

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 bacterial cell division

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, 15. 5. 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 díky moderním metodám podařilo objasnit na molekulární úrovni. Regulace buněčného cyklu v závislosti na metabolismu a nutričních podmínkách probíhá na více úrovních dělení buněk, nejvíce je popsáno na úrovni vytváření bakteriálního divisomu. Změny v nutričních podmínkách vyvolávají stresovou odpověď, která využívá nízkomolekulární látky účastnící se signálních drah vedoucích ke změnám v buněčném cyklu. Jedna z nejvíce studovaných je molekula (p)ppGpp, která se účastní stringentní odpovědi, ale také ovlivňuje funkci sigma faktorů, přímo inhibuje iniciaci replikace vazbou na DnaG primázu a nepřímo inhibuje elongaci 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 procesu buňky. Tyto signály nejčastěji inhibují protein FtsZ nebo ovlivňují jeho pomocné proteiny a následnou tvorbu Z prstence. Analogy těchto enzymů byly nalezeny v grampozitivních (*Bacillus subtilis*) i gramnegativních bakteriích (*Escherichia coli*, *Caulobacter crescentus*). V neposlední řadě se tato práce věnuje i nemodelovým mikroorganismům, jejichž unikátní formy senzorů vychází z variability životního stylu bakterií.

Klíčová slova: Metabolická kontrola, buněčný cyklus, (p)ppGpp, katabolická represe, DnaG primáza, FtsZ, glykolýza, TCA cyklus

Abstract

Metabolic control of cell cycle has been study for a long time, but it is not completely known. Mechanisms of metabolic control described for a several decade has been explained on molecular level with using a modern methods. Regulation of cell cycle in consideration of metabolism and nutritional status is going on at the several level of cell replication, the most known is about assembly of bacterial cell divisome. Changes in nutrient availability induce stress response that use low-molecular substances in signaling pathways leading to changes in the cell cycle. One of the most studied is (p)ppGpp that participates in stringent response and affect sigma factors, directly inhibits the initiation of replication by binding to the DnaG primase and indirectly inhibits the elongation of replication. Current researches has revealed that some enzymes with already known enzymatic function in the major metabolic pathways

(glycolysis or TCA) also has function as sensors that transmit the nutritional change signal directly into the cell dividing process. These signals most often inhibit FtsZ protein or affect its helper proteins and subsequent ring formation. Analogues of these enzymes were found in gram-positive (*Bacillus subtilis*) and gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Caulobacter crescentus*). Last but not least, this work is also devoted to non-model microorganisms whose unique forms of sensors are based on the variability of the lifestyle of bacteria.

Keywords: Metabolic control, cell cycle, (p)ppGpp, catabolic repression, DnaG primase, FtsZ, glycolysis, TCA cycle

Seznam zkratek

6PG – 6-fosfoglukonát
ATP – adenosintrifosfát
bp – párů bazí, z angl.: „base pair“
cAMP – cyklický adenosinmonofosfát
Cra – represor katabolických drah, z angl.: „catabolite repressor activator“
Crp – represor katabolických drah, z angl.: „cAMP receptor protein“
dsDNA- dvouvláknová DNA, z angl.: „double strand DNA“
ED - Entner-Doudoroffova dráha
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
GTP – guanosintrifosfát
HB- doména vázající helikázu, z angl.: „helicase bound“
KidO - oxidoreduktáza
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“
PDHE1 α – α podjednotka pyruvátdehydrogenázy
PgcA - fosfoglukomutáza
(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“
TOPRIM – topoizomerázová doména
tRNA – transferová RNA
Rtp – protein pro ukončení replikace, z angl.: „replication terminator protein“
rRNA – ribozomální RNA
UgtP – UDP-glukuronylfosfáttransferáza
UDP-Glc – uridin-5'-difosfoglukóza

1. ÚVOD	1
2. DĚLENÍ BUNĚK	2
2.1. ZDVOJENÍ GENETICKÉHO MATERIÁLU.....	2
2.2. SEGREGACE CHROMOZOMŮ.....	2
2.3. FUNKCE PROTEINU FTSZ V BUNĚČNÉM DĚLENÍ.....	4
3. REGULAČNÍ MECHANISMY NUTRIČNÍHO STRESU OVLIVŇUJÍCÍ BUNĚČNÉ DĚLENÍ	5
3.1. REGULACE INICIACE REPLIKACE.....	5
3.2. STRINGENTNÍ ODPOVĚĎ A FUNKCE (P)PPGPP V DĚLENÍ BAKTERIÁLNÍ BUŇKY.....	6
3.2.1. Struktura vazby DnaG primázy a (p)ppGpp.....	7
3.3. VAZBA (P)PPGPP NA SIGMA FAKTORY RNA POLYMERÁZY U <i>ESCHERICHIA COLI</i>	9
3.4. TRANSKRIPČNÍ FAKTORY KATABOLICKÉ REPRESE U <i>ESCHERICHIA COLI</i>	10
4. PŘÍMÉ METABOLICKÉ SENZORY UPLATŇUJÍCÍ SE V REGULACI BUNĚČNÉHO CYKLU	11
4.1. PŘÍMÉ METABOLICKÉ SENZORY U <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	11
4.1.1. Pyruvát a jeho role v buněčném dělení.....	11
4.1.2. Protein UgtP – regulátor formace dělicího septa.....	12
4.1.2. Protein PlsX.....	14
4.2. PŘÍMÉ METABOLICKÉ SENZORY U <i>ESCHERICHIA COLI</i>	14
4.2.1. Protein OpgH.....	15
4.2.2. Protein SulA.....	16
4.3. METABOLICKÉ SENZORY U DALŠÍCH NEMODELOVÝCH TYPŮ BAKTERIÍ.....	16
4.3.1. Transkripční faktory CceR a AkgR u <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	16
4.3.2. Protein Ga5DH u <i>Streptococcus suis</i>	17
4.3.3. Protein OatA u <i>Lactobacillus planatarum</i>	17
5. CAULOBACTER CRESCENTUS – VÝZNAMNÝ MODEL PRO STUDIUM BUNĚČNÉHO CYKLU	18
5.1. REGULACE DNAA PŘI HLADOVĚNÍ.....	18
5.2. PROTEIN KIDO – VAZEBNÝ REGULÁTOR FTSZ.....	19
5.3. PROTEIN GDHZ – REGULÁTOR GTPÁZOVÉ AKTIVITY FTSZ.....	19
6. ZÁVĚR	20
7. POUŽITÁ LITERATURA	23

1. Úvod

Bakterie žijí v nutričně proměnlivém prostředí a jejich rezervoár živin je omezený, na rozdíl od laboratorních podmínek, kde jsou jim dopřány neměnné podmínky a dostatek živin. Pro lepší přežití a zvládnutí stresových podmínek mohou regulací buněčného cyklu částečně ovládat svůj růst. Prvotní poznatky o spojení metabolismu a buněčného cyklu definovaly geny iniciující a regulující buněčný cyklus. Dalším studiem se ukázalo, 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 figurující přímo v glykolýze nebo enzymy figurující v drahách spojených s glykolýzou (Weart, R.B. et al. 2007). Proteiny, jež bude popisovat tato práce, jsou u zmiňovaných organismů diverzifikované, protože jsou příkladem konvergentní evoluce, kdy se u různých taxonů vyvinuly podobné mechanismy.

Environmentální prostředí je zásadní pro přežívání a dělení každé buňky, proto je důležité studovat, jak je buňka schopná integrovat exogenní a endogenní signály z okolí do vlastních signalizačních drah, které by růst buňky ovlivnily. Díky moderním metodám a intenzivnímu zaměření se na tuto problematiku, se v poslední době objevují nové, překvapivé poznatky, které mohou později přinést přesnější a ucelenější pohled na to, jak bakterie dosáhne svého cíle a rozdělí se na dvě.

Bakterie mají velice variabilní metabolismy, které jsou určeny prostředími, ve kterých žijí. Popisované mechanismy se odlišují právě díky této variabilitě životního stylu. Zvolené modelové organismy jsou půdní grampozitivní aerobní bakterie *Bacillus subtilis*, gramnegativní fakultativně anaerobní *Escherichia coli* a gramnegativní aerobní oligotrofní heterotrof *Caulobacter crescentus*.

Tato práce má za cíl shrnout nejnovější potvrzené poznatky o metabolické kontrole buněčného cyklu, které popisují enzymy pro přímé spojení mezi metabolismem a buněčným dělením a doplnit je o starší poznatky, které se dále vyvíjejí. Mechanismy budou popisovány na molekulární úrovni doplněné názornými schémata. Zmiňovány budou nejvíce prozkoumané organismy a také méně popsané mechanismy na nepříliš studovaných druzích s ohledem na jejich metabolismus.

2. Dělení buněk

Samotnému zdvojení buňky předchází tři hlavní kroky, zdvojení genetické informace a dalších buněčných komponent, segregace chromozomů a samotné rozdělení buňky. Koncentrace potřebných živin je limitující faktor pro to, zda se buňka rozdělí či ne. Dostupné živiny také ovlivňují rychlost růstu, čím jich má buňka k dispozici více, tím je růst rychlejší a buňka se rychleji zvětšuje. Po správném ukončení prvních dvou kroků a dosažení kritického objemu se buňka rozdělí na dvě dceřiné.

2.1. Zdvojení genetického materiálu

Genetická informace je u bakterií uložena v podobě svinutého nukleoidu, který není nijak oddělen od cytoplazmy a vytváří cirkulární molekulu. Buňka zahájí replikaci nasednutím iniciátorového proteinu DnaA do místa replikačního počátku, který nese název *oriC* a odtud probíhá zdvojení cirkulární molekuly v obou směrech. Regulace iniciace replikace je pod přísnou kontrolou proteinu DnaA, který nasedne pouze tehdy, má-li buňka k dispozici dostatek živin. Koncentrace DnaA pozitivně koreluje s růstem buňky (Atlung et al. 1987). Po nasednutí DnaA se vytvoří dvě replikační vidličky, které se pohybují opačnými směry od sebe a tak vytvoří dvě totožné cirkulární molekuly DNA. Pokud replikace proběhne, je ukončena v terminačním místě *terC*, které se nachází na opačném konci chromozomu než *oriC*. Toto zdvojení se odehraje 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. U bakterií je možné, že se v rychle rostoucích buňkách může vytvořit další replikační vidlička ještě před rozdělením buňky a tím se na cirkulární molekule objeví dva překryvné replikační cykly (Quinn, W. G., & Sueoka, N. 1970).

2.2. Segregace chromozomů

Před samotným rozdělením buňky je důležité, aby se rovnoměrně rozdělil genetický materiál do dvou vznikajících dceřiných buněk. Chromozomy, jakožto nositelé genetického materiálu, se rozchází k pólům buňky a uvolňují tak její prostřední část pro tvorbu FtsZ prstence (viz kapitola 2.3.). Názorů na mechanismus segregace chromozomů je více, protože výzkum v této oblasti stále probíhá. Nejvíce zkoumaným mikroorganismem pro studium segregace chromozomů se stal *Bacillus subtilis*.

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

Velmi citované jsou práce, ve kterých za použití fluorescenční mikroskopie byly nalezeny proteiny odpovědné za segregaci chromozomů. Výsledky ukázaly, že existuje mechanismus, který při replikaci navíjí DNA a následně ji sune k pólům buňky (Lemon and Grossman 1998; Lemon and Grossman 2000).

Jiný model dává do souvislosti segregaci chromozomů 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 chromozomů mohou být spojeny s membránou. Podstata děje spočívá v tom, že transerční komplexy 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 chromozomů s bakteriálním homologem aktinu MreB (Jones et al. 2001).

MreB je již znám pro svou funkci regulace tvaru buňky, kdy jeho polymerační schopnost distribuuje a orientuje nově syntetizovaný materiál po buňce. MreB tvoří komplex společně s proteiny MreC, MreD a RodZ a společně vytváří strukturu asociovanou s cytoplazmatickou membránou (Divakaruni et al. 2005; Kruse et al. 2005; Shiomi et al. 2008; Bendezu et al. 2009; 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.

Spojitosť s buněčným dělením vyšla najevo, když se ukázalo, že při jeho absenci dochází k nesprávné segregaci chromozomů (Defeu Soufo and Graumann 2003).

MreB přímo interaguje s chromozomy a to v místě blízko oriC, které se dá připodobnit k eukaryotické centromeře. Chromozomy jsou následně odděleny cytoskeletálními pohyby společně s vytvořeným gradientem k opačným pólům buňky (Gitai, Zemer, et al. 2005).

Později se proteinu MreB ve vytváření bakteriálního divisomu, kromě mechanické funkce, přisoudila i funkce chemická, která spočívá v regulaci enzymů syntetizující buněčnou stěnu. MreB spolu s FtsZ interagují právě s těmito enzymy a společně je nasměrují do středu buňky, kde je třeba vytvořit dělicí septum. Interakce MreB s FtsZ je tak esenciální pro správné složení Z prstence, maturaci divisomu i syntézu peptidoglykanového septa (Fenton and Gerdes, 2013).

2.3. Funkce proteinu FtsZ v buněčném dělení

Pro tvorbu divisomu, nezbytného pro buněčné dělení, je nejdůležitějším a nejlépe popsáním proteinem FtsZ. FtsZ je tubulinu příbuzný protein s GTPázovou aktivitou (De Boer et al. 1992). Při dělení vytváří jakési lešení a strukturu zvanou Z prstenec, který buňku přetne a oddělí uprostřed na dvě buňky dceřiné (Bi and Lutkenhaus 1991). Regulace tohoto děje se účastní další doplňkové proteiny a jejich interakcemi s FtsZ se vytváří Z prstenec (Adams and Errington 2009). Proteiny, které jsou pro vytvoření Z prstence nezbytné, mohou být například FtsZ vazebné proteiny ZapA, ZapB, FtsA (De Boer, 2010).

FtsZ je hojně studován na organismech *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). Min systém zahrnuje sadu proteinů, které udávají pozici Z prstence (Romberg and Levin, 2003), kde nejdůležitější jsou tři z nich. Proteiny MinCa MinD vytváří strukturu na pólech buňky a také oscilují kolem nukleoidu. Protein MinE osciluje od pólu k pólu a nejvíce je frekventován uprostřed, kde vytlačuje MinCD komplex. MinC navíc inhibuje polymeraci FtsZ prstence přímou interakcí (Hu et al. 1999). Prstenec se tedy vytvoří tam, kde je nejmenší koncentrace MinC a to je uprostřed buňky (Monahan, L. G., Harry, E. J. 2013).

Jev zvaný nucleoid occlusion (NO) počítá s existencí silných inhibitorů, které se vytváří během transkripce či translace. První takové objevené faktory byly proteiny Noc, nalezen v *Bacillus subtilis* (Wu and Errington 2004) a protein SlmA, nalezen v *Escherichia coli* (Bernhardt and de Boer 2005). Funkce obou proteinů spočívá v inhibici polymerace FtsZ, oba jsou to DNA vazebné proteiny a oba interagují s FtsZ přímo přes specifické domény.

Protein SlmA interaguje s FtsZ svou C terminální doménou a také interaguje s DNA a společně tvoří komplex s FtsZ. Vazba proteinu SlmA do specifických míst chromosomu (SBS míst) přímo blokuje polymeraci FtsZ a tedy složení Z prstence (Cho, Hongbaek, et al. 2011).

Protein Noc je membránově vázaný protein asociovaný s membránou svým N koncem, váže se také do specifických míst chromosomu (NBS míst) (Wu, Ling Juan, et al. 2009). Spojením DNA s membránou zastavuje buněčné dělení. Přesný mechanismus inhibice FtsZ není dosud znám, protože nebyla zaznamenaná interakce Noc s FtsZ jak je tomu u SlmA. Hypotéza je, že protein Noc asociací s membránou a DNA vytváří velký nukleoproteinový komplex, který fyzicky inhibuje buněčné dělení (Adams, Wu and Errington 2015).

3. Regulační mechanismy nutričního stresu ovlivňující buněčné dělení

Nutriční změny vyvolávají stresové odpovědi, které převádějí signál do regulačních mechanismů, které jsou důležité pro zvládnutí stresových podmínek a pro případné pozastavení dělení buněk. Tyto mechanismy jsou již známy mnoha let a zahrnují takové molekuly, které se vyskytují napříč většiny druhů organismů.

3.1. Regulace iniciace replikace

Hlavní iniciační protein pro zahájení replikace je již zmíněný DnaA, podstatná je jeho hladina i aktivita. Hladina DnaA přibývá společně s buněčnou masou (Atlung et al. 1987). Nezbytná pro nasednutí DnaA do oriC je vazba DnaA s ATP, která určuje frekvenci iniciace replikace (Sekimizu et al. 1987). V rostoucích buňkách je k dispozici dostatečné množství volného ATP, vytváří se tedy více vazeb DnaA-ATP a častěji se iniciuje replikace.

Je jen málo známo, jak koreluje aktivita DnaA se změnami v buněčném růstu. U mikroorganismu *Bacillus subtilis* studie prokázala, že DnaA dostatečně nekoreluje s nutričním stavem buňky (Murray, Heath, and Alan Koh. 2014). Nicméně nepřímé spojení mezi nutričním stavem a iniciací replikace zajišťují regulační proteiny DnaA, proteiny Soj a YabA. Protein Soj je znám pro svou negativní a zároveň i pozitivní regulaci aktivity iniciačního proteinu DnaA. Pozitivní regulace spočívá ve vazbě Soj s ATP, čímž se vytváří dimer, což je forma, ve které může nasednout na DNA a společně s DnaA asistovat u rozplétání dvouvláknové molekuly (Katayama et al. 2010). Inhibiční mechanismus je pak způsoben kontaktem proteinu Soj s proteinem Spo0J, kdy dochází k hydrolýze ATP a rozpadu jeho dimerní funkční formy na dva monomery ATP. Protein YabA je regulátor negativní, kdy tvoří můstek mezi proteinem DnaA a svorkovým proteinem DNA polymerázy a tím zastavuje DNA replikaci, protože inhibuje nezbytnou polymerizaci proteinu DnaA (Soufo, Clarisse Defeu, et al. 2008). Hladina proteinů Soj i YabA koreluje s nutričním stavem, koncentrace obou stoupá při větším přísunu aminokyselin a tak de facto zprostředkovávají přenos informace o nutričním stavu do regulace iniciace replikace (Murray, H., & Koh, A. 2014).

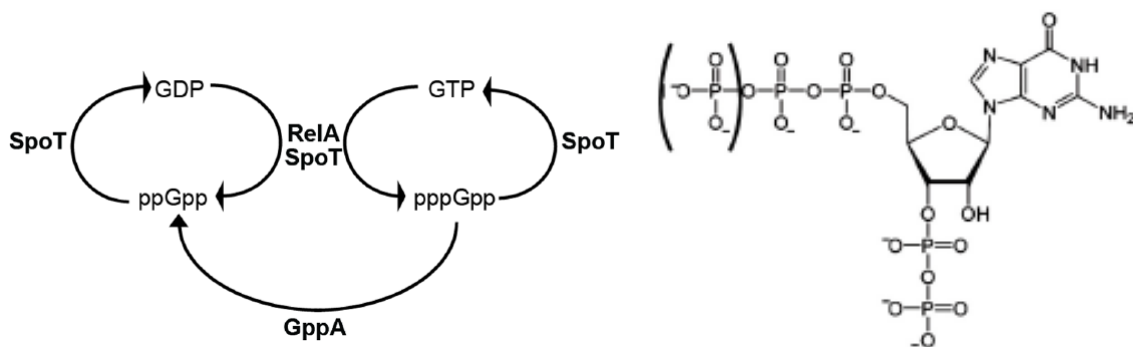
Jasně prokázaná spojitost mezi aktivitou DnaA a nutričním stavem je jen u bakterie *Caulobacter crescentus* (viz kapitola 5.1.).

Za správný průběh iniciace replikace jsou zodpovědné primárně další tři proteiny DnaE polymeráza, DnaC helikáza a DnaG primáza, hladina všech těchto proteinů koreluje s rostoucí

buněčnou masou. Popsané mechanismy, které pojí přímo iniciační proteiny a buněčné dělení se z vyjmenovaných týkají pouze DnaG primázy, která katalyzuje syntézu primeru (viz kapitola 3.2.(1.)). Ukončení replikace v místě ter provádí protein Rtp (Duggin and Wake, 2002). Jak se ukázalo, tak aktivita Rtp je stejně jako aktivita DnaA nezávislá na koncentraci živin (Wang et al. 2007).

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

Stringentní odpověď byla dříve definována jako programovaná transkripční změna způsobená nutriční deprivací, která se značí nedostatečným přísunem aminokyselin, což má za následek snížení transkripce a translace (Levine et al. 1991, Schreiber et al. 1995). Dnes se tak říká jakékoliv nutriční deprivaci, kdy se hromadí molekuly ppGpp (guanosintetrafosfát) a pppGpp (guanosinpentafosfát) (Potrykus, K., & Cashel, M. 2008). Molekulární mechanismus stringentní odpovědi a následné ukončení translace spočívá v důsledku hromadění nenabitých tRNA na ribozomu, v případě hladovění na aminokyseliny. Rozdílný, ale dosud neznámý molekulární mechanismus, se objevuje v případě nedostatku fosfátu. Ribozom je také dále blokován proteinem RelA, který se váže do A místa ribozomu (Haseltine, William A., and Ricardo Block. 1973). RelA je též protein, který syntetizuje alarmující nukleotidy (p)ppGpp, kdy molekula pppGpp je syntetizována z GTP a molekula ppGpp je syntetizována z ATP a GDP. Další protein, který reguluje hladiny (p)ppGpp, je SpoT, který způsobuje degradaci (p)ppGpp při nedostatku aminokyselin. Při nedostatku fosfátu se hladina (p)ppGpp naopak zvyšuje v důsledku inhibice proteinu SpoT. 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 akumulace tohoto nukleotidu v buňce.



Obr. 1: Vlevo schéma reprezentující metabolismus (p)ppGpp u *E.coli* s vyznačenými enzymy zde figurujícími. Převzato z (Wang et al. 2013). Vpravo chemický vzorec (p)ppGpp.

Nukleotid (p)ppGpp je globální faktor, který negativně reguluje expresi mnoha genů, včetně komponent bakteriálního replisomu (Durfee et al. 2007).

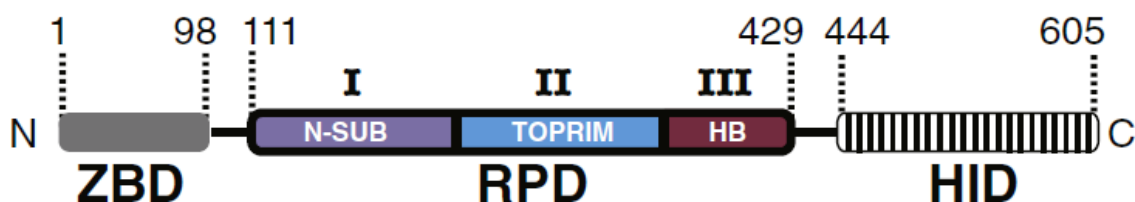
Bylo prokázáno, že (p)ppGpp inhibuje buněčné dělení přímou i nepřímou cestou. U *Escherichia coli* bylo zaznamenáno, že (p)ppGpp inhibuje iniciaci i elongaci replikace, kdežto u *Bacillus subtilis* jen elongaci a ani mnoho dalších studií neprokázalo, že je jeho dělení též regulováno ve fázi iniciace replikace (Lark and Lark, 1966; Billen and Hewitt, 1966; Marsh and Hepburn, 1980; Levine et al., 1991; Ferullo and Lovett, 2008; Tehranchi et al., 2010). Při inhibici iniciace replikace se tedy jedná o přímou cestu, kterou zprostředkovává vazba (p)ppGpp na DnaG primázu a ve výsledku je zastavena primázová aktivita DnaG (viz kapitola 3.2.1.). Co se týče nepřímé inhibice (elongace) replikace je nejpravděpodobnější příčinou vyčerpání nukleotidů dNTP (deoxyribonukleotidtrifosfát), které snadno podléhají nutriční deprivaci, protože pro zdárné dokončení elongace replikace si musí držet svou stálou hladinu, jakožto stavební jednotky pro DNA. Inhibice elongace vykazuje silnější efekt než inhibice iniciace (Wang et al. 2013). Síla efektu také závisí na koncentraci (p)ppGpp, kdy vyšší hladina způsobuje ukončení replikace, nižší jen zpomaluje frekvenci replikace (Wang et al. 2007).

3.2.1. Struktura vazby DnaG primázy a (p)ppGpp

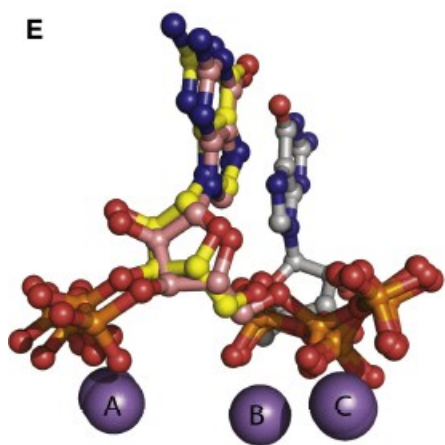
Pro lepší pochopení, jak přesně interferuje indukce stringentní odpovědi se syntézou primeru, byl popsán model vazby DnaG primázy a inhibičního nukleotidu (p)ppGpp. Protein DnaG má RNA polymerázovou doménu (RPD), která má další tři subdomény a to N-subdoménu (N-

SUB), TOPRIM doménu vázající enzymy topoizomerázu I a II a také helikální uzel (HB) (viz obr. 2).

Vazba nukleotidů na DnaG primázu vyžaduje přítomnost kofaktoru a to buď Mg^{2+} nebo Mn^{2+} . Oba zmíněné ionty mohou být úspěšně zaměnitelné. Pro vazbu topoizomerázy II, která vytváří zlom obou vláken DNA (ds zlom) a následně obě vlákna spojí, je také vyžadována přítomnost kofaktoru. Inspirací touto vazbou vyžadující kofaktor vyšlo najevo, že nukleotidy (p)ppGpp se na DnaG primázu vážou do pozice +1 nukleobáze od vazebného místa pro topoizomerázu II a touto vazbou zablokuje vstup dalších nukleotidů, které jsou stavebním materiálem pro primer, jehož stavba se tak zablokuje. Další vliv vazby (p)ppGpp s DnaG primázou se ukázal být na heteroduplex RNA•DNA a to kompeticí (p)ppGpp s GTP. Oba nukleotidy soutěží o místo na 5'konci (5'-CTG a 5'-CAG) DnaG primázy, na kterém jediném může GTP iniciovat transkripci. Výzkum tedy ukázal, že ppGpp a pppGpp kvantitativně blokují syntézu primeru v závislosti na koncentraci GTP (Rymer, Richard U., et al. 2012).



Obr. 2: Schéma domén DnaG primázy: ZBD (zinek vazebná doména), RPD (RNA polymerázová doména), HID (helikázová doména. Převzato z (Rymer, Richard U., et al. 2012).



Obr. 3: Model vazby pppGpp (B) a ppGpp (C) na DnaG primázu (tyčkovitý model). (A) představuje kofaktor Mg^{2+} . Převzato z (Rymer, Richard U., et al. 2012).

3.3. Vazba (p)ppGpp na sigma faktory RNA polymerázy u *Escherichia coli*

Sigma faktory jsou podjednotky, které se váží na DNA dependentní RNA polymerázu (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. Nedávné výzkumy odhalily, že globální alarmující nukleotid (p)ppGpp má vliv i na dlouho známe sigma faktory (Magnusson 2005).

Nukleotid (p)ppGpp se váže na rozhraní β' a ω podjednotek RNA-polymerázy. K vazbě (p)ppGpp na sigma faktory je vyžadován transkripční faktor DksA, který interaguje se sekundárním pórem RNAP (Paul et al. 2004; Perederina et al. 2004). Společně regulují expresi genů nebo aktivitu sigma faktorů, jako je σ^S (RpoS) (Brown et al. 2002) nebo σ^E (Costanzo et al. 2008). Komplex DksA/RNAP/(p)ppGpp snižuje stabilitu tzv. otevřeného komplexu, což znamená rozpletení dsDNA v oblasti promotoru, na který pak může RNA polymeráza nasednout. Bude-li se jednat o aktivaci či inhibici záleží na kinetických a termodynamických parametrech jednotlivých promotorů (Gopalkrishnan et al. 2014).

SigmaS (σ^S , RpoS) je hlavní regulátor obecné stresové odpovědi u *E.coli*, který reguluje kolem 50 genů, které pomáhají buňce vyrovnat se se stresem (Brown et al. 2002). Když se buňka nachází v dostatečném nutričním prostředí, váže se na RNA polymerázu σ^{70} , která spustí expresi tzv. „house-keeping“ genů, které zajišťují základní buněčné a metabolické funkce. Když je ale buňka vystavena stresu a zvýší se hladina molekul (p)ppGpp, roste i koncentrace σ^S a spouští se stresová odpověď.

Stávající hypotézou je, že σ^S faktor je preferován na základě kompetice s σ^{70} o místo na RNAP a v případě přítomnosti (p)ppGpp je zvýhodňována σ^S (Jishage et al. 2002).

SigmaE (σ^E) je zásadní faktor v nutričním a oxidačním stresu, exprimuje však další důležité geny (biosyntéza lipopolysacharidů, mastných kyselin, oligosacharidů). Jeho funkce je také řízena rostoucí hladinou (p)ppGpp a to jak přímo vazbou s DksA, tak nepřímo negativní regulací transkripce z promotorů genů pro rRNA. Přímá vazba (p)ppGpp s DksA může mít jak pozitivní tak negativní efekt na transkripci genů podle kinetických parametrů. Nepřímý vliv je také vysvětlován rostoucími volnými vazebnými místy na RNAP při rostoucí hladině (p)ppGpp a následnou kompeticí různých sigma faktorů o tyto vazebná místa (Costanzo, Alessandra et al. 2008).

Další významný mechanismus, kdy se vazbou na DNA reguluje syntéza důležitých genů kódujících metabolické komponenty, jsou transkripční faktory (viz kapitoly 3.4. a 4.3.1.)

3.4. Transkripční faktory katabolické represe u *Escherichia coli*

Katabolická represe je zpětná pozitivní regulace transkripce, která bakteriím umožňuje využívat různé zdroje uhlíku. U G^- bakterií jsou dva hlavní regulátory katabolické represe a to aktivátor či inhibitor Cra (catabolite repressor activator), občas zvaný CAP (catabolite gene-activator protein). Druhým je protein Crp (cAMP receptor protein), jehož funkce je řízena přítomností cAMP. Při zvýšení koncentrace proteinu, Crp vytvoří s cAMP komplex a tento komplex řídí funkci mnoha operonů. Oba tyto proteiny byly známy pro svou regulaci enzymů hlavního metabolismu uhlíku, dnešní studie však ukázaly, že kódují drah mnohem více.

Po analýze vazebných míst v genomu pro Cra protein bylo objeveno, že se jich u *E.coli* nachází celkem 164. Byly mezi nimi nalezeny vazebná místa pro všechny geny kódující enzymy centrálního metabolismu, jako například *gapA* (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza), *eno* (enoláza) nebo *hydN* (formátdehydrogenáza). Protein Cra má na tyto enzymy vliv pouze inhibiční a jeho role spočívá v udržení konstantního množství enzymů v měnících se podmínkách prostředí (Shimada et al. 2011).

Pro protein Crp bylo v genomu *E.coli* nalezeno 254 vazebných míst zahrnujících místa pro enzymy glykolýzy, komplexu pyruvát dehydrogenázy a TCA cyklu. Kódované jsou například geny *fabA* (fruktóza-1,6-bisfosfátaldoláza), *gapA* (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza) nebo *pgk* (fosfoglycerátkináza). Proteinu Crp byla nově přisouzená i role v kódování genů pro ABC transportery, což napomáhá řazení uhlíkatých zdrojů ke správným transportérům (Shimada, Tomohiro, et al. 2011).

Protein Cra má roli i v metabolickém obratu, konkrétně v obratu mezi glykolýzou a glukoneogenezí. Reverzibilní reakce glykolýzy, umožňující změnu na glukoneogenezy, jsou tři a protein Cra reprimuje tři geny kódující enzymy účastníci se tohoto obratu. Jsou to geny *pykA* a *pykF* kódující pyruvátkinázu a *glk* kódující glukokinázu. Tento proces je regulován koncentrací molekul fruktóza-1,6-bisfosfát a fruktóza-6-fosfát, které tvoří jednu z reverzibilních reakcí (Shimada et al. 2011).

I protein Crp hraje roli v metabolickém obratu, kdy je aktivován při absenci glukózy a aktivuje všechny geny tvořící obrat glykolýzy v glukoneogenezy.

Katabolická represe řídí syntézu enzymů a substrátů, které mohou přímo ovlivňovat buněčný cyklus, jak, o tom bude pojednáno v následující kapitole.

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 známých enzymů, která spočívá v přenesení signálu přímou cestou z metabolických drah a ovlivnění tak rozdělení buňky, způsobilo v dané problematice jakousi revoluci a přineslo nové možnosti pro studium.

Tradiční metody studia metabolismu jsou nespolehlivé, díky tomu, že metabolické mutace mohou způsobit řadu přímých a nepřímých změn v buněčném cyklu, které se později obtížně kvantifikují. Z tohoto důvodu je potřeba moderních metod kvantifikujících celé metabolomy, aby se tak daly popisovat kompletní změny v metabolismu.

Testování enzymatických aktivit probíhá tvořením mutant, ve kterých jsou dané enzymy nefunkční.

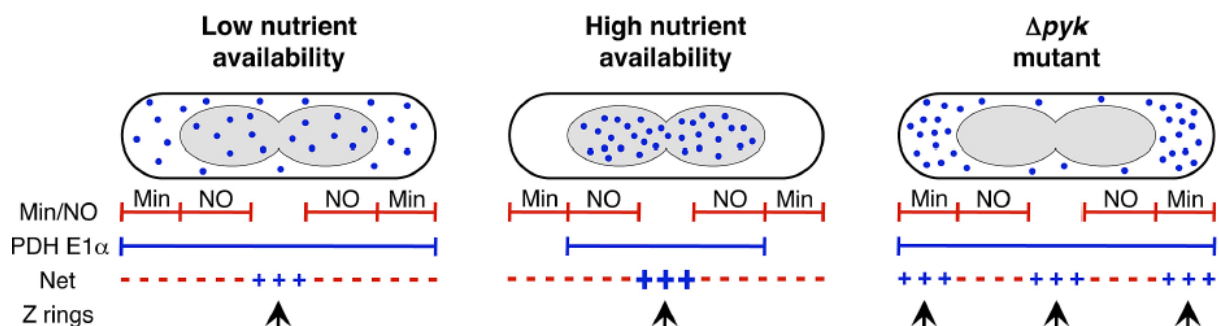
4.1. Přímé metabolické senzory u *Bacillus subtilis*

B. subtilis je G^+ , půdní, aerobní bakterie z třídy Bacilli. *B. subtilis* byl zvolen jako modelový organismus pro G^+ bakterie a proběhlo na něm již 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 poskytují spoje mezi jednotlivými dráhami. Pyruvát je výchozím produktem glykolýzy a poté vstupuje do TCA cyklu jako acetylkoenzym A (A-CoA). Pyruvát je produkován enzymem pyruvátkinázou. Podle studie Monahana a spolupracovníků je formace Z prstence závislá na syntéze pyruvátu, jelikož vytvořené mutanty nemající enzym syntetizující pyruvát vykazovaly poruchy ve tvorbě Z prstence. Po přidání pyruvátu se však Z prstencem vytvořil, proto se za klíčový označuje samotný pyruvát. Jelikož nebylo 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 účastníci se metabolismu pyruvátu a ukázalo se, že jistá podjednotka enzymu pyruvátdehydrogenázy, což je enzym který pyruvát rozkládá na acetylkoenzym A a oxid uhličitý, zvaná E1 α (PDHE1 α), je svým rozmístěním podobná rozmístění nukleoidu při dělení, a že je tedy s genetickou molekulou spojená. PDHE1 α je při nízké koncentraci živin rozmístěna po celé cytoplasmě, při vysoké koncentraci živin se však soustředí do oblasti nukleoidu (viz obr. 4) a právě to řídí formaci Z prstence uprostřed. Asociace PDHE1 α s chromosomy se nejspíše uskutečňuje v místě, kde se již nenachází proteiny SlmA a Noc, které se v poslední fázi segregace chromozomů posouvají k pólům buňky (Monahan, Leigh G., et al. 2014). Toto spojení glykolýzy a buněčného dělení ukazuje, jak moc je správné dělení buněk závislé na koncentraci živin v okolí.

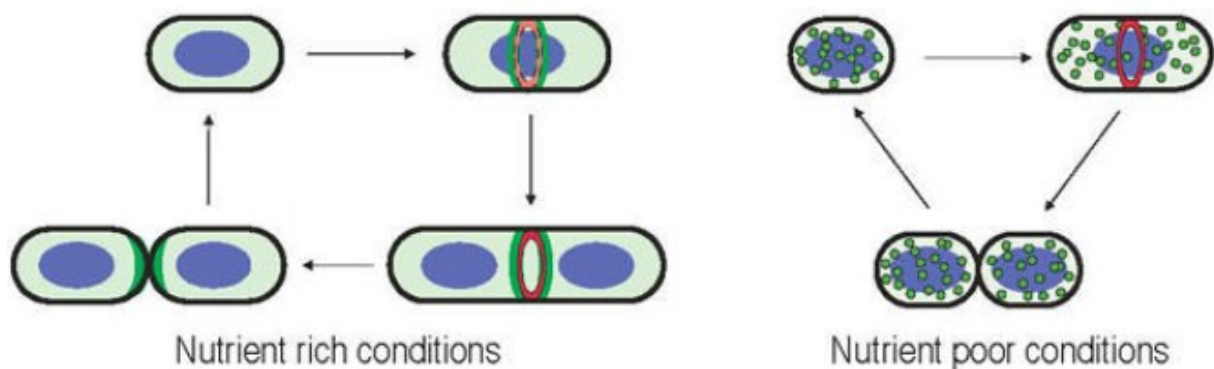


Obr. 4: Rozmístění PDHE1 α (modře) v cytoplasmě (bílá) a nukleoidu (šedá) v posledním kroku segregace chromozomů. Δ pyk mutant má zablokovanou syntézu pyruvátu. Min a NO jsou inhibitory polymerizace FtsZ. Net představuje rovnováhu mezi pozitivními a negativními regulátory proteinu FtsZ při jejich rozdílné pozici v buňce. Převzato z (Monahan , Leigh G., et al. 2014).

4.1.2. Protein UgtP – regulátor formace dělicího septa

Prvním objeveným enzymem, propojujícím přímo metabolismus s buněčným cyklem, se stal protein UgtP a byl popsán v práci Wearta a spol. Mechanismus UgtP byl zpozorován a částečně popsán na organismu *Bacillus subtilis*. Hlavní, již známá, enzymatická aktivita proteinu UgtP je účast na syntéze diglukosyl-diacylglycerolu, což je kotva pro LTA (lipoteichová kyselina), která tvoří významnou součást cytoplazmatické membrány. Zároveň, ale bylo objeveno, že inhibuje dělení buněk interakcemi s FtsZ při nedostatku živin.

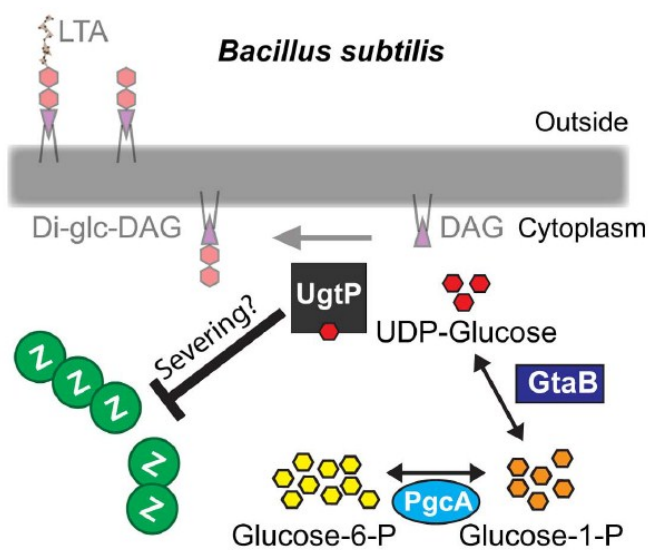
Na koncentraci živin je závislá jak exprese proteinu UgtP, tak i jeho lokalizace. UgtP vytváří přímé laterální interakce s proteinem FtsZ mezi jednotlivými protofilamenty a v případě absence UgtP vytvoří FtsZ zauzlenou strukturu (Weart, R. B. et al. 2007). Podobně jako pyruvát (viz kapitola 4.1.2.) je UgtP v nutričně bohatých podmínkách exprimován více a je lokalizován v blízkosti dělicího septa, aby tak mohl interagovat s proteinem FtsZ. Naopak v buňkách vystavených nutričnímu stresu, uniká UgtP mimo oblast počínajících dceřiných buněk a je rozmístěn po celé cytoplazmě (viz obr. 5) (Chien, Levin et al. 2012).



Obr. 5: Rozmístění UgtP (zeleně) v buňce při tvorbě Z prstence (červeně) v závislosti na koncentraci živin. Vlevo vysoká koncentrace, vpravo nízká. Převzato z (Weart et al. 2007).

Přesný mechanismus inhibice FtsZ není dosud objasněn, s největší pravděpodobností se tak děje na základě tvorby čepičky na protofilamentech pomocí UgtP, čímž se zastaví jejich polymerace. Vliv na GTPázovou aktivitu FtsZ nebyl prokázán (Chien, Levin et al. 2012).

Biochemická dráha, která předchází tvorbě UgtP je biosyntéza glukolipidů. V této dráze figurují enzymy PgcA (fosfoglukomutáza) a GtaB (glukóza-1-fosfát uridilyltransferáza), které na efektorový protein UgtP převádějí signál. Katalytická funkce PgcA je izomerizace glukóza-6-fosfát (Glc-6-P) na glukóza-1-fosfát (Glc-1-P). Enzym GtaB katalyzuje tvorbu uridine-5'-difosfoglukózy (UDP-Glc) z Glc-1-P (viz obr. 6). Tyto dva enzymy ovlivňují lokalizaci UgtP, nikoliv jeho expresi (Weart R. B. et al. 2007). Vytvořená UDP-glukóza slouží jako vnitrobuněčné čidlo koncentrace 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 oligomerizaci, když je UDP-glc přítomna, pomáhá stabilizovat interakce UgtP s FtsZ, naopak když je pak v hladovějících buňkách UDP glukóza nepřítomna, UgtP vytvoří interakce mezi sebou a tím se inaktivuje (Chien, Levin et al. 2012).



Obr. 6: Schéma spolupůsobení enzymů UgtP, GtaB s PgcA u *Bacillus subtilis* na syntézu proteinu UgtP, který inhibuje FtsZ (zeleně). Převzato z (Hill, Norbert S., et al. 2013)

4.1.2. Protein PlsX

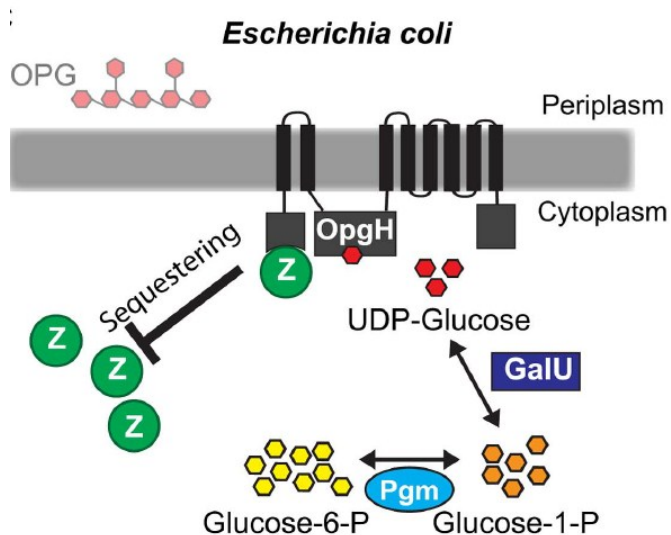
PlsX je klíčový enzym pro syntézu fosfolipidů a mastných kyselin, kdy přináší acylovou skupinu na koenzym A, což je zásadní krok pro iniciaci biosyntézy fosfolipidů. Podle současných studií také figuruje jako regulátor buněčného dělení. Jako další zmíněné proteiny, je i PlsX v buňce lokalizován podle postupné tvorby dělicího septa. PlsX nicméně interaguje s pomocným proteinem FtsZ a to s kotvicím proteinem FtsA a společně kolokalizují v dělicí se buňce. Podle studií Takada a spol se PlsX lokalizuje do potenciálního místa dělení nezávisle na proteinu FtsZ a FtsA, což indikuje, že PlsX interaguje s FtsZ až po vytvoření Z prstence a brání tak dalšímu pohybu PlsX. Ze studie vyplývá, že PlsX zastává důležitou funkci ve výběru dělicího místa v závislosti na replikaci DNA a tvorby Z prstence a protein FtsA by tu mohl sloužit jen jako stabilizátor vazby PlsX k Z prstenci (Takada, Hiraku, et al. 2014).

4.2. Přímé metabolické senzory u *Escherichia coli*

E. 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 organismem vůbec, proto i na ní byly učiněny významné objevy metabolické kontroly buněčného cyklu.

4.2.1. Protein OpgH

Protein OpgH je funkčním homologem proteinu UgtP objeveným u *Bacillus subtilis*. Stejně jako UgtP je i OpgH glukosyltransferáza asociovaná s cytoplazmatickou membránou, která má již popsanou enzymatickou funkci, je jí syntéza osmoregulačních periplazmatických glukonů. Spojitost s dělením spočívá, stejně jako v případě UgtP, v inhibici polymerace FtsZ v Z prstenc. Dalším společným znakem je, že i protein OpgH je aktivován UDP-glc a její přítomnost je pro inhibiční funkci OpgH nezbytná. Pro zjištění přesnější funkce OpgH byly prováděné mutace v genech *pgm* (gen pro fosfoglukomutázu), *galU* (gen pro alphagalaktozidázu), které oba kódují fosforylázu syntetizující UDP-glc z glukóza-1-fosfát a v genu *opgH*, který kóduje přítomnou glukosyltransferázu (viz obr. 7). Z výzkumu vyplynulo, že rozdíl mezi těmito dvěma proteiny spočívá v jejich mechanismu působení na FtsZ a tyto dva proteiny jsou tak typickým příkladem konvergentní evoluce (Hill, Norbert S., et al. 2013). Biochemická data ukázala, že OpgH interaguje s FtsZ svou N koncovou doménou a tím přímo inhibuje složení 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. Také bylo ukázáno, že rostoucí koncentrace OpgH v nutričně bohatém prostředí snižuje počet dostupných podjednotek FtsZ, jelikož jejich normálně konstantní koncentrace v přítomnosti OpgH klesla (Chien, Levin et al. 2012).



Obr. 7: Schéma spolupůsobení enzymů OpgH, GalU a Pgm u *Escherichia coli* na protein OpgH, který inhibuje FtsZ (zeleně). Převzato z (Hill, Norbert S., et al. 2013).

4.2.2. Protein Sula

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

Mechanismus inhibice bakteriálního divisiomu prostřednictvím Sula spočívá v jeho vazbě s proteinem FtsZ (Gottesman, Susan 1989). 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 rozděluje 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 obojí vedlo ke zvýšení koncentrace proteinu Sula a snížení monomerů FtsZ pod práh nutný k tvorbě protofilament (Nazir, A., & Harinarayanan, R. 2016).

4.3. Metabolické senzory u dalších nemodelových typů bakterií

Jak již bylo zmíněno, bakterie se od sebe velmi liší svým metabolismem, protože žijí v různých prostředích, ale díky své dlouhé evoluci se mu stačily přizpůsobit nejrůznějšími mechanismy pro přežití. Protože se musí většina z nich vyrovnávat se stresovými podmínkami, vyvinuly se u nich různé metabolické mechanismy a senzory, které mohou mít podobný průběh a dopad jako mechanismy u modelových bakterií. Z toho důvodu budou níže zmíněny další nemodelové mikroorganismy, u kterých byla objevena přímá cesta mezi metabolismem a buněčným cyklem.

4.3.1. Transkripční faktory CceR a AkgR u *Rhodobacter sphaeroides*

R. sphaeroides patří do třídy alphaproteobacteria a je nejvýznamnějším modelem z této třídy pro genetické, biochemické i genomické studie. *R. sphaeroides* je fakultativní anaerob a může tak využívat různé akceptory elektronů.

Protein CceR patří do třídy enzymů LacI (patří sem např. proteiny Crp a Cra, regulátory katabolické represe), proto se, i díky své funkci, dá označit za homologa Cra proteinu.

Ve studii Imama a spolupracovníků se ukázalo, že CceR je DNA vazebný protein přímo potlačující nebo aktivující geny kódující enzymy Entner-Doudoroffovy dráhy (ED), glykolýzy, glukoneogeneze a F_1F_0 ATPázy. Při nedostatku glukózy se glykolýza obrací

opačným směrem a spustí se tak glukoneogeneze. Tohoto metabolického obratu se účastní CceR pod regulací intermediátu 6-fosfoglukonát (6PG), který je vyčerpána při nedostatku glukózy. 6PG je poskytován ED dráhou a inhibuje vazbu CceR s DNA, kdy tato inhibice funguje v přítomnosti i v absenci kyslíku.

CceR se váže do promotorů operonů pro geny centrálního metabolismu uhlíku. Po zmapování genomu *R. sphaeroides* vyšlo najevo, že se v něm nachází celkem 19 vazebných míst pro CceR, které představují speciální DNA sekvence. Jako inhibitor figuruje pro všechny geny kódující proteiny ED dráhy, některé geny F₀F₁ATPázy a jako aktivátor pro sukcinátdehydrogenázu, což je enzym TCA cyklu.

Protein AkgR je homologem proteinu CceR, který se přímo váže do definované 13bp sekvence promotoru pro geny kódující enzymy TCA dráhy a kooperuje s proteinem CceR.

Po osekvenování předpokládaných vazebných DNA míst pro CceR a AkgR u dalších dvaceti druhů z třídy alphaproteobacteria se ukázalo, že případné homology těchto enzymů se nachází pravděpodobně ve všech dalších alphaproteobacteriích (Imam et al. 2015).

4.3.2. Protein Ga5DH u *Streptococcus suis*

S.suis je G⁺, patogenní bakterie z třídy Bacilli mající anaerobní metabolismus. Ga5DH je membránově vázaný protein, který katalyzuje reverzibilní přeměnu 5-ketoglukonát na D-glukonát. Při jeho absenci se ukázalo, že potomci 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 má i Ga5DH přímý či nepřímý vliv na FtsZ a tím funguje jako metabolický senzor přímo přenášející signál do dělicího aparátu buňky (Shi, Zhongyu, et al. 2014).

4.3.3. Protein OatA u *Lactobacillus planatarum*

L. planatarum je G⁺, aerotolerantní bakterie z třídy Bacilli. Podobně jako lokalizace pyruvátu v dělicích se buňkách, existují i u jiných bakterií proteiny pohybující se podle polohy nukleoidu, je jím například protein OatA u *Lactobacillus planatarum*. OatA má 11 transmembránových úseků na N konci a katalytickou doménu na C konci. O-acetyltransferáza (OatA) má již známou enzymatickou aktivitu, je jí O-acetylace peptidoglykanu. Ukázalo se, že OatA se rekrutuje 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 výzkum ukázal, že při absenci proteinu OatA byla narušena funkce systému Min (Bernard, Elvis, et al. 2012).

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

C.crescentus je G⁻, oligotrofní, dimorfická (tvoří plovoucí a přisedlou formu), aerobní bakterie z třídy alphaproteobacteria. *C.crescentus* se v probírané problematice stal významným modelem, ale má řadu odlišností a rozdílné mechanismy, proto je mu věnována samostatná kapitola. *Caulobacter* se již stal plodným modelem pro výzkum buněčného cyklu, protože se dělí asymetricky a má řadu unikátních kroků při dělení (viz obr. 8).

5.1. Regulace DnaA při hladovění

Na rozdíl od předchozích zmiňovaných mikroorganismů jsou u *C. crescentus* nutričně ovlivňovány přímo hlavní iniciační proteiny replikace. U *C. crescentus* jsou dva důležité a to inhibitor CtrA, který se váže do Cori (origin u *Caulobacter*) pro ukončení replikace (Quon, Kim C., et al. 1998) a protein DnaA, který replikaci v místě Cori aktivuje (Gorbatyuk et al. 2001). Protein CtrA je multiregulační transkripční faktor kódující nejméně 14 genů pro proteiny zastávající nejrůznější funkce, jako jsou replikace DNA nebo dělení buněk.

V nehladovějících buňkách se udržuje bazální hladina (p)ppGpp, která nijak neovlivňuje funkci DnaA, při vystavení nutričnímu stresu a akumulaci nukleotidů (p)ppGpp se však spustí proteolýza DnaA, čímž se inhibuje iniciace replikace (Lesley, Shapiro 2008). Nukleotidy (p)ppGpp jsou zde syntetizovány pouze proteinem SpoT při nedostatku glukózy i aminokyselin (Boutte and Crosson, 2011).

Pokles živin v buňce také působí pokles exprese genu *dnaA* kódujícího protein DnaA, a to dokonce nezávisle na globálním stresovém nukleotidu (p)ppGpp, jak ukázala starší studie (Lesley and Shapiro 2008). Mechanismus závisí na existenci 5'netranslatujícího regionu transkriptu *dnaA* (5'UTR). Nejpravděpodobnější hypotézou je, že zatím neznámá malá nekódující molekula RNA, produkovaná při hladovění, se váže na tuto sekvenci a působí změny v sekundární struktuře mRNA, což ovlivní vazebná místa na ribozomu a zastaví translaci (Leslie, David J., et al. 2015).

V proteotoxickém stresu se hromadí nesbalené proteiny, které alostericky stimulují Lon proteázu (z třídy Lac I proteáz) k proteolytické degradaci iniciačního proteinu DnaA (Jonas,

Kristina, et al. 2013). Předpokládá se, že Lon protéza zaujímá svou funkci i v nutričním stresu, ta však zůstává stále předmět studia.

5.2. Protein KidO – vazebný regulátor FtsZ

KidO (oxidoreduktáza) je NAD(H) vazebný protein, který destabilizuje laterální interakce mezi protofilamenty FtsZ kooperací s dalším proteinem GdhZ a při dělení buněk je lokalizován ve středu. Protein KidO brání předčasnému složení Z prstence během G1 fáze, kdy se *Caulobacter* nachází ve stavu plovoucí buňky a naopak podporuje jeho vznik během G2 fáze (viz obr. 8).

Protein KidO stimuluje DivJ kinázu, která katalyzuje reverzní fosforylaci fosfotransferázy DivK fosfatázou PleC (Hecht et al., 1995; Matroule et al., 2004; Wheeler and Shapiro, 1999). DivK_P zpětně moduluje aktivitu PleC a DivK (Paul et al., 2008). Fosforylaci DivK je zajištěn přechod mezi plovoucí a přisedlou formou (G1 -> S transice).

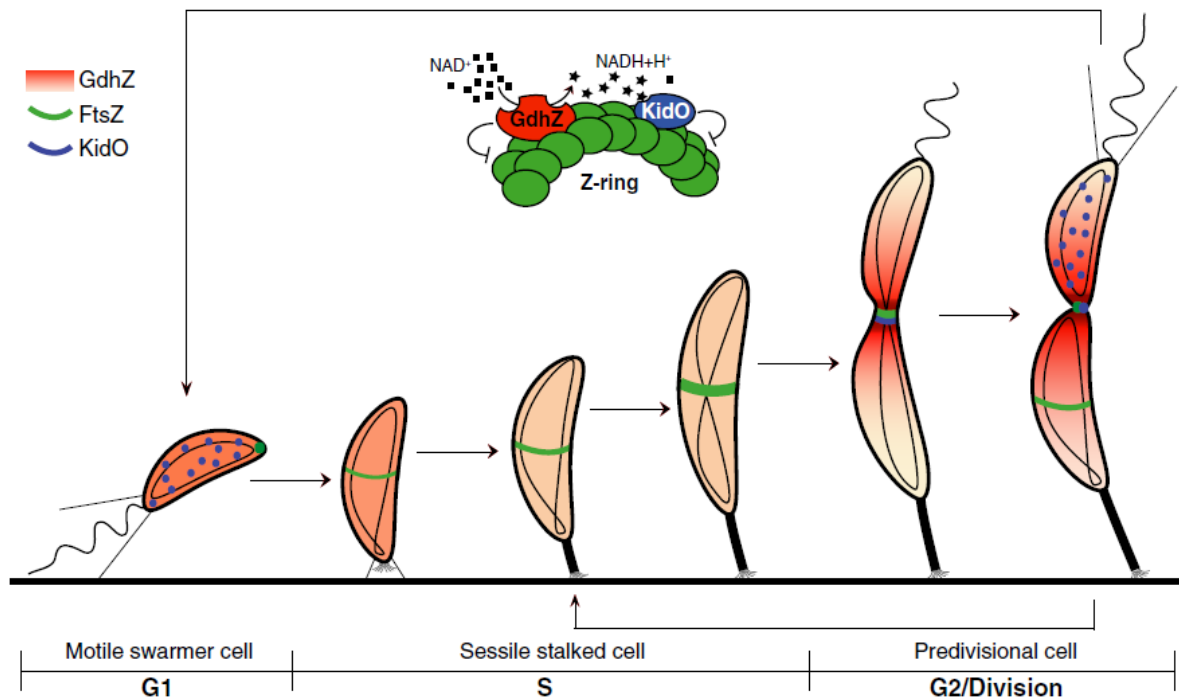
KidO váže kofaktory NAD⁺ (nikotinamidadenindinukleotid) a NAD(H), které jsou důležité pro regulaci FtsZ, ale nikoliv pro DivJ. Hypotéza jak působí KidO na DivJ je, že KidO kooperuje s SpmX, což je nezávislý aktivátor DivJ. Dále se ukázalo, že pro funkci KidO je důležité hlavně vazebné místo kofaktoru NAD(H) a ne jeho enzymatická aktivita (Radhakrishnan et al. 2010).

5.3. Protein GdhZ – regulátor GTPázové aktivity FtsZ

GdhZ (glutamátdehydrogenáza) je NAD dependentní protein regulující rozkládání Z prstence. Z prsteneček by se nejspíše nemohl bez asistence proteinu GdhZ vůbec rozložit. GdhZ katalyzuje přeměnu glutamátu na α -ketoglutarát a amoniak s využitím NAD(P)H jako kofaktoru, čímž vytváří můstek mezi TCA a cyklem dusíku (viz obr. 9). Stejně jako KidO i GdhZ podporuje vznik prstence v G1 fázi a degradaci v G2 fázi (viz obr. 8). Protein GdhZ se rekrutuje do dělicího místa v závislosti na pohybu proteinu FtsZ. Jeho působení na FtsZ spočívá v regulaci jeho GTPázové aktivity, ke které je zcela nezbytná molekula NAD⁺ a glutamát. Jako mnoha dalších genů u *C. crescentus* je i zde transkripce genu *gdhZ* regulována faktorem CtrA a jeho fosforylací/defosforylací.

Ukázalo se, že proteiny KidO a GdhZ sdílí stejnou regulační cestu, nejprve jsou oba degradovány podjednotkou peptidázy (ClpXP) mezi G1 a S fází, poté se pod regulací CtrA transkribují geny *gdhZ* a *kidO* a společně pak spustí depolymerizaci Z prstence v G2 fázi.

Vztah mezi KidO a GdhZ je nezbytný také proto, že GdhZ produkuje molekulu NADH, která umožňuje interakci KidO s FtsZ (Beaufay, François, et al. 2015).



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

6. Závěr

Měnící se nutriční podmínky prostředí, ve kterých musí bakterie přežít, způsobily vývoj mnoha různých mechanismů pro zvládnutí stresu, které se odehrávají na různých úrovních buněčného cyklu. Mnoho regulačních mechanismů bylo popsáno již dávno, jako například katabolická represe nebo sigma faktory RNA polymerázy, jiné jsou zcela unikátní a nové.

Velmi zmiňován je v této práci nukleotid (p)ppGpp, který se dá označit za multifunkční, protože působí v různých stresových odpovědích. Nejznámější je stringentní odpověď, která (p)ppGpp produkuje. Nově popsaná role pro (p)ppGpp se ukázala být vazba s DnaG primázou, která zastavuje syntézu primeru, takže se vlastně jedná o přímou inhibici na úrovni zdvojení genetické informace. Nukleotidy (p)ppGpp také působí na sigma faktory ovlivněním jejich hladiny a kompeticí o vazebné místo na RNA polymeráze (RNAP).

Na spojení metabolismu a buněčného cyklu se nemálo podílí transkripční faktory, které ovlivňují expresi genů kódující enzymy, které figurují v hlavních metabolických cyklech. V této práci jsou zmíněny Cra (catabolite repressor activator) a Crp (cAMP receptor protein),

známý svým působením v katabolické represi u *E.coli* a transkripční faktory CceR a AkgR u *R.sphareoides*.

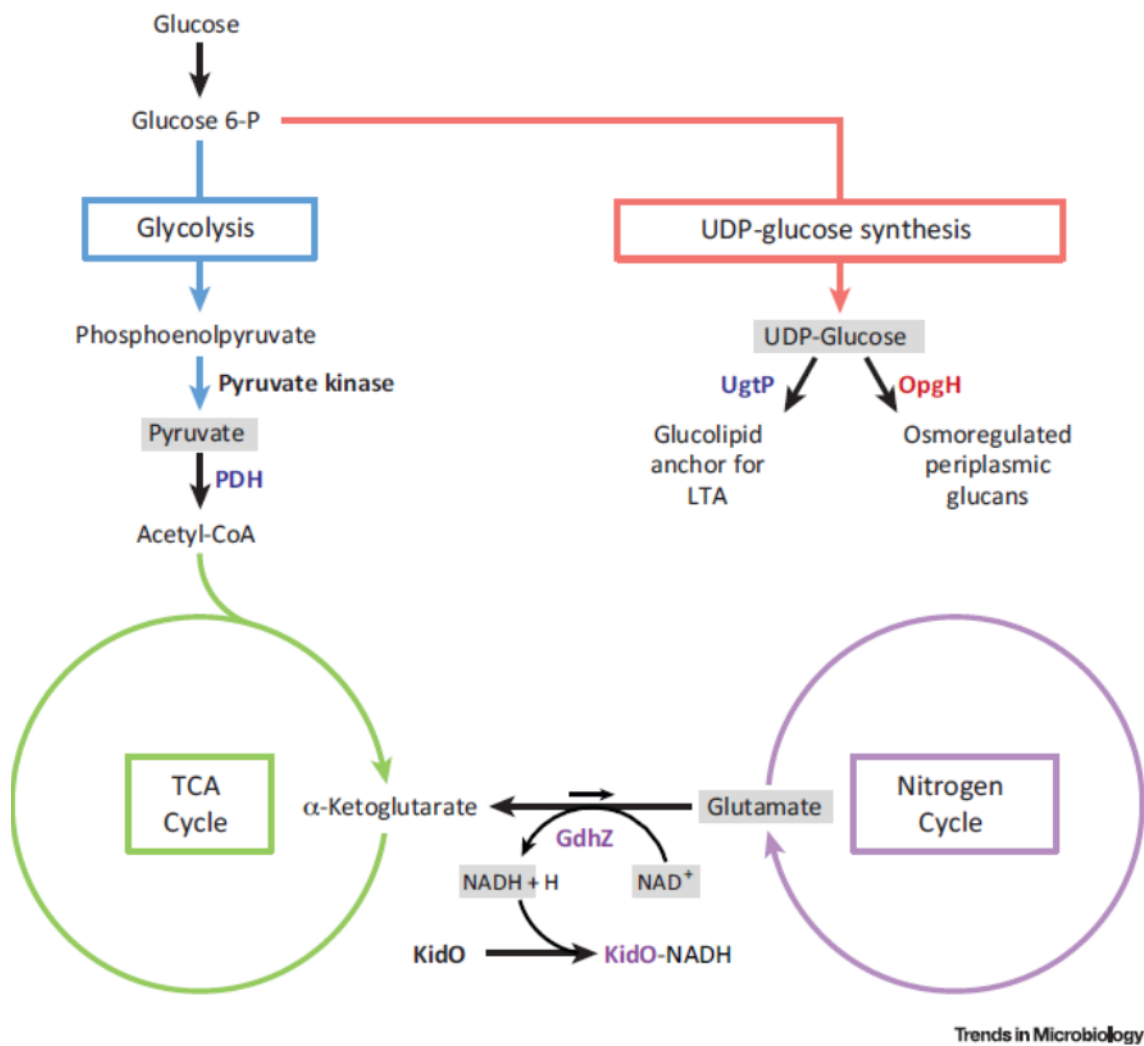
Stěžejní kapitolou této práce byla identifikace a shrnutí nejnovějších poznatků o přímé kontrole buněčného cyklu, která zahrnovala enzymy hlavních metabolických drah. Protože bakterie musí rychle modulovat svůj buněčný cyklus, vyvinuly se u nich enzymy, které dokážou přijmout signál o změně nutričního stavu a přímo ho předat do komponent bakteriálního divisomu. Nejčastěji se jedná o inhibici složení dělicího Z prstence, jak je tomu u proteinu OpgH a SulA u *E.coli* nebo u proteinu UgtP a pyruvátu 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 homology, jako například protein UgtP a protein OpgH, jejichž produkce je závislá na glykolýze. Vyvinuté mechanismy jsou vždy závislé na metabolismu, který daný organismus využívá (viz obr. 9).

Práce v neposlední řadě také zmiňuje další nemodelové organismy, které mají vyvinuté podobné mechanismy jako organismy modelové, například protein OatA u *L.planatarum* zasahující do regulačních mechanismů skládání bakteriálního divisomu nebo protein Ga5DH u *S.suis* vážící se na protein FtsZ.

Samostatnou kapitolu získal organismus *C.crescentus* protože má řadu zvláštností, například působení poklesu živin na hlavní iniciační protein DnaA a to hned několika způsoby, včetně působení multiregulačního alarmonu (p)ppGpp. Dále zde figurují podobné proteiny jako u *B.subtilis* a u *E.coli*, které nejsou jejich homology, ale jsou homology vzájemnými, jde o proteiny KidO a GdhZ, oba stimulující protein FtsZ. Proteiny KidO a GdhZ jsou produktem cyklu dusíku a nezbytným pro jejich funkci je i vedlejší produkt reakce NADH (viz obr. 9).

Tato práce zahrnuje mechanismy velmi dobře pospané 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 rostoucímu zájmu ujasnit všechny mechanismy související s metabolickou kontrolou, budou výše zmíněné mechanismy popsány na nižší, více molekulární úrovni. Také se nejspíše budou objevovat nové poznatky a spojitosti, a to jak u již známých regulačních mechanismů, tak u mechanismů dosud zcela skrytých.

Metabolic Links to Bacterial Cell Division



Obr. 9: Základní schéma glykolýzy, TCA cyklu a cyklu dusíku s barevně vyznačenými enzymy, které hrají důležitou roli v metabolické kontrole. Modrá (UgtP) je pro organismus *Bacillus subtilis* a červená (OpgH) pro *Escherichia coli*, fialová (GdhZ a KidO) pak pro *Caulobacter crescentus*. Převzato z (Monahan L. G., Harry E. J. 2016).

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.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2198>
- 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.
<https://doi.org/10.15252/emboj.201490177>
- 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.
<https://doi.org/10.15252/emboj.201490730>
- Bendezú, F. O., Hale, C. A., Bernhardt, T. G., & Aj De Boer, P. (2009). RodZ (YfgA) is required for proper assembly of the MreB actin cytoskeleton and cell shape in *E. coli*. *The EMBO Journal*, 28264(3), 193-204.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2008.264>
- 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).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047893>
- 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.
- Billen, D., & Hewitt, R. (1966). Influence of starvation for methionine and other amino acids on subsequent bacterial deoxyribonucleic acid replication. *Journal of Bacteriology*, 92(3), 609-617.
- Boer, P. A. J. de. (2010). Advances in understanding *E. coli* cell fission. *Current opinion in microbiology*, 13(6), 730-737.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.015>.Advances
- Boutte, C. C., Henry, J. T., & Crosson, S. (2012). ppGpp and polyphosphate modulate cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 194(1), 28-35.
<https://doi.org/10.1128/JB.05932-11>

- 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.
<https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4455-4465.2002>
- Carey, J. R., Durfee, W. K., Bhatt, E., Nagpal, A., Weinstein, S. A., Anderson, K. M., & Lewis, S. M. (2007). Comparison of finger tracking versus simple movement training via telerehabilitation to alter hand function and cortical reorganization after stroke. *Neurorehabilitation and neural repair*, *21*(3), 216-232.
- 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.
<https://doi.org/10.1128/JB.01981-05>
- Costanzo, A., Nicoloff, H., Barchinger, S. E., Banta, A. B., Gourse, R. L., & Ades, S. E. (2008). ppGpp and DksA likely regulate the activity of the extracytoplasmic stress factor σ^E in *Escherichia coli* by both direct and indirect mechanisms. *Molecular Microbiology*, *67*(3), 619-632.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06072>
- 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., Tehranchi, 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.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.024>
- Divakaruni, A. V., Loo, R. R. O., Xie, Y., Loo, J. a., & Gober, J. W. (2005). The cell-shape protein MreC interacts with extracytoplasmic proteins including cell wall assembly complexes in *Caulobacter crescentus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(51), 18602-18607.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0507937102>
- Duggin, I. G., & Wake, R. G. (2002). Termination of chromosome replication. In *Bacillus subtilis* and its closest relatives (pp. 87-95). *American Society of Microbiology*.
- Durfee, T., Hansen, A. M., Zhi, H., Blattner, F. R., & Ding, J. J. (2008). Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *190*(3), 1084-1096.
<https://doi.org/10.1128/JB.01092-07>

- 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.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2013.129>
- Ferullo, D. J., & Lovett, S. T. (2008). The stringent response and cell cycle arrest in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 4(12), 21-23.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000300>
- Gitai, Z., Dye, N. A., Reisenauer, A., Wachi, M., & Shapiro, L. (2005). MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. *Cell*, 120(3), 329-341.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.007>
- Gopalkrishnan, S., Nicoloff, H., & Ades, S. E. (2014). Co-ordinated regulation of the extracytoplasmic stress factor, sigmaE, with other *Escherichia coli* sigma factors by (p)ppGpp and DksA may be achieved by specific regulation of individual holoenzymes. *Molecular Microbiology*, 93(3), 479-493.
<https://doi.org/10.1111/mmi.12674>
- Gorbatyuk, B., & Marczynski, G. T. (2001). Physiological consequences of blocked *Caulobacter crescentus* dnaA expression, an essential DNA replication gene. *Molecular Microbiology*, 40(2), 485-497.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02404.x>
- 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.
- Hecht, G. B., & Newton, A. (1995). Identification of a novel response regulator required for the swarmer-to-stalked-cell transition in *Caulobacter crescentus*. *Journal of bacteriology*, 177(21), 6223-9. Repéré à
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=177463&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 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).
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003663>
- 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.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.14819>
- Chen, Y., Milam, S. L., & Erickson, H. P. (2013). Mechanism, 51(14), 3100-3109.
<https://doi.org/10.1021/bi201669d.SulA>

- 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.
<https://doi.org/10.1111/mmi.12007>.Changes
- 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.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1018674108>
- Imam, S., Noguera, D. R., & Donohue, T. J. (2015). CceR and AkgR regulate central carbon and energy metabolism in alphaproteobacteria. *mBio*, *6*(1), 1-15.
<https://doi.org/10.1128/mBio.02461-14>
- 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.
<https://doi.org/10.1101/gad.227902>
- 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.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00287-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00287-2)
- Katayama, T., Ozaki, S., Keyamura, K., & Fujimitsu, K. (2010). Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for dnaA and oriC. *Nature reviews. Microbiology*, *8*(3), 163-70. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2314>
- Kruse, T., Bork-Jensen, J., & Gerdes, K. (2005). The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. *Molecular Microbiology*, *55*(1), 78-89.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04367.x>
- Lark, K. G., & Lark, C. (1966). Regulation of chromosome replication in *Escherichia coli*: a comparison of the effects of phenethyl alcohol treatment with those of amino acid starvation. *Journal of molecular biology*, *20*(1), 9-19.
- 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.
<https://doi.org/10.1126/science.282.5393.1516>

- Lemon, K. P., & Grossman, A. D. (2000). Movement of replicating DNA through a stationary replisome. *Molecular Cell*, 6(6), 1321-1330.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00130-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00130-1)
- 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.
<https://doi.org/10.1128/JB.00700-08>
- 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.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005342>
- 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.
- Magnusson, L. U., Farewell, A., & Nyström, T. (2005). ppGpp: A global regulator in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*, 13(5), 236-242.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.03.008>
- Marsh, R. C., & Hepburn, M. L. (1980). Initiation and termination of chromosome replication in *Escherichia coli* subjected to amino acid starvation. *Journal of Bacteriology*, 142(1), 236-242.
- Matroule, J. Y., Lam, H., Burnette, D. T., & Jacobs-Wagner, C. (2004). Cytokinesis monitoring during development: Rapid pole-to-pole shuttling of a signaling protein by localized kinase and phosphatase in *Caulobacter*. *Cell*, 118(5), 579-590.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.019>
- Monahan, L. G., & Harry, E. J. (2013). Identifying how bacterial cells find their middle: A new perspective. *Molecular Microbiology*, 87(2), 231-234.
<https://doi.org/10.1111/mmi.12114>
- 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.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00935-14>
- Monahan, L. G., & Harry, E. J. (2016). You Are What You Eat: Metabolic Control of Bacterial Division. *Trends in Microbiology*, 24(3), 181-189.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.11.007>
- Murray, H., & Koh, A. (2014). Multiple regulatory systems coordinate DNA replication with cell growth in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genetics*, 10(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004731>

- 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.
- 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.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.009>
- Paul, R., Jaeger, T., Abel, S., Wiederkehr, I., Folcher, M., Emanuele, G., Jenal, U. (2010). Allosteric regulation of histidine kinases by their cognate response regulator determines cell fate. *Cell*, *133*(3), 452-461.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.045>.
- 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.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.030>
- 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.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=283264&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 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.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.10.024>
- 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.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.012903.074300>
- Rymer, R. U., Solorio, F. A., Tehrani, 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.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2012.05.017>

- 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.
<https://doi.org/10.1007/s13238-014-0074-8>
- Shimada, T., Fujita, N., Yamamoto, K., & Ishihama, A. (2011). Novel roles of camp receptor protein (CRP) in regulation of transport and metabolism of carbon sources. *PLoS ONE*, 6(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020081>
- Shimada, T., Yamamoto, K., & Ishihama, A. (2011). Novel members of the Cra regulon involved in carbon metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 193(3), 649-659.
<https://doi.org/10.1128/JB.01214-10>
- Shiomi, D., Sakai, M., & Niki, H. (2008). Determination of bacterial rod shape by a novel cytoskeletal membrane protein. *Embo J*, 27(23), 3081-3091.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2008.234>
- 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.
- Soufo, C. D., Soufo, H. J. D., Noirot-Gros, M. F., Steindorf, A., Noirot, P., & Graumann, P. L. (2008). Cell-cycle-dependent spatial sequestration of the dnaA replication initiator protein in *Bacillus subtilis*. *Developmental Cell*, 15(6), 935-941.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.09.010>
- 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.
<https://doi.org/10.1111/mmi.12457>
- Tehranchi, A. K., Blankschien, M. D., Zhang, Y., Halliday, J., Peng, J., Herman, C., & Wang, J. D. (2011). The transcription factor DksA prevents disruption of DNA replication upon nutritional stress, *141*(4), 595-605.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.036>
- Trempey, J. E., & Gottesman, S. (1989). Alp, a suppressor of lon protease mutants in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 171(6), 3348-3353.
- 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.

- Wheeler, R. T., Gobert, J. W., & Shapiro, L. (1998). Protein localization during the *Caulobacter crescentus* cell cycle. *Current opinion in microbiology*, 1(Figure 1), 636-642.
- White, C. L., Kitich, A., & Guber, J. W. (2010). Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD. *Molecular Microbiology*, 76(3), 616-633.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07108>.
- Woldringh, C. L. (2002). The role of co-transcriptional translation and protein translocation (transertion) in bacterial chromosome segregation. *Molecular Microbiology*, 45(1), 17-29.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02993>.
- 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.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.002>
- 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.
<https://doi.org/10.1038/>