

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: **Biologie**

Studijní obor: **Molekulární biologie a biochemie organismů**



Aneta Valtová

Metabolická kontrola buněčného cyklu u bakterií

Metabolic control of the cell cycle in bacteria

Bakalářská práce

Školitel: **RNDr. Irena Lichá, CSc.**

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 24. 8. 2017

Podpis

Poděkování:

Děkuji paní doktorce Ireně Liché za věnovaný čas, odborný dohled a věcné připomínky, které byly stěžejní k dokončení mé bakalářské práce.

Abstrakt

Metabolická kontrola buněčného cyklu je u bakterií již dlouho studována, ale zdaleka není zcela objasněna. Mechanismy popsané již několik desetiletí se podařilo popsat detailněji a byla objevena nová propojení mezi základním metabolismem a samotným procesem dělení buněk. Regulace buněčného cyklu v závislosti na metabolismu a nutričních podmínkách probíhá na všech stupních cyklu. Nejvíce je prostudováno na úrovni vytváření bakteriálního divisomu. Nutriční deprivace vyvolávají stresové odpovědi, při kterých se uplatňují nízkomolekulární látky, které se účastní v signálních drahách, a které buněčný cyklus regulují. Jedna z nejvíce studovaných je molekula guanosin(penta)tetrafosfátu (p)ppGpp, která ovlivňuje buněčný cyklus na úrovni exprese genů, na úrovni proteinů zúčastněných v procesu vytváření divisomu, i na úrovni replikace. Současné výzkumy odhalily, že některé enzymy s již známou enzymatickou funkcí v hlavních metabolických drahách (glykolýzy či TCA), fungují i jako senzory, které přenášejí signál o nutriční změně přímo do dělicího aparátu buňky. Tyto enzymy nejčastěji regulují tvorbu Z prstence ovlivněním funkce proteinu FtsZ nebo jeho pomocných proteinů a byly nalezeny v grampozitivních (*Bacillus subtilis*) i gramnegativních bakteriích (*Escherichia coli*, *Caulobacter crescentus*). V neposlední řadě tato práce zmiňuje i nemodelové mikroorganismy, jejichž unikátní formy senzorů vychází z variability životního stylu bakterií.

Klíčová slova: Metabolická kontrola, buněčný cyklus, replikace, DnaG primáza, (p)ppGpp FtsZ, divisom, glykolýza

Abstract

Metabolic control of cell cycle has been studied for a long time in bacteria, but it is not still fully elucidated. The mechanisms described for several decades have been described in more detail and find new connections between basic metabolism and the cell division process itself. Cell cycle regulation, depending on metabolism and nutritional conditions, takes place over all steps of the cycle. The most mechanisms are studied at the level of bacterial division formation. Nutritional deprivation induces stress responses that use low-molecular substances which are involved in signaling pathways and which regulate the cell cycle. One of the most studying is the molecule of guanosine (penta)tetraphosphate (p)ppGpp, which affects cell cycle at the level of genes expression, at the level of proteins involved in the process of creating divisome, even at the level of replication. Recent research revealed that some

enzymes with their already known enzymatic function in major metabolic pathways (glycolysis and TCA), also have a function as sensors that transmit a signal about the nutritional change directly to the division apparatus of the cell. These enzymes regulate the formation of the Z ring through the protein FtsZ or its auxiliary proteins most often and have been found in Gram-positive (*Bacillus subtilis*) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Caulobacter crescentus*). Last but not least, this work also describe non-model microorganisms whose unique forms of sensors are based on the variability of bacterial lifestyle.

Keywords: Metabolic control, cell cycle, replication, DnaG primase, (p)ppGpp, FtsZ, divisome, glycolysis

Seznam zkratek

6PG – 6-fosfoglukonát
ATP – adenosintrifosfát
ADP - adenosindifosfát
dsDNA- dvouvláknová DNA, z angl.: „double strand DNA“
ssDNA – jednovláknová DNA, z angl.: „single strand DNA“
G⁺ - grampozitivní
G⁻ - gramnegativní
Ga5DH – glukonátdehydrogenáza
GalU – alphagalktosidáza
GdhZ - glutamátdehydrogenáza
Glc-1-P – glukóza-1-fosfát
Glc-6-P – glukóza-6-fosfát
GtaB - glukóza-1-fosfáturidilyltransferáza
GDP - guanosindifosfát
GTP – guanosintrifosfát
KidO – oxidoreduktáza
mRNA – z angl.: „messenger RNA“
NAD(H) – nikotinamidadenindinukleotid
NBS – Noc vazebná sekvence, z angl.: „Noc binding sequences“
NO – angl.: „nucleoid occlusion“
OatA – O-acetyltransferáza
oriC – počátek replikace, z angl. „origin“
PDH - pyruvátdehydrogenáza
PDHE1 α – α podjednotka pyruvátdehydrogenázy
PgcA, Pgm– fosfoglukomutáza
PlsX – fosfátacyltransferáza
Pyk - pyruvátkináza
(p)ppGpp – guanosin(penta)tetrafosfát
RNAP – RNA polymeráza
RPD – RNA polymerázová doména
SBS – SlmA vazebná sekvence, z angl.: „SlmA binding sequences“
terC – místo ukončení replikace, z angl.: „termination“
TCA – cyklus trikarboxylových kyselin, z angl.: „Tricarboxylic acid cycle“
tRNA – transferová RNA
Rtp – protein pro ukončení replikace, z angl.: „replication terminator protein“
rRNA – ribozomální RNA
UDP-Glc – uridin-5'-difosfoglukóza
UgtP – UDP-glukuronylfosfáttransferáza

1. ÚVOD	1
2. DĚLENÍ BUNĚK.....	2
2.1. ZDVOJENÍ GENETICKÉHO MATERIÁLU A INICIACE REPLIKACE	2
2.2. SEGREGACE CHROMOSOMŮ	3
2.3. ROZDĚLENÍ BUŇKY – VYTVOŘENÍ DIVISOMU	4
3. REGULAČNÍ MECHANISMY NUTRIČNÍHO STRESU NEPŘÍMO OVLIVŇUJÍCÍ BUNĚČNÉ DĚLENÍ	6
3.1. STRINGENTNÍ ODPOVĚĎ A FUNKCE (P)PPGPP V DĚLENÍ BAKTERIÁLNÍ BUŇKY	6
3.2. NUKLEOTID PPGPP A REGULACE TRANSKRIPCE.....	7
3.3. NUKLEOTID PPGPP A REGULACE TRANSLACE.....	8
3.4. NUKLEOTID (P)PPGPP A REGULACE ELONGACE REPLIKACE	9
4. PŘÍMÉ METABOLICKÉ SENZORY UPLATŇUJÍCÍ SE V REGULACI BUNĚČNÉHO CYKLU	10
4.1. PŘÍMÉ METABOLICKÉ SENZORY U BACILLUS SUBTILIS	10
4.1.1. Pyruvát a jeho role v buněčném dělení.....	10
4.1.2. Protein UgtP – regulátor formace dělicího septa.....	11
4.1.3. Protein PlsX a jeho funkce v regulaci buněčného dělení.....	13
4.2. PŘÍMÉ METABOLICKÉ SENZORY U ESCHERICHIA COLI.....	14
4.2.1. Protein OpgH – homolog proteinu UgtP	14
4.2.2. Protein Sula – inhibitor bakteriálního divisomu.....	15
4.3. METABOLICKÉ SENZORY U DALŠÍCH NEMODELOVÝCH TYPŮ BAKTERIÍ	15
4.3.1. Protein Ga5DH u Streptococcus suis.....	16
4.3.2. Protein OatA a tvorba septa u Lactobacillus plantarum.....	16
5. CAULOBACTER CRESCENTUS – VÝZNAMNÝ MODEL PRO STUDIUM BUNĚČNÉHO CYKLU	16
5.1. REGULACE INICIACE REPLIKACE PŘI HLADOVĚNÍ.....	17
5.2. PROTEINY KIDO A GDHŽ – REGULACE TVORBY Z PRSTENCE	18
6. ZÁVĚR.....	20
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	22

1. Úvod

Bakterie ve svém přirozeném prostředí žijí v nutričně proměnlivém prostředí, na rozdíl od laboratorních podmínek, kde jsou jim dopřány víceméně neměnné podmínky a dostatek živin. Regulace buněčného cyklu je jedním z mechanismů, které napomáhají bakteriím přežít, vyrovnat se stresovými podmínkami a uspět v kompetici o živiny. Prvotní poznatky o spojení metabolismu a buněčného cyklu definovaly geny iniciující a regulující buněčný cyklus. Nové studie ukázaly, že spojení mezi centrálním metabolismem a buněčným cyklem může být i přímé. Toto propojení je zajišťováno enzymy, participujícími na stěžejních metabolických drahách, převážně na glykolýze, a to buď enzymy přímo z glykolýzy nebo enzymy z drah s glykolýzou spojených (Weart et al. 2007). Proteiny, jež bude popisovat tato práce, jsou u zmiňovaných organismů diversifikované, protože jsou příkladem konvergentní evoluce, kdy se přímá metabolická kontrola vyvinula u všech bakterií, liší se však u různých taxonů svými mechanismy. Ty jsou podmíněné selekčními tlaky prostředí.

Práce se zmiňuje o modelovém mikroorganismu pro gramnegativní bakterie, je jím půdní, aerobní bakterie *Bacillus subtilis* a o modelovém mikroorganismu pro grampozitivní bakterie, kterým je fakultativně anaerobní bakterie *Escherichia coli*. Dále práce zmiňuje i nemodelové mikroorganismy, u kterých byl vytvořený podobný mechanismus přímé metabolické kontroly jako u mikroorganismů modelových.

V neposlední řadě je zmiňován aerobní, oligotrofní heterotrof *Caulobacter crescentus*, který se stal velmi plodným mikroorganismem pro studium buněčného cyklu, a u kterého je přímá metabolická kontrola popsána detailně.

Cílem práce je popsat nejnovější poznatky o propojení mezi buněčným cyklem a metabolismem bakterií. Práce se snaží chronologicky uvést všechny důležité kroky buněčného dělení a představit mechanismy, které o změnách nutričního stavu předávají informaci k jednotlivým krokům buněčného dělení. Jsou zde uvedeny mechanismy nepřímého ovlivnění signálními molekulami, které vznikají při nutričním stresu. Dále jsou popsány proteiny metabolických drah, které při nutričních změnách interagují přímo s bakteriálním divisoem. Vzhledem k rozsáhlosti tématu, se práce věnuje třem modelovým mikroorganismům; *E.coli*, *B.subtilis*, *C.crescentus* a v několika případech ukazuje odlišnosti u jiných druhů bakterií.

2. Dělení buněk

Samotnému zdvojení buňky předchází tři hlavní kroky; růst buňky, při kterém dochází ke zdvojení genetické informace, dále segregace chromosomů a samotné rozdělení buňky. Všechny tři kroky jsou metabolicky ovlivňovány a úzce spjaty. Dostupné živiny ovlivňují i rychlost růstu, čím jich má buňka k dispozici více, tím je růst rychlejší a buňka se rychleji zvětšuje. Po správném ukončení prvních dvou kroků může buňka přestoupit k samotnému rozdělení.

V následujících kapitolách jsou shrnuty tyto tři kroky při dělení buňky, aby mohlo být dále vysvětleno provázání regulace buněčného cyklu s dostupností živin.

2.1. Zdvojení genetického materiálu a iniciace replikace

Genetická informace je u bakterií uložena v podobě svinutého nukleoidu, který není nijak oddělen od cytoplazmy. Buňka zahájí replikaci nasednutím iniciátorového proteinu DnaA do místa replikačního počátku, *oriC*. Odtud probíhá zdvojení cirkulární molekuly DNA v obou směrech tak, že po nasednutí DnaA se vytvoří dvě replikační vidličky, které se pohybují opačnými směry od sebe a vytvoří tak dvě totožné cirkulární molekuly DNA. Pokud replikace proběhne, je ukončena v terminačním místě *terC*, které se nachází na opačném konci chromosomu než *oriC*. Toto zdvojení je regulováno tak, aby proběhlo pouze jednou za buněčný cyklus, čehož je dosaženo metylací GATC sekvence enzymem DAM metyltransferázou. Nově vznikající hemimetylované vlákno je rozpoznáváno proteinem SeqA a ten brání nasednutí další molekuly proteinu DnaA na *oriC* a spuštění dalšího cyklu replikace.

Nejdůležitější kontrola koordinace růstu a replikace probíhá v iniciační fázi replikace. Je za ní primárně zodpovědný iniciační protein DnaA, jehož hladina stoupá společně s růstem objemu buňky (Atlung et al. 1987). Aktivace DnaA probíhá vytvořením vazby s ATP, jen v této formě může DnaA nasednout do *oriC* a zahájit tak replikaci. Je zřejmé, že pouze buňka mající dostatek živin roste a jen taková buňka má i dostatek volného ATP pro zahájení replikace. Čím více ATP v buňce je, tím je frekvence iniciace replikace vyšší (Sekimizu et al. 1987).

Iniciátorový protein DnaA řídí načasování i frekvenci replikace. U bakterií se vyskytuje jev zvaný „multifork replication“, kdy se v rychle rostoucích buňkách vytvoří další replikační vidlička ještě před rozdělením buňky a na cirkulární molekule probíhají dva překryvné replikační cykly (Quinn, Sueoka 1970).

Je jen málo známo, jak koreluje hladina a aktivita samotného DnaA se změnami v nutričním stavu buňky. U mikroorganismu *Bacillus subtilis* studie prokázala, že změny v hladině DnaA dostatečně nekorelují s nutričním stavem buňky (Murray, Heath, Koh 2014). Jasně prokázaná spojitost mezi aktivitou DnaA a nutričním stavem je jen u bakterie *Caulobacter crescentus* (viz kapitola 5.1.).

Za správný průběh iniciace replikace jsou zodpovědné primárně další tři proteiny; DnaE polymeráza katalyzující polymeraci DNA řetězce, DnaC helikáza rozplétající dsDNA na dvě ssDNA a DnaG primáza katalyzující syntézu primeru. U mikroorganismu *E.coli* bylo také prokázáno, že je zahájení replikace regulováno inhibicí enzymatické aktivity DnaG primázy přímou vazbou (p)ppGpp na DnaG primázu (Maciag et al. 2010; Rymer et al. 2012).

2.2. Segregace chromosomů

Po správném zdvojení genetické informace a před samotným rozdělením buňky je důležité, aby se rovnoměrně rozdělil genetický materiál do dvou vznikajících dceřiných buněk. Chromosomy, jako nositelé genetického materiálu, se rozchází k pólům buňky a uvolňují tak její prostřední část pro tvorbu budoucího septa a Z prstence (viz kapitola 2.3.). Názorů na mechanismus segregace chromosomů je více, protože výzkum v této oblasti stále probíhá. Nejvíce zkoumaným mikroorganismem pro studium segregace chromosomů se stal *Bacillus subtilis*.

Nejstarší modely předpokládaly, že část chromosomu oriC je nějakým neznámým mechanismem kotvena v cytoplazmatické membráně a chromosomy se tedy segregují společně s růstem buňky (Jacob et al. 1963).

Velmi citované jsou práce popisující model, ve kterém replisom (dělicí aparát) při iniciaci replikace zaujme stacionární pozici uprostřed buňky a funguje zde jako jakýsi motor. Výsledky indikují, že helikáza (protein, který je součástí replisomu) zde figuruje jako cívka, která při replikaci navíjí DNA a následně je nová DNA sunuta k opačným pólům buňky. Experiment byl prováděn za použití fluoroscenční mikroskopie, kdy byla sledována DNA polymeráza odpovědná za polymeraci DNA řetězce (Lemon, Grossman 1998; Lemon, Grossman 2000).

Jiný model dává do souvislosti segregaci chromosomů a jev zvaný transerce, což je spojení transkripce, translace a vkládání proteinů do membrány. Bakterie nemají prostorově ani časově oddělenou transkripci s translací, jak je tomu u eukaryot, proto některé oblasti chromosomů mohou být spojeny s membránou. Podstata děje spočívá v tom, že transerční

komplexy, které jsou tvořené RNA polymerázou, mRNA, ribozomem a translokonem, přibývají ve středu buňky a svým narůstáním tlačí DNA k opačným pólům buňky (Woldringh 2002).

Model, který se v poslední době ukazuje jako nejsprávnější, spojuje segregaci chromosomů s bakteriálním homologem aktinu, proteinem MreB (Jones et al. 2001). Ten je již z předešlých studií znám pro svou funkci regulace tvaru buňky, kdy jeho polymerační schopnost distribuuje a orientuje nově syntetizovaný materiál pro stavbu buněčných komponent po buňce. MreB tvoří komplex společně s proteiny MreC, MreD a RodZ a tento komplex je asociován s cytoplazmatickou membránou (White et al. 2010). Interakcí komplexu s cytoplazmatickou membránou ve speciálních regionech započne tvorba filament, které narostou přes celou buňku, a tak dají buňce její budoucí tvar. Spojitost s buněčným dělením vyšla najevo, když se ukázalo, že při absenci proteinu MreB dochází k nesprávné segregaci chromosomů (Defeu Soufo, Graumann 2003).

MreB přímo interaguje s nově vzniklými chromosomy, a to v místě blízko *oriC*, které se dá připodobnit k eukaryotické centromere. Chromosomy jsou následně odděleny cytoskeletálními pohyby k opačným pólům buňky (Gitai et al. 2005). U mikroorganismu *Caulobacter crescentus* je toto místo definované jako Par místo (Ptacin et al. 2010).

Později se proteinu MreB přisoudila i funkce ve vytváření bakteriálního divisomu, kdy fluorescenční mikroskopie odhalila, že protein MreB kolokalizuje s FtsZ při tvorbě Z prstence. To ukazuje na to, že k sestavení Z prstence je potřeba přímá interakce MreB s FtsZ. MreB zde má funkci mechanickou, ale i funkci chemickou, která spočívá v regulaci enzymů syntetizující buněčnou stěnu. MreB spolu s FtsZ totiž interagují právě s těmito enzymy a společně je nasměrují do středu buňky, kde se vytváří dělicí septum (Fenton and Gerdes 2013).

Protein MreB je esenciální pro segregaci chromosomů, ale též pro správný tvar buňky, správné složení Z prstence, maturaci divisomu i syntézu peptidoglykanového septa.

2.3. Rozdělení buňky – vytvoření divisomu

Pro tvorbu divisomu, nezbytného pro zahájení buněčného dělení, je nejdůležitějším a nejlépe popsáním proteinem protein FtsZ, jak již bylo naznačeno v předchozí kapitole. FtsZ je tubulinu příbuzný protein s GTPázovou aktivitou (De Boer et al. 1992). Při dělení vytváří jakési lešení a strukturu zvanou Z prsteneček, který buňku přetne a oddělí uprostřed na dvě buňky dceřiné (Bi, Lutkenhaus 1991). Regulace tohoto děje je velmi komplexní, účastní se jí

další doplňkové proteiny, které interagují s proteinem FtsZ a tato interakce je nezbytná pro správné vytvoření Z prstence (Adams, Errington 2009). Tato práce zmiňuje jeden pomocný protein, protein FtsA, který se účastní přímé metabolické kontroly u mikroorganismu *B.subtilis* (viz kapitola 4.1.3.).

Protein FtsZ a jeho funkce ve vytváření Z prstence je podrobně studována na modelových mikroorganismech *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*, kde se ukázaly být za správné načasování a pozici Z prstence zodpovědné hlavně dva regulační systémy, Min systém a tzv. „nucleoid occlusion“ (NO). Oba systémy spolupracují na umístění dělicího aparátu uprostřed buňky.

Min systém zahrnuje sadu proteinů, které udávají pozici Z prstence uprostřed a zabráňují jeho vytvoření na pólech (Romberg, Levin 2003). Nejdůležitější jsou tři z nich; MinC, MinD, MinE. Protein MinC inhibuje polymeraci Z prstence přímou interakcí s FtsZ (Hu et al. 1999). Protein MinD se nachází na pólech buňky a přímo se váže na cytoplazmatickou membránu přes svůj C konec (Szeto et al. 2002). Dále se MinD přímo váže i na protein MinC. Protein MinE vytváří prstenec a osciluje v buňce od pólu k pólu, čímž způsobí stejnou migraci proteinu MinD (Hu et al. 2002). Dynamika mezi proteiny MinE a MinD vytváří oscilační systém, který vytlačuje protein MinC ze středu buňky, aby nemohl inhibovat složení Z prstence. Prstenec se tedy vytvoří tam, kde je nejmenší koncentrace MinC, a to je uprostřed buňky (Monahan, Harry 2013).

Jev zvaný nucleoid occlusion (NO) počítá s existencí silných inhibitorů, které inhibují tvorbu Z prstence v místech, kde se nachází nově vzniklé segregované chromosomy. První takové objevené faktory byly dva proteiny; Noc u *Bacillus subtilis* (Wu, Errington 2004) a protein SlmA u *Escherichia coli* (Bernhardt, de Boer 2005). Funkce obou proteinů spočívá v inhibici polymerace FtsZ, oba jsou to DNA vazebné proteiny a oba interagují s FtsZ přímo přes své specifické domény.

Protein SlmA interaguje s FtsZ svou C terminální doménou a také interaguje s DNA ve specifických místech chromozomu (SBS). K zablokování polymerace a tedy složení Z prstence, dochází tehdy, pokud při současné interakci FtsZ se SlmA je protein SlmA navázán do SBS míst na DNA, protože tato vazba zaručí přesnou prostorovou kontrolu nad inhibicí (Cho et al. 2011).

Protein Noc je membránově vázaný protein asociovaný s membránou svým N koncem a též se váže do specifických míst chromozomu (NBS) (Wu et al. 2009). Spojením DNA s membránou zastavuje buněčné dělení. Přesný mechanismus inhibice FtsZ není dosud znám,

protože nebyla prokázána interakce Noc s FtsZ. Byla vyslovena pouze hypotéza, že protein Noc asociací s membránou a DNA vytváří velký nukleoproteinový komplex, který stéricky inhibuje buněčné dělení (Adams, Wu, Errington 2015).

Nové studie ukázaly, že protein FtsZ a následná tvorba Z prstence je prokazatelně přímo metabolicky regulována (viz kapitola 4.).

3. Regulační mechanismy nutričního stresu nepřímo ovlivňující buněčné dělení

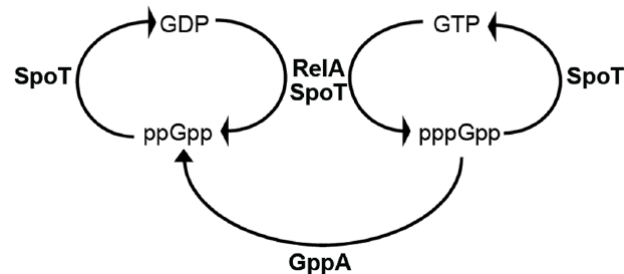
Nutriční změny vyvolávají stresové odpovědi, které se primárně snaží vyrovnat se se stresovými podmínkami, adaptovat na nově vzniklou situaci metabolismus, případně pak pozastavit nebo zcela přerušit buněčné dělení. Nutriční deprivace se odráží ve všech hlavních krocích dělení buněk, které byly popsány výše.

3.1. Stringentní odpověď a funkce (p)ppGpp v dělení bakteriální buňky

Stringentní odpověď je adaptační mechanismus způsobený nutriční deprivací, zvláště nedostatečným přísunem aminokyselin a má za následek snížení translace a následně také transkripce (Levine et al. 1991, Schreiber et al. 1995). Molekulární mechanismus stringentní odpovědi a následné ukončení translace spočívá v hromadění nenabitých (neacetylovaných) tRNA v A místě ribozomu, což společně s interakcí mRNA v tomto místě vede k syntéze molekul ppGpp (guanosintetrafosfát) a pppGpp (guanosinpentafosfát), souhrně zvané (p)ppGpp (Wendrich et al. 2002). Tyto molekuly jsou syntetizovány aktivovaným proteinem RelA, kdy molekula pppGpp je syntetizována z GTP a molekula ppGpp je syntetizována z ATP a GDP (Haseltine, Block 1973) (viz obr. 1).

Protein RelA je navázán do A místa ribozomu a je neaktivní. Při hromadění nenabitých tRNA je aktivován a začne syntetizovat molekuly (p)ppGpp. Další protein, který reguluje hladiny (p)ppGpp, je SpoT, který katalyzuje degradaci (p)ppGpp. Proteiny RelA a SpoT patří do rodiny proteinů RSH (RelA/SpoT homologue) a oba mají katalytickou doménu na svém C konci, kdy u RelA proteinu jde o syntetickou doménu a u SpoT proteinu o hydrolytickou doménu. V popsaném metabolismu (p)ppGpp je dále důležitý enzym Gppa (gammafosfáthydroláza), který konvertuje pppGpp na ppGpp podle množství těchto nukleotidů v buňce.

Hladina nukleotidu (p)ppGpp reguluje buněčné dělení na úrovni transkripce, translace a replikace (viz následující kapitoly) a tak vytváří významné spojení mezi metabolismem a buněčným dělením.



Obr. 1: Schéma prezentující metabolismus (p)ppGpp u *E. coli* s vyznačenými enzymy podílející se na jeho syntéze i degradaci. Převzato z (DeNapoli et al. 2013).

3.2. Nukleotid ppGpp a regulace transkripce

Regulaci na transkripční úrovni zprostředkovává signální molekula ppGpp u *E. coli* jednak na úrovni vazby na RNA polymerázu (RNAP), čímž ovlivňuje elongaci transkripce, jednak na úrovni vazby na sigma faktory, čímž ovlivňuje iniciaci transkripce (Magnusson 2005).

Molekula ppGpp přímo ovlivňuje zejména syntézu rRNA a tRNA tím, že se váže na rozhraní β' a ω podjednotek RNAP a kompetuje s GTP o vazebné místo na RNAP a nepřímo tím, že snižuje koncentraci GTP, z kterého se syntetizuje pppGpp, jehož hladina se v nutričním stresu také zvyšuje (Milon et al. 2006).

K vazbě ppGpp na RNA polymerázu je vyžadován transkripční faktor DksA, který se váže do sekundárního póru RNAP (Paul et al. 2004; Perederina et al. 2004). Komplex DksA-ppGpp snižuje životnost tzv. otevřeného komplexu, který je tak kratší dobu dostupný pro nasednutí RNAP a snižuje se tak pravděpodobnost spuštění elongace transkripce. Životnost komplexu je kinetický parametr, který určuje, zda bude regulace elongace transkripce pozitivní nebo negativní. Když se molekuly ppGpp i DksA společně váží na RNAP, snižují volnou energii intermediátu mezi intermediáty DksA/RNAP a ppGpp/RNAP. V případě, že má druhý intermediát vyšší volnou energii než první, jde o regulaci pozitivní, v opačném případě jde o regulaci negativní (Haugen, Ross, Gourse 2008).

Sigma faktory jsou podjednotky, které se váží na DNA dependentní RNAP a tak vytváří holoenzym ($E\sigma$) určující výběr promotorů a následnou expresi potřebných genů. Často

se angažují v odpovědích na změny prostředí, tedy i na nutriční změny. Když buňka není vystavena nutričnímu stresu, váže se na RNAP Sigma70 (σ^{70}), která spustí expresi tzv. „house-keeping“ genů, jejichž produkty zajišťují základní buněčné a metabolické funkce.

Bylo zjištěno, že se molekula ppGpp váže na tyto sigma faktory, čímž ovlivňuje jejich schopnost navázat se na RNAP. Je známo o vazbě ppGpp na sigmaS faktor (σ^S , RpoS), hlavní regulátor obecné stresové odpovědi u *E.coli* (Brown et al. 2002) a také na sigmaE faktor (σ^E), důležitý faktor v nutričním, ale i oxidačním stresu (Costanzo et al. 2006). Při rostoucím počtu obsazených RNAP začnou sigma faktory kompetovat o zbylá volná vazebná místa na RNAP a bylo prokázáno, že jsou zvýhodňovány ty sigma faktory, které mají na sobě navázáno ppGpp. Například při kompetici σ^{70} s σ^S faktorem je preferován σ^S v případě, že váže ppGpp (Jishage et al. 2002).

3.3. Nukleotid ppGpp a regulace translace

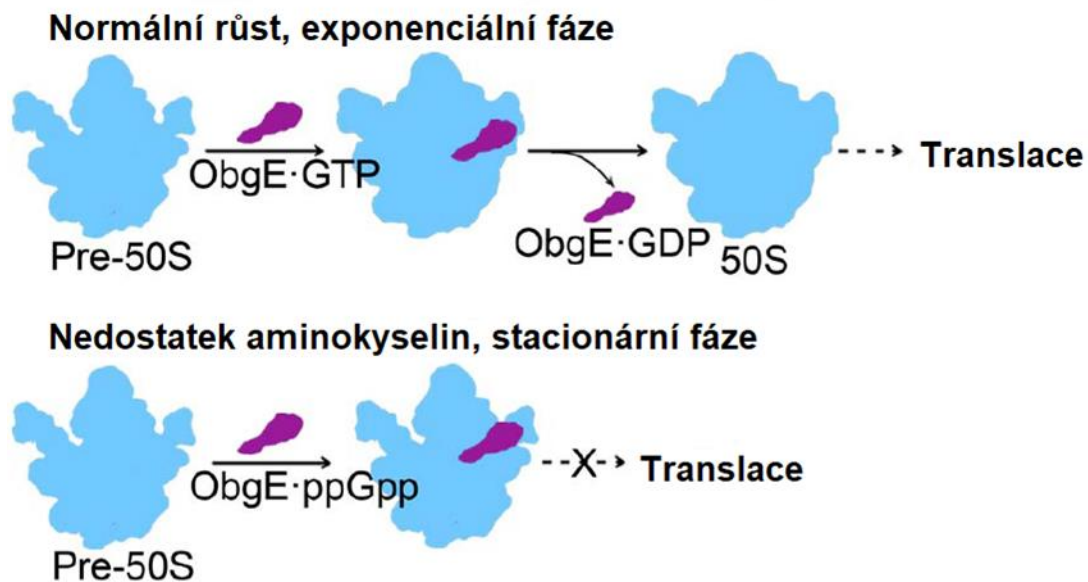
Nukleotid ppGpp ovlivňuje translaci nepřímo skrze inhibici transkripce, nicméně dokáže inhibovat translaci proteinů i přímo prostřednictvím vazby na translační faktory; translační iniciační faktor IF2 a faktor pro stavbu ribozomu ObgE.

Faktor IF2 je GTP vazebný translační iniciační faktor, který se váže na 30S podjednotku ribozomu (po navázání IF3 a IF2) a tato vazba umožní navázání další ribozomální podjednotky 50S a to následně umožní tvorbu iniciačního komplexu 70S. Těmito kroky se formuje první peptidická vazba a vytváří se pretranslokační komplex.

Faktor IF2 má také vlastnosti metabolického senzoru, protože osciluje mezi aktivní formou, kdy je na něj navázáno GTP a inaktivní, kdy je na něj navázán nukleotid ppGpp. Molekula GTP podporuje translaci, protože IF2 s navázaným GTP má nejvyšší afinitu k 30S podjednotce, nižší afinitu má IF2 s navázaným GDP a malou afinitu má i samotný IF2. Nukleotid ppGpp naopak inhibuje translaci, protože komplex IF2-ppGpp se nemůže na 30S podjednotku ribozomu vázat vůbec a nemůže se tak vytvořit ani první peptidická vazba nezbytná k zahájení translace (Milon et al. 2006).

ObgE je GTPáza účastnící se složení ribozomu. Nová studie prokázala, že ObgE může bránit translaci v odpovědi na nutriční stres prostřednictvím alarmujícího nukleotidu ppGpp. Bylo prokázáno, že ppGpp stimuluje vazbu ObgE na ribozomální podjednotku 50S, což inhibuje translaci, protože pro spuštění translace je nezbytné vyvázat ObgE z 50S ribozomální podjednotky. Studie ukázala, že ObgE vykazuje vyšší afinitu k ribozomu s navázaným GTP než s GDP. Při standardních nutričních podmínkách je tedy ObgE navázán na 50S

podjednotku ribozomu společně s GTP a po defosforylaci GTP na GDP a následném vyvázání komplexu ObgE-GDP se spustí translace. Při hladovění se však molekula ppGpp kompetitivně váže na ObgE a způsobí, že ObgE zůstane na ribozomu navázán a translace neprobíhá (viz obr. 2) (Feng et al. 2014).



Obr. 2: Funkce translačního faktoru ObgE na ribozomální podjednotku 50S a následnou translaci v různých fázích růstu. Převzato z (Feng et al. 2014).

3.4. Nukleotid (p)ppGpp a regulace elongace replikace

Bylo prokázáno, že (p)ppGpp inhibuje iniciaci replikace u mikroorganismu *Bacillus subtilis* (2007) a později i u *Escherichia coli* (2013). Při inhibici iniciace replikace se jedná o přímou cestu, kdy se (p)ppGpp přímo váže na DnaG primázu a inhibuje její primázovou aktivitu. Bylo současně vytvořeno několik hypotéz, jak může inhibice DnaG primázy působit i na elongaci replikace.

Přímá inhibice, způsobená vazbou (p)ppGpp na primázu, může způsobit alosterickou inhibici dalších komponent replikačního aparátu. Primáza také přímo interaguje s helikázou, která rozplétá dsDNA pro zahájení elongace a oba enzymy vzájemně regulují svou aktivitu (Corn, Berger 2006). Tímto se považuje aktivita primázy také za vstupní krok elongace replikace. Spekuluje se tedy, že inhibice primázy přímo inhibuje helikázu. Stejná studie

ukázala, že inhibice elongace replikace vykazuje silnější efekt než inhibice iniciace replikace (DeNapoli et al. 2013).

Nepřímo může též (p)ppGpp inhibovat elongaci tím, že při nutriční deprivaci je nukleotid GTP potřebný pro primázovou aktivitu vyčerpáván, protože se přeměňuje na pppGpp. Síla efektu je kvantitativní, závisí na koncentraci (p)ppGpp, kdy vyšší hladina (p)ppGpp silněji a rychleji inhibuje replikaci (Wang et al. 2007).

4. Přímé metabolické senzory uplatňující se v regulaci buněčného cyklu

Dosud byly popisovány mechanismy, které mají vliv na dělení buňky více méně nepřímý. Objevení nové funkce některých známých metabolických enzymů, které přenášejí signály z metabolických drah přímou cestou a ovlivňují tak rozdělení buňky, přineslo nový pohled a nové možnosti pro studium buněčného cyklu.

Tradiční metody studia metabolismu genetickými modifikacemi příslušných genů jsou nespolehlivé, protože mutace mohou způsobit řadu přímých a nepřímých změn v buněčném cyklu, které se později obtížně kvantifikují a interpretují. Z tohoto důvodu je potřeba uplatnění moderních metod kvantifikujících u mutant celé metabolomy, aby se tak daly popisovat kompletní změny v metabolismu.

4.1. Přímé metabolické senzory u *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je G^+ , půdní, aerobní bakterie z třídy Bacilli. *B.subtilis* byl zvolen jako modelový organismus pro všechny G^+ bakterie a proto i na něm proběhlo několik významných studií v oblasti metabolické kontroly buněčného cyklu, včetně objevení několika enzymů ovlivňující buněčné dělení přímou cestou.

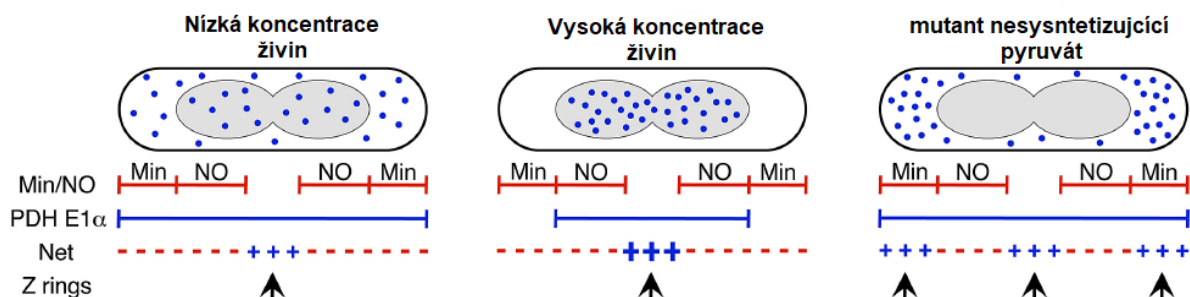
4.1.1. Pyruvát a jeho role v buněčném dělení

Mezi hlavní dráhy centrálního metabolismu uhlíku patří glykolýza (Entner-Doudoroffova dráha, pentozofosfátový cyklus), glukoneogeneze, pentozofosfátová dráha a cyklus trikarboxylových kyselin, jejichž produkty fungují jako spoje mezi jednotlivými dráhami. Pyruvát je konečným produktem glykolýzy a dále u *B.subtilis* vstupuje do TCA cyklu jako acetylkoenzym A (A-CoA). Pyruvát je produkován enzymem pyruvátkinázou (Pyk). Podle studie Monahana a spolupracovníků je formace Z prstence přímo závislá na

syntéze pyruvátu, jelikož vytvořené mutanty nemající pyruvátkinázu vykazovaly poruchy ve tvorbě Z prstence. Po přidání pyruvátu se však Z prsteneček vytvořil, proto se za kruciální označuje samotný pyruvát, nebylo však prokázáno přímé působení pyruvátu na FtsZ. Nejpravděpodobnějším mechanismem vysvětlující regulaci formace Z prstence je působení pyruvátu na další proteiny regulující jeho tvorbu.

Pro lepší pochopení molekulárního mechanismu byly testovány další enzymy účastnící se metabolismu pyruvátu a ukázalo se, že podjednotka enzymu pyruvátdehydrogenázy, což je enzym, který pyruvát rozkládá na acetylkoenzym A a oxid uhličitý, zvaná E1 α (PDHE1 α), svým rozmístěním v cytosolu koreluje s rozmístěním nukleoidu při dělení, a že je tedy s genetickou molekulou spojená. PDHE1 α je při nízké koncentraci živin rozmístěna po celé cytoplazmě, při vysoké koncentraci živin se však soustředí do oblasti nukleoidu (viz obr. 3) a právě tím napomáhá k formaci Z prstence uprostřed buňky. Asociace PDHE1 α s chromosomy se nejspíše uskutečňuje v místě, kde se již nenachází proteiny SlnA a Noc, které se v poslední fázi segregace chromosomů posouvají k pólům buňky, přesný mechanismus ale není dosud znám. (Monahan et al. 2014).

Toto spojení glykolýzy a buněčného dělení ukazuje, jak moc je správné dělení buněk závislé na koncentraci živin v okolí.



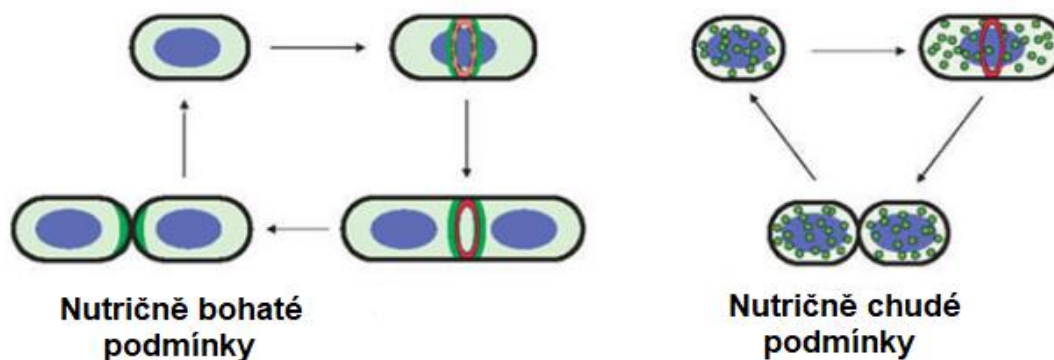
Obr. 3: Rozmístění PDHE1 α (modře) v cytoplazmě (bílá) a nukleoidu (šedá) v posledním kroku segregace chromosomů. Δ pyk mutant má zablokovanou syntézu pyruvátu. Min a NO jsou inhibitory polymerizace FtsZ. Net představuje rovnováhu mezi pozitivními a negativními regulátory proteinu FtsZ při jejich rozdílné pozici v buňce. Převzato z (Monahan et al. 2014).

4.1.2. Protein UgtP – regulátor formace dělicího septa

Prvním objeveným enzymem, propojujícím přímo metabolismus s buněčným cyklem, je protein UgtP. Protein UgtP je glukosyltransferáza asociovaná s cytoplazmatickou membránou. Jeho charakteristika a funkce byla popsána v práci Weart a spol (2007). Mechanismus působení UgtP byl objeven a částečně popsán u organismu *Bacillus subtilis*. Již

známá enzymatická aktivita proteinu UgtP je účast na syntéze diglukosyl-diacylglycerolu, což je kotva pro lipoteichovou kyselinu (LTA), která tvoří významnou součást cytoplazmatické membrány. Zároveň, ale bylo objeveno, že inhibuje dělení buněk interakcemi s FtsZ.

UgtP vytváří přímé laterální interakce s proteinem FtsZ mezi jednotlivými protofilamenty a v případě absence UgtP vytvoří FtsZ zauzlenou strukturu. Na koncentraci živin je závislá jak exprese proteinu UgtP, tak i jeho lokalizace v cytoplazmě. Podobně jako pyruvátdehydrogenáza (viz kapitola 4.1.2.) je UgtP v nutričně bohatých podmínkách exprimován více a je lokalizován v blízkosti dělicího septa, kde interaguje s proteinem FtsZ. Naopak v buňkách vystavených nutričnímu stresu, uniká UgtP mimo oblast počínajících dceřiných buněk a je rozmístěn po celé cytoplazmě (viz obr. 4) (Chien, Levin et al.2013).

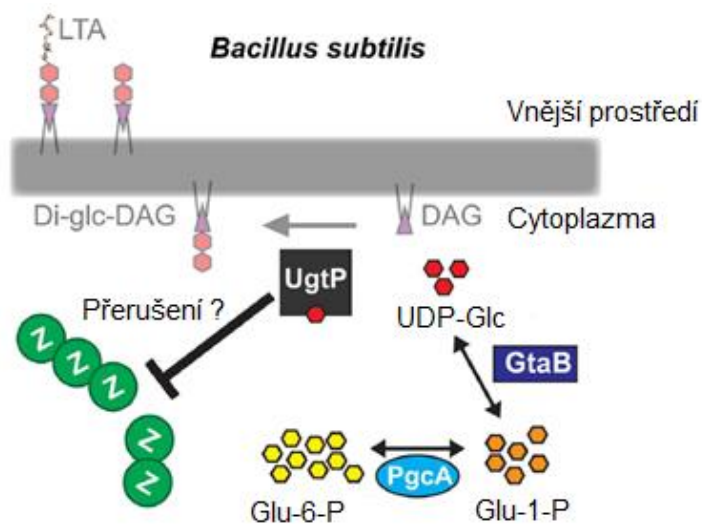


Obr. 4: Rozmístění UgtP (zeleně) v buňce při tvorbě Z prstence (červeně) v závislosti na koncentraci živin. Vlevo vysoká, vpravo nízká koncentrace živin. Převzato z (Weart et al. 2007).

Přesný mechanismus inhibice FtsZ není dosud zcela objasněn, s největší pravděpodobností se tak děje na základě tvorby čepičky na protofilamentech prostřednictvím UgtP, čímž se zastaví jejich polymerace. Vliv na GTPázovou aktivitu FtsZ nebyl prokázán (Chien, Levin et al. 2013).

Aktivita proteinu UgtP je regulována kofaktorem, kterým je UDP glukóza (UDP-Glc). UDP-Glc se tvoří v dráze biosyntézy glykolipidů. V této dráze figurují enzymy fosfoglukomutáza (PgcA) a glukóza-1-fosfát uridilyltransferáza (GtaB), které katalyzují tvorbu UDP-Glc. Katalytická funkce PgcA je izomerizace glukóza-6-fosfát (Glc-6-P) na glukóza-1-fosfát (Glc-1-P). Enzym GtaB poté katalyzuje Glc-1-P na UDP-Glc (viz obr.5) (Weartet al. 2007).

UDP-Glc přenáší signál o koncentraci živin, její koncentrace vzrůstá v buňkách majících dostatek živin, takže se dá připodobnit k nukleotidu (p)ppGpp, i když je zde opačný trend. UDP-Glc je aktivátorem UgtP, tak, že působí změny v jeho interakcích. Když je UDP-Glc přítomna pomáhá stabilizovat interakce UgtP s FtsZ. Naopak, když je pak v hladovějících buňkách UDP glukóza nepřítomna, UgtP utvoří dimery a tím se inaktivuje (Chien, Levin et al. 2013).



Obr. 5: Schéma vzniku UDP-Glc a předpokládané působení enzymu UgtP u *Bacillus subtilis* na protein FtsZ (zeleně). Převzato z (Hill et al. 2013).

4.1.3. Protein PlsX a jeho funkce v regulaci buněčného dělení

PlsX je klíčový enzym pro syntézu fosfolipidů a mastných kyseliny, kdy přenáší acylovou skupinu na koenzym A, což je zásadní krok pro iniciaci biosyntézy fosfolipidů (Paoletti 2007). Podle současných studií také slouží jako regulátor buněčného dělení. Jako dříve zmíněné proteiny, je i protein PlsX v buňce lokalizován podle postupné tvorby dělicího septa. Protein PlsX nicméně neinteraguje přímo s proteinem FtsZ, ale s kotvicím proteinem FtsA a společně kolokalizují v dělicí se buňce. Podle studií Takada a spol PlsX lokalizuje do potenciálního místa dělení nezávisle na proteinu FtsZ a FtsA, což je indikováno tím, že společně interagují až po vytvoření Z prstence. Ze studie vyplývá, že PlsX zastává důležitou funkci v lokalizaci Z prstence v závislosti na replikaci DNA a protein FtsA by tu mohl sloužit jen jako stabilizátor vazby PlsX k Z prstenci (Takada et al. 2014).

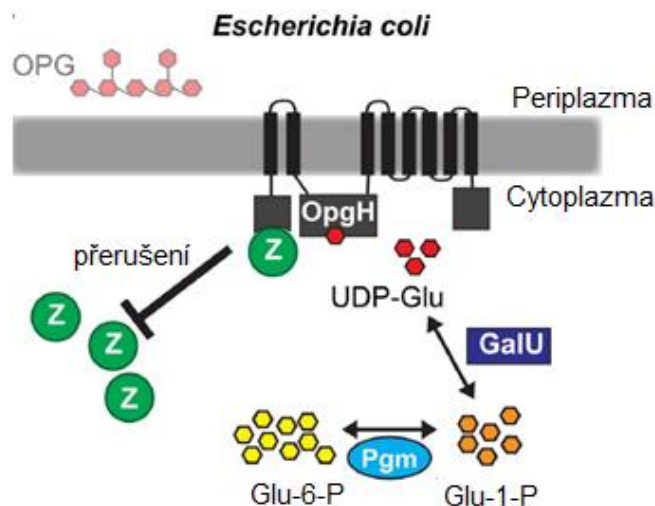
4.2. Přímé metabolické senzory u *Escherichia coli*

Escherichia coli je G⁻, fakultativně anaerobní bakterie z třídy Gammaproteobacteria. Žije v nutričně bohatém prostředí, převážně v gastrointestinálním traktu. Pro svou snadnou detekci a kultivaci se *E.coli* stala nejprozkoumanějším mikroorganismem vůbec, proto i na ní byly učiněny významné objevy metabolické kontroly buněčného cyklu.

4.2.1. Protein OpgH – homolog proteinu UgtP

Protein OpgH je v buněčném dělení funkčním homologem proteinu UgtP. Stejně jako UgtP inhibuje polymeraci FtsZ při tvorbě Z prstence. Protein a jeho funkce byly objeveny u mikroorganismu *Bacillus subtilis*. Stejně jako UgtP je i OpgH glukosyltransferáza asociovaná s cytoplazmatickou membránou. Protein OpgH má již popsanou enzymatickou funkci, je jí syntéza osmoregulačních periplazmatických glukanů. Dalším společným znakem je, že i protein OpgH je aktivován UDP-Glc a jeho přítomnost je pro inhibiční funkci OpgH nezbytná. Pro zjištění přesnější funkce OpgH byly prováděny mutace v genu pro fosfoglukomutázu (*pgm*), v genu pro alphagalaktozidázu (*galU*), které oba kódují fosforylázu syntetizující UDP-Glc z glukóza-1-fosfát a v genu, který kóduje přítomnou glukosyltransferázu (*opgH*) (viz obr. 6). Z výzkumu vyplynulo, že rozdíl mezi proteiny UgtP a OpgH spočívá v jejich mechanismu působení na FtsZ a tyto dva proteiny jsou tak typickým příkladem konvergentní evoluce (Hill et al. 2013).

Provedená biochemická analýza ukázala, že OpgH interaguje s FtsZ svou N koncovou doménou a tím přímo inhibuje skládání a maturaci Z prstence, ale ani zde není mechanismus zcela objasněn. Další analýza potvrdila, že též jako UgtP nemá OpgH vliv na GTPázovou aktivitu FtsZ. Analýzou mutant bylo ukázáno, že rostoucí koncentrace OpgH v nutričně bohatém prostředí snižuje počet dostupných podjednotek FtsZ, jelikož jejich normálně konstantní koncentrace v přítomnosti OpgH klesá (Hill et al. 2013).



Obr. 6: Schéma vzniku UDP-Glc a působení enzymu UgtP u *Bacillus subtilis* na protein FtsZ (zeleně). Převzato z (Hill, Norbert et al. 2013).

4.2.2. Protein Sula – inhibitor bakteriálního divisomu

Protein Sula je součástí SOS odpovědi na poškozenou DNA a jeho hladina je řízena Lon proteázou. Lon proteáza je ATP-dependentní proteáza, která vytváří v přítomnosti ATP funkční oligomer.

Inhibice FtsZ pomocí Sula byla odhalena již dávno pomocí imunoelektronové mikroskopie. Bylo již známo, že se inhibice odehrává ještě před vytvořením Z prstence působením na FtsZ, ale nebylo známo, jakým mechanismem (Bi, Lutkenhaus 1993).

Ukázalo se, že při rostoucí koncentraci Sula klesá počet FtsZ monomerů, které jsou potřeba k vytvoření protofilamenta. Vysvětlení je, že se Sula přímo váže na monomery FtsZ a rozděljuje je od sebe, aby spolu nemohly zreagovat. Tato vazba trvá, dokud se DNA neopraví, poté dojde k proteolýze Sula Lon proteázou. (Chen et al. 2012).

Souvislost tohoto děje s metabolismem vyšla najevo, když se vytvořily mutanty s absencí (p)ppGpp a Lon proteázy, což vedlo ke zvýšení koncentrace proteinu Sula a následné snižování počtu volných monomerů FtsZ po práh nutný k tvorbě protofilament (Nazir, Harinarayanan 2016).

4.3. Metabolické senzory u dalších nemodelových typů bakterií

Během posledních pěti let byly nalezeny enzymy, které pojí metabolismus a buněčné dělení v mnohých bakteriálních druzích. Z toho důvodu budou níže shrnuty další enzymy popsané na nemodelových druzích mikroorganismů. Mechanismy těchto enzymů nejsou

popsány ještě tak dobře jako u mikroorganismů modelových, protože je jim věnováno méně pozornosti, je však zajímavé, jak mají rozličné druhy bakterií vyvinuté analogické mechanismy pro odlišné životní podmínky.

4.3.1. Protein Ga5DH u *Streptococcus suis*

Streptococcus suis je G^+ , patogenní bakterie z třídy Bacilli mající anaerobní metabolismus. Ga5DH je membránově vázaný protein, který katalyzuje reverzibilní přeměnu 5-ketoglukonátu (5-kGln) na D-glukonát (dGln). Při jeho delecii se ukázalo, že mutanti mají pokřivený tvar a nedochází u nich k tvorbě septa. Vzhledem k tomu, že se Ga5DH při dělení pohybuje ke středu buňky a při jeho absenci dochází k nesprávnému zvolení dělicího místa proteinem FtsZ. Předpokládá se, že stejně jako výše zmiňované proteiny (PDH, UgtP, PlsX, OpgH, Sula) má i Ga5DH přímý či nepřímý vliv na lokalizaci Z prstence a tím funguje jako metabolický senzor, který přímo přenáší signál do dělicího aparátu buňky (Shi et al. 2014).

4.3.2. Protein OatA a tvorba septa u *Lactobacillus plantarum*

Protein OatA je znám výhradně pro svou funkci O-acetylace N-acetylglukosaminu (složka bakteriální buněčné stěny) a nachází se jak v gram pozitivních, tak gram negativních bakteriích. U organismu *Lactobacillus plantarum* byla objevena další funkce proteinu OatA, a to v buněčné elongaci a v tvorbě buněčného septa. Podobně jako lokalizace pyruvátdehydrogenázy v dělicích se buňkách, se i OatA pohybuje podle pozice nukleoidu. Ukázalo se, že OatA se pozicuje do buněčného středu ještě před invaginací membrány a počátkem dělení. Předpokládá se, že enzym OatA neznámým mechanismem působí na jeden z hlavních regulačních systémů tvorby Z prstence, jelikož bylo ukázáno, že při absenci proteinu OatA byla narušena funkce systému Min (Bernard et al. 2012).

5. *Caulobacter crescentus* – významný model pro studium buněčného cyklu

Caulobacter crescentus se stal v probírané problematice významným modelem, ale má řadu odlišností od ostatních modelových mikroorganismů, a proto je mu věnována samostatná kapitola. *C. crescentus* je G^- , oligotrofní, aerobní bakterie z třídy alphaproteobacteria, která je dimorfická, tvoří plovoucí a přisedlou formu, dělí se asymetricky na malou plovoucí buňku a

velkou přisedlou a má řadu unikátních kroků při dělení, které jsou zajištěny odlišnými mechanismy (viz obr. 8).

V plovoucí formě je buňka ve své nereplikativní fázi (G1 fáze). V přisedlé fázi pak dochází k replikaci DNA (S fáze), tvorby Z prstence a následně k rozdělení buňky na dvě dceřiné (G2 fáze).

5.1. Regulace iniciace replikace při hladovění

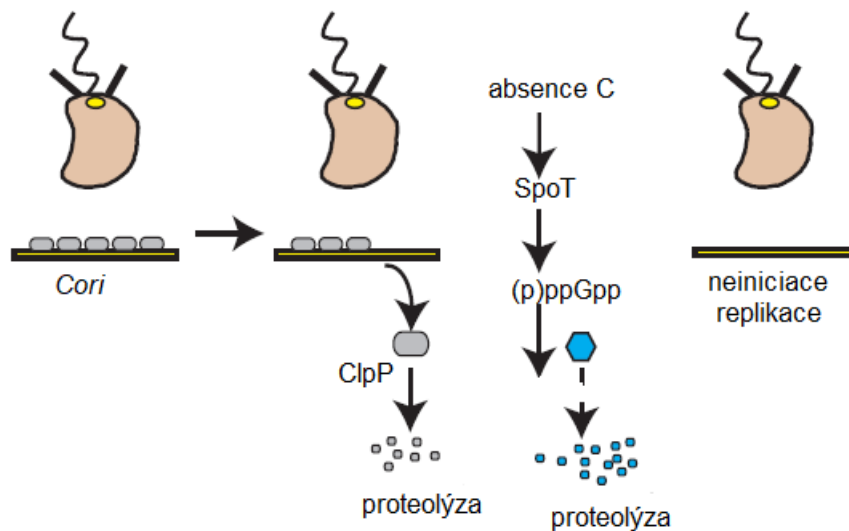
Na rozdíl od předchozích zmiňovaných mikroorganismů jsou u *C.crescentus* dva hlavní iniciační proteiny replikace (DnaA, CtrA). Protein DnaA aktivuje replikaci v místě Cori (origin u *C.crescentus*) (Gorbatyuk et al. 2001). Inhibitor iniciace replikace CtrA se váže do Coria překrývá zde promotor, aby se nemohla navázat RNA polymeráza, čímž je inhibována syntéza vzniku primeru a iniciace replikace (Quon et al. 1998). Přesné načasování iniciace replikace je řízeno přísnou kontrolou množství a aktivity proteinů DnaA a CtrA. V plovoucích buňkách je CtrA fosforylovaný a může se tak vázat do Cori. V přisedlé buňce je CtrA defosforylován a degradován, aby mohl protein DnaA zahájit replikaci (Domian, Quon, Shapiro 1997). Protein CtrA je zároveň multiregulační transkripční faktor regulující nejméně 14 genů pro proteiny zastávající nejrůznější funkce, vedle replikace DNA je to dělení buněk nebo tvorba flagelárních proteinů (Quon, Marczyński, Shapiro 1996).

Metabolické ovlivnění iniciace replikace proteinem DnaA se děje prostřednictvím alarmonu (p)ppGpp. V nehladovějících buňkách se udržuje bazální hladina nukleotidu (p)ppGpp, který je zde syntetizován pouze proteinem SpoT a nijak neovlivňuje funkci DnaA. Při vystavení buněk nutričnímu stresu, se však spustí proteolýza DnaA proteázou ClpP, za což se ukázala být zodpovědná akumulace nukleotidů (p)ppGpp v buňce (viz obr. 7). Vzniklá nerovnováha mezi DnaA a CtrA inhibuje iniciaci replikace (Lesley, Shapiro 2008)

Stejná studie také prokázala, že pokles živin v buňce způsobí pokles exprese proteinu DnaA i nezávisle na globálním stresovém nukleotidu (p)ppGpp (Lesley, Shapiro 2008). Model, jak tento mechanismus funguje, byl publikován později. Zatím neznámá malá nekódující molekula RNA, vznikající při hladovění, se váže na 5' netranslatovaný region transkriptu *dnaA* (5'UTR *dnaA*) a způsobí takové změny v sekundární struktuře mRNA, které ovlivní vazebné místo pro ribozom a zastaví translaci DnaA (Leslie et al. 2015).

Protein DnaA je také degradován již zmíněnou Lon proteázou (viz kapitola 4.2.2.). Je prokázáno, že se tak děje při proteotoxickém stresu, kdy se hromadí nesbalené proteiny, které alostericky stimulují Lon proteázu k proteolytické degradaci iniciačního proteinu DnaA.

Předpokládá se, že Lon proteáza degraduje protein DnaA i při nutričním stresu, tato funkce však zůstává stále předmětem studia (Jonas et al. 2013).



Obr. 7: Schéma SpoT závislé DnaA proteolýzy a inhibice replikace při nedostatku zdroje uhlíku v plovoucích buňkách *Caulobacter crescentus*. Převzato z (Lesley, Shapiro 2008).

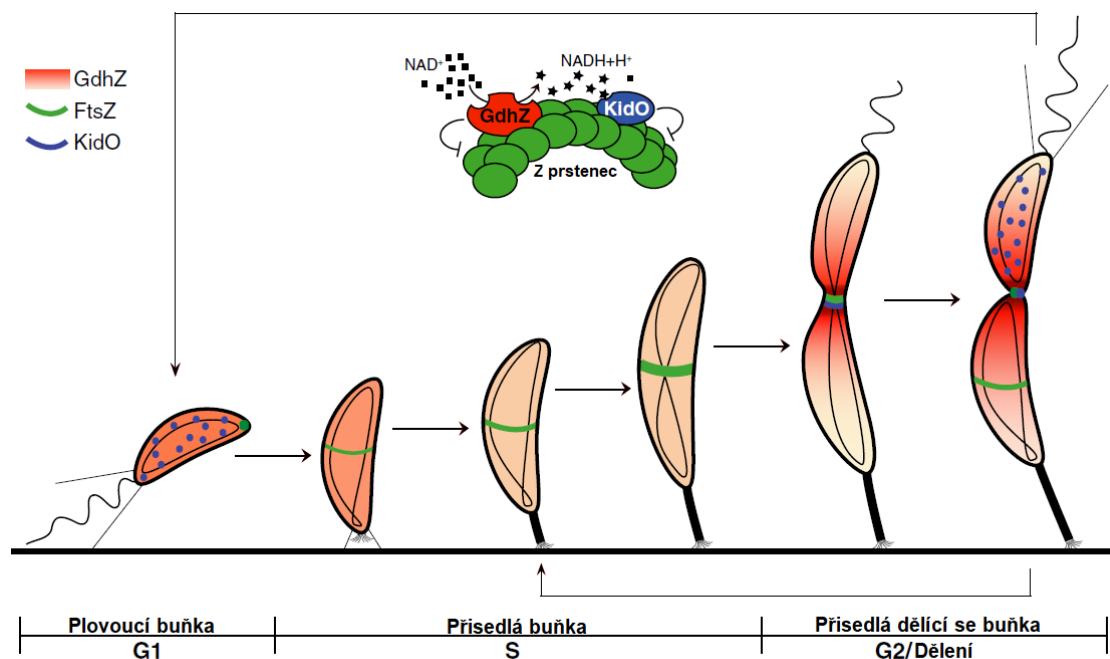
5.2. Proteiny KidO a GdhZ – regulace tvorby Z prstence

Oxidoreduktáza (KidO) a glutamátdehydrogenáza (GdhZ) jsou proteiny, jejichž přítomost v buňce je synchronizována, a které spolupracují při rozložení Z prstence v načasování s buněčným cyklem. Oba proteiny řídí *C. crescentus* přechod z plovoucí buňky (G1 fáze) do přisedlé formy (S fáze), zvaný G1->S transice. Jejich úkolem je jednak zabránit předčasnému složení Z prstence během G1 fáze, jednak podpořit jeho rozklad během S fáze, kdy se buňka začíná dělit. Nejprve jsou oba degradovány peptidázou v rané S fázi, aby nebyly přítomni při sestavení Z prstence. Poté se v G2 fázi pod pozitivní regulací proteinu CtrA transkribují geny *gdhZ* a *kidO* a následně se exprimují proteiny KidO a GdhZ v G2 fázi, kdy společně způsobí rozložení Z prstence (viz obr. 8).

Jelikož jsou oba proteiny součástí hlavních metabolických drah, dají se označit za přímé metabolické senzory, nápadně podobné sensorům již zmíněným (UgtP, OpgH). Oba proteiny také přímo interagují s proteinem FtsZ a degradují tvorbu Z prstence.

Kombinací biochemických a genetických analýz bylo zjištěno, že protein KidO v přítomnosti NADH inhibuje složení Z prstence přímou vazbou na FtsZ (Radhakrishnan et al. 2010). Tehdy však nebyl odhalený přesný mechanismus. Navazující studie za použití elektronové mikroskopie dokázala, že v přítomnosti NADH, nikoli však v přítomnosti NAD⁺, KidO drasticky redukuje interakce mezi monomery FtsZ. Toto zjištění indukuje, že KidO s navázaným NADH destabilizuje laterální interakce mezi jednotkami FtsZ s navázaným NADH a tím způsobuje rozložení Z prstence v G1 fázi (Beaufay et al. 2015).

Glutamátdehydrogenáza (GdhZ) je NAD dependentní protein, který katalyzuje přeměnu glutamátu na α -ketoglutarát a amoniak, čímž vytváří můstek mezi TCA a cyklem dusíku. Při této reakci GdhZ produkuje molekulu NADH, která umožňuje interakci KidO s FtsZ, a to je jádro jejich spolupráce. Na rozdíl od KidO, působení GdhZ spočívá v přímé regulaci GTPázové aktivity FtsZ, ke které je potřebná katalytická funkce GdhZ a nezbytné jsou i molekuly NAD⁺ a glutamát (Beaufay et al. 2015).



Obr. 8: Schéma cyklu asymetrického dělení u *Caulobacter crescentus* s vyznačeným umístěním proteinů GdhZ (červeně) a KidO (modře) a jejich působení na FtsZ (zeleně). Převzato z (Beaufay et al. 2015).

6. Závěr

Mění se nutriční podmínky prostředí, ve kterých musí bakterie přežít a kompetovat, způsobily vývoj mnoha různých mechanismů pro zvládnutí stresu. Výzkum těchto mechanismů probíhá již dlouho. Prvně byly objeveny a charakterizovány mechanismy regulace buněčného cyklu. Později se začalo ukazovat, jak tyto mechanismy synchronizují s dostupností živin, růstem buňky a jejím dělením.

Jeden z prvních a nejlépe popsanych mechanismů a také první mechanismus popisovaný v této práci je stringentní odpověď, při které vzniká nukleotid (p)ppGpp. Nukleotid (p)ppGpp se dá označit za multifunkční, protože působí v různých stresových odpovědích, ale nově působí i v genové expresi a dvou nejdůležitějších bodech replikace, v iniciaci a elongaci replikace.

Nukleotid (p)ppGpp reguluje transkripci tím, že se váže na RNAP a také působí na sigma faktory přímou vazbou. Při kompetici o zbylá vazebná místa na RNAP zvýhodňuje právě ty sigma faktory, se kterými vytváří komplex.

Nukleotid ppGpp působí přímou vazbou také na translační faktory, a tak inhibuje iniciaci translace skrze translační faktor IF2 a složení ribozomu skrze translační faktor ObgE.

Stěžejním cílem této práce bylo shrnutí nejnovějších poznatků o přímé kontrole buněčného cyklu. Protože bakterie musí rychle modulovat svůj buněčný cyklus, vyvinul se u nich mechanismus využívající enzymy, které dokážou přijmout signál o změně nutričního stavu a přímo ho předat do komponent bakteriálního divisomu. Nejčastěji se jedná o regulaci na úrovni složení Z prstence, jak je tomu u proteinu OpgH a Sula u *E.coli* nebo u proteinu UgtP a pyruvátdehydrogenázy u *B.subtilis*. Některé proteiny také mohou interagovat s dalšími složkami divisomu, jako například protein PlsX působící na protein FtsA u *B.subtilis*.

Tyto mechanismy jsou důsledkem konvergentní evoluce a dají se zde najít různé proteiny s homologní funkcí v buněčném dělení, jako jsou proteiny UgtP a OpgH, jejichž produkce je závislá na glykolýze, a které inhibují složení Z prstence.

Práce v neposlední řadě také zmiňuje další nemodelové mikroorganismy, které mají vyvinuté podobné mechanismy jako organismy modelové, jsou však zastoupeny jinými proteiny. Například protein OatA u *Lactobacillus planatarum* zasahující do regulačních mechanismů skládání bakteriálního divisomu nebo protein Ga5DH u *Streptococcus suis*, který ovlivňuje lokalizaci tvorby septa.

Poslední modelový mikroorganismus zmiňovaný v této práci je *Caulobacter crescentus* a je popisován v samostatné kapitole. Bylo u něj prokázáno přímé působení

poklesu živin na hlavní iniciační protein replikace (DnaA) a to hned několika způsoby, včetně působení multiregulačního alarmonu (p)ppGpp. Dále jsou u *C.crescentus* popsány proteiny s podobnou funkcí v buněčném dělení jako u *B.subtilis* a u *E.coli*. Proteiny KidO a GdhZ společně inhibují tvorbu Z prstence v nedělící se fázi buňky. V závislosti na metabolismu protein GdhZ vytváří molekulu NADH, která je kofaktorem pro protein KidO.

Tato práce zahrnuje mechanismy velmi dobře popsané na molekulární úrovni, ale i mechanismy objasněné dosud málo, které jsou však nutné zmínit vzhledem k tématu práce.

Dá se očekávat, že díky moderním metodám a zájmu ujasnit všechny souvislosti související s metabolismem a buněčným cyklem, se budou objevovat poznatky další a starší mechanismy budou objasněny detailněji.

7. Použitá literatura

- Adams, D. W., & Errington, J. (2009). Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature Review Microbiology*, 7(9), 642-653.
- Adams, D. W., Wu, L. J., & Errington, J. (2015). Nucleoid occlusion protein Noc recruits DNA to the bacterial cell membrane. *The EMBO journal*, 34(4), 491-501.
- Atlung, T., Løbner-Olesen, A., & Hansen, F. G. (1987). Overproduction of dnaA protein stimulates initiation of chromosome and minichromosome replication in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics MGG*, 206(1), 51-59.
- Beaufay, F., Coppine, J., Mayard, A., Laloux, G., Bolle, X. De, & Hallez, R. (2015). A NAD-dependent glutamate dehydrogenase coordinates metabolism with cell division in *Caulobacter crescentus*. *The EMBO journal*, 34(13), 1-15.
- Bernard, E., Rolain, T., David, B., André, G., Dupres, V., Dufrêne, Y. F., Hols, P. (2012). Dual role for the O-Acetyltransferase OatA in peptidoglycan modification and control of cell septation in *Lactobacillus plantarum*. *PLoS ONE*, 7(10).
- Bernhardt, T. G., & De Boer, P. A. (2005). SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over chromosomes in *E. coli*. *Molecular cell*, 18(5), 555-564.
- Bi, E., & Lutkenhaus, J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature*, 354(6349), 161.
- Bi, E. R. F. E. I., & Lutkenhaus, J. (1993). Cell division inhibitors SulA and MinCD prevent formation of the FtsZ ring. *Journal of bacteriology*, 175(4), 1118-1125.
- Brown, L., Gentry, D., Elliott, T., & Cashel, M. (2002). DksA affects ppGpp induction of RpoS at a translational level. *Journal of Bacteriology*, 184(16), 4455-4465.
- Costanzo, A., & Ades, S. E. (2006). Growth phase-dependent regulation of the extracytoplasmic stress factor, σ^E , by guanosine 3'5'-bispyrophosphate (ppGpp). *Journal of Bacteriology*, 188(13), 4627-4634.
- Corn, J. E., & Berger, J. M. (2006). Regulation of bacterial priming and daughter strand synthesis through helicase-primase interactions. *Nucleic acids research*, 34(15), 4082-4088.
- De Boer, P., Crossley, R., & Rothfield, L. (1992). The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature*, 359(6392), 254-256.
- DeNapoli, J., Tehrani, A. K., & Wang, J. D. (2013). Dose-dependent reduction of replication elongation rate by (p) ppGpp in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 88(1), 93-104.

- Defeu Soufo, H. J., & Graumann, P. L. (2003). Actin-like Proteins MreB and Mbl from *Bacillus subtilis* Are Required for Bipolar Positioning of Replication Origins. *Current Biology*, 13(21), 1916-1920.
- Domian, I. J., Quon, K. C., & Shapiro, L. (1997). Cell type-specific phosphorylation and proteolysis of a transcriptional regulator controls the G1-to-S transition in a bacterial cell cycle. *Cell*, 90(3), 415-424.
- Feng, B., Mandava, C. S., Guo, Q., Wang, J., Cao, W., Li, N., & Sanyal, S. (2014). Structural and functional insights into the mode of action of a universally conserved Obg GTPase. *PLoS biology*, 12(5), e1001866.
- Fenton, A. K., & Gerdes, K. (2013). Direct interaction of FtsZ and MreB is required for septum synthesis and cell division in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 32(13), 1953-1965.
- Gitai, Z., Dye, N. A., Reisenauer, A., Wachi, M., & Shapiro, L. (2005). *Cell*, 120(3), 329-341.
- Gorbatyuk, B., & Marczyński, G. T. (2001). Physiological consequences of blocked *Caulobacter crescentus* dnaA expression, an essential DNA replication gene. *Molecular Microbiology*, 40(2), 485-497.
- Haseltine, W. A., & Block, R. (1973). Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(5), 1564-1568.
- Hill, N. S., Buske, P. J., Shi, Y., & Levin, P. A. (2013). A moonlighting enzyme links *Escherichia coli* cell size with central metabolism. *PLoS Genetics*, 9(7).
- Hu, Z., Gogol, E. P., & Lutkenhaus, J. (2002). Dynamic assembly of MinD on phospholipid vesicles regulated by ATP and MinE. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(10), 6761-6766.
- Hu, Z., Mukherjee, a, Pichoff, S., & Lutkenhaus, J. (1999). The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 14819-14824.
- Chen, Y., Milam, S. L., & Erickson, H. P. (2012). Sula inhibits assembly of FtsZ by a simple sequestration mechanism. *Biochemistry*, 51(14), 3100-3109.
- Chien, A.-C., Zareh, S. K., Wang, Y. M., & Levin, P. A. (2013). Changes in the oligomerization potential of the division inhibitor UgtP coordinated *Bacillus subtilis* cell size with nutrient availability, 86(3), 594-610.

- Cho, H., Mc Manus, H. R., Dove, S. L., & Bernhardt, T. G. (2011). Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(9), 3773-3778.
- Jacob, F., Brenner, S., & Cuzin, F. (1963, January). On the regulation of DNA replication in bacteria. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (Vol. 28, pp. 329-348). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V., & Nyström, T. (2002). Regulation of σ factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes and Development*, *16*(10), 1260-1270.
- Jonas, K., Liu, J., Chien, P., & Laub, M. T. (2013). Proteotoxic stress induces a cell-cycle arrest by stimulating Lon to degrade the replication initiator DnaA. *Cell*, *154*(3), 623-636.
- Jones, L. J. F., Carballido-López, R., & Errington, J. (2001). Control of cell shape in bacteria: Helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell*, *104*(6), 913-922.
- Lemon, K. P., & Grossman, A. D. (1998). Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication. *Science (New York, N.Y.)*, *282*(5393), 1516-1519.
- Lemon, K. P., & Grossman, A. D. (2000). Movement of replicating DNA through a stationary replisome. *Molecular Cell*, *6*(6), 1321-1330.
- Lesley, J. A., & Shapiro, L. (2008). SpoT regulates dnaA stability and initiation of DNA replication in carbon-starved *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, *190*(20), 6867-6880.
- Leslie, D. J., Heinen, C., Schramm, F. D., Thüring, M., Aakre, C. D., Murray, S. M., Jonas, K. (2015). Nutritional control of DNA replication initiation through the proteolysis and regulated translation of dnaA. *PLoS Genetics*, *11*(7), 1-25.
- Levine, A., Vannier, F., Dehbi, M., Henckes, G., & Séror, S. J. (1991). The stringent response blocks DNA replication outside the ori region in *Bacillus subtilis* and at the origin in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, *219*(4), 605-613.
- Maciąg, M., Kochanowska, M., Łyżeń, R., Węgrzyn, G., & Szalewska-Pałasz, A. (2010). ppGpp inhibits the activity of Escherichia coli DnaG primase. *Plasmid*, *63*(1), 61-67.
- Magnusson, L. U., Farewell, A., & Nyström, T. (2005). ppGpp: A global regulator in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*, *13*(5), 236-242.
- Milon, P., Tischenko, E., Tomšić, J., Caserta, E., Folkers, G., La Teana, A., & Gualerzi, C. O. (2006). The nucleotide-binding site of bacterial translation initiation factor 2 (IF2) as a metabolic sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(38), 13962-13967.

- Monahan, L. G., & Harry, E. J. (2013). Identifying how bacterial cells find their middle: A new perspective. *Molecular Microbiology*, 87(2), 231-234.
- Monahan, L. G., Hajduk, I. V., Blaber, S. P., Charles, I. G., & Harry, E. J. (2014). Coordinating bacterial cell division with nutrient availability: A role for glycolysis. *mBio*, 5(3), 1-13.
- Monahan, L. G., & Harry, E. J. (2016). You Are What You Eat: Metabolic Control of Bacterial Division. *Trends in Microbiology*, 24(3), 181-189.
- Murray, H., & Koh, A. (2014). Multiple regulatory systems coordinate DNA replication with cell growth in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genetics*, 10(10).
- Nazir, A., & Harinarayanan, R. (2016). Inactivation of cell division protein FtsZ by Sula makes Lon indispensable for the viability of a ppGpp0 strain of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 198(4), 688-700.
- Paoletti, L., Lu, Y. J., Schujman, G. E., de Mendoza, D., & Rock, C. O. (2007). Coupling of fatty acid and phospholipid synthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 189(16), 5816-5824.
- Paul, B. J., Barker, M. M., Ross, W., Schneider, D. A., Webb, C., Foster, J. W., & Gourse, R. L. (2004). DksA: A critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell*, 118(3), 311-322.
- Perederina, A., Svetlov, V., Vassylyeva, M. N., Tahirov, T. H., Yokoyama, S., Artsimovitch, I., & Vassylyev, D. G. (2004). Regulation through the secondary channel - Structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell*, 118(3), 297-309.
- Potrykus, K., & Cashel, M. (2008). (p) ppGpp: still Magical?. *Annu. Rev. Microbiol.*, 62, 35-51.
- Quinn, W. G., & Sueoka, N. (1970). Symmetric replication of the *Bacillus subtilis* chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 67(2), 717-23.
- Quon, K. C., Yang, B., Domian, I. J., Shapiro, L., & Marczyński, G. T. (1998). Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle protein that binds at the chromosome origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(January), 120-125.
- Radhakrishnan, S. K., Pritchard, S., & Viollier, P. H. (2010). Coupling prokaryotic cell fate and division control with a bifunctional and oscillating oxidoreductase homolog. *Developmental Cell*, 18(1), 90-101.
- Romberg, L., & Levin, P. A. (2003). Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FTSZ: poised at the edge of stability. *Annual review of microbiology*, 57, 125-154.

- Rymer, R. U., Solorio, F. A., Tehranchi, A. K., Chu, C., Corn, J. E., Keck, J. L., & Berger, J. M. (2012). Binding mechanism of metal·NTP substrates and stringent-response alarmones to bacterial DnaG-type primases. *Structure*, 20(9), 1478-1489.
- Sekimizu, K., Bramhill, D., & Kornberg, A. (1987). ATP activates dnaA protein in initiating replication of plasmids bearing the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell*, 50(2), 259-265.
- Shi, Z., Xuan, C., Han, H., Cheng, X., Wang, J., Feng, Y., Gao, G. F. (2014). Gluconate 5-dehydrogenase (Ga5DH) participates in *Streptococcus suis* cell division. *Protein and Cell*, 5(10), 761-769.
- Schreiber, G., Ron, E. Z., & Glaser, G. (1995). ppGpp-mediated regulation of DNA replication and cell division in *Escherichia coli*. *Current microbiology*, 30(1), 27-32.
- Szeto, T. H., Rowland, S. L., Rothfield, L. I., & King, G. F. (2002). Membrane localization of MinD is mediated by a C-terminal motif that is conserved across eubacteria, archaea, and chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15693-15698.
- Takada, H., Fukushima-Tanaka, S., Morita, M., Kasahara, Y., Watanabe, S., Chibazakura, T., Yoshikawa, H. (2014). An essential enzyme for phospholipid synthesis associates with the *Bacillus subtilis* divisome. *Molecular Microbiology*, 91(2), 242-255.
- Wang, J. D., Sanders, G. M., & Grossman, A. D. (2007). Nutritional control of elongation of DNA replication by (p) ppGpp. *Cell*, 128(5), 865-875.
- Weart, R. B., Lee, A. H., Chien, A. C., Haeusser, D. P., Hill, N. S., & Levin, P. A. (2007). A metabolic sensor governing cell size in bacteria. *Cell*, 130(2), 335-347.
- Wendrich, T. M., Blaha, G., Wilson, D. N., Marahiel, M. A., & Nierhaus, K. H. (2002). Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Molecular cell*, 10(4), 779-788.
- White, C. L., Kitich, A., & Gober, J. W. (2010). Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD. *Molecular Microbiology*, 76(3), 616-633.
- Woldringh, C. L. (2002). The role of co-transcriptional translation and protein translocation (transertion) in bacterial chromosome segregation. *Molecular Microbiology*, 45(1), 17-29.
- Wu, L. J., & Errington, J. (2004). Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell*, 117(7), 915-925.
- Wu, L. J., Ishikawa, S., Kawai, Y., Oshima, T., Ogasawara, N., & Errington, J. (2009). Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. *The EMBO Journal*, 28(13), 1940-1952.

