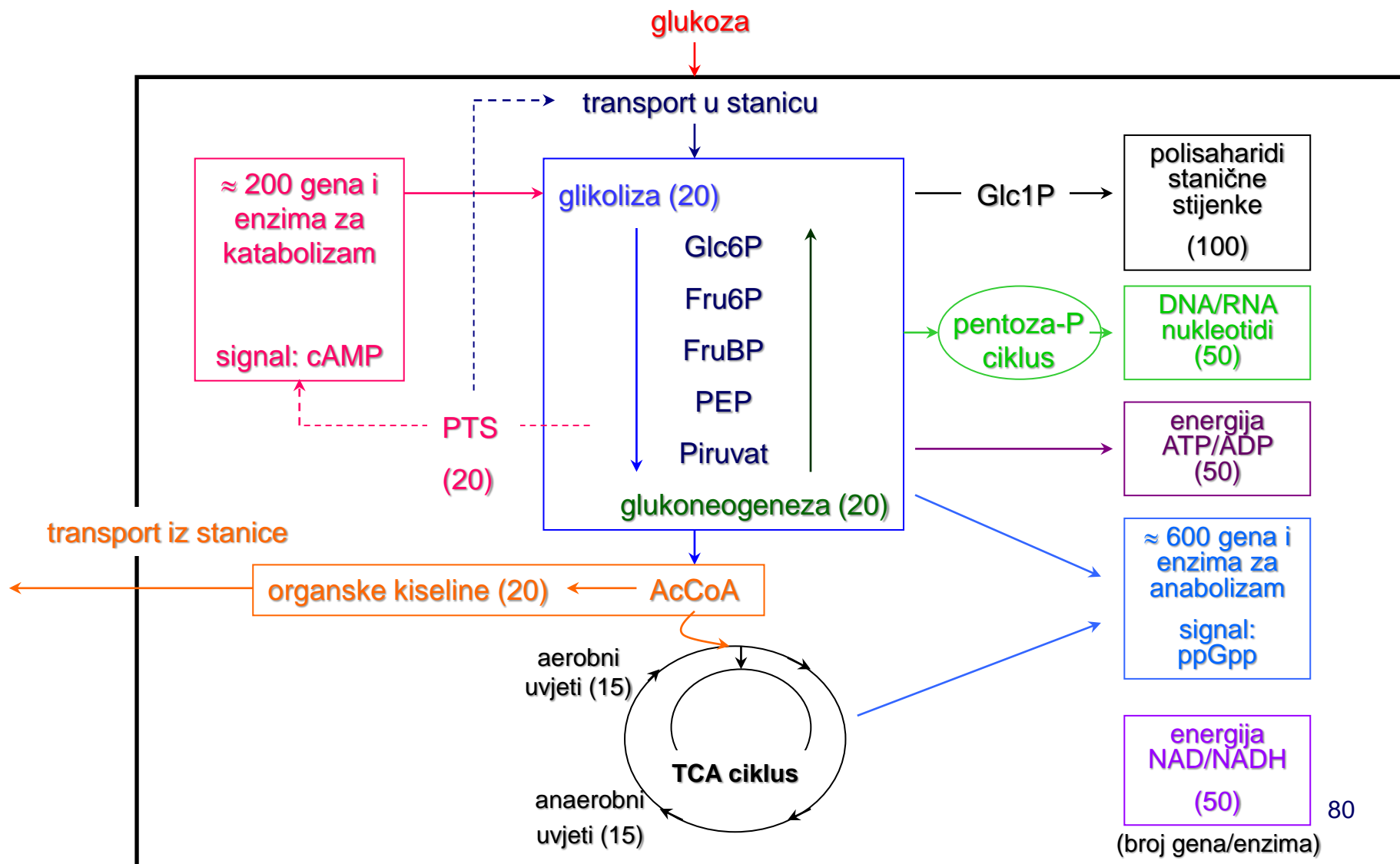


- RNAP RNA polimeraza
- DksA supresor kofaktor
- P primaza
- IF2 faktor inicijacije 2
- EF faktor elongacije

metabolički blokovi u bakterijskoj stanici (genetički, biokemijski i informacijski)

- 50 integriranih metaboličkih blokova (modulona) u bakterijskoj stanici podijeljeno je u četiri klase:
 - moduloni uključeni u dobavu supstrata i energije
 - moduloni uključeni u prilagodbu stresu
 - moduloni uključeni u diferencijaciju stanica
 - moduloni uključeni u agregaciju stanica i “kontakt” među stanicama (biofilmovi, dentalni plakovi, ..., eng. *quorum sensing*)

metabolički blokovi u bakterijskoj stanici (genetički, biokemijski i informacijski)



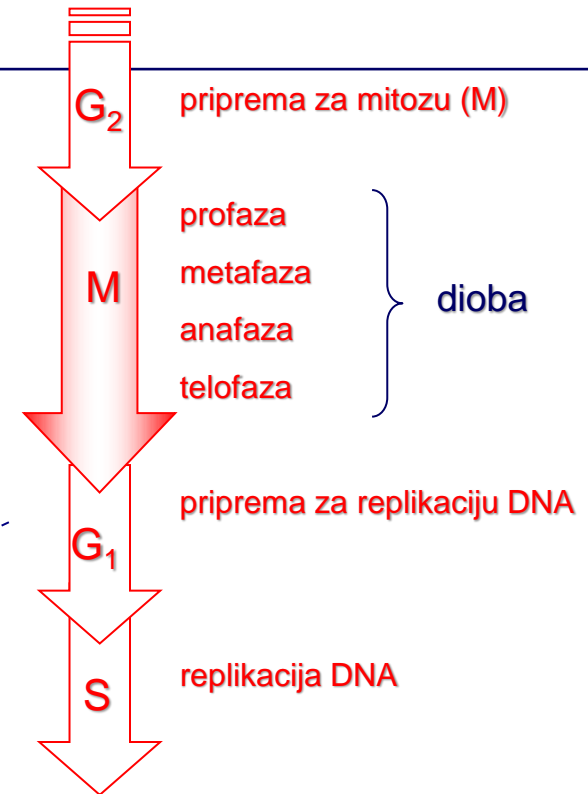
stanični ciklus prokariota i eukariota

stanični ciklus prokariota i eukariota - općenito

· faze staničnog ciklusa: G_1 , S, G_2 , M

· raspodjela genetičkog materijala na dvije stanice kćeri
(mitoza, M)

interfaza



· nakon replikacije DNA slijedi **citokineza** (dioba citoplazme)

· da bi stanice kćeri bile genetski identične, dioba jezgre (mitoza) i citokineza moraju biti koordinirane međusobno u vremenu i u prostoru (stanice/a)

· istraživanje citokineze: *E. coli*, *B. subtilis*, *Caulobacter crescentus*

Dictyostelium discoideum (kvasci i fungi; jezgrina membrana),

sisavci, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*,...

(viši eukarioti - jezgrina membrana)

stanični ciklus prokariota i eukariota - općenito

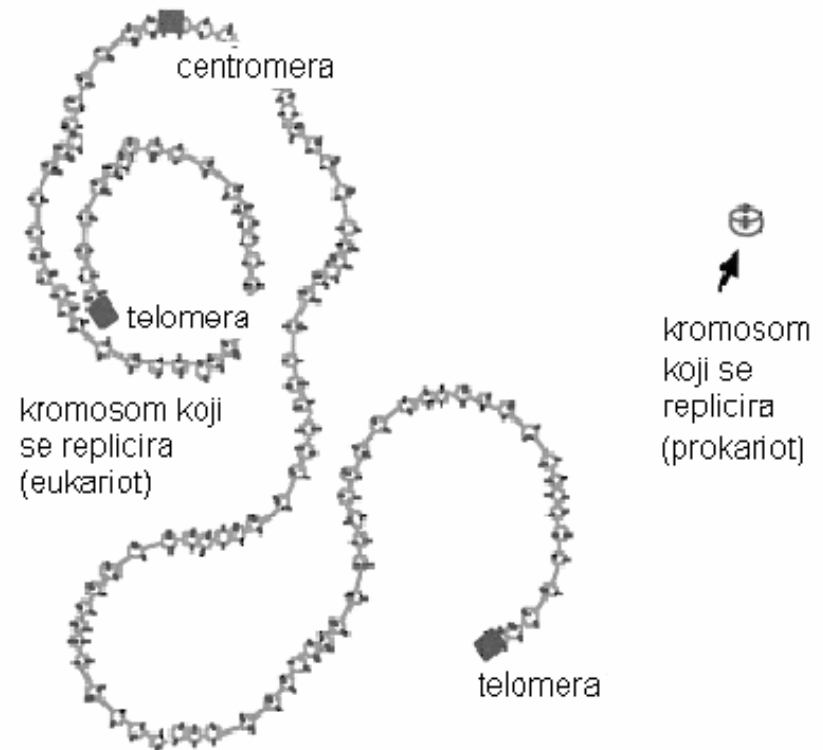
- NUKLEOID čine kromosomi i proteinske strukture uključene u procese transkripcije, replikacije i formiranje samog nukleoida
- nakon usklađene replikacije (započinje formiranje nukleoida) i razdvajanja kromosoma (nukleoida), odvija se dioba stanice

stanični ciklus prokariota i eukariota - općenito

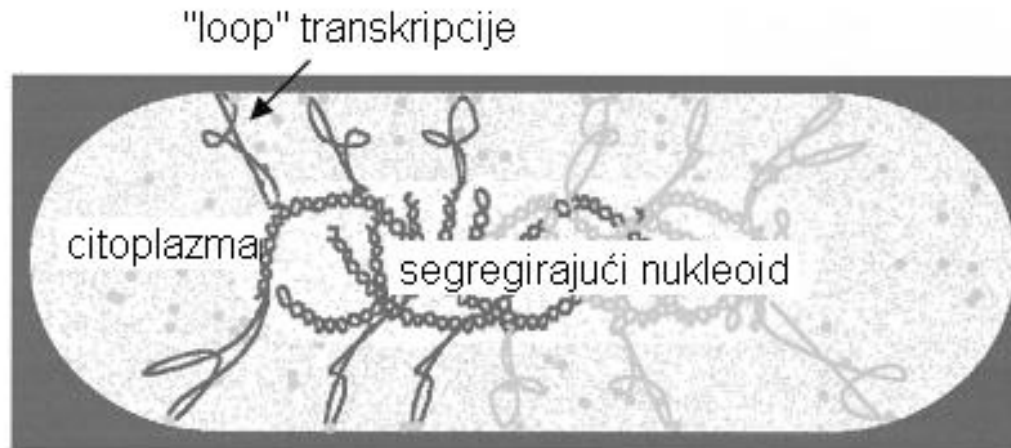
- citokineza zahtijeva dupliciranje određenih struktura stanice
- duplikaciju slijedi bipolarizacija stanice koja će se podijeliti i nastaju dvije stanice “kćeri”
- ovo se događa kod prokariotske i eukariotske stanice
- makromolekularna događanja u ove dvije stanice se razlikuju
- eukariotska stanica ima viši nivo organizacije: prije mitoze tzv. MTOC stukture se udvostručavaju i “vode” diobu stanice
- prokariotska stanica ima niži nivo organizacije: nema citoskeletona koji prožima citoplazmu ove stanice; replikacija i razdvajanje udvostručene DNA odvija se bez pomoći supramolekulskog sustava (aparata)

stanični ciklus prokariota i eukariota - usporedba

- replikacija kromosoma
- kromosom eukariota ima brojne *bidirectional* jedinice replikacije, svaka jedinica ima svoj *origin*
- kod prokariotske stanice (npr. *E. coli*) replikacija započinje kod definiranog *origina* i odvija se *bidirectional*;
- kromosom *E. coli* nema centromere ili telomere



stanični ciklus prokariota i eukariota: segregacija nukleoida kod *E. coli*



- nukleoid se kroz neko prijelazno razdoblje poveže s plazminom membranom i to pomoću tzv. transkripcijske *loop*; ovaj je model primjenjiv kod stanica koje sporo rastu

stanični ciklus prokariota i eukariota - usporedba

· bipolarna organizacija stanice

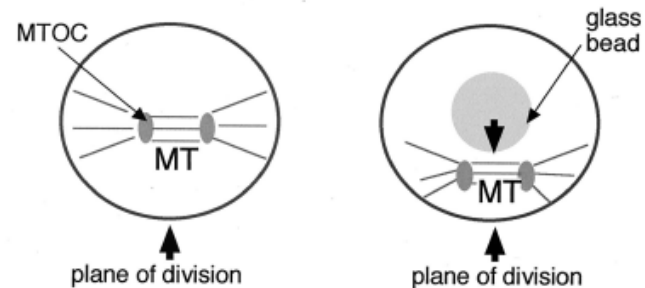
MTOC ↔ SPB
(kvasci)

MTOC eng. microtubule-organizing center

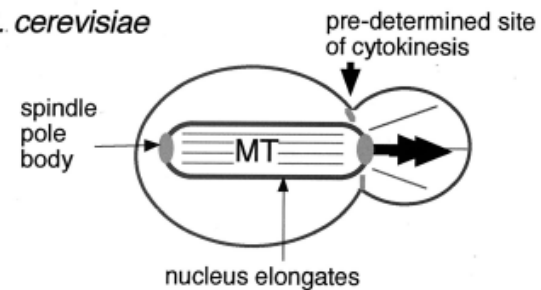
MT eng. microtubules

SPB eng. spindle pole body

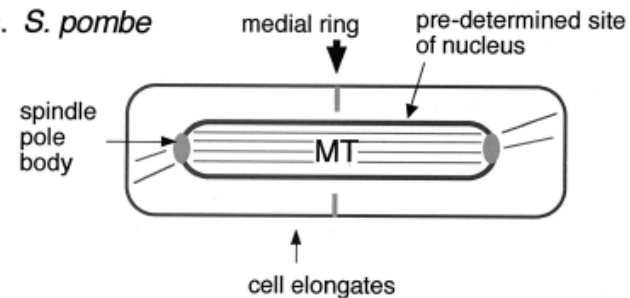
a. animal cell



b. *S. cerevisiae*



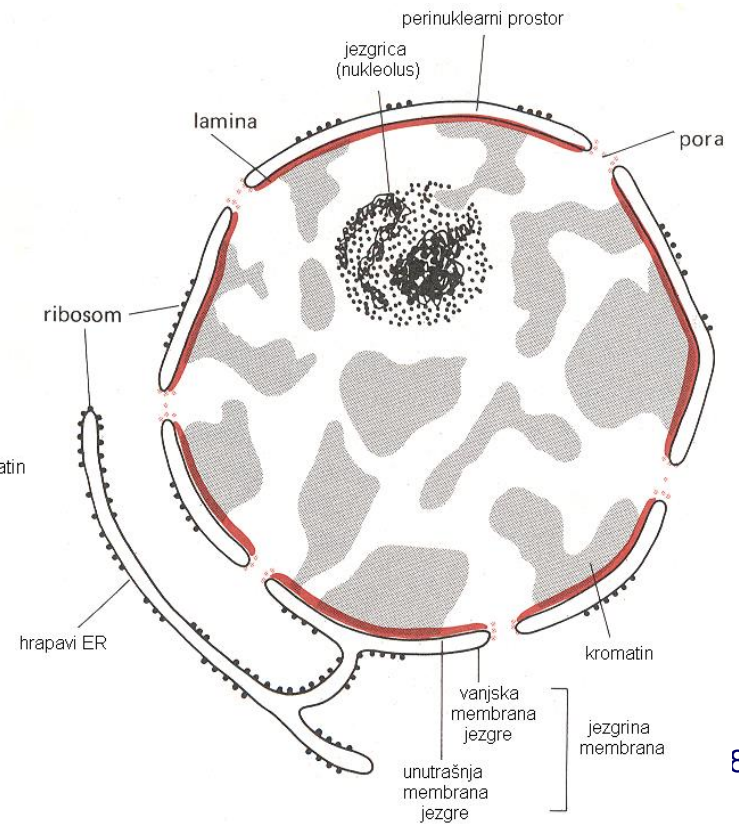
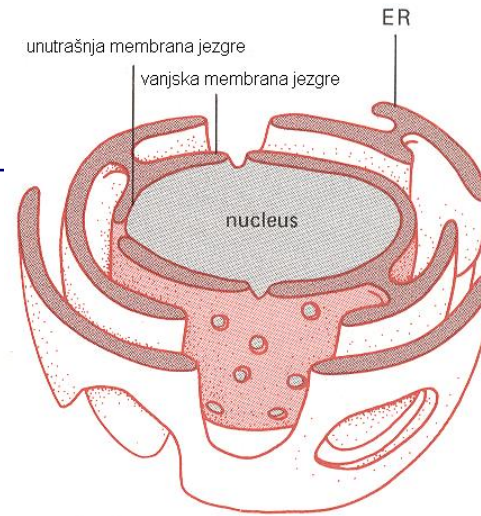
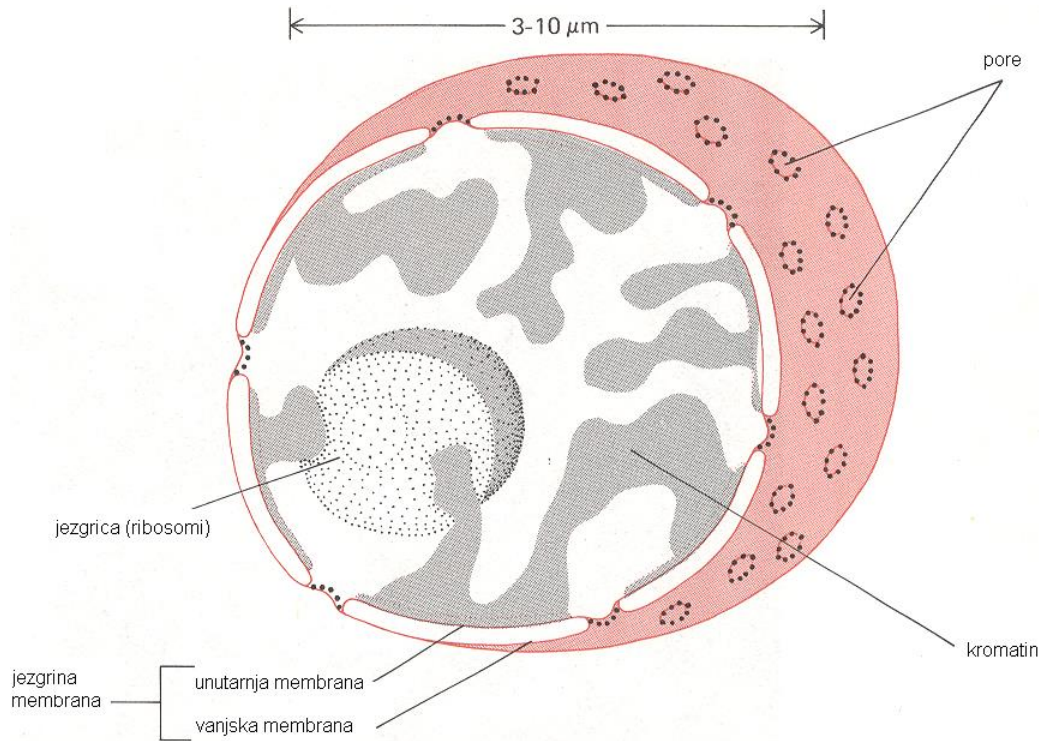
c. *S. pombe*



“mehanizam - sustav za određivanje smještaja jezgre”

biomembrane – organele

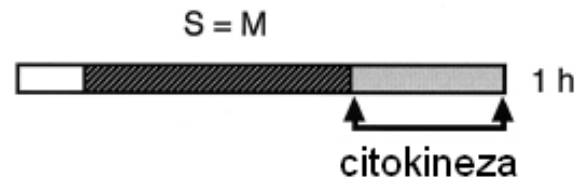
· organele s dvostrukom membranom jezgra



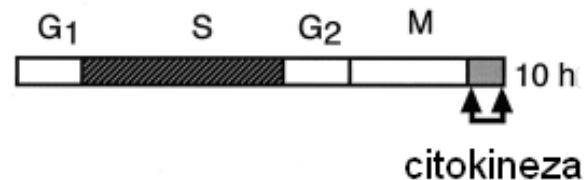
stanični ciklus prokariota i eukariota - usporedba

- usporedba trajanja faza staničnog ciklusa kod prokariota i eukariota

prokariot



eukariot



- postizanje kompaktnosti DNA nakon replikacije tijekom mitoze kod eukariota nije proces koji je zabilježen i kod prokariota; nema ni potrebe za ovim procesom jer se replicirani kromosomi raspodjeljuju u dvije stanice kćeri tijekom produživanja same prokariotske stanice; zbog toga *E. coli* nema izdvojenu M fazu.

stanični ciklus prokariota i eukariota - usporedba citokineze (1)

(na nivou stanice i na subcelularnom nivou)

1. prije same citokineze kod eukariota se formira BSA (eng. *bipolar spindle apparatus*; bipolarno diobeno vreteno).
2. orijentacija BSA potpomognuta je astralnim mikrotubulima koji su u interakciji sa membranom stanice.
3. površina po kojoj se cijepa stanica je definirana i nalazi se između dva MTOCa (eng. *microtubule-organizing center*).
4. tijekom citokineze kod stanice kvasca *S. cerevisiae* postoje odstupanja i to u smislu da BSA “podešava” svoju orijentaciju/smješta se u skladu s predodređenim mjestom cijepanja stanice (mjestom nastanka pupa), u svim ostalim slučajevima je upravo obrnuto tj. mjesto cijepanja stanice određeno je simetrijom BSA.

stanični ciklus prokariota i eukariota - usporedba citokineze (2)

(na nivou stanice i na subcelularnom nivou)

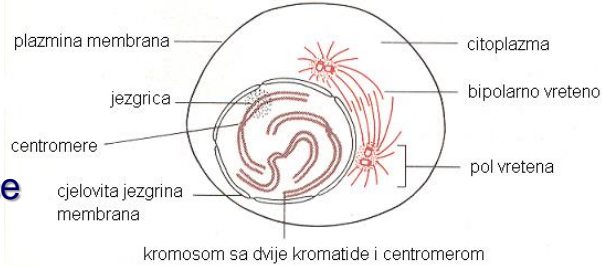
5. kod prokariota citokineza se odvija na pola puta između dva pola stanice; kao i kod eukariota, replicirani kromosom mora se prikladno orijentirati u prokariotskoj stanici; bakterije nemaju MTOC i smatra se da bi trebale imati stukturu ekvivalentnu MTOCu koji je karakterističan za eukariote.
6. kod prokariota replikacija DNA odvija se iz samo jednog mjesta (eng. *origin*).
7. kromatide se razdvajaju tijekom replikacije DNA.

stanični ciklus prokariota i eukariota: mitoza

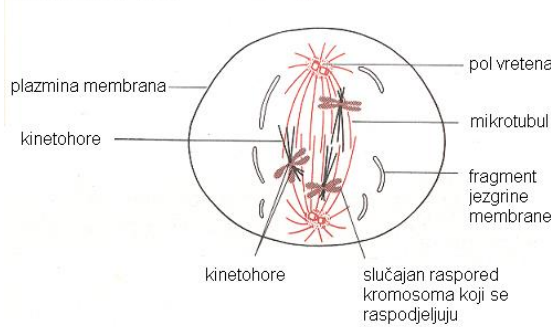
• mitoza (M)

• bipolarna organizacija stanice

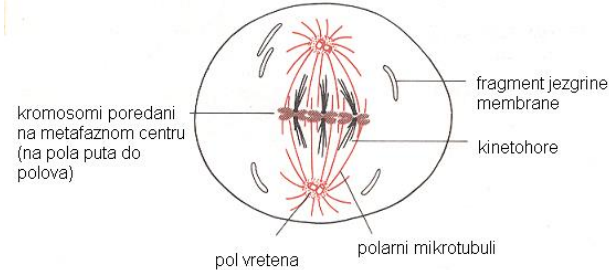
PROFAZA



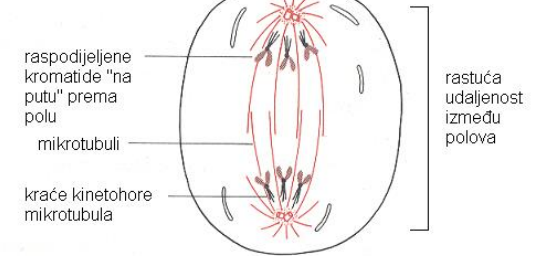
PROMETAFAZA



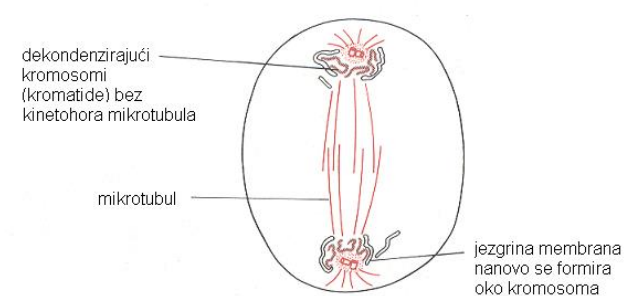
METAFAZA



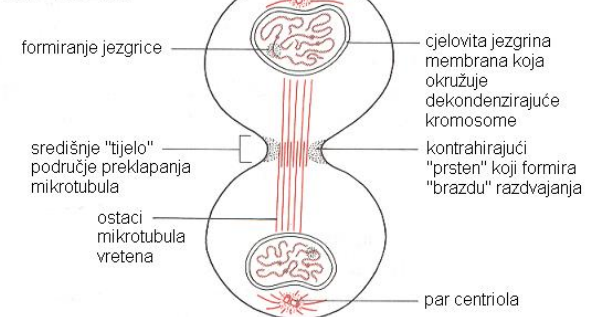
ANAFAZA



TELOFAZA



CITOKINEZA



stanični ciklus prokariota i eukariota: mitoza

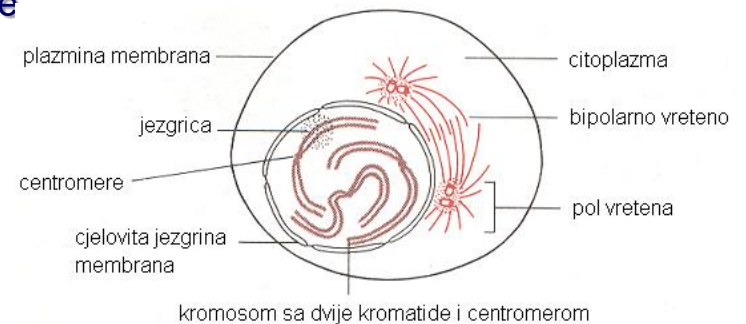
prijelaz između G_2 faze i M faze staničnog ciklusa nije jasno definiran

kromatin kondenzira u definirane kromosome (broj kromosoma ovisi o vrsti (mikro)organizma)

svaki se kromosom udvostručio tijekom S faze i sastoji se od dviju kromatida

kromatide kromosoma povezane su centromerom

jezgrica se počinje “raspadati” i postupno “nestaje”



- **profaza** mikrotubuli citoplazme (dio citoskeletona) se “raspadaju” i formiraju “pool” tubulinskih molekula; ove se molekule koriste za formiranje glavnog mitotičkog sustava - mitotičkog vretena; mitotičko vreteno je bipolarna struktura koja se formira izvan jezgre; centriole se repliciraju upravo prije S faze, svaki par centriola dio je mitotičkog centra; dva mitotička centra (eng. *aster or star*) se razdvajaju, a između se formiraju mikrotubuli; tako se formira bipolarno mitotičko vreteno.

stanični ciklus prokariota i eukariota: mitoza

· prometafaza

započinje raspadom jezgrine membrane;

fragmenti (slični ER) su vidljivi i nalaze se oko vretena tijekom M;

vreteno formirano izvan jezgre “ulazi” u područje jezgre;

formiraju se kinetohore i prihvaćaju za mikrotubule;

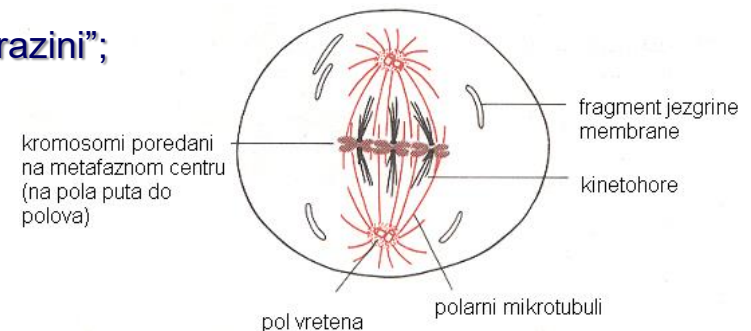
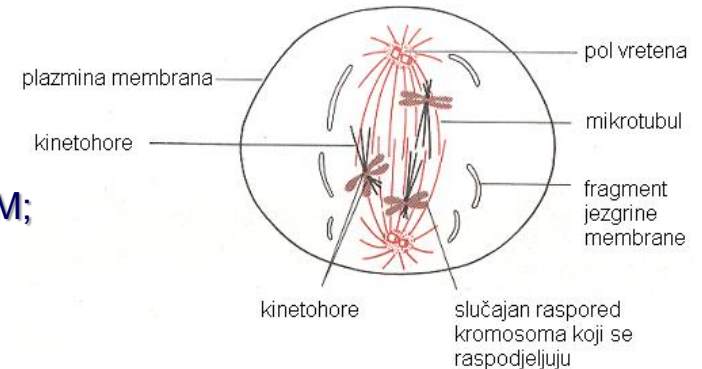
kromosomi se raspodjeljuju zbog interakcije njihovih kinetohora i vretena;

· metafaza

kromosomi se organiziraju tako da su im centromere na istoj “razini”;

kinetohore “poredaju” kromosome na pola puta do pola;

svaki se kromosom nalazi na “metafaznoj ploči”;



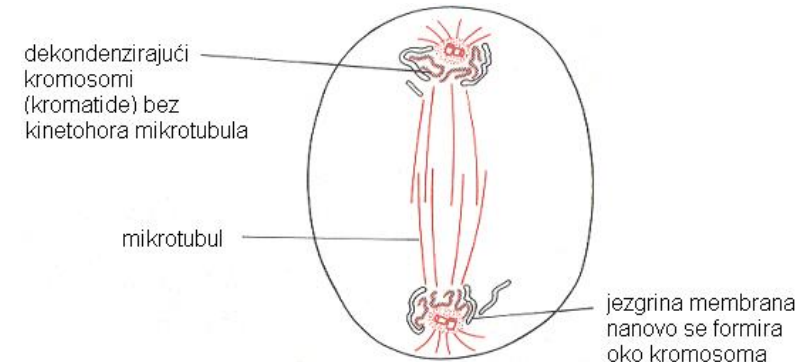
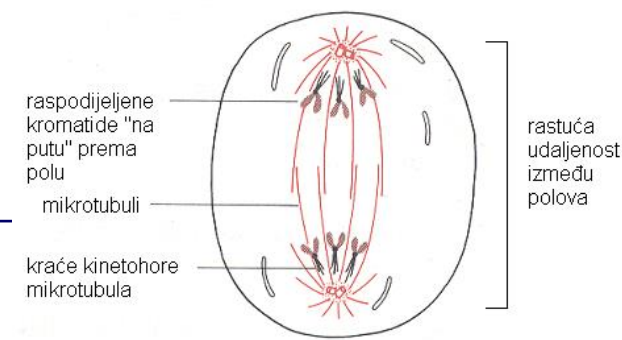
stanični ciklus prokariota i eukariota: mitoza

· anafaza

- započinje kad se sparene kinetohore na svakom kromosomu počnu razdvajati;
- svaka kromatida se “povlači” prema suprotnom polu;
- sve se kromatide “povlače” istom brzinom prema “svom” polu ($\approx 1\mu\text{m min}^{-1}$);
- kinetohore se skraćuju proporcionalno s “dolaskom” kromatida na pol;
- vreteno se produljuje;
- “dva” se pola “udaljavaju”;

· telofaza

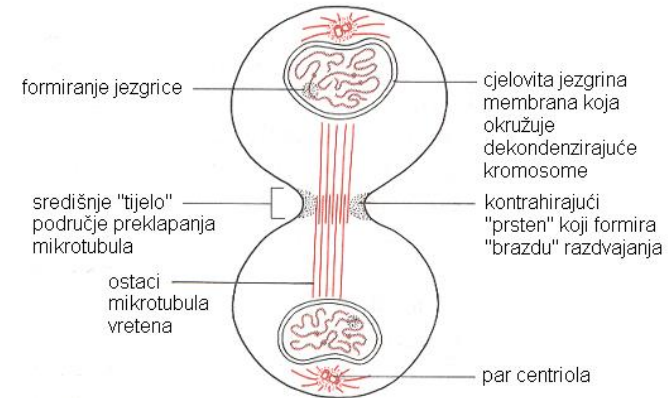
- kromatide su na polovima;
- kinetohore “nestaju”;
- polarna vlakna se produljuju;
- membrana jezgre se nanovo formira oko skupine kromatida-kćeri na svakom polu;
- kondenzirani kromatin ekspandira i formiraju se jezgrice;
- mitoza je kompletna;



stanični ciklus prokariota i eukariota: mitoza

· citokineza

citoplazma se počinje “cijepati” na kraju telo- ili anafaze;
membrana oko središta stanice se invaginira i formira “brazdu”;
“brazda” se produbljuje i stješnjuje mitotičko vreteno pri sredini;
“središnje tijelo” se konačno raspada i preostaju
dvije kompletne, razdvojene stanice kćeri.



→ animacije: **Meiosis**
Mitosis
www.sumanasinc.com/webcontent/animations/biology.html

literatura

1. Grupa autora: *Molecular biology of the cell*, B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson (eds.), Garland Publishing, Inc., New York (1983).
2. Grupa autora: *Biology of the procaryotes*, J.W. Lengeler, G. Drews, H.G. Schlegel (eds.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany (1999).
3. Grupa autora: *Applied Microbial Physiology*, P.M. Rhodes, P.F. Stanbury (eds.), IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK (1997).
4. N. Nanninga (2001) Cytokinesis in prokaryotes and eukariotes: common prnciples and different solutions, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**, 319-333.
5. F. Rallu. A. Gruss, E. Maguin (1996) *Lactococcus lactis* and stress, *Antonie van Leeuwenhoek* **70**, 243-251.
6. A. Srivastan, J.D. Wang (2008) Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp, *Current Opinion in Microbiology* **11**, 100-105.

vegetativni stanični ciklus

vegetativni stanični ciklus

- stanice svih mikroorganizama povećavaju svoju masu, rastu i dijele se
- tako mogu nastati dvije identične stanice kćeri
- ovaj se cjelokupni proces naziva vegetativni stanični ciklus

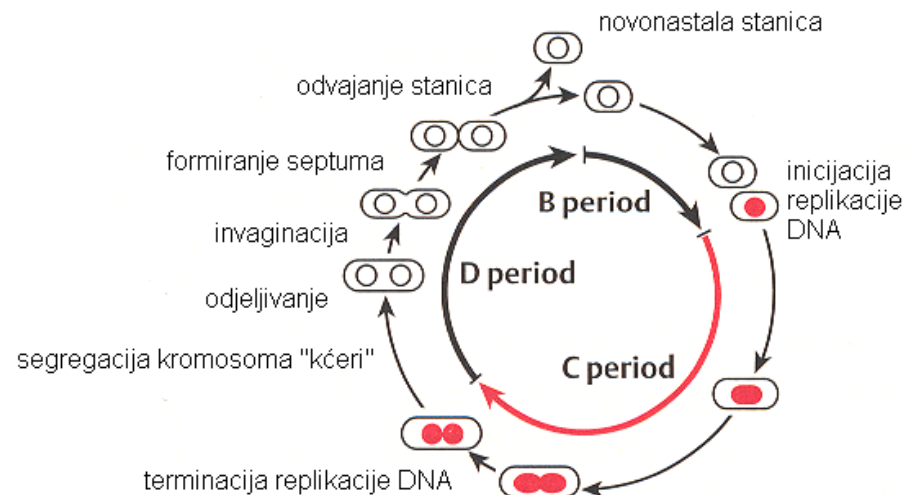
- tijekom vegetativnog staničnog ciklusa kod prokariotske stanice

genetski materijal je udvostručen

novonastali kromosomi su separirani

stanica je podijeljena

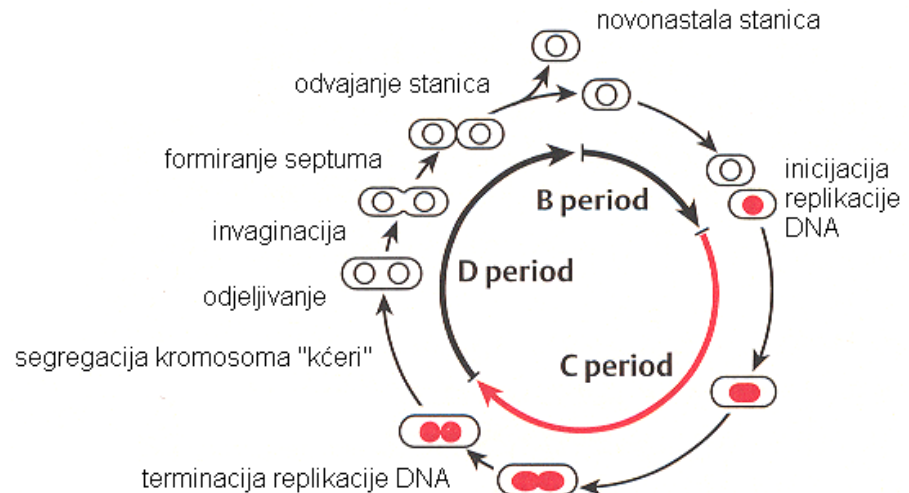
- tri faze staničnog ciklusa: B, C i D



vegetativni stanični ciklus

	prokarioti	eukarioti
porast mase stanice	B period	Gap1 ili G1 faza
sinteza DNA	C period	sinteza DNA ili S faza
porast mase stanice	D period	mitoza ili M faza
razdvajanje stanica	D period	citokineza

- trajanje C i D perioda ne ovisi o brzini rasta mikroorganizma
- trajanje B perioda se povećava s t_g



vegetativni stanični ciklus

- prokarioti
 - stanični ciklus je vrlo pažljivo kontroliran i koordiniran proces
 - veto sustav ne dozvoljava diobu stanice ukoliko replikacija kromosoma i dioba nukleoida nije kompletirana
 - stanica gubi mogućnost diobe u slučajevima kada nastupa oštećenje DNA ili je onemogućena sinteza DNA
 - nemogućnost odvajanja kromosoma “kćeri” može dovesti do diobe stanice u području polova
 - do danas nisu razjašnjeni molekularna osnova kontrole staničnog ciklusa kao i povezanost rasta stanice i diobe stanice
 - dioba stanice može se zaobići bez da se remete ostali događaji staničnog ciklusa

SPORULACIJA

sporulacija

- bakterije mogu kroz relativno dug period preživjeti u nepovoljnim uvjetima
- prilagodba nepovoljnim uvjetima predstavlja ireverzibilnu diferencijaciju stanice, jedan od načina diferencijacije stanice je npr. formiranje spore (npr. kod *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Streptomyces* sp., *Myxococcus xanthus*)
- formiranje spore je način preživljavanja stanice u nepovoljnim uvjetima širenja i kolonizacije različitih staništa (strujanje zraka, oborine, životinje)
- bakterije koje imaju sposobnost sporulacije su “sveprisutne” u prirodi
- sporulacija: model za istraživanje diferencijacije stanica i razvoja multistaničnih “organizacija”

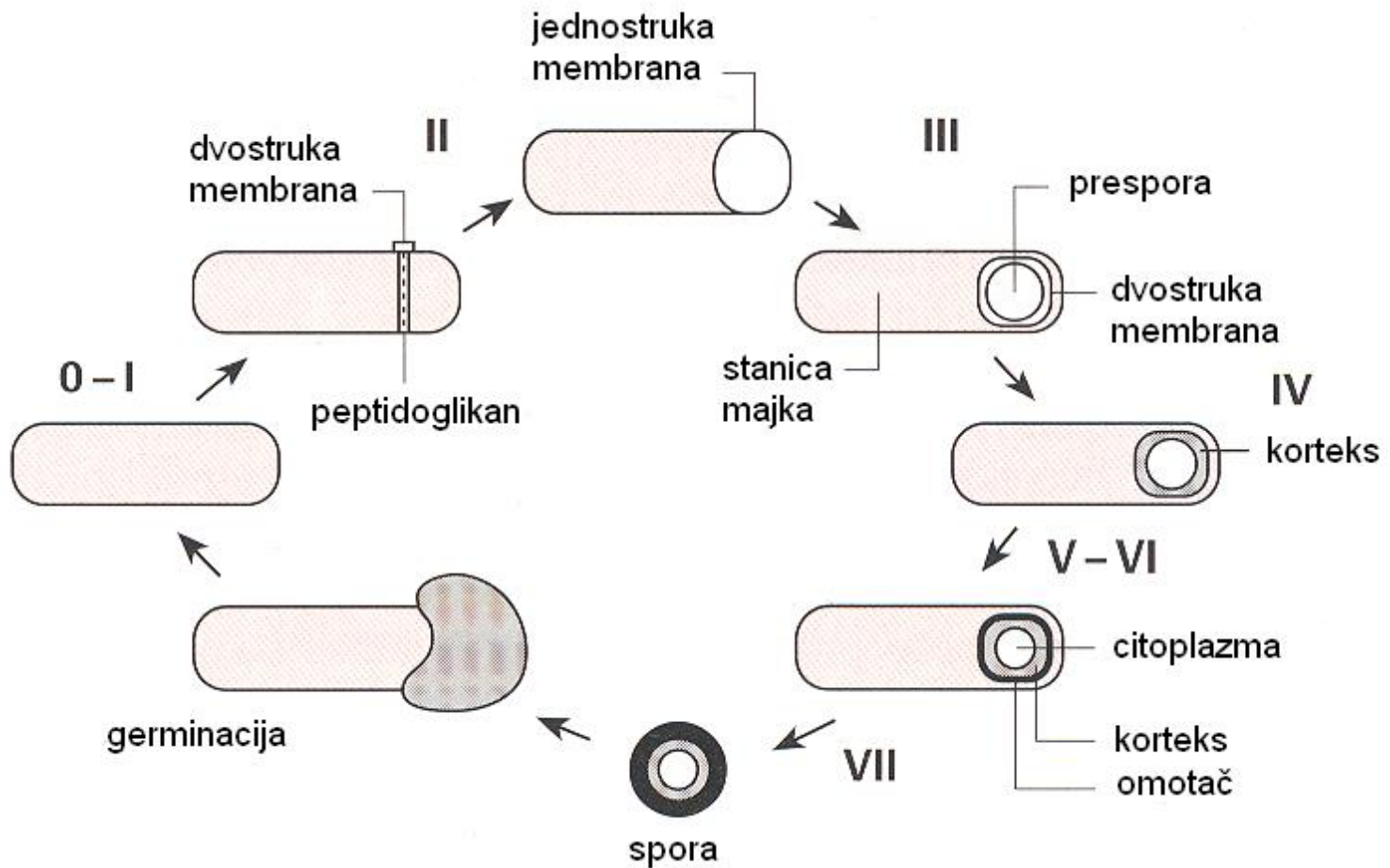
kako se mijenja ekspresija gena u stresnim situacijama koje dovode do sporulacije?

kako stanice međusobno komuniciraju u smislu razvoja multistaničnih kompleksa?

kako se u stanici odvija ekspresija gena u smislu formiranja dvaju (ili više) različitih tipova stanica (embriogeneza, patogeneza, kancerogeneza,...)?

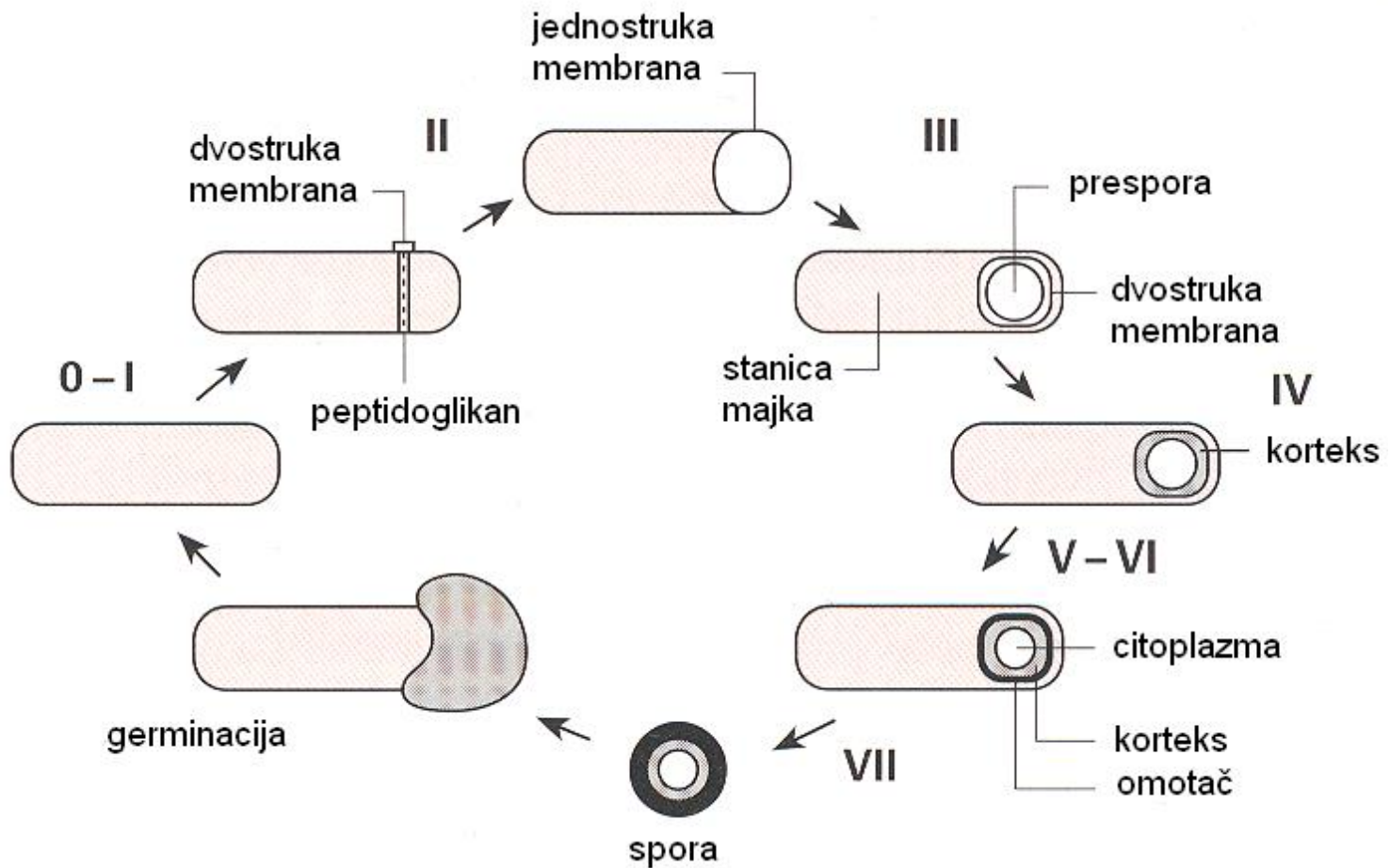
sporulacija: *Bacillus subtilis*

- morfološke karakteristike procesa sporulacije aerobne Gram-pozitivne bakterije *B. subtilis*



sporulacija: *Bacillus subtilis*

- morfološke karakteristike procesa sporulacije aerobne Gram-pozitivne bakterije *B. subtilis*



sporulacija: *Bacillus subtilis*

- morfološke karakteristike procesa sporulacije aerobne Gram-pozitivne bakterije *B. subtilis*

faza

- 0-I stanice se razmnožavaju diobom (simetrično)
- II asimetrična dioba; formira se septum (dvostruka lipidna membrana i tanki peptidoglikanski sloj)
- III hidroliza peptidoglikanskog sloja septuma; stanica majka “proguta” buduću sporu tako da buduća spora egzistira kao amorfni protoplast unutar stanice majke, koji je odvojen dvostrukom membranom (prespora)
- IV između dviju membrana prespore formira se peptidoglikanski sloj koji je preteča korteksu spore, a spori daje čvrstoću i oblik

sporulacija: *Bacillus subtilis*

- morfološke karakteristike procesa sporulacije aerobne Gram-pozitivne bakterije *B. subtilis*

faza

- V nastaje omotač spore (eng. *coat*) načinjen od ≈ 20 različitih polipeptida i proteina
- VI spora sazrijeva (eng. *maturation*); nastaju karakteristični spojevi (dipikolinska kiselina, 3-PGA); formira se višeslojni korteks; sporu karakteriziraju specifična svojstva (otpornost, “pospanost”, klijavost)
- VII autoliza stanice majke i “oslobađanje” spore

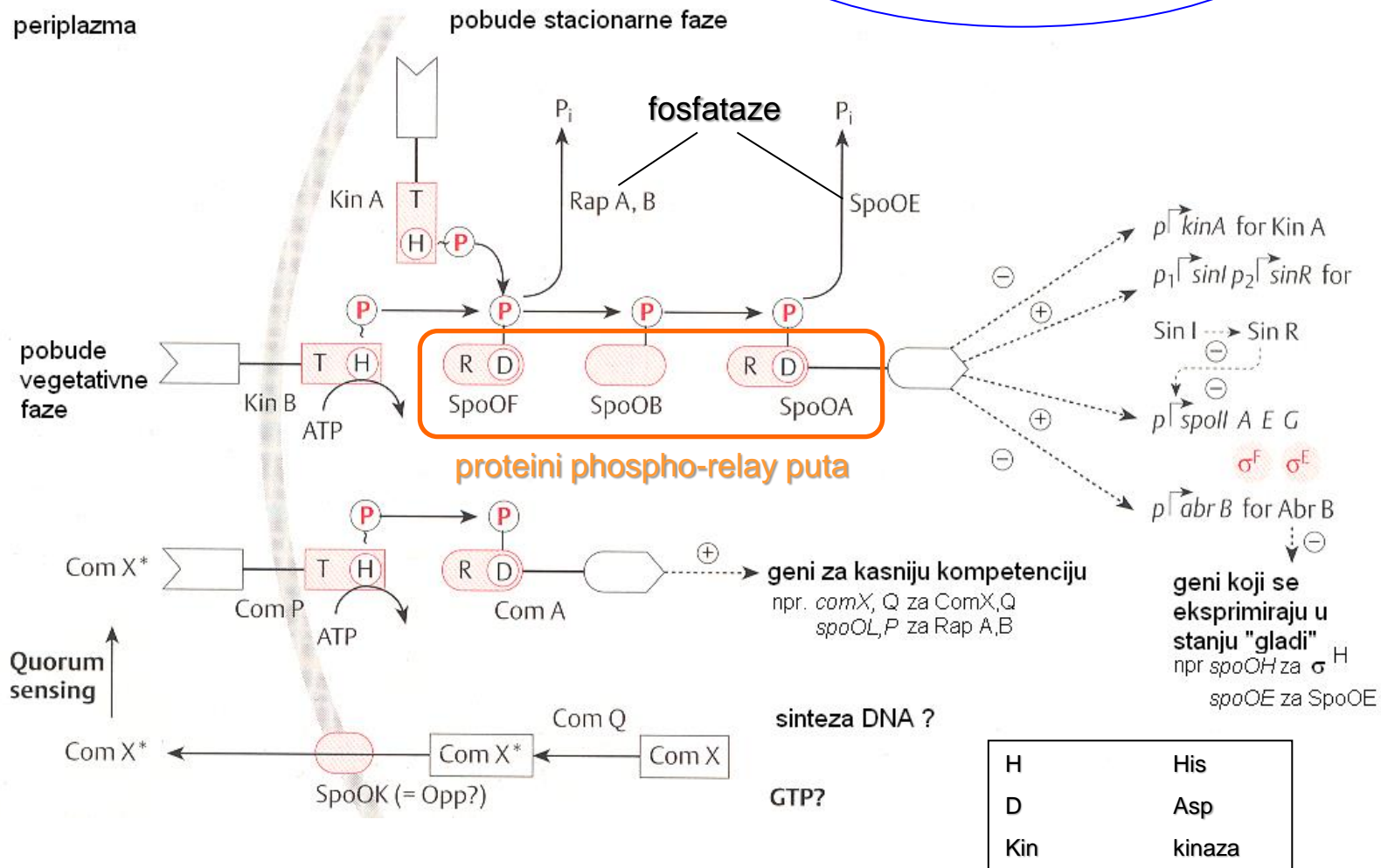
sporulacija: *Bacillus subtilis*

- identificirana su 24 gena koji kodiraju signalne, regulacijske i strukturne proteine koji su aktivni u različitim fazama sporulacije
- inicijacija sporulacije započinje fosforilacijskom kaskadom: nekoliko protein kinaza čini tzv. fosforelej sustav
- posljedica djelovanja fosforilacijske kaskade je segregacija σ faktora tj. sinteza četiri specifična σ proteina

sporulacija: *Bacillus subtilis*

· shema SpoO i Com *phospho-relay* puta

1. iscrpljivanje supstrata ("glad")
2. određena gustoća stanica
3. sinteza DNA



sporulacija: *Bacillus subtilis*

- shema *SpoO* i *Com phospho-relay* puta: *SpoOF* i *SpoOA*
- dvokomponentni sustav prijenosa signala za ekspresiju određenih gena (npr. aerobna respiracija i sporulacija)

Kin A - *SpoO A*

(senzor, His je donor **P**, Asp je akceptor **P**)

Com P - Com A

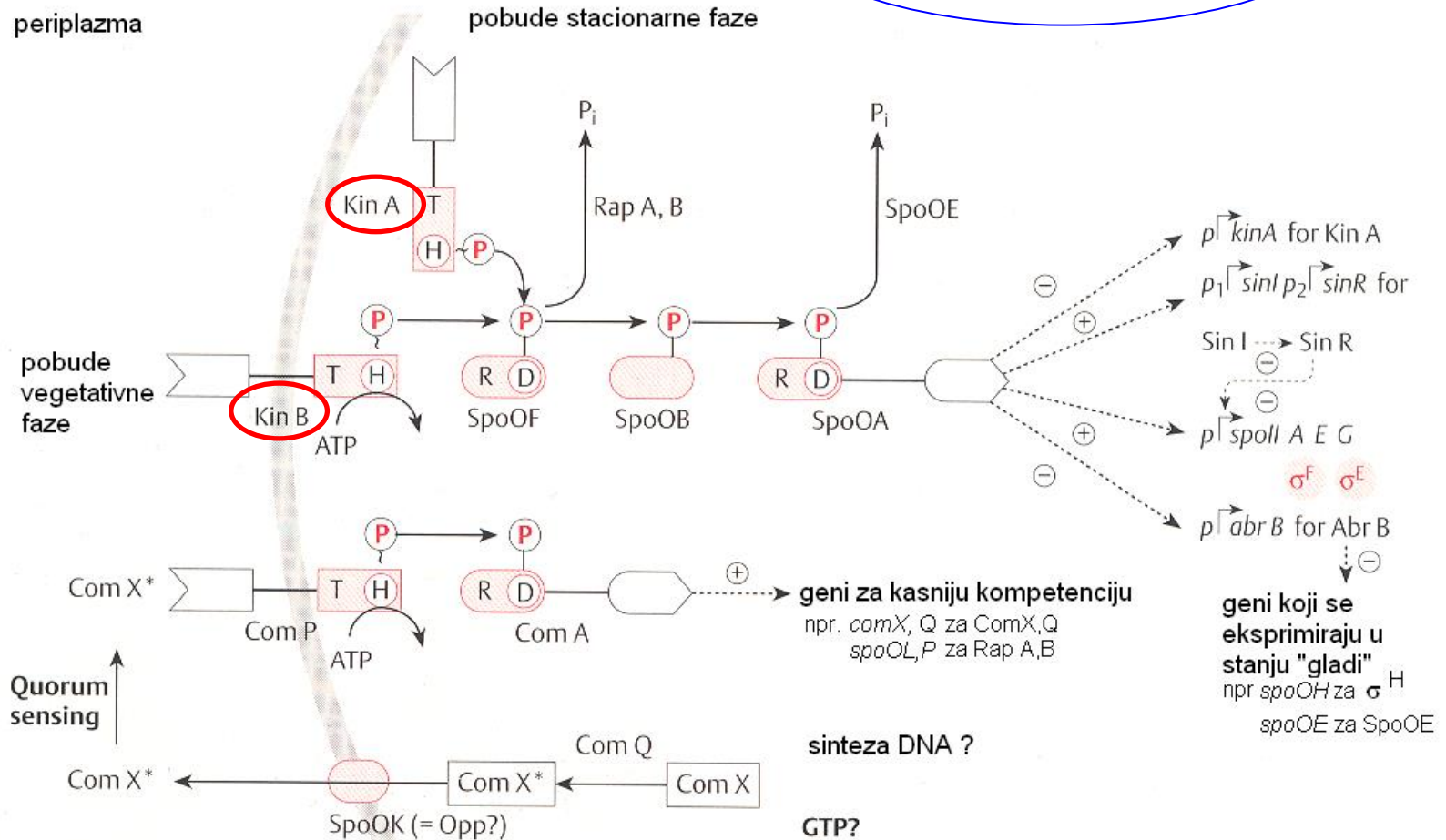
(senzor, His je donor **P**, Asp je akceptor **P**)

- kada je stimulirana, kinaza se autofosforilira uz utrošak ATP
- kinaza (*Kin A* i *Com P*) je *transmitter* signala, a *receiver* je *SpoO A* i *Com A*

sporulacija: *Bacillus subtilis*

· shema SpoO i Com *phospho-relay* puta

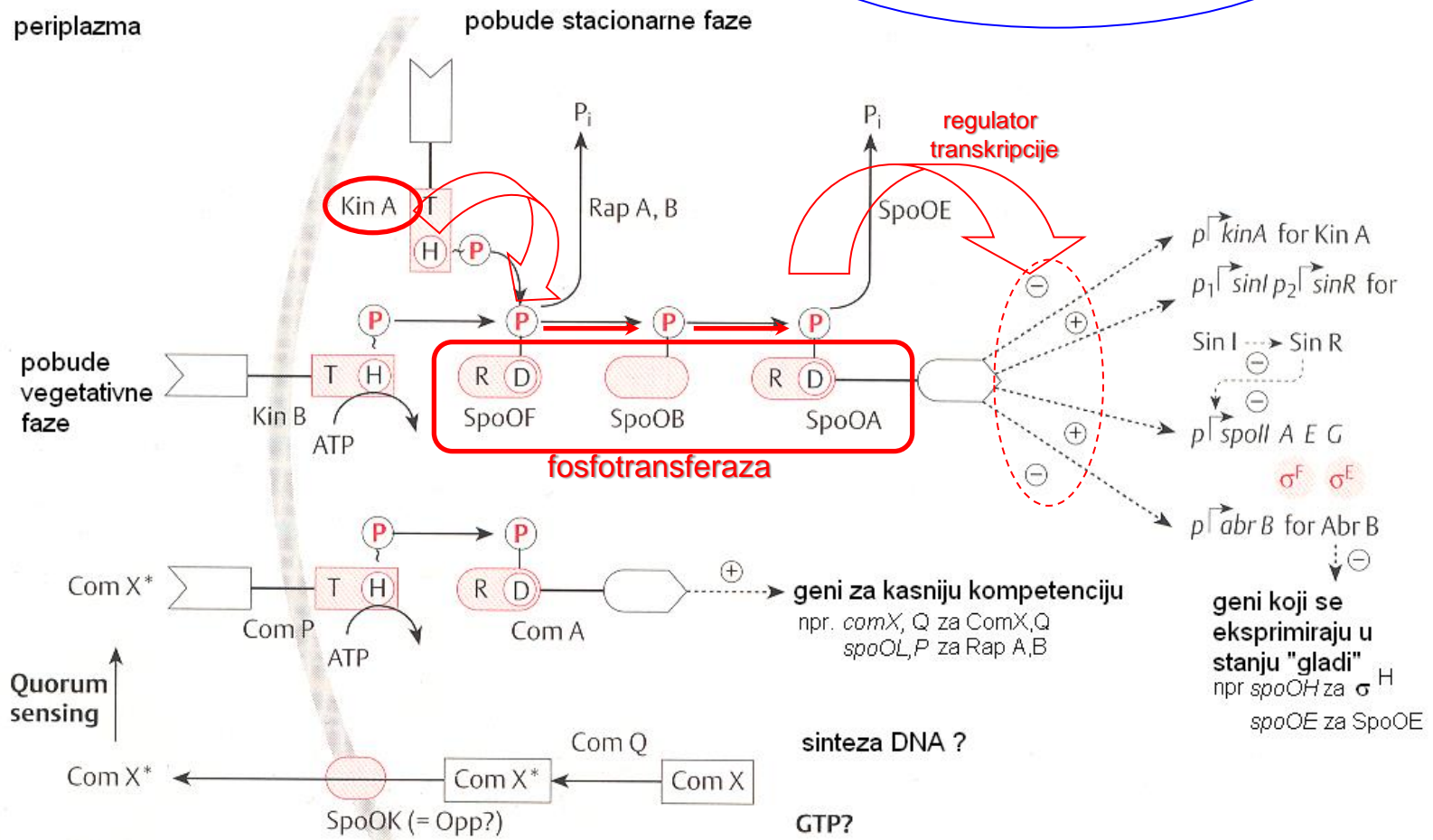
1. iscrpljivanje supstrata ("glad")
2. gustoća stanica
3. sinteza DNA



sporulacija: *Bacillus subtilis*

· shema SpoO i Com *phospho-relay* puta

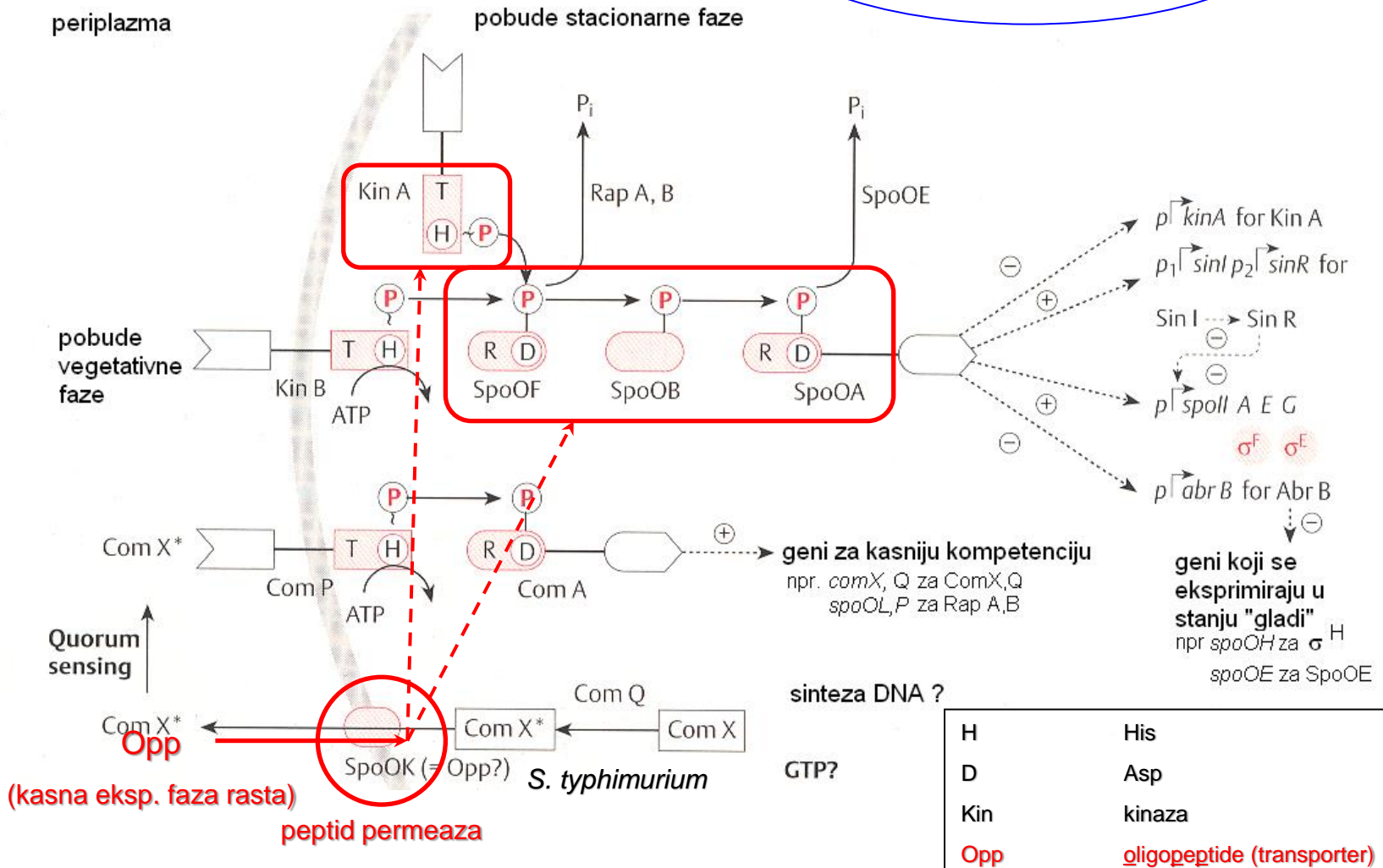
1. iscrpljivanje supstrata ("glad")
2. gustoća stanica
3. sinteza DNA



sporulacija: *Bacillus subtilis*

· shema SpoO i Com *phospho-relay* puta

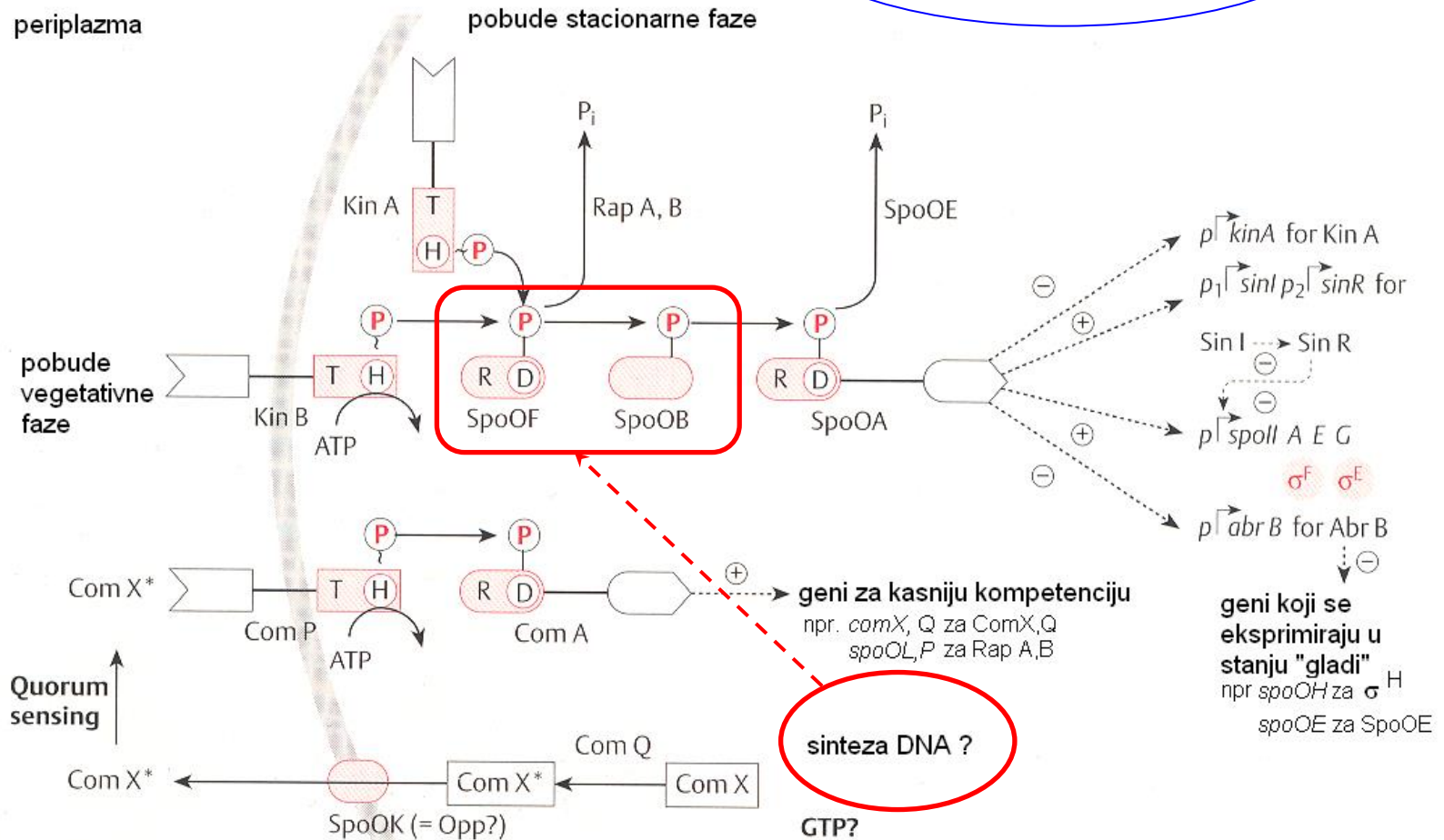
1. iscrpljivanje supstrata ("glad")
2. gustoća stanica
3. sinteza DNA



sporulacija: *Bacillus subtilis*

· shema SpoO i Com *phospho-relay* puta

1. iscrpljivanje supstrata ("glad")
2. gustoća stanica
3. sinteza DNA

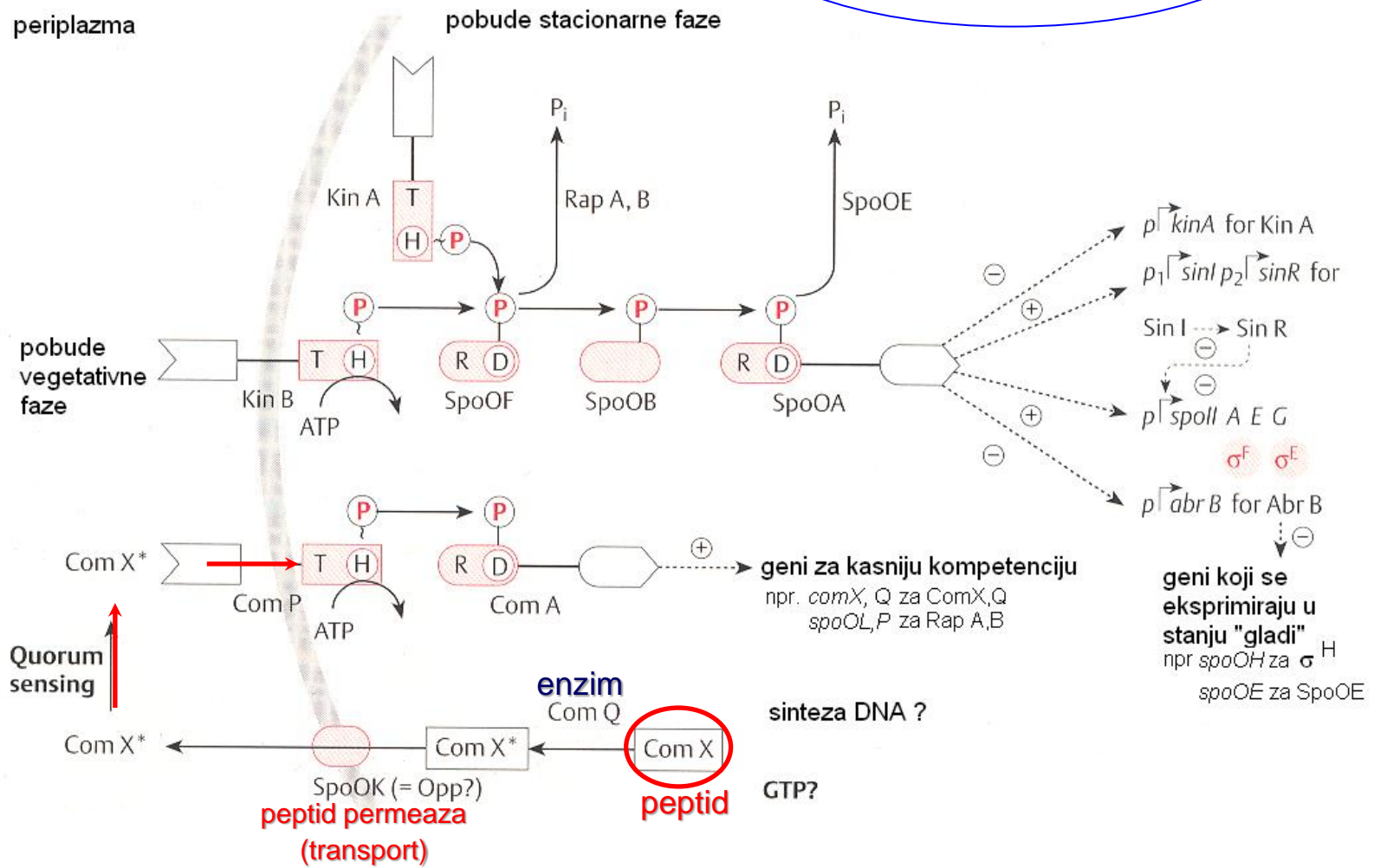


inhibicija sinteze DNA - stimulirana ekspresija gena za sporulaciju 115

sporulacija: *Bacillus subtilis*

· shema SpoO i Com *phospho-relay* puta

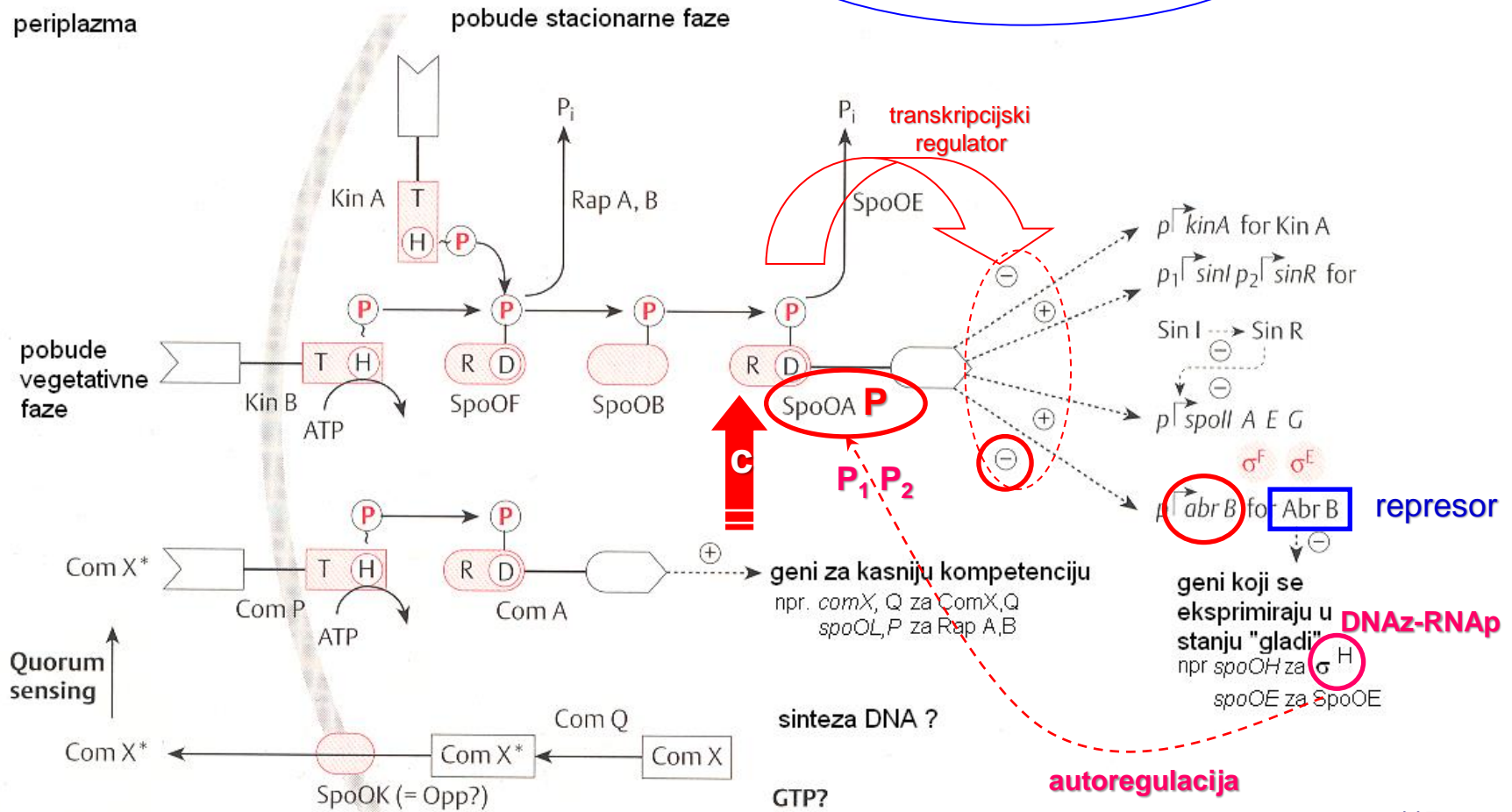
1. iscrpljivanje supstrata ("glad")
2. gustoća stanica
3. sinteza DNA



sporulacija: *Bacillus subtilis*

· shema SpoO i Com *phospho-relay* puta

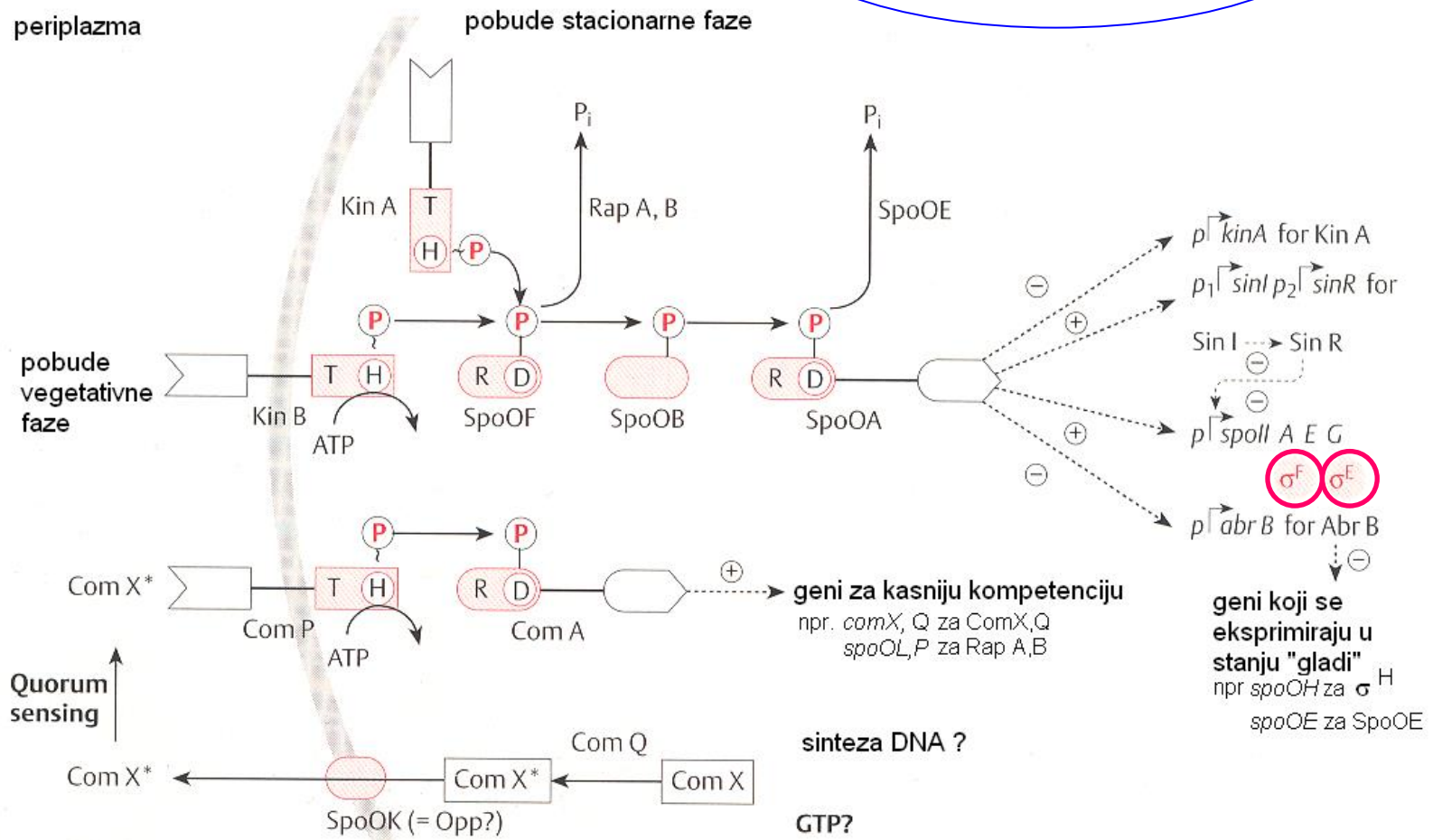
1. iscrpljivanje supstrata ("glad")
2. gustoća stanica
3. sinteza DNA



sporulacija: *Bacillus subtilis*

· shema SpoO i Com *phospho-relay* puta

1. iscrpljivanje supstrata ("glad")
2. gustoća stanica
3. sinteza DNA



sporulacija: *Bacillus subtilis*

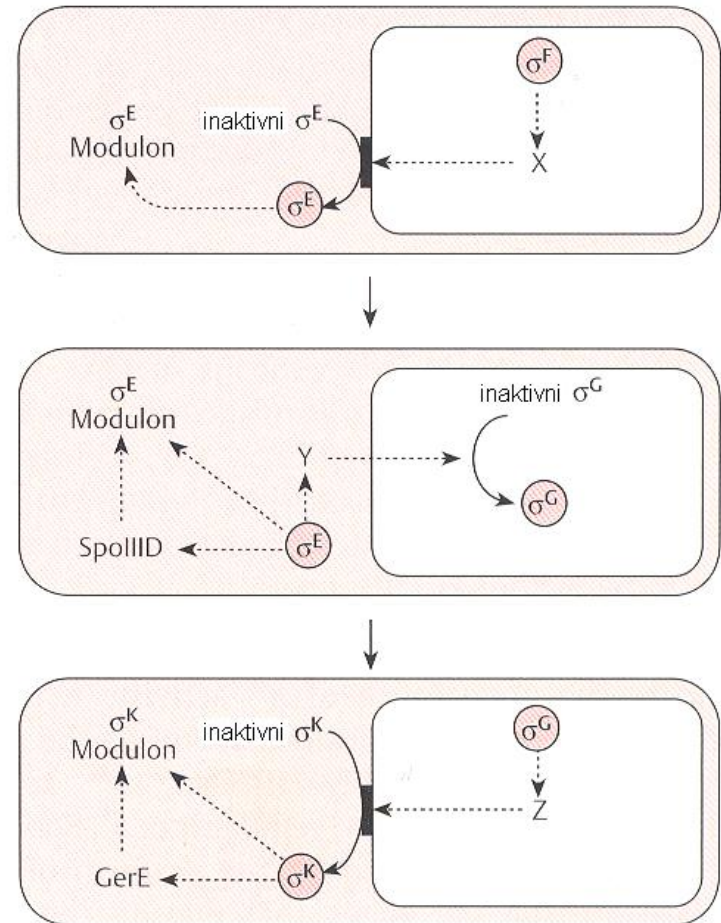
- σ proteini identificirani su isključivo tijekom sporulacije (stanica majka: σ^E i σ^K ; spora: σ^F i σ^G)
- za sintezu σ^K potrebna je “site-specific” rekombinacija DNA, a ovu reakciju katalizira specifična rekombinaza
- rekombinacijom nastaje gen koji kodira prekursor σ^K proteina koji posttranslacijskim modifikacijama postane aktivni σ^K

sporulacija: *Bacillus subtilis*

- σ^F aktivira σ^E i ova dva proteina su aktivna i to svaki u svom odjeljku do formiranja protoplasta spore (pri kraju faze III)
- σ^G provodi transkripciju gena za formiranje korteksa i gena za sazrijevanje spore
- σ^K sudjeluje u formiranju korteksa i omotača spore, kao i u sintezi proteina/enzima koji kataliziraju autolizu stanice i “oslobađanje” spore

sporulacija: *Bacillus subtilis*

- osnovne faze regulacije i prijenosa signala
- σ faktori koji funkcioniraju u stanici majci (σ^E i σ^K) i u prespori (σ^F i σ^G)
- hipotetski faktori X, Y i Z sudjeluju u komunikaciji među ova dva odjeljka stanice, a aktiviraju se u specifičnim fazama sporulacije
- sigma-specifični moduloni (σ^E i σ^K) i regulatori transkripcije SpoIIID i GerE se aktiviraju



sporulacija: *Bacillus subtilis*

- klijanje (germinacija) spore

nije do kraja istražen proces

faze:

aktivacija (nije neophodna, započinje na poticaj aktivatora)

klijanje (započinje na poticaj germinatora: L-Ala, različiti UH, ribonukleozidi, anorganski ioni)

- tijekom klijanja energija za biosintezu pribavlja se od 3-PGA
- sinteza RNA prvih 20 min odvija se iz postojećih ribonukleotida
- slijedećih 25-50 min sinteza RNA odvija se “na račun” ribonukleotida nastalih razgradnjom RNA
- aminokiseline za sintezu proteina nastaju razgradnjom postojećih proteina u spori
- sinteza DNA započinje pri kraju klijanja, koriste se nukleotidi nastali konverzijom ribonukleotida (RNA)
- metabolizam malih molekula započinje nakon oko 70 min kada je isključena spora „spremna” za rast i razmnožavanje

literatura

1. Grupa autora: *Biology of the procaryotes*, J.W. Lengeler, G. Drews, H.G. Schlegel (eds.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany (1999).
2. J.C. March, W.E. Bentley (2004) Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology* **15**, 495-502.
3. J. Marles-Wright, R.J. Lewis (2007) Stress responses of bacteria, *Current Opinion in Structural Biology* **17**, 755-760.

BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

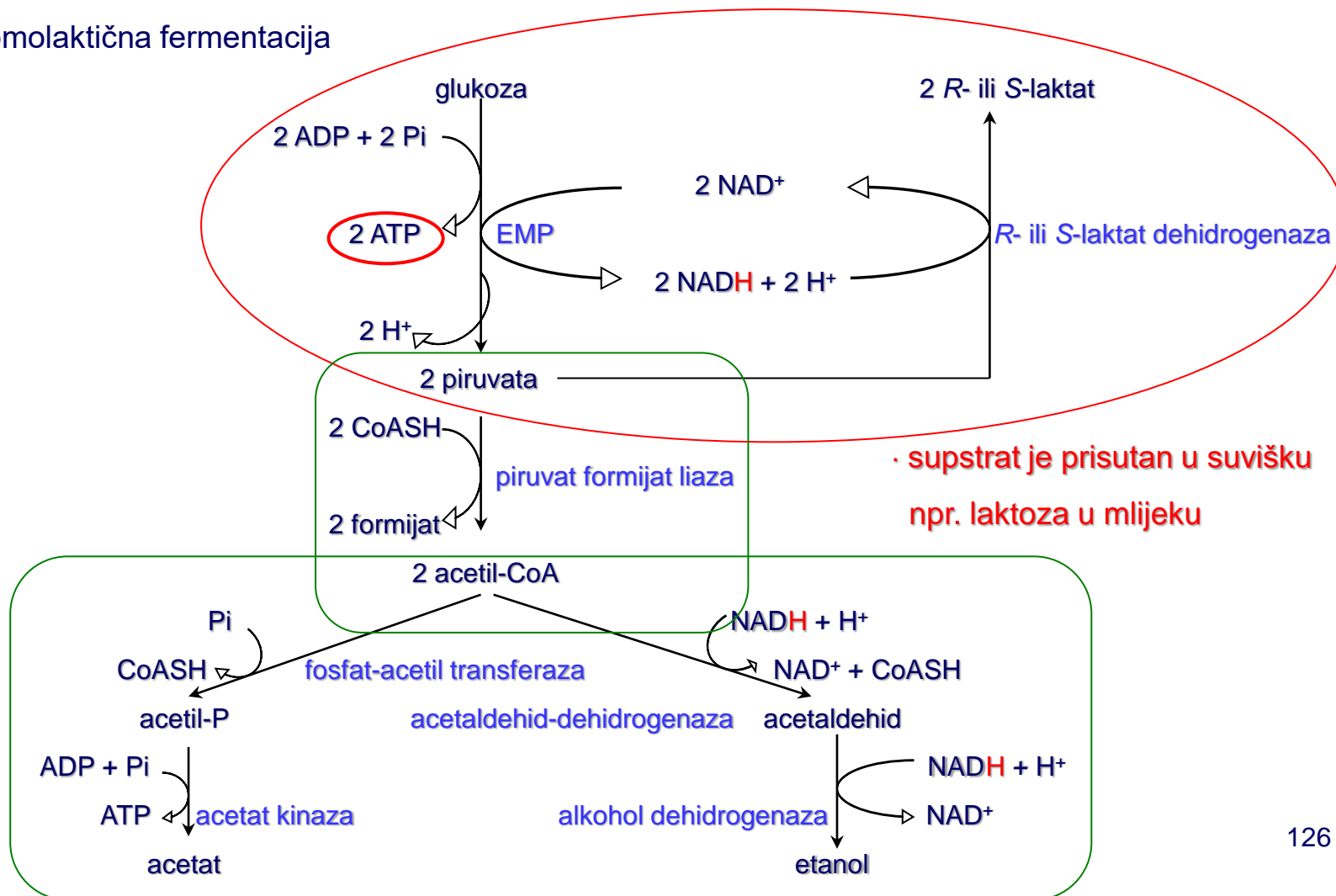
bakterije mliječne kiseline

- fermentacijski procesi podrazumijevaju anaerobne redoks reakcije u kojima se supstratnom fosforilacijom pridobiva ATP
 - supstratna fosforilacija povezana je s oksidacijom supstrata
 - tijekom oksidacije supstrata transport elektrona nije povezan s pridobivanjem energije
 - donori i akceptori elektrona su npr. UH, organske kiseline, aminokiseline, heterocikli
-
- metabolizam ugljikohidrata
 - homolaktična fermentacija
 - heterolaktična fermentacija
 - fosfoketolazni put
 - metabolizam ugljikohidrata kod *Bifidobacterium bifidum*

bakterije mliječne kiseline

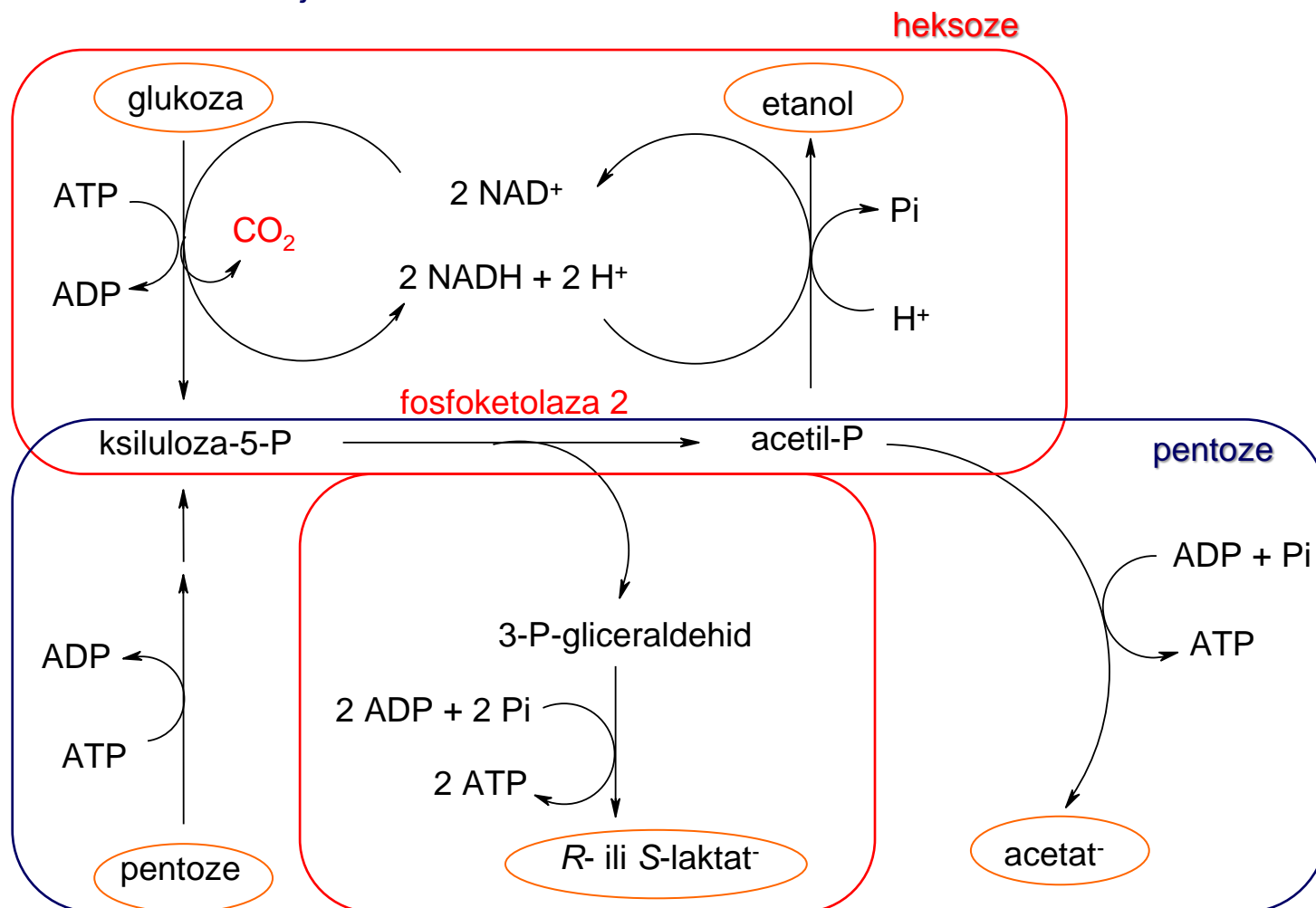
· bilanca: $\text{glukoza} \rightarrow 2 \text{ laktata} + 2 \text{ H}^+$

· homolaktična fermentacija

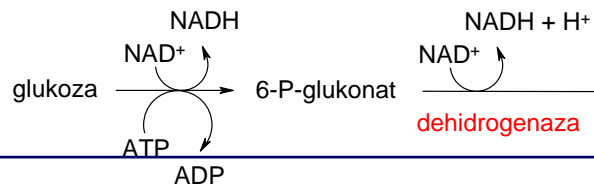


bakterije mliječne kiseline

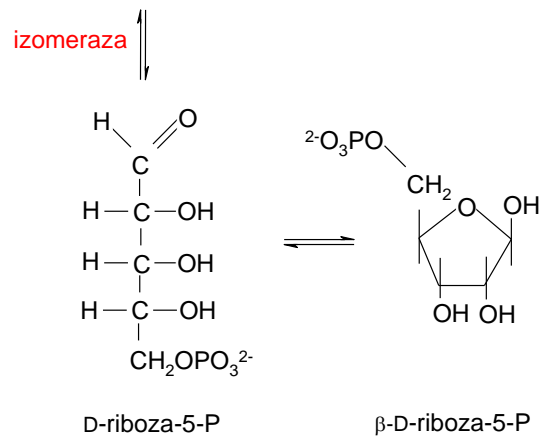
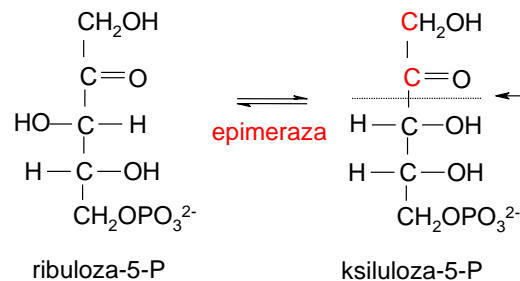
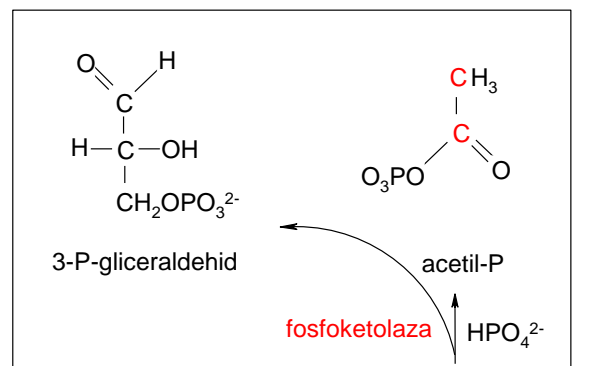
· heterolaktična fermentacija



bakterije mliječne kiseline

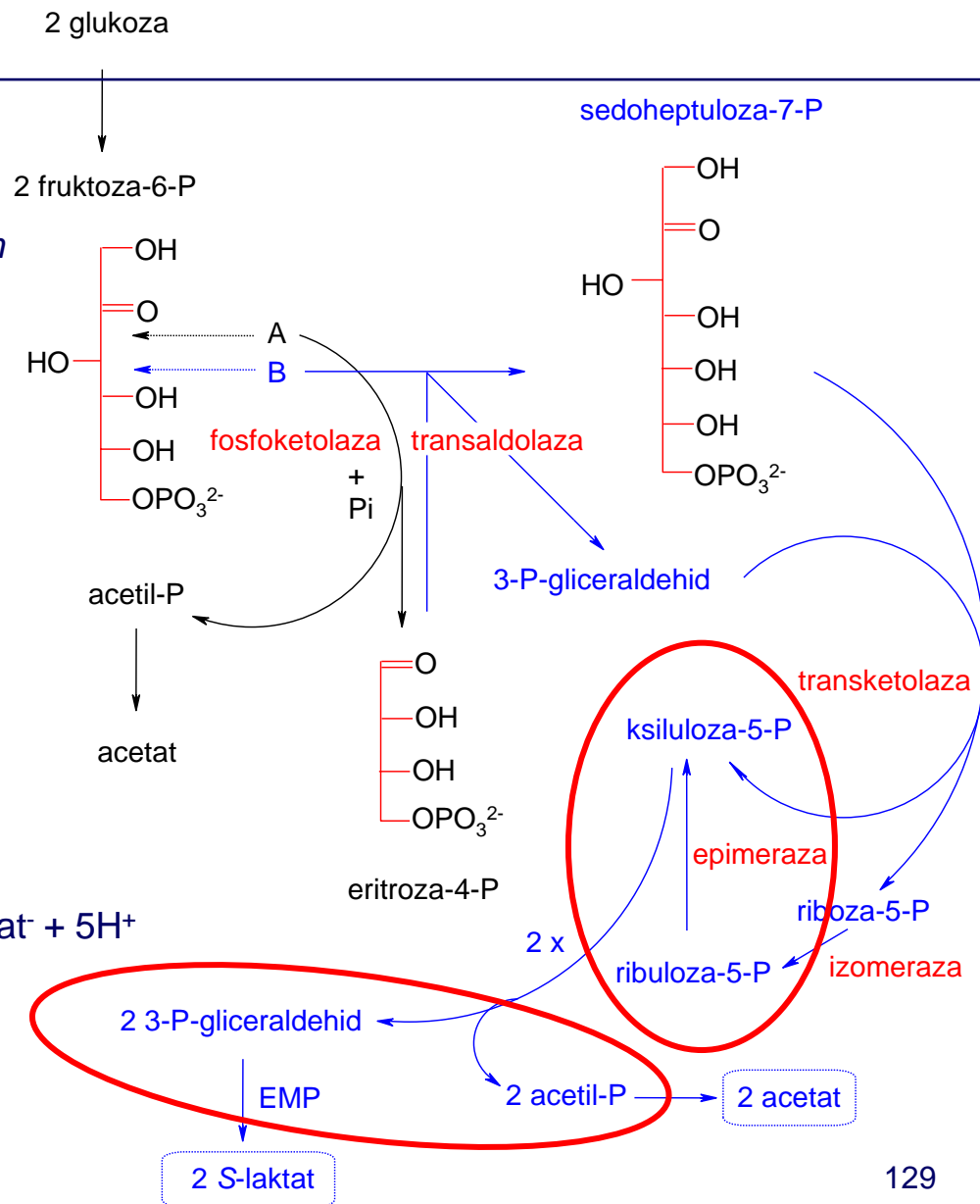


· fosfoketolazna fermentacija



bakterije mliječne kiseline

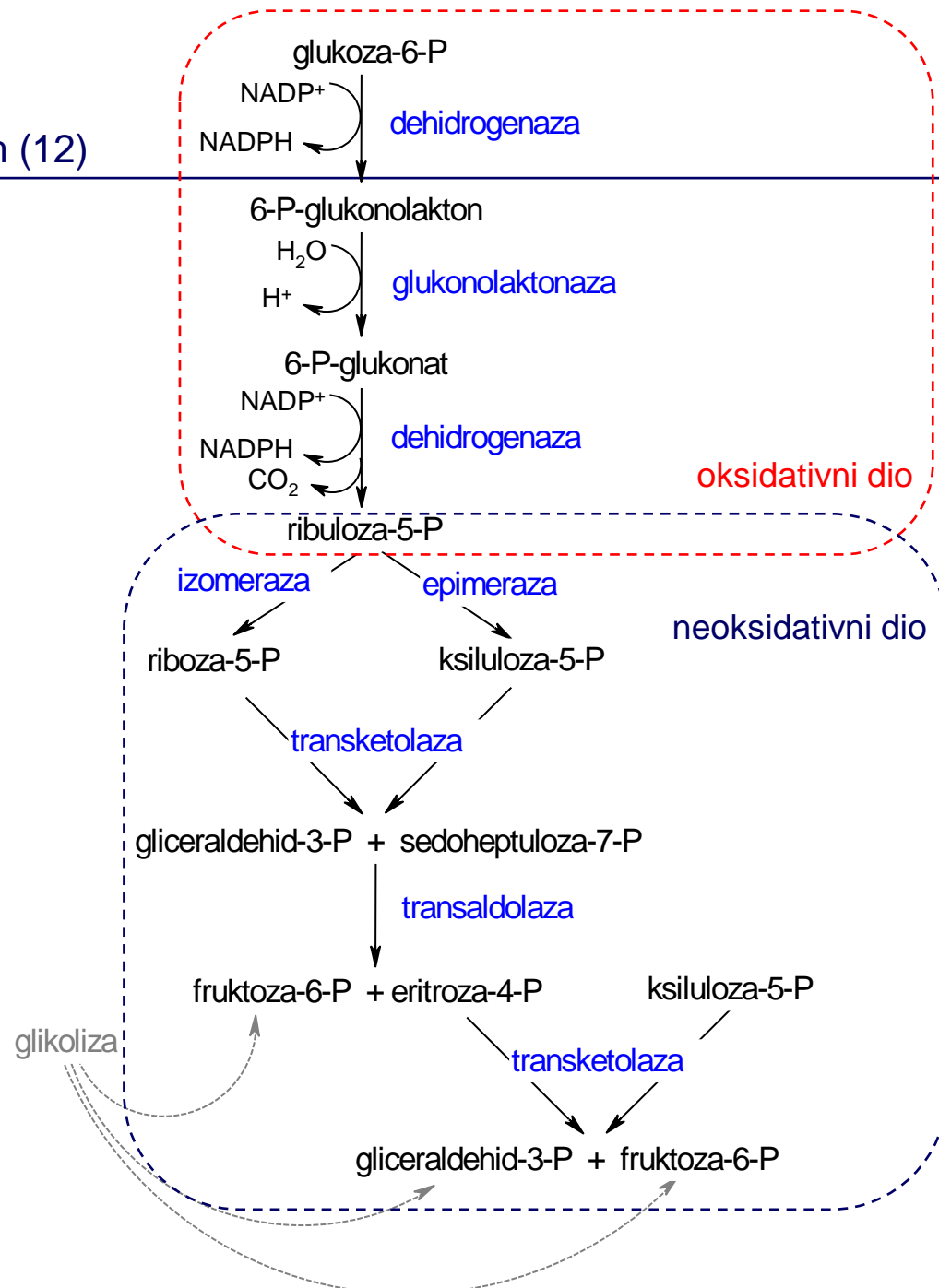
· fermentacija kod *Bifidobacterium bifidum*



bilanca: 2 glukoza → 2 laktat + 3 acetat + 5H⁺

metabolizam - katabolizam (12)

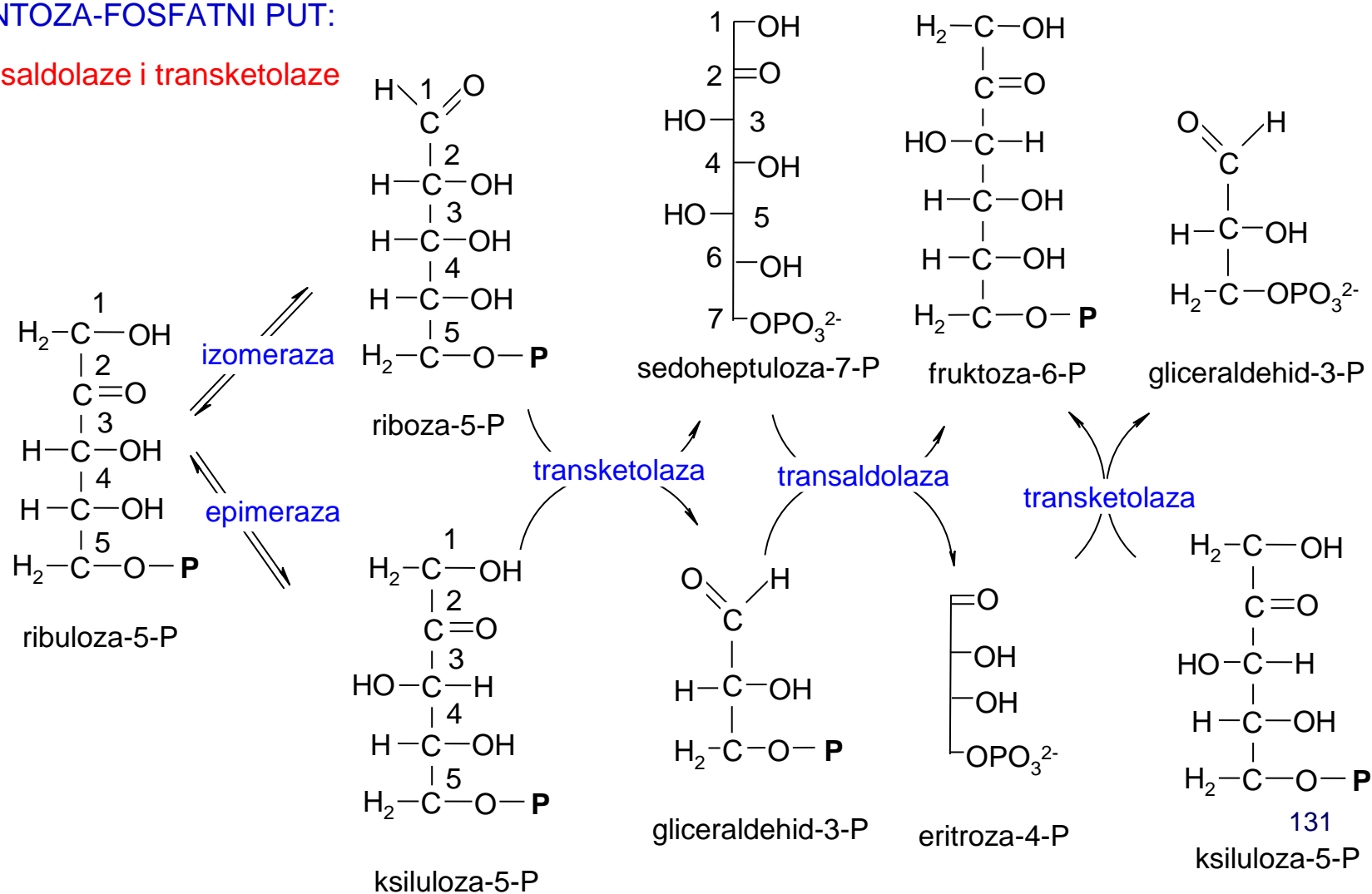
- metabolizam ugljikohidrata
- PENTOZA-FOSFATNI PUT
(heksoza-monofosfatni, HMP;
Warburg-Horeckerov put)



metabolizam - katabolizam (12b)

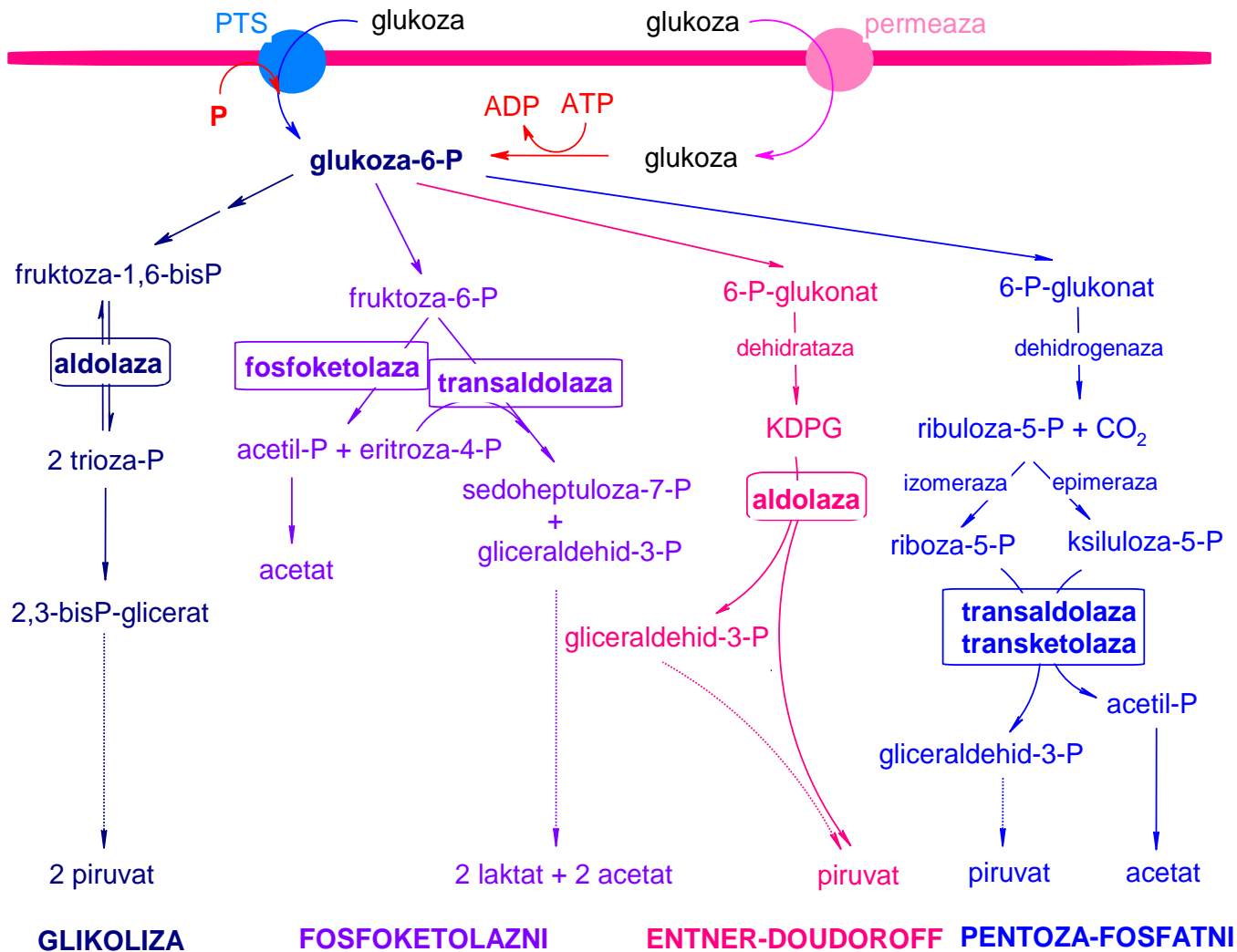
PENTOZA-FOSFATNI PUT:

transaldolaze i transketolaze



metabolizam - katabolizam (13)

- metabolizam ugljikohidrata
- pregled najčešćih metaboličkih puteva pregradnje glukoze



metabolizam - katabolizam (10a)

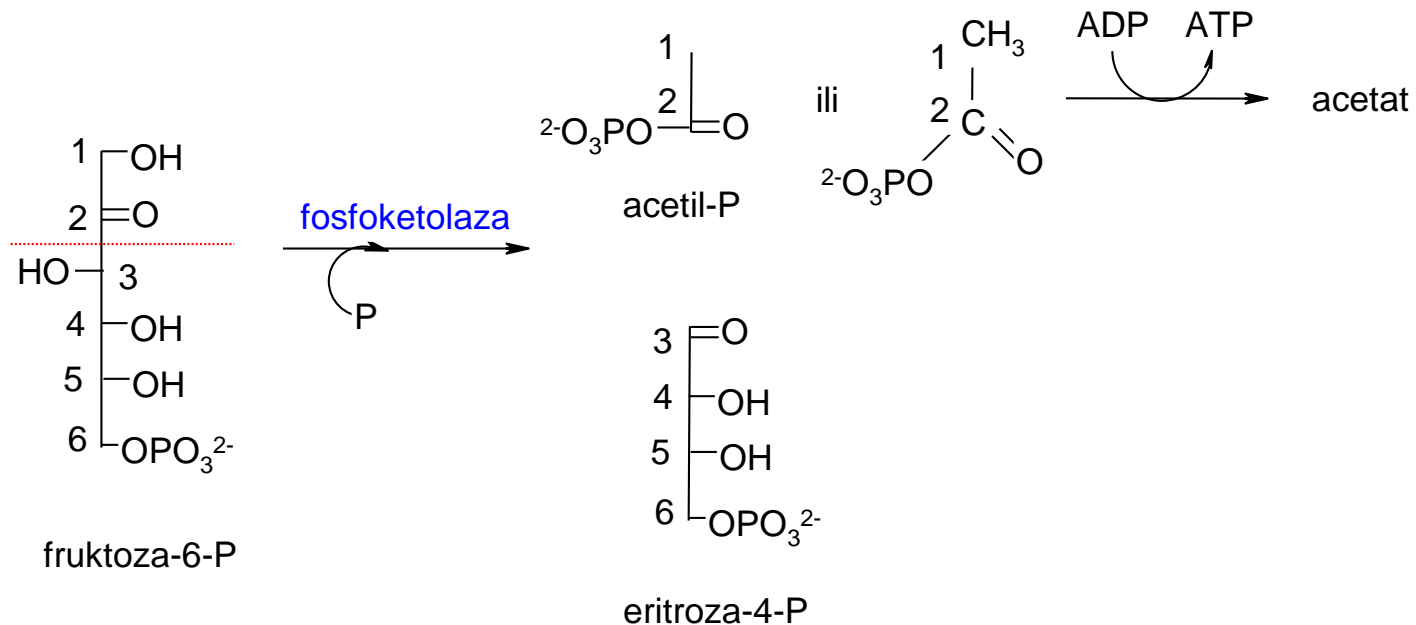
· metabolizam ugljikohidrata

· fosfoketolazni put kod bakterije

Bifidobacterium bifidum:

od heksoza fosfata (fruktoza-6-fosfat)

fosforolizom do (A) acetil-P i eritroza -4-P

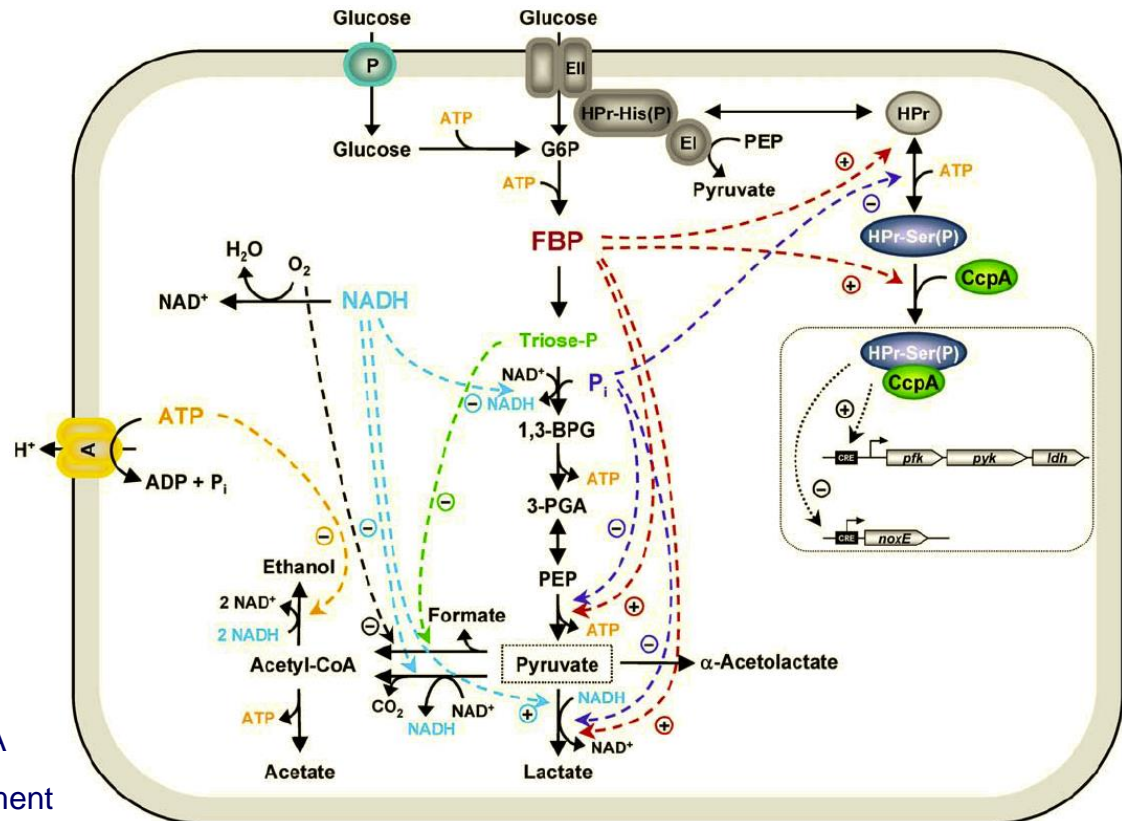


bakterije mliječne kiseline

- fermentacija laktoze kod roda *Streptococcus*
 - transport i fermentacija pomoću Lac-PTS;
 - razgradnja laktoza-6-P do glukoze i galaktoze-6-P;
 - katabolizam galaktoze-6-P putem tagatoza-6-P;
 - katabolizam glukoze EMP putem (fosforilacija glukoze ne provodi heksokinaza već membranska komponenta PTSa za manozu);
 - regulacija aktivnosti **piruvat kinaze** određuje da li se PEP troši za PTS ili za pridobivanje ATP;
 - piruvat kinazu aktivira **FBP**, a inaktivira **fosfat**;
 - pri optimalnoj brzini glikolize 50% PEP se troši za PTS, a 50% za stvaranje ATP; koncentracija FBP je maksimalna, a fosfata minimalna, što aktivira piruvat kinazu
 - kad nestane laktoze, nema ni energije, koncentracija FBP opada na minimum, a koncentracija fosfata raste do maksimuma, što inaktivira piruvat kinazu, zbog toga se nakupljaju PEP, 2-PGA i 3-PGA (tzv. PEP-potencijal);
 - na ovaj način stanica u “gladovanju” akumulira energijom bogate spojeve koji će pokrenuti glikolizu kada se UH ponovno nađe u okolini stanice.

bakterije mliječne kiseline

· regulacija piruvat kinaze: **FBP** i fosfat

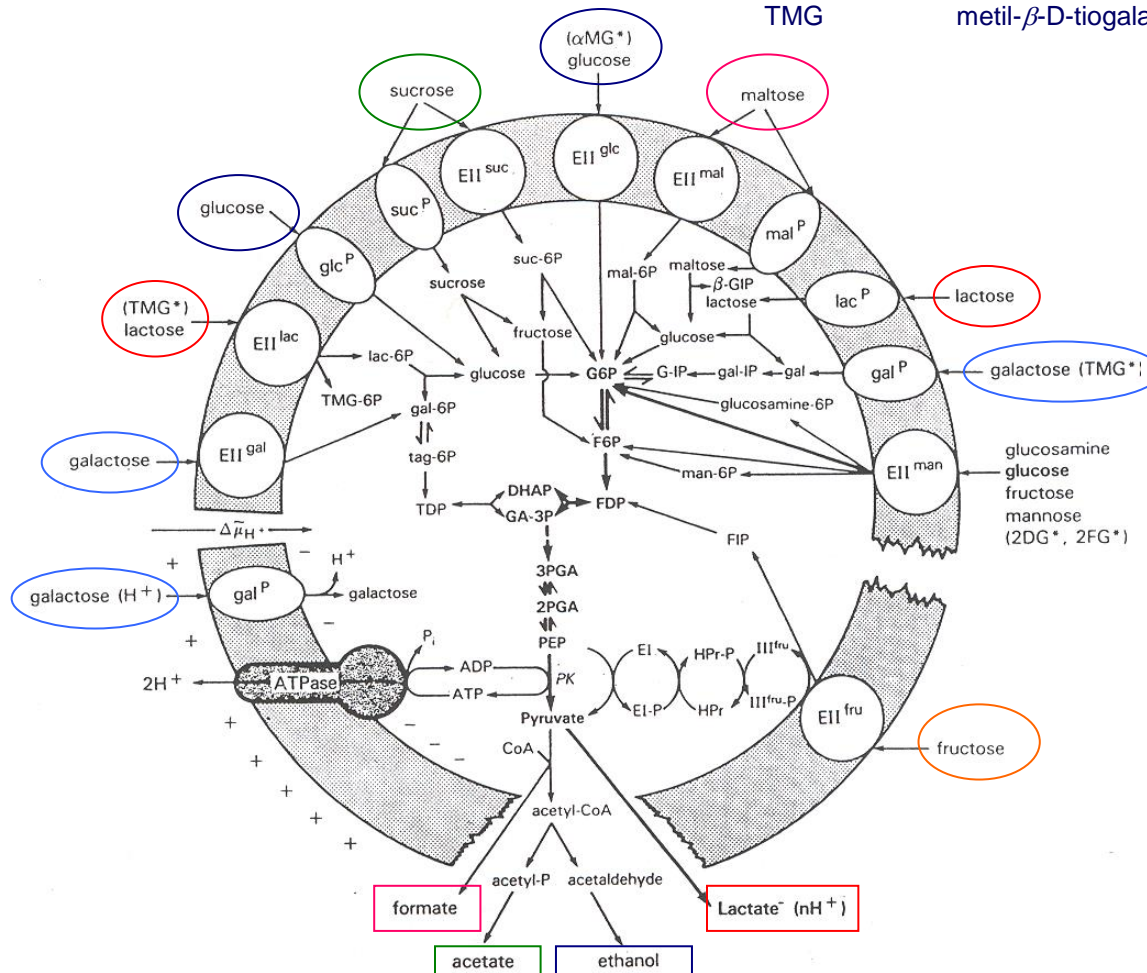


- P permeaza
- A ATP-aza
- CcpA catabolite control protein A
- cre catabolite responsive element
- noxE gen koji kodira H₂O-formirajuću NADH oksidazu

bakterije mliječne kiseline

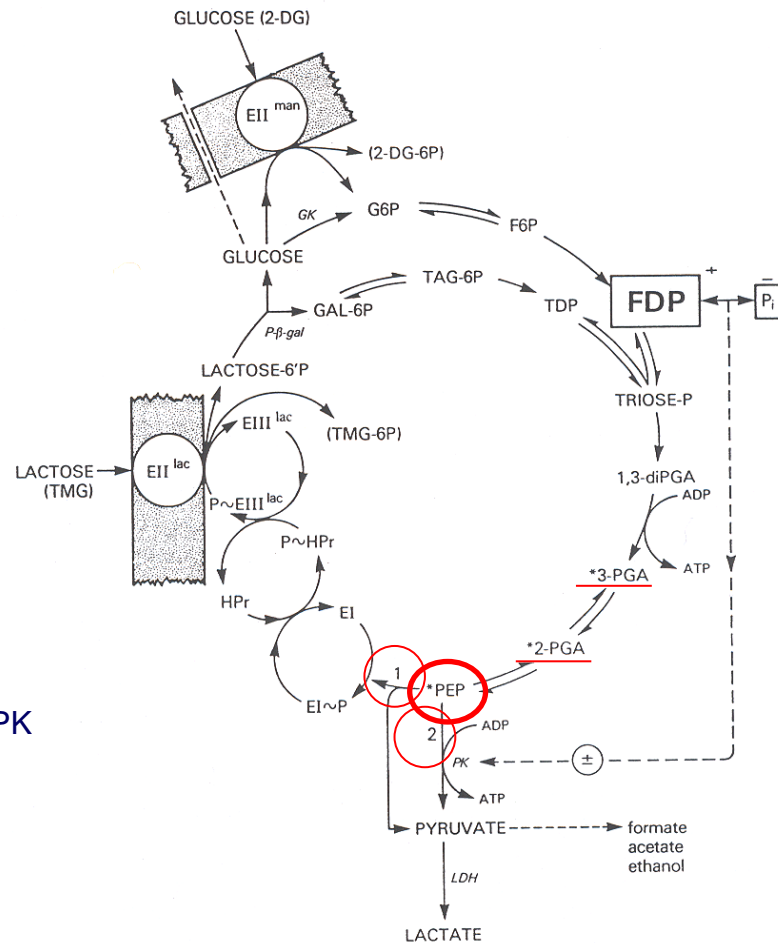
· transport i metabolizam UH kod BMK

- EII UH-specifičan PTS membranski protein
- P aktivni transport
- * analozi UH koji se ne mogu metabolizirati
- 2DG 2-deoksi-D-glukoza
- TMG metil-β-D-tiogalaktopiranozid



bakterije mliječne kiseline

- transport i metabolizam laktoze kod *S. lactis*

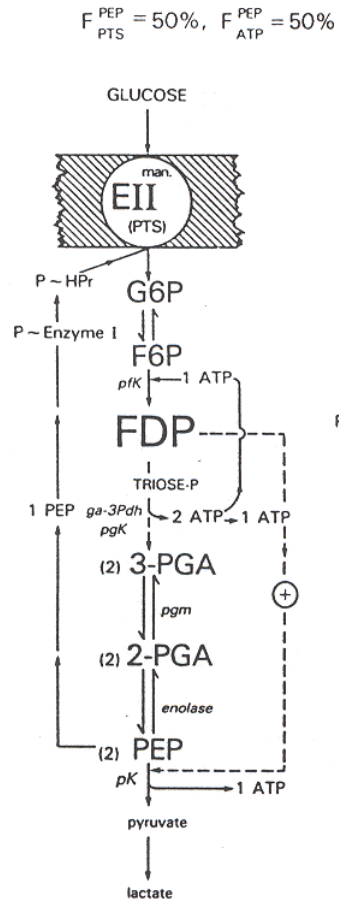


- 1 i 2 raspodjela PEP na lac-PTS i PK
- TMG metil- β -D-tiogalaktopiranozid

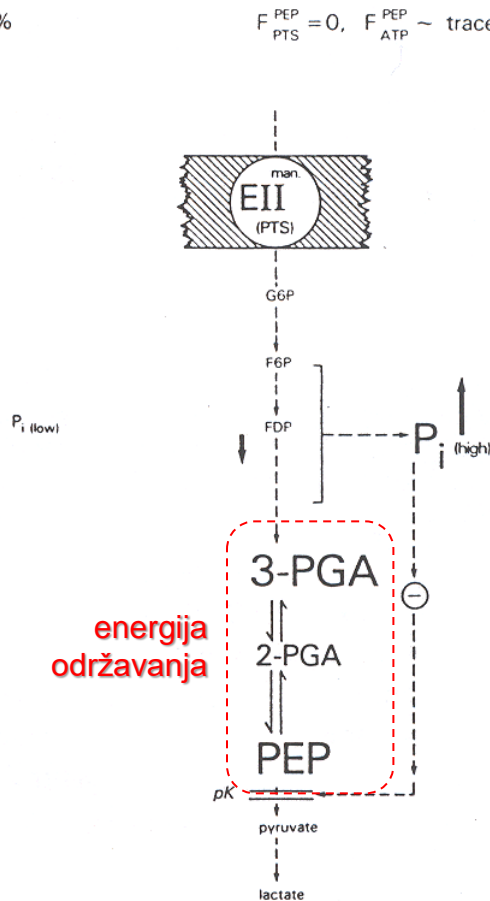
bakterije mliječne kiseline

· glikoliza: ustaljeno stanje, “gladovanje” i “re-start” kod *S. lactis*

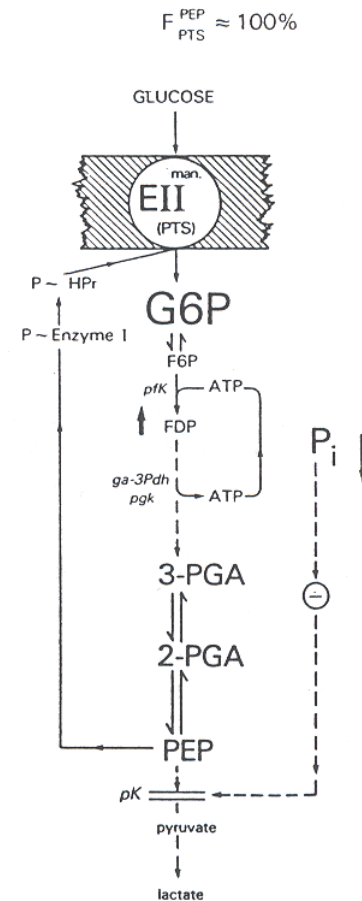
A. Steady-State Glycolysis



B. Starvation (“Shut-down”)



C. re-Start



bakterije mliječne kiseline

- metabolizam citrata

Leuconostoc mesenteroides

Leuconostoc oenos

Lactococcus lactis

- transport citrata u stanicu odvija se citrat-laktat antiportom (transportni protein CitP)
- citrat se cijepa djelovanjem **citrat liaze**

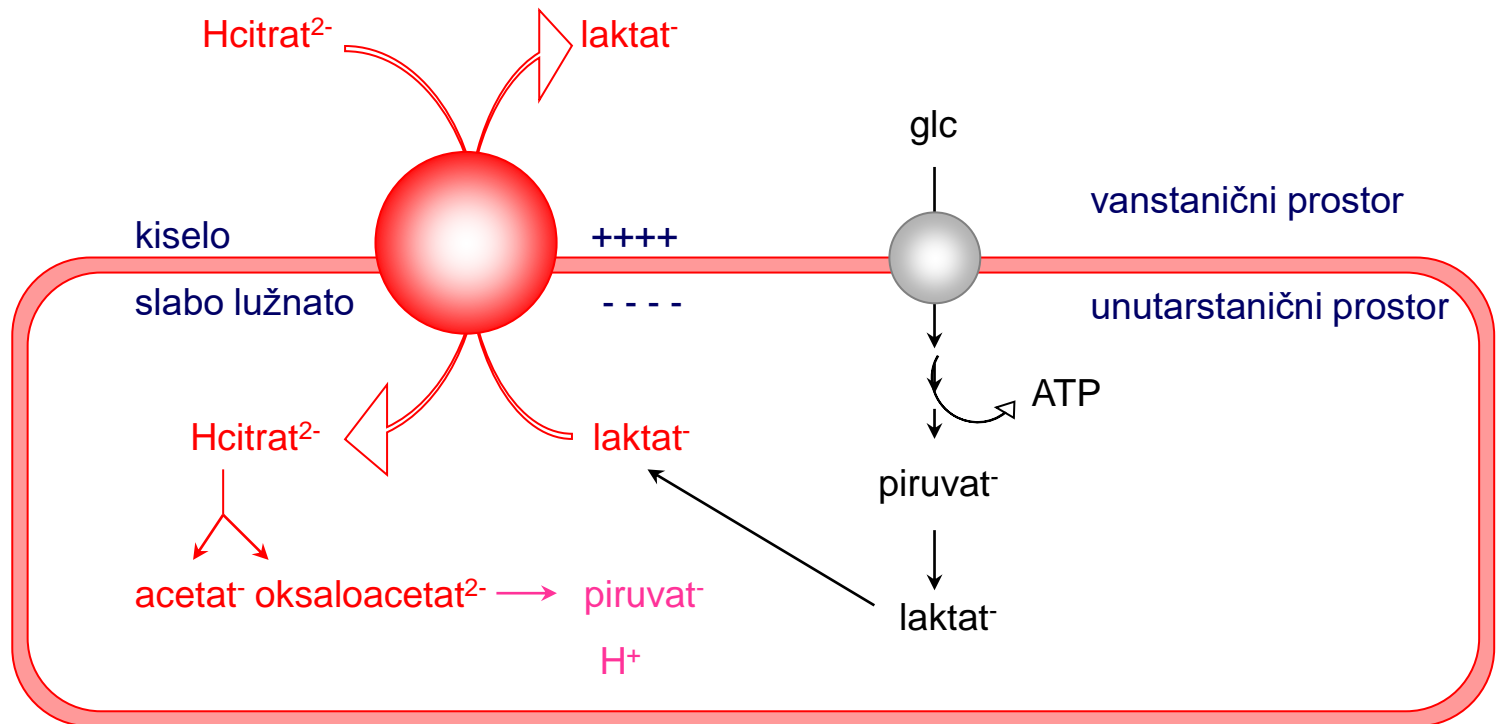


- oksalacetat se cijepa djelovanjem **oksalacetat dekarboksilaze**



bakterije mliječne kiseline

- metabolizam citrata (*L. lactis* CRL264)



bakterije mliječne kiseline

- metabolizam citrata: novija istraživanja
 - kiselinski stres pobuđuje aktivaciju CitP proteina;
 - tako se smanjuje toksično djelovanje unutarstaničnog laktata;
 - kada stanice BMK rastu na citratu i glukozi, laktat nastao fermentacijom glukoze izlazi iz stanice citrat-laktat antiportom;
 - kada stanice BMK rastu samo na citratu, CitP funkcionira kao citrat-proton simporter (jedan citrat + jedan proton);
 - pri tome nastaje slaba PMF i metabolizam citrata je usporen;
 - doda li se laktat u podlogu, laktat se transportira u stanicu pasivnom difuzijom i tada se aktivira citrat-laktat antiport i metabolizam citrata je znatno pojačan.