

UNIVERZITETNI DOKTORSKI ŠTUDIJ BIOMEDICINA

SEMINAR pri predmetu Mikrobiologija

Maruša Novak

REGULACIJA SEKUNDARNEGA METABOLIZMA PRI GLIVAH

MODERATOR SEMINARJA
prof. Srečko Koren

Ljubljana, 14.03.2013

1. Izvleček

Glive v svojem genomu vsebujejo zapise za biosintezo številnih sekundarnih metabolitov, ki imajo vlogo pri procesu transkripcije, razvoju, medsebojnem komuniciranju ter komuniciranju z drugimi organizmi. Poleg tega pa imajo nekateri uporabno vrednost tudi za človeka (številni antibiotiki, zaviralci imunskega odziva...). Geni, ki so potrebni za biosintezo sekundarnih metabolitov se v genomu nahajajo v skupinah – klastrih. Z gojenjem gliv v medijih z različno sestavo, pri različnih temperaturah, pH-ju, prezračevanju... lahko sprožimo biosintezo različnih sekundarnih metabolitov. Številni genski klastri za sekundarne metabolite pa kljub spreminjanju rastnih pogojev ostajajo utišani. Ti utišani genski klastri predstavljajo nabor naravnih produktov, med katerimi bi lahko našli nove virulentne faktorje, toksine in zdravila. Da bi lahko podrobneje proučevali funkcije in lastnosti teh utišanih sekundarnih metabolitov, je ključno poznavanje regulatornih omrežij in signalov, ki ta regulatorna omrežja aktivirajo. Nekaj je o tem že znanega, še več pa bo potrebno odkriti, da bomo lahko bolj celostno razumeli pomen sekundarnih metabolitov za glive in njihovo regulacijo.

2. Vsebina

Na splošno o glivah

Glive so heterotrofni, evkariontski organizmi, ki spadajo v samostojno kraljestvo gliv (Fungi). Večina je pritrjenih (izjema je deblo Chytridiomycota). V naravi jih najpogosteje najdemo kot prostoživeče saprofite (njihova hrana so odmrle organske snovi), lahko pa so tudi zajedalci ali simbionti. Prisotne so v skoraj vseh ekoloških nišah. Najbolje uspevajo v vlažnih okoljih in pri temperaturah od 15-35°C¹.

Glive so pomembne kot razkrojevalci odmrlih organskih snovi, s čimer sodelujejo pri kroženju snovi v ekosistemih. Sposobne so razgraditi celulozo in lignin. Nekatere proizvajajo antibiotike, ki zavirajo ali preprečujejo rast nekaterih vrst bakterij, ali imunosupresive (ciklosporine). V živilski industriji se uporabljajo pri procesiranju hrane (v pekarnah, pivovarnah, pri pridelavi sirov), kot dodatek jedem ali kot samostojno živilo. Nekatere glive proizvajajo sekundarne metabolite, ki so lahko zelo strupeni in celo karcinogeni (aflatoksini), poleg tega pa lahko glive povzročajo tudi številna težko ozdravljiva obolenja (mikoze) pri rastlinah, živalih in ljudeh¹. Nekatere vrste gliv izrabljamo kot modelne organizme za preučevanje osnovnih procesov v genetiki, fiziologiji, biokemiji in molekularni biologiji².

Razdelimo jih v tri glavne skupine: **plesni**, **kvasovke** in **prave glive**.

Plesni so filamentozne glive. V naravi so močno razširjene. Posamezen filament imenujemo hifa. Hife so lahko septirane ali neseptirane. So močno razvejane, preraščajo površje in se med seboj prepletajo ter oblikujejo kompaktne skupke, ki jim pravimo micelij. Iz micelija lahko v zrak izraščajo posamezne veje hif – zračne hife ali konidiofori, na katerih nastajajo spore ali konidiji. S konidiji (nespolne spore – za nastanek ni potrebna združitev gamet) poteka nespolno razmnoževanje. Nekatere plesni se razmnožujejo tudi spolno.

Prave glive oblikujejo plodišča (t.i. gobo). Večino časa gliva raste v obliki micelija, skrita pod površjem. Ko se pojavijo ugodne okoljske razmere (ponavadi po deževnem in hladnem vremenskem obdobju), se razvijejo nadzemna plodišča. Plodišča proizvajajo spolne spore.

Kvasovke so enocelične glive. Večina spada v deblo Ascomycota (zaprtotrosnice). Celice so okrogle, ovalne ali cilindrične. Razmnožujejo se nespolno s cepitvijo ali brstenjem. Čeprav se jih večina razmnožuje kot posamezne celice, lahko nekatere kvasovke tvorijo tudi filamente. Pri nekaterih poznamo spolno razmnoževanje. Najbolj poznane so kvasovke iz rodu *Saccharomyces*³.

Na splošno o metabolizmu

Metabolizem je skupek kemičnih transformacij v celicah živih organizmov, ki omogočajo njihovo preživetje. Gre za encimsko katalizirane reakcije, ki pri organizmih omogočajo rast, razmnoževanje, vzdrževanje strukture, odzivanje na okolje⁴...

Primarni metaboliti so nujno potrebni za normalno rast, razvoj in razmnoževanje organizma. Sekundarni metaboliti za preživetje organizma niso nujno potrebni. Za razliko od primarnih metabolitov njihovo pomanjkanje ali odsotnost ne vodi v smrt, lahko pa vpliva na preživeljivost, sposobnost za razmnoževanje, morfologijo ali pa sploh ne vpliva na organizem. So strukturno heterogene molekule z nizkimi molekulskimi masami, ki jih proizvajajo predstavniki različnih skupin organizmov (bakterije, glive, rastline in živali)³.

Sekundarni metaboliti pri glivah

Glive proizvajajo veliko število različnih sekundarnih metabolitov, ki omogočajo medsebojno komunikacijo, obrambo habitata ter zavirajo rast kompetitorjev. Številni sekundarni metaboliti gliv pa so tudi pomembni za človeka, kot npr. antibiotiki, zaviralci imunskega odziva, zniževalci holesterola⁵.

Sintetizirajo se iz različnih spojin. Najpogosteje so derivati ne-ribosomalnih peptidov (penicilini, cefalosporini, ciklosporini) in poliketidov (lovastatin, eritromicin). Lahko pa so tudi mešanica obeh omenjenih skupin molekul (aspiridoni) ali derivati drugih molekulskih skupin, kot npr. terpenov (giberelini) ali maščobnih kislin (oksilipini)⁶.

Organizacija genov sekundarnih metabolitov in podrobnosti biosinteze^{6,7}

Geni vključeni v biosintezo sekundarnih metabolitov so v večini primerov združeni v klastre. Sestava teh klastrov je zelo značilna. Klaster vsebuje enega ali več centralnih biosinteznih genov, ki kodirajo encime z več domenami in moduli. Ti encimi so največkrat iz skupine poliketid sintaz (PKS) ali ne-ribosomalnih peptid sintaz (NRPS). Obstajajo pa izjeme, kot npr. giberelinski klaster, ki vsebuje gen za geranil-geranil difosfat sintazo.

Poleg osrednjih encimov se v klastrih nahajajo tudi geni, ki kodirajo oksigenaze, transporterje ali regulatorne proteine, ki so odgovorni za modifikacije (t.i. krojaški encimi), transport in regulacijo celotnega procesa.

PKS ali NRPS kot osnovno gradbeno enoto za sintezo dotičnih sekundarnih metabolitov uporabljajo malonil ali amino kisline oziroma njihove derivate. Encimi iz teh dveh skupin so si med seboj podobni ne samo strukturno, ampak tudi po mehanizmu sinteze končnega produkta. Oba encimska sistema sta urejena modularno. Vsak module je odgovoren za en sintezni korak in nadalje razdeljen na domene, ki omogočajo specifične spremembe dodane enote (adenilacija, kondenzacija, dehidracija, oksidacija, tiolacija...).

Značilen NRPS modul je zgrajen iz treh domen: adenilacijske (aktivacija amino kisline), tiolacijske (ali PCP – kovalentno veže aktivirano amino kislino) in kondenzacijske (tvorba peptidne vezi). Poleg teh domen se lahko pojavljajo še druge, kot npr. metiltransferazna, epimerizacijska, oksidacijska... Tudi PKS modul v osnovi gradijo tri domene: aciltransferazna domena (izbor in prenos podaljševalne enote – malonil-CoA ali metilmalonil-CoA), acil-prenašalni protein (naloži podaljševalno enoto) in ketoacil sintazna domena (kondenzacija podaljševalne enote z dekarboksilacijo). Pojavljajo pa se še sledeče domene: reduktazna, dehidratazna, metiltransferazna...

Obstajajo tudi modularni NRPS-PKS hibridni sistemi. Hibridni produkti takega sistema so rapamicin in aspiridoni.

Kodirajoči (kriptični) genski klastri^{6,7}

Na podlagi znanih sekvenc genomov in poznavanju značilne sestave klastrov, so se razvila bioinformacijska orodja, ki omogočajo identifikacijo genskih klastrov sekundarnih metabolitov. Identiteta, struktura in funkcija večine metabolitov, ki jih kodirajo ti klastri pa ostaja neznana. Govorimo o kodirajočih ali kriptičnih genskih klastrih¹⁰. Število takih klastrov je veliko. To pa pomeni, da ostaja 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 na nivoju transkripcije

Regulacija biosinteznih poti sekundarnih metabolitov je kompleksna in zajema več medsebojno povezanih omrežij. Regulatorne molekule se odzivajo na različne stimule iz

okolja, kot so: vir ogljika in dušika, temperatura, svetloba, pH, reaktivne kisikove vrste, hipoksični pogoji, pomanjkanje železa, prisotnost dotičnih molekul drugih organizmov⁶...

Regulacija genskih klastrov sekundarnih metabolitov lahko poteka na globalnem nivoju z globalno aktivnimi transkripcijskimi faktorji (TF) in/ali pa s pomočjo potno-specifičnih transkripcijskih faktorjev⁶.

Geni za potno-specifične TF se načeloma nahajajo na klastru, katerega gene regulirajo. Pri večini klastrov se najde zapis za en sam TF (primer: genski klaster za sintezo gliotoksina pri glivi *Aspergillus fumigatus* regulira GliZ⁸). V večini primerov potno-specifični TF regulira vse gene nekega klastra, obstajajo pa izjeme (*gliT* gen pri *A. fumigatus* ni pod kontrolo GliZ⁷). Ravno tako se v genskih klastrih lahko pojavlja več regulatorjev (biosintezni klaster za aflatoksin pri *A. flavus* vsebuje regulatorna gena *aflR* in *aflS*⁹). Posebnost so potno-specifični TF-ji, ki lahko regulirajo dva različna genska klastra, na dveh različnih kromosomih (*A. nidulans* – regulator ScpR kontrolira *inp* in *afo* klaster⁶). Signali in signalne kaskade, ki so vključeni v aktivacijo potno-specifičnih TF, večinoma še niso znani.

Globalno aktivne TF kodirajo geni, ki niso del nobenega klastra, in ki poleg genskih klastrov sekundarnih metabolitov (lahko več kot enega, primer LaeA, CBC kompleks, PacC) regulirajo tudi druge gene⁶. Pomembni so za regulacijo izražanja genskih klastrov sekundarnih metabolitov, ki nimajo lastnih specifičnih regulatorjev (npr. klastra za biosintezo penicilinov in cefalosporinov). Regulirali pa naj bi tudi genske klastre, ki imajo zapis za svoje potno-specifične TF-je. Ali regulirajo posredno preko specifičnih TF-jev ali neposredno vse gene dotičnega klastra pa se še ne ve. Za aktivacijo nekaterih globalnih TF so potrebni signali iz okolja, kot je:

- sprememba pH (regulator PacC iz *A. nidulans* v bazičnem okolju aktivira prepisovanje genov vključenih v biosintezo penicilina¹⁰),
- redoks status in pomanjkanje železa (CBC kompleks v *A. nidulans* ob pomanjkanju železa aktivira penicilin biosintezne gene¹¹, Yap1 v *A. parasiticus* aktivira biosintezo aflatoksina kot odziv na oksidativni stres¹²),
- vir ogljika in dušika (regulator AreA ob prisotnosti dušika zavre biosintezo giberelinov¹³).

Za nekatere globalne TF pa je signale, ki sprožijo njihovo aktivnost, še potrebno najti.

Regulacija na nivoju kromatina⁶

DNA je navita okoli histonskih oktamerov, ki so zgrajeni iz dveh molekul histonskih proteinov H2A, H2B, H3 in H4. Strukturo navite DNA okoli histonskega oktamera imenujemo nukleosom. Na histonih se dogajajo razne modifikacije, kot so metilacija, acetilacija, ubikvitinacija, sumoilacija in fosforilacija. Te modifikacije pa se dogajajo predvsem na histonskih proteinih H3 in H4 in igrajo pomembno vlogo pri regulaciji glivnih sekundarnih metabolitov. Posledica teh modifikacij je namreč boljša/slabša dostopnost DNA ter posledično aktivacija ali zavrtje prepisovanja genov. Metilacija in acetilacija sta omejeni na točno določena področja kromosomov, ki zajemajo nekaj genov in to je lahko dober razlog, da gene sekundarnega metabolizma najdemo v klastrih. Opaža pa se tudi, da genski klastri sekundarnih metabolitov niso enakomerno razporejeni po kromosomih, temveč se pogosto nahajajo na sub-telomernih regijah. To so regije kromosomov, kjer prihaja do rekombinacij, DNA inverzij, delecij, translokacij in drugih sprememb. Z drugimi besedami, gre za mesta, kjer se odvija adaptivna evolucija.

Dozdajšnje ugotovitve kažejo, da sta metilacija in acetilacija histonov na določenih mestih kromosomov pomembni za aktivacijo genskih klastrov sekundarnih metabolitov pri glivah (LaeA z modifikacijo histonov, demetilacijo, sproži biosintezo penicilina in sterigmatocistina¹⁴). Modifikacije kromatina so pomembne tudi za reprogramiranje celic ob prisotnosti drugih mikroorganizmov (npr. bakterija *Streptomyces rapamycinicus* v glivi *A. nidulans* aktivira histonsko acetiltransferazo GcnE in posledično sproži sintezo orzelinične kisline¹⁵). Do zdaj odkriti encimi, ki so vpleteni v modifikacije kromatina pri glivah, so del večjih regulatornih kompleksov, kot npr. GcnE je del SAGA-ADA kompleksa, LaeA je del žametnega kompleksa. Odkrivanje specifičnih signalov in mehanizmov, ki pripeljejo do aktivacije teh regulatornih kompleksov in njihovega delovanja na točno določenih mestih kromosomov pa ostaja neznanka.

Povezava med sekundarni metabolizmom in razvojnimi fazami⁶

Razvoj gliv poteka v več fazah: tvorba hif, tvorba konidioforov, tvorba spolnih ali/in nespolnih spor. Ugotavlja se, da obstaja povezava med prožilci posameznih razvojnih oblik in biosintezo sekundarnih metabolitov (žametni kompleks, ki lahko aktivira tako biosintezo penicilina kot tvorbo spolnih in nespolnih spor¹⁶).

Utišani klastri – vir novih zdravil?⁶

Klasične metode gojenja gliv v laboratoriju in spreminjanje rastnih pogojev (sestava medija, pH, svetloba, prezračevanje, temperatura...) za aktivacijo določenih genskih klastrov sekundarnih metabolitov niso dovolj. Zlasti če fiziološki in/ali ekološki sprožilci niso poznani. V takih primerih se je potrebno poslužiti drugačnih pristopov, s pomočjo katerih lahko pridemo do novih in pomembnih biomolekul.

Eden od možnih načinov aktivacije utišanih genskih klastrov je s pomočjo genskega inženiringa. Z vnosom gena za potno-specifični TF v plazmid z inducibilnim promotorjem lahko dosežemo povečano izražanje TF in posledično sprožitev prepisovanja genov potrebnih za sintezo sekundarnega metabolita, ki so pod kontrolo tega TF (primer *A. nidulans* – povečano izražanje *apdR* TF je sprožilo izražanje genov celotnega klastra genov in omogočilo identifikacijo nove skupine sekundarnih metabolitov, aspiridonov⁷). S pomočjo homologne rekombinacije lahko zamenjamo endogeni promotor genskega klastra sekundarnega metabolita z inducibilnim promotorjem in posledično povečamo izražanje genov dotičnega klastra (primer *A. fumigatus* – gen za brevianamid F sintazo so spojili z inducibilnim promotorjem ter s homologno rekombinacijo vnesli v genom glive in po indukciji zaznali do takrat nepoznane spojine¹⁷). Poleg povečanja izražanja potno-specifičnih TF, pa lahko na podoben način vplivamo tudi na izražanje globalnih regulatorjev in s tem tudi pridemo do odkritja novih sekundarnih metabolitov.

Drugi možni način aktivacije utišanih genskih klastrov je gojenje glive ob prisotnosti mikroorganizmov, s katerimi je dotična gliva v kontaktu v svojem naravnem okolju. Pod vplivom snovi, ki jih v okolje sprošča drug mikroorganizem, se v glivi lahko sproži prepisovanje genskih klastrov sekundarnih metabolitov (primer je ko-kultivacija glive *A. nidulans* z bakterijo *S. rapamycinicus*, kjer je v glivi na račun sproščenih bakterijskih molekul prišlo do acetilacije histonov in posledično aktivacije biosinteze različnih sekundarnih metabolitov^{18,15}).

Tretji možni način aktivacije utišanih genskih klastrov pa je manipulacija s kromatinskimi modifikacijami. Potrjeno je, da imajo kromatinske modifikacije pomembno regulatorno vlogo pri genskih klastrih sekundarnih metabolitov. Ta način se uporablja pri glivah, ki niso dovzetne za genetske manipulacije. Glive se lahko tretira z različnimi inhibitorji histon acetiltransferaz, histon deacetilaz in DNA metiltransferaz.

3. Zaključek

Do zdaj znani sekundarni metaboliti gliv kontrolirajo različne procese v celici kot tudi sodelujejo pri medcelični komunikaciji in komunikaciji z drugimi organizmi. Pomembni pa so tudi za človeka (antibiotiki, zaviralci imunskega odziva, zniževalci holesterola). Geni, ki kodirajo molekule potrebne za biosintezo nekega sekundarnega metabolita se v genomu nahajajo v skupinah (klastrih). V veliki večini primerov so vsi geni dotičnega klastra pod kontrolo enega transkripcijskega faktorja: bodisi globalnega regulatorja ali potno-specifičnega regulatorja. Zakaj so nekateri klastri le pod kontrolo globalnega regulatorja še potrebuje razjasnitve. Regulacija genskih klastrov za sekundarne metabolite pa lahko poteka tudi z modifikacijami kromatina (metilacijo in acetilacijo). Kaj je vzrok, da se modifikacije zgodijo na točno določenih mestih kromosoma zaenkrat ostaja neznanka.

Na podlagi poznavanja genomskih sekvenc in centralnih genov, ki jih najdemo v genskih klastrih sekundarnih metabolitov, so se razvila bioinformacijska orodja, ki omogočajo identifikacijo še neznanih genskih klastrov sekundarnih metabolitov. Identiteta, struktura in funkcija večine teh sekundarnih metabolitov pa ostaja neznana, saj pri klasičnih manipulacijah s fiziološkimi in ekološkimi pogoji rasti ne aktiviramo biosinteze teh sekundarnih metabolitov. Govorimo o t.i. utišanih genskih klastrih. Ti "utišani" sekundarni metaboliti predstavljajo nabor neznanih naravnih produktov. Spoznavanje le-teh nas lahko pripelje do odkritja novih virulentnih faktorjev, toksinov in zdravil. Pri njihovem spoznavanju pomembno vlogo igrajo regulatorna omrežja in signali, ki ta omrežja aktivirajo. Zato je poznavanje teh omrežij in signalov za aktivacijo ključnega pomena.

Literatura

1. **Podobnik A., Devetak D.** *Biologija 4 in 5, Raznolikost živih bitij*. 2. izdaja, 3. natis, DZS, Ljubljana, 2000.
2. **Taylor J. W., Bowman B., Berbee M. L., White T. J.** *Fungal model organisms: phylogenetics of Saccharomyces, Aspergillus and Neurospora*. Syst. Biol. 1993, 42: 440-457.
3. **Madigan T. M., Martinko M. J.** *Brock Biology of Microorganisms*. Eleventh Edition. Pearson Prentice Hall, NJ, ZDA, 2006.
4. **Boyer R. F.** *Temelji biokemije*. Študentska založba, Ljubljana, 2005.
5. **Yim G., Wang H. H., Davies J.** 2007. *Antibiotics as signalling molecules*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., 362, 1195-1200.
6. **Brakhage A. A.** 2013. *Regulation of fungal secondary metabolism*. Nature Rev. Microbiol. 2013, 11, 21-32.
7. **Bergmann S., Schümann J., Scherlach K., Lange C., Brakhage A. A., Hertweck C.** *Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from Aspergillus nidulans*. Nature Chem. Biol. 2007, 3, 213–217.
8. **Bok J. W., Chung D., Balajee S. A., Marr K. A., Andes D., Nielsen K. F., Frisvad J. C. et al.** *GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to Aspergillus fumigatus virulence*. Infect. Immun. 2006, 74, 6761–6768.
9. **Georgianna D. R., Payne G. A.** *Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome*. Fungal Genet. Biol. 2009, 46, 113–125.
10. **Tilburn J., Sarkar S., Widdick D. A., Espeso E. A., Orejas M., Mungroo J., Peñalva M. A. et al.** *The Aspergillus PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH*. EMBO J. 1995, 14, 779–790.
11. **Hortschansky P., Eisendle M., Al-Abdallah Q., Schmidt A. D., Bergmann S., Thön M., Kniemeyer O. et al.** *Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex — a novel mechanism of gene regulation by iron*. EMBO J. 2007, 26, 3157–3168.
12. **Reverberi M., Zjalic S., Ricelli A., Punelli F., Camera E., Fabbri C., Picardo M. et al.** *Modulation of antioxidant defense in Aspergillus parasiticus is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the ApyapA gene*. Eukaryot. Cell. 2008, 7, 988–1000.
13. **Tudzynski B., Homann V., Feng B., Marzluf G. A.** *Isolation, characterization and disruption of the area nitrogen regulatory gene of Gibberella fujikuroi*. Mol. Gen. Genet. 1999, 261, 106–114.
14. **Yin W., Keller N. P.** *Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism*. J. Microbiol. 2011, 49, 329–339.
15. **Nützmann H. W., Reyes-Dominguez Y., Scherlach K., Schroeckh V., Horn F., Gacek A., Schümann J. et al.** *Bacteria-induced natural product formation in the fungus Aspergillus nidulans requires Saga/Ada-mediated histone acetylation*. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2011, 108, 14282–14287.
16. **Bayram O., Braus G. H.** *Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins*. FEMS Microbiol. Rev. 2012, 36, 1–24.
17. **Maiya S., Grundmann A., Li S. M., Turner G.** *The fumitremorgin gene cluster of Aspergillus fumigatus: identification of a gene encoding brevianamide F synthetase*. Chembiochem. 2006, 7, 1062–1069.
18. **Schroeckh V., Scherlach K., Nützmann H. W., Shelest E., Schmidt-Heck W., Schuemann J., Martin K. et al.** *Intimate bacterial–fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in Aspergillus nidulans*. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2009, 106, 14558–14563.