

Regulacija sekundarnega metabolizma pri glivah

Regulation of fungal secondary metabolism

Axel A. Brakhage

Seminar pripravila: Maruša Novak

Vsebina predavanja

- Glive in njihova delitev
- Metabolizem (primarni, sekundarni metaboliti)
- Sekundarni metaboliti pri glivah (vloga, biosinteza, urejenost na genetskem nivoju)
- Regulacija sekundarnih metabolitov z globalnimi in potno-specifičnimi transkripcijskimi faktorji
- Regulacija sekundarnih metabolitov z modifikacijami kromatina (metilacija in acetilacija histonov)
- Utišane skupine genov in strategije iskanja novih sekundarnih metabolitov ter zaključki

Splošno o glivah

- Heterotrofni, evkariontski organizmi
- V vseh ekoloških nišah
- Pomembne
 - kot razkrojevalci organskih snovi
 - kot proizvajalci antibiotikov, imunosupresivov, zniževalcev holesterola
 - pri procesiranju hrane in pijače
- Delitev: kvasovke, plesni (filamentozne glive), prave glive

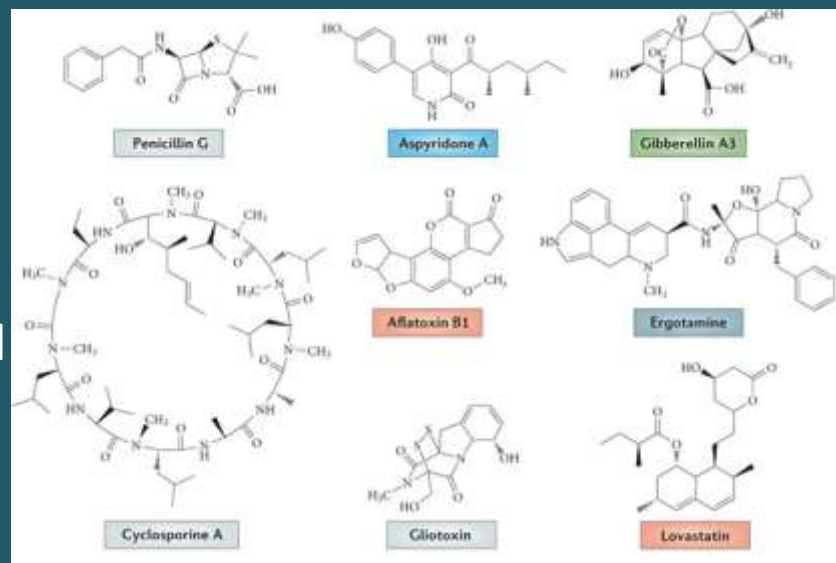


Metabolizem

- Skupek kemičnih transformacij v celicah, ki omogoča njihovo preživetje
- Encimsko katalizirane reakcije
- Primarni metaboliti: nujno potrebni za normalno rast, razvoj in razmnoževanje organizma
- Sekundarni metaboliti:
 - za preživetje organizma niso nujno potrebni
 - odsotnost vpliva na preživeljivost, sposobnost za razmnoževanje, morfologijo ali pa sploh ne vpliva
 - strukturno heterogene molekule z nizkimi molekulskimi masami
 - proizvajajo predstavniki različnih skupin organizmov (bakterije, glive, rastline in živali)

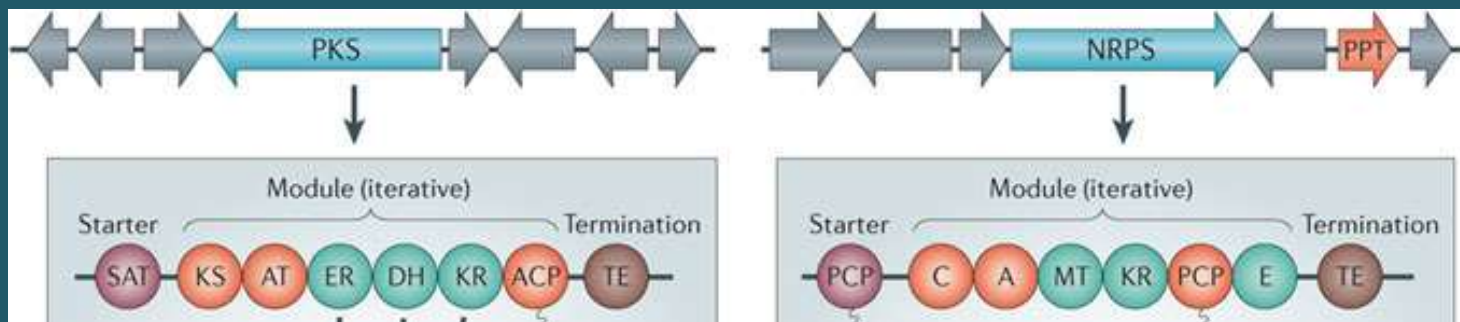
Sekundarni metaboliti pri glivah

- Veliko število različnih sekundarnih metabolitov
- Medsebojna komunikacija, obramba habitata ter zaviranje rasti kompetitorjev
- Pomembni za človeka (antibiotiki, zaviralci imunskega odziva, zniževalci holesterola)
- Sintetizirajo se iz različnih spojin:
 - derivati ne-ribosomalnih peptidov (penicilini, cefalosporini, ciklosporini),
 - derivati poliketidov (lovastatin, eritromicin),
 - mešanica obeh omenjenih skupin molekul (aspiridoni) ali
 - derivati drugih molekulskih skupin, kot npr. terpenov (giberelini) ali maščobnih kislin (oksilipini)



Organizacija genov sekundarnih metabolitov

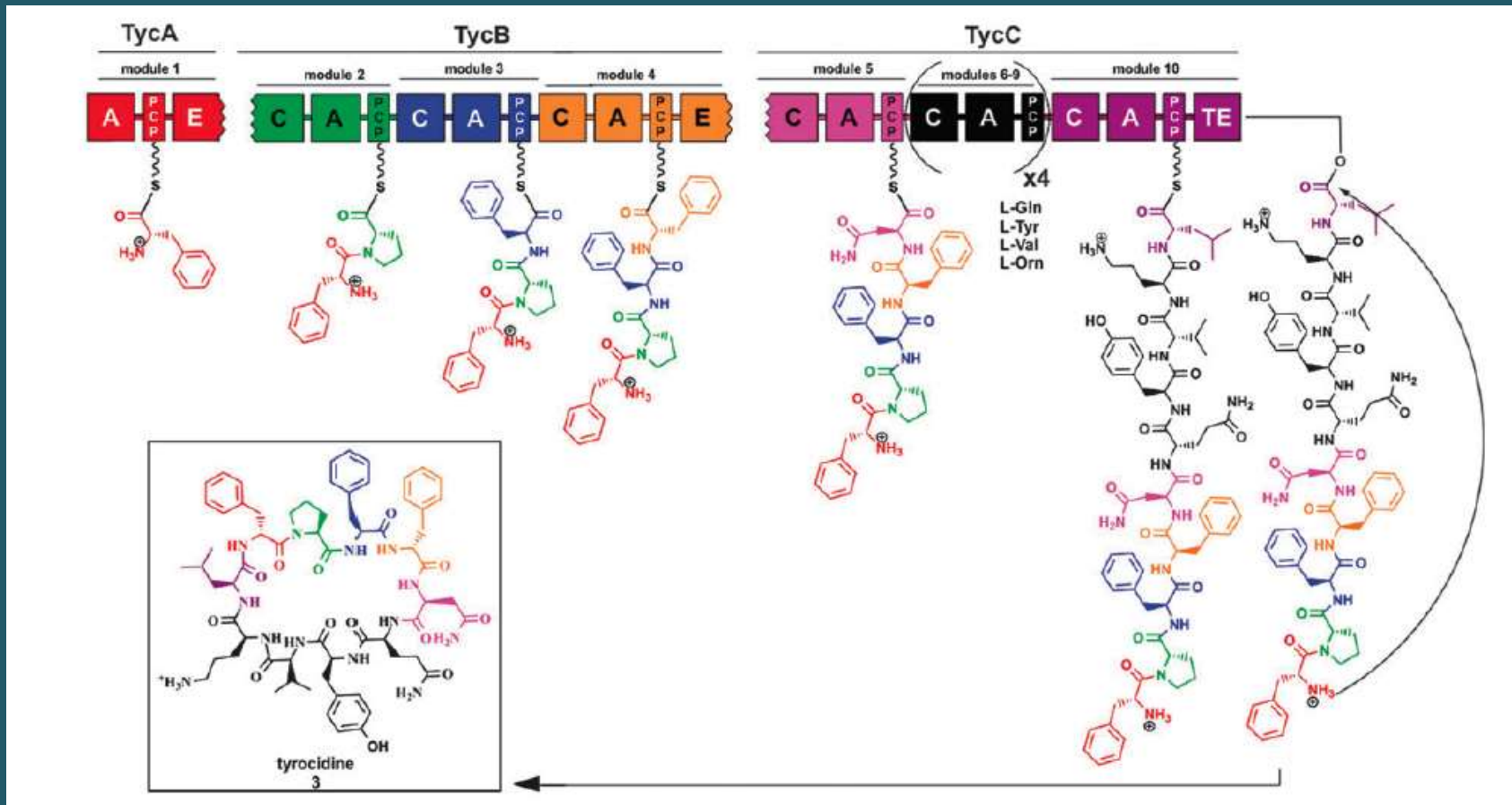
- Združeni v klastre z značilno sestavo :
 - en ali več centralnih genov, ki kodirajo encime za biosintezo
 - geni, ki kodirajo proteine odgovorne za modifikacije (t.i. krojaški encimi), transport in regulacijo celotnega procesa
- Encimi
 - poliketid sintaze (PKS),
 - ne-ribosomalne peptid sintaze (NRPS),
 - geranil-geranil difosfat sintaza



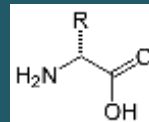
Encimi iz skupin PKS in NRPS

- Podobni strukturno in po mehanizmu sinteze končnega produkta
- Modularna ureditev
- Posamičen module odgovoren za en sintezni korak
- Modul nadalje razdeljen na domene (specifične spremembe dodane enote - adenilacija, kondenzacija...)

Mehanizem biosinteze sekund. metabolitov - NRPS



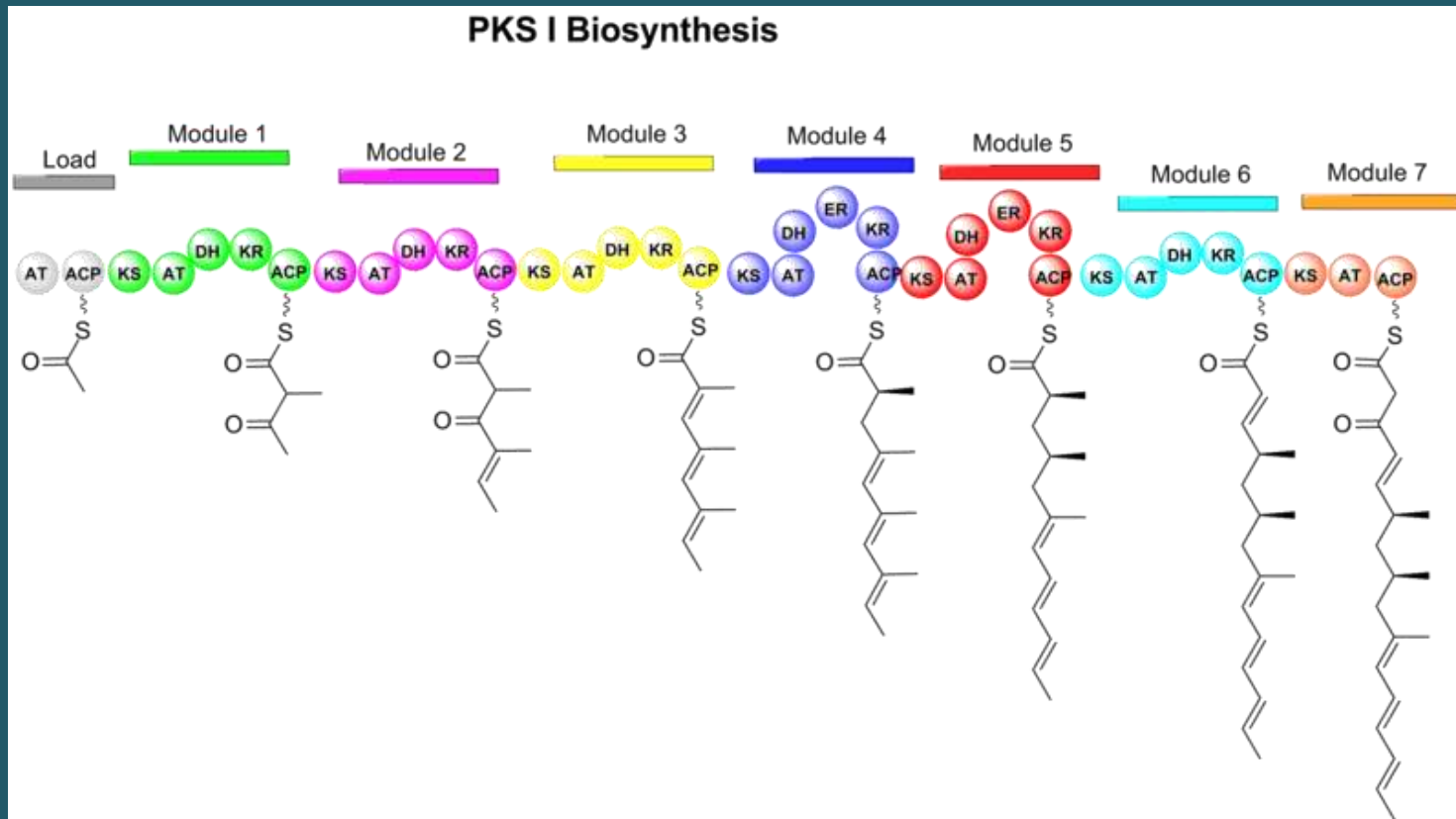
• Osnovna gradbena enota: amino kisline



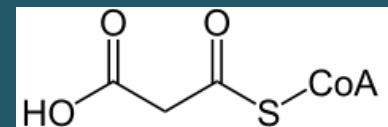
• Adenilacijska, tiolacijska in kondenzacijska domena

• Druge domene: metiltransferazna, epimerizacijska, oksidacijska...

Mehanizem biosinteze sekund. metabolitov - PKS



• Osnovna gradbena enota: malonil-CoA ali metilmalonil-CoA



• Aciltransferazna domena, acil-prenašalni protein in ketoacil sintazna domena

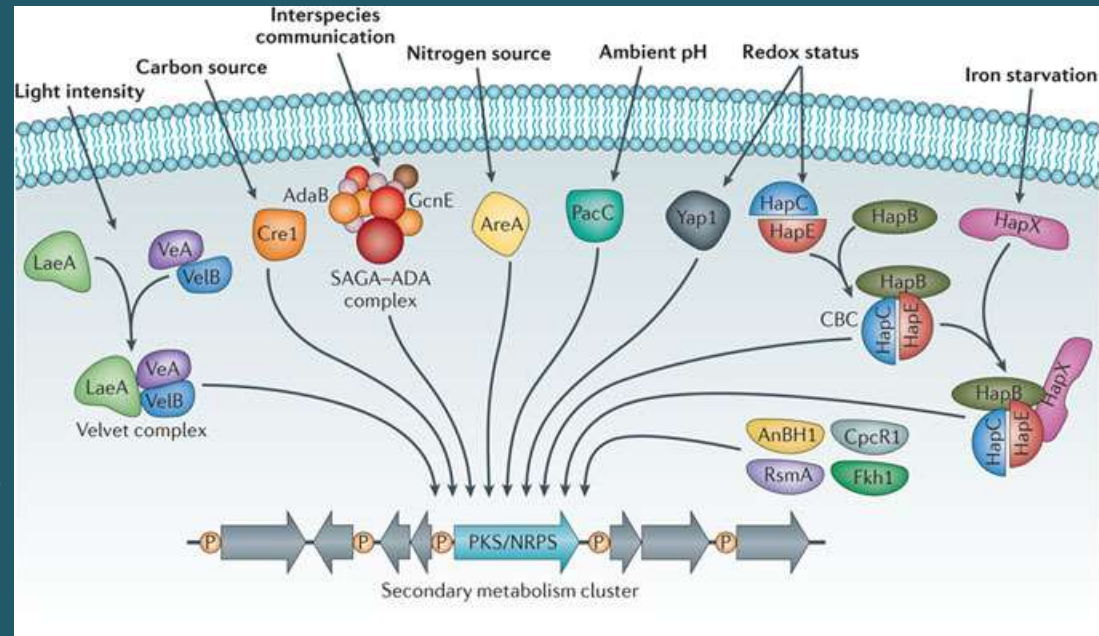
• Druge domene: reduktazna, dehidratazna, metiltransferazna...

Kodirajoči (kriptični) genski klastri

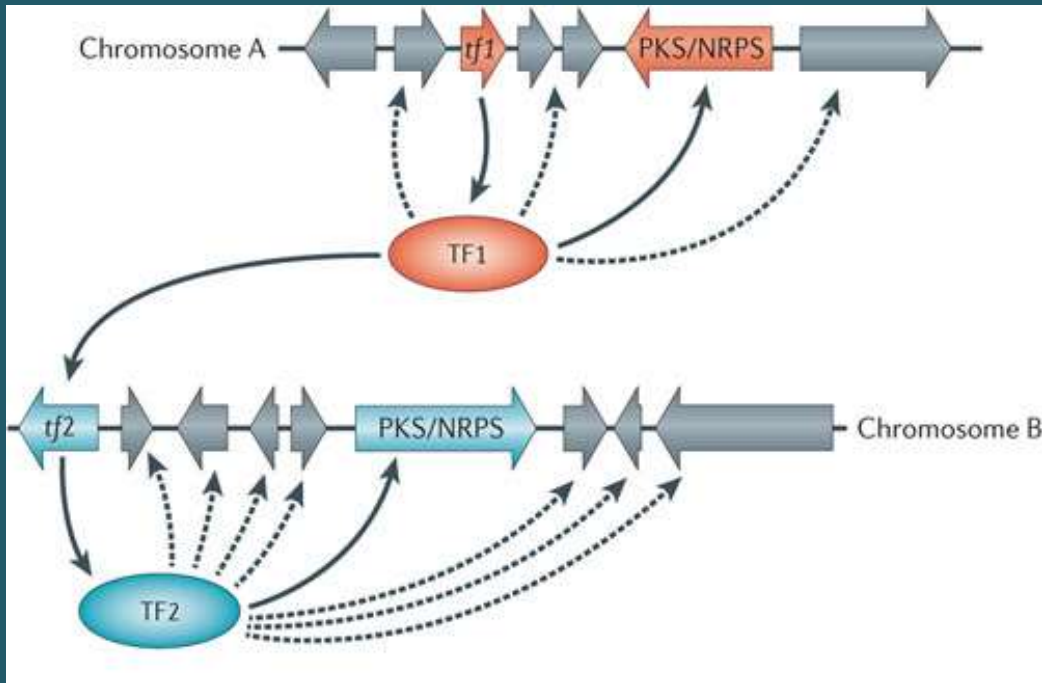
- Na podlagi znanih sekvenc genomov in poznavanju značilne sestave klastrov, so se razvila bioinformacijska orodja, ki omogočajo identifikacijo genskih klastrov sekundarnih metabolitov → kodirajoči ali kriptični genski klastri
- Identiteta, struktura in funkcija večine teh metabolitov ostaja neznana
- Število takih klastrov je veliko → veliko naravnih produktov – potencialnih virulentnih faktorjev, toksinov, zdravil, ki jih je še potrebno odkriti in podrobneje opredeliti
- Pomembno vlogo pri odkrivanju teh produktov in opredeljevanju pa imajo tudi različni regulatorni mehanizmi sekundarnega metabolizma in naše poznavanje le-teh

Regulacija – transkripcijski faktorji (TF)

- **Kompleksna regulacija biosinteznih poti**
- **Regulatorne molekule se odzivajo na stimule iz okolja (vir ogljika in dušika, pH, pomanjkanje železa...)**
- **Regulacija na globalnem nivoju z globalno aktivnimi TF in/ali s potno-specifičnimi TF**



Potno-specifični TF



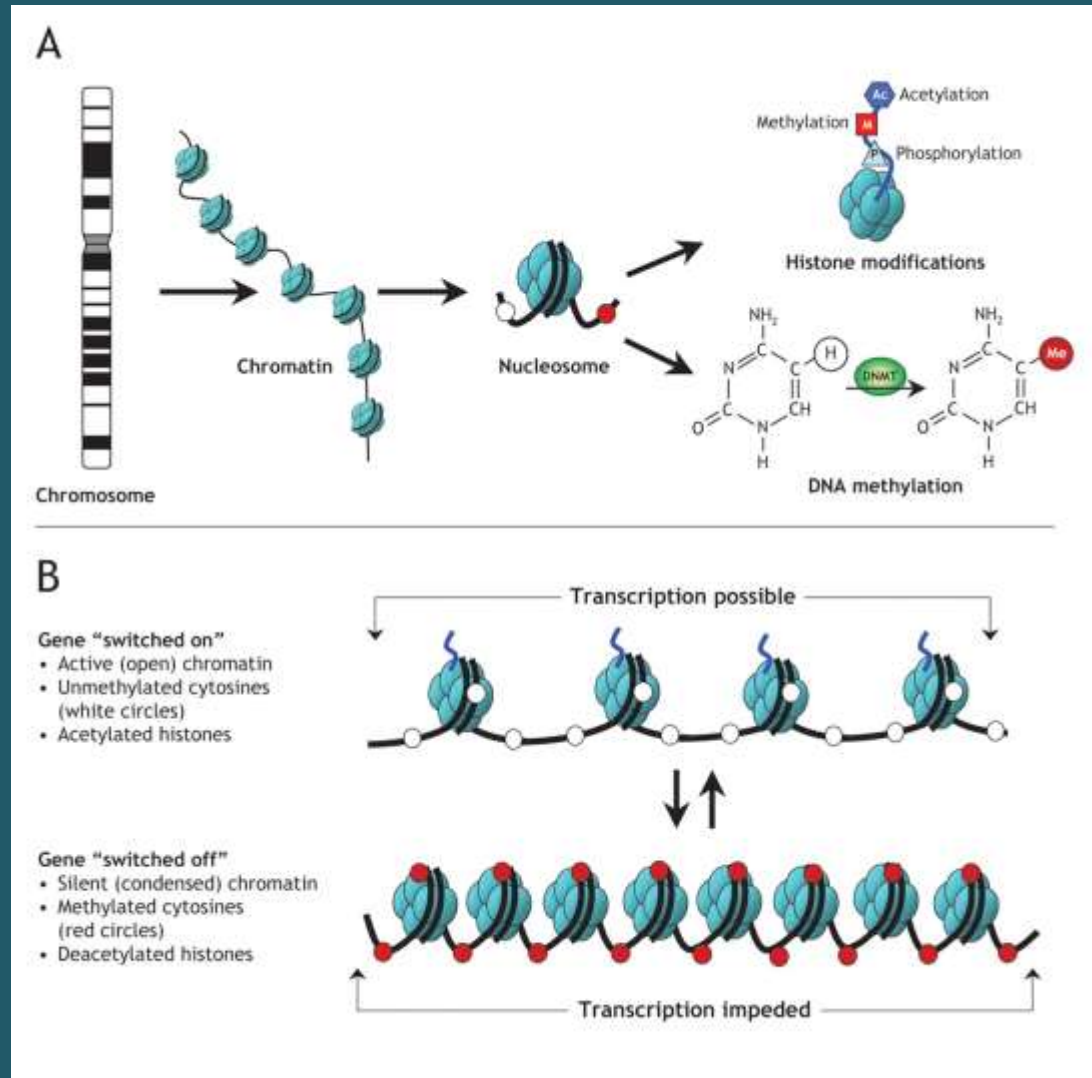
- Geni za te TF načeloma na klastru, katerega gene regulirajo
- Pri večini klastrov zapis za en potno-specifični TF, lahko več
- TF načeloma regulira vse gene v klastru
- TF lahko regulira dva genska klastra na različnih kromosomih
- Signali in signalne kaskade za aktivacijo teh TF še neznani

Globalno aktivni TF

- Kodirajo geni, ki niso del nobenega klastra
- Poleg genskih klastrov sekundarnih metabolitov regulirajo tudi druge gene
- Pomembni za regulacijo genskih klastrov, ki nimajo lastnega potno-specifičnega TF (penicilini in cefalosporini npr.), lahko pa regulirajo tudi genske klastre, ki imajo svoje specifične regulatorje (posredno ali neposredno?)
- Za aktivacijo potrebni signali iz okolja (sprememba pH, redoks potencial, pomanjkanje železa) ali pa signal neznan

Regulacija – modifikacije kromatina (splošno)

- DNA navita okoli histonskih oktamerov → nukleosom
- Na histonih se dogajajo razne modifikacije (metilacije, acetilacije, fosforilacije...) → boljša/slabša dostopnost DNA → aktivacija ali zavrtje prepisovanja genov



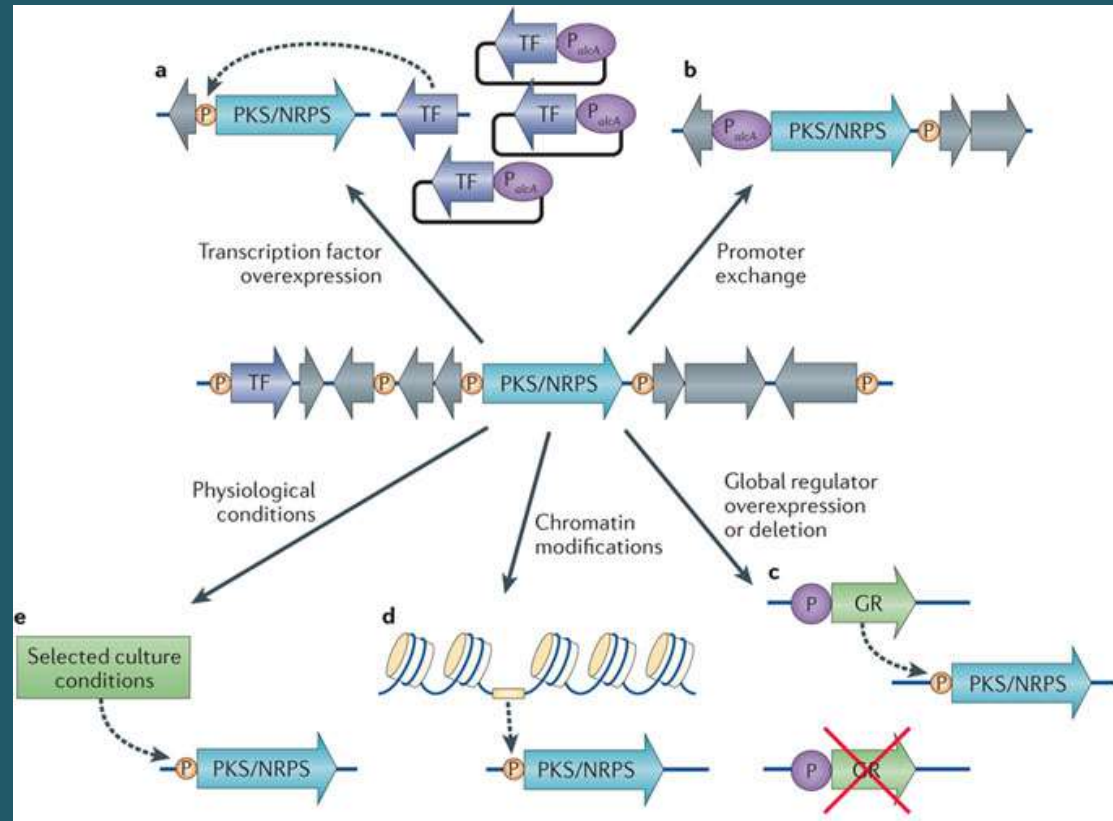
Regulacija – modifikacije kromatina (glive)

- Do zdaj znane metilacije in acetilacije histonov na določenih mestih kromosomov (LaeA z demetilacijo sproži biosintezo penicilina in sterigmatocistina)
- Modifikacije histonov tudi pod vplivom snovi drugih mikroorganizmov (bakterija *Streptomyces rapamycinicus* in gliva *Aspergillus nidulans*)
- Encimi za modifikacije histonov del večjih regulatornih kompleksov kot so SAGA-ADA, žametni kompleks
- Metilacija in acetilacija omejeni na točno določena področja kromosomov in zajemajo nekaj genov → razlog, da so geni za biosintezo sekundarnih metabolitov v klastrih
- Signali in mehanizmi aktivacije ter delovanje na točno določenih mestih kromosomov???

Utišani genski klastri – načini aktivacije

- Klasične metode gojenja v laboratoriju in spreminjanje rastnih pogojev niso dovolj za aktivacijo določenih genskih klastrov → drugačni pristopi, da pridemo do novih biomolekul

- Povečanje izražanja TF (v plazmid za inducibilni promotor)
- Zamenjava endogenega promotorja za inducibilni promotor (homologna rekombinacija)
- Delecija ali povečano izražanje globalnega regulatorja
- Manipulacija s kromatinskimi modifikacijami (inhibicija encimov za acetilacijo, metilacijo)
- Simulacija fizioloških pogojev s ko-kultivacijo



Zaključki

- Geni za biosintezo sekundarnih metabolitov se nahajajo v klastrih z značilno sestavo
- Derivati poliketidov in ne-ribosomalnih peptidov
- Regulacija biosinteze je kompleksna in poteka na globalnem nivoju z globalno aktivnimi TF ter na nivoju posameznega klastra s potno-specifičnimi TF
- Regulacija prepisovanja genskih klastrov sekundarnih metabolitov poteka tudi preko histonskih modifikacij (metilacije, acetilacije)
- Poznavanje regulatornih omrežij in signalov, ki ta omrežja aktivirajo, je pomembno, saj lahko s tem znanjem na "neklasične" načine aktiviramo utišane genske klastre sekundarnih metabolitov in pridemo do odkritja novih naravnih produktov, ki imajo lahko tudi pomembno uporabno vrednost (nova zdravila)