



Laboratorij za tehnologiju antibiotika,
enzima, probiotika i starter kultura
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišta u Zagrebu



FIZIOLOGIJA INDUSTRIJSKIH MIKROORGANIZAMA

Diplomski studij Molekularna biotehnologija
Nositelj modula: izv.prof. Anita Slavica
Diplomski studij Bioproceno inženjerstvo
Nositelj modula: red.prof. Sr an Novak

Sekundarni metabolizam u mikroorganizama: biosinteza antibiotika, regulacija i funkcija

Dr. sc. Jagoda Šuškovi , red. prof.
Akad. god. 2014/15.

SEKUNDARNI METABOLIZAM U MIKROORGANIZAMA – BIOSINTEZA ANTIBIOTIKA

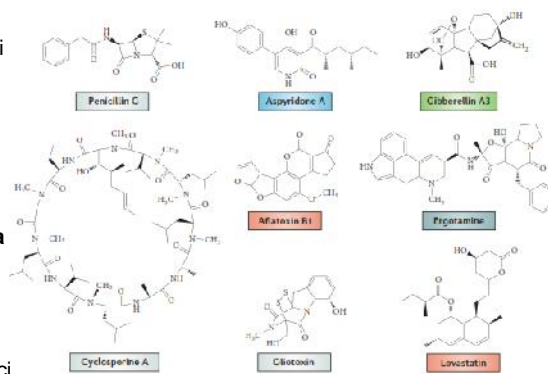
- Sve biokemijske reakcije (kataboli ke i anaboli ke) vezane uz rast mikroorganizama nazivaju se PRIMARNI METABOLIZAM. Me utim, mnogi mikroorganizmi na prijelazu iz eksponencijalne u stacionarnu fazu rasta po inju sintetizirati i izlu ivati u okolinu razli ite spojeve koji, iako nemaju neke vidljive funkcije prilikom rasta i razmnožavanja stanice, nastaju u tolikoj koli ini da na njihovu sintezu otpada znatan dio energije u obliku ATP-a. Ove spojeve nazivamo SEKUNDARNIM METABOLITIMA ili IDIOLITIMA.
- Mikrobni sekundarni metaboliti (idioliti) su nisko molekularni proizvodi sekundarnog metabolizma koji se proizvode pri specifi noj brzini rasta nižoj od maksimalne. Sekundarni metaboliti su relativno male molekule, a svaku proizvodi samo jedan mikrobni soj ili ograni eni broj mikrobnih sojeva i nasuprot primarnim metabolitima, nemaju zna ajnu funkciju u procesu rasta soja producenta.
- Sojevi koji mutacijom izgube sposobnost proizvodnje sekundarnog metabolita i dalje iskazuju uobi ajnu brzinu rasta i druge karakteristike. Me utim, proizvodnja antibiotika je presudna za preživljavanje i kompetitivnu prednost proizvodnog mikroorganizma u njegovom prirodnom okolišu.

ANTIBIOTICI – NAJVAŽNIJI PROIZVODI SEKUNDARNOG METABOLIZMA MIKROORGANIZAMA

- Općenito, može se reći da je sekundarni metabolizam karakterističan za filamentozne bakterije (streptomicete) i gljivice, te sporogene bakterije.
- Diferencijacija u mikroorganizmima uključuje **morfološku diferencijaciju** (morfogenezu, sporulaciju, germinaciju) i **kemijsku diferencijaciju** (sekundarni metabolizam). Ova dva aspekta diferencijacije često dijele gene uključene u regulaciju. Međutim, nasuprot **morfološkoj** diferencijaciji koja je tipična za vrstu ili rod, ekspresija sekundarnog metabolizma je specifična za soj (različiti sojevi iste vrste mogu proizvoditi različite sekundarne metabolite).
- Najveći broj do sada izoliranih sekundarnih metabolita su antibiotici. Njihova uporaba ima značajan utjecaj na zdravlje, prehranu i ekonomiju ljudskog društva.

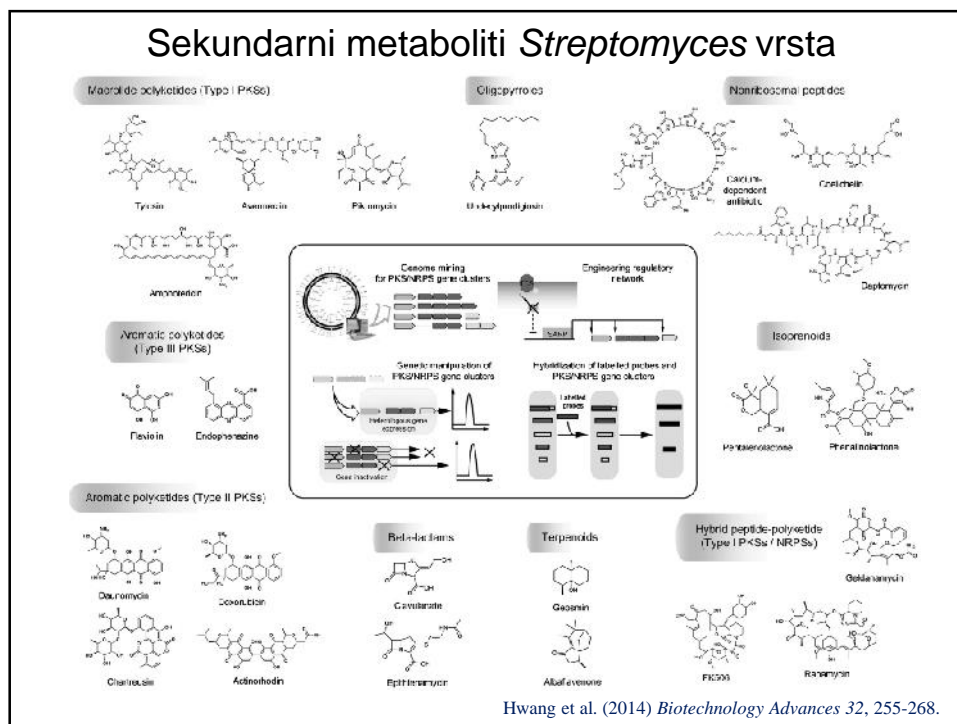
Primjeri sekundarnih metabolita koje proizvode gljivice

- **Ne-ribosomska sinteza peptida** (na slici svijetlo sivo i tamno sivo označeni metaboliti).
- **Derivati poliketida** (na slici crveno označeni metaboliti)
- **Kombinirana sinteza - poliketidni put i ne-ribosomska sinteza peptida - hibridni sekundarni metaboliti** (na slici plavo označeni metaboliti)
- **Sinteza koja uključuje enzim terpen ciklazu** (na slici zeleno označeni metaboliti)



Penicilin G – β -laktamski antibiotik (producent: *Penicillium chrysogenum*)
 Ciklosporin A – imunosupresivno djelovanje; Lovastatin – snižavanje razine kolesterola u krvi (producent: *Tolypocladium inflatum* i *Aspergillus terreus*);
 Ergotamin – ergot alkaloid (producent: *Claviceps purpurea*); Gliotoksin – citotoksično djelovanje (producent: *Aspergillus fumigatus*);
 Aspiridon A – citotoksično djelovanje (producent: *Aspergillus nidulans*);
 Gibberelin A3 – biljni hormon (producent: *Fusarium fujikuroi*).

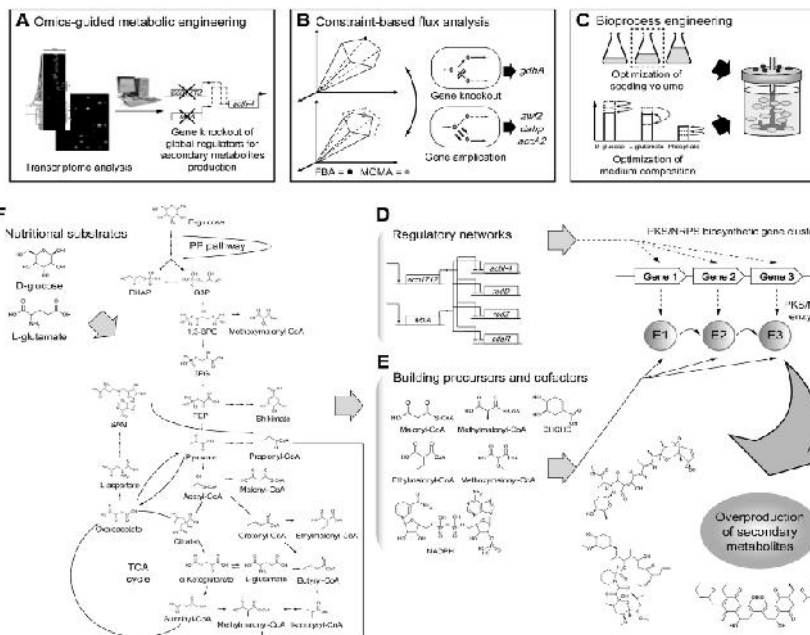
Sekundarni metaboliti *Streptomyces* vrsta



Sekundarni metaboliti *Streptomyces* vrsta

- Specifično svojstvo genoma *Streptomyces* vrsta su klasteri gena koji kodiraju za enzime uključene u biosintezu sekundarnih metabolita: poliketida, laktama, ne-ribosomskih peptida i terpena
- Medicinska primjena tih sekundarnih metabolita uključuje ne samo antibiotike (npr. daptomicin, streptomycin), nego i imunosupresore (npr. rapamicin), antifungalne (npr. amfotericin B), antitumorne (npr. doksorubicin) i antiparazitske lijekove (ivermektin)
- Intenzivna istraživanja *Streptomyces* vrsta provode se u svrhu otkrića novih antibiotika, prvenstveno zbog višestruke rezistencije patogenih bakterija na antibiotike (MDR - multidrug resistance).
- Dostupne baze podataka koje sadrže informacije o genomima velikog broja *Streptomyces* vrsta, te primjena metoda genetičkog i metaboličkog inženjerstva, omogućavaju istraživanje i razvoj proizvodnje novih sekundarnih metabolita sa *Streptomyces* vrstama za medicinsku primjenu
- Međutim, kako je uloga mnogih sekundarnih metabolita u samoj mikrobnjoj stanici nepoznata, još uvijek nije moguće predvidjeti sve molekularne mehanizme koji reguliraju njihovu biosintezu, što predstavlja problem pri razvijanju strategija za otkrivanje novih antibiotika

Strategija razvitka novih antibiotika u *Streptomyces* vrsta



BIOSINTEZA SEKUNDARNIH METABOLITA – ANTIBIOTIKA –

- Ve ina sekundarnih metabolita nastaje polimerizacijskim reakcijama:
1. **biosintezom poliketida** sa enzimom poliketid sintaza (PKS – polyketide synthases (type I PKSs, type II PKS, type III PKS) - kondenzacijom acil-CoA jedinica (poliketidni put biosinteze makrolida i aromatskih poliketida)
 2. **ne-ribosomskom sintezom peptida** sa enzimom ne-ribosomska peptid sintetaza (NRPS – Non-ribosomal peptide synthetase) -kondenzacijom aminokiselina u oligopeptide (ne-ribosomski put biosinteze peptida: gramicidin S, β -laktamski antibiotici: penicilini i cefalosporini)

1. Poliketidni put biosinteze sekundarnih metabolita - kondenzacija acetat-malonatnih jedinica

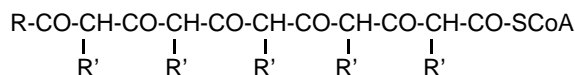
- Poliketid sintaza (PKS) – multifunkcionalni enzim koji katalizira biosintezu poliketida iz acil-CoA prekursora
- poliketid nastaje kondenzacijom acetatnih jedinica i uključuje se u biosintezu brojnih mikrobnih sekundarnih metabolita.
- Dva tipa mikrobnih metabolita, masne kiseline i poliketidi, se dobivaju iz acetata i malonata ili drugih građivnih jedinica
- Postoje sličnosti i različitosti između biosinteze masnih kiselina i biosinteze poliketida:
 - a) masne kiseline se sintetiziraju specifičnim putem u kojem je acetat “starter” jedinica i mali broj malonata koji su “elongator” jedinice.
 - b) poliketidi se sintetiziraju nespecifičnim putevima u kojima je jedna “starter” jedinica (acetat ili propionat) i veći broj “elongator” jedinica (malonat, 2-metilmalonat ili 2-etilmalonat).

1. Poliketidni put biosinteze sekundarnih metabolita - kondenzacija acetat-malonatnih jedinica (nastavak)

- U biosintezi masnih kiselina sudjeluju acetat (starter) i malonat (elongator) u njihovim aktiviranim oblicima, kao acetil-CoA i malonil-CoA (potreban ATP). Acetat aktiviran kao acetil-CoA i malonat aktiviran kao malonil-CoA se vežu na pantetein komponentu **sintaze masnih kiselina** (fatty acid synthase) kao tioesteri. Aktivirani acetil-CoA se karboksilira u malonil-CoA, elongacijsku jedinicu. Slijedi biosinteza masnih kiselina nastajanjem β -keto estera koji ostaje vezan na pantetein komponentu sintaze masnih kiselina. Proces se nastavlja do određene dužine lanca. Masna kiselina se otpušta s tioesterazom. U biosintezi masnih kiselina, β -keto grupa koja se uvodi u svakom stupnju kondenzacije, podliježe modifikaciji redukcijom, dehidracijom i hidrogenacijom, prije slijede sledeći stupnja kondenzacije.
- U biosintezi poliketida, neke od β -keto grupa ostaju u finalnoj strukturi ili se reduciraju u hidroksilne grupe, a ne dolazi do modifikacije β -keto grupa dehidracijom i dehidrogenacijom.

1. Poliketidni put biosinteze sekundarnih metabolita - kondenzacija acetat-malonatnih jedinica (nastavak)

- Opća struktura poliketidnog lanca

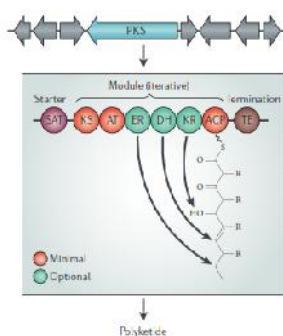


R - označava radikal različitih starter jedinica (npr. metil u aflatoksinima, metil ili etil u makrolidnim antibioticima, aromatski prsten u nekim polienskim makrolidima ili malonamoil u tetraciklinskim antibioticima)

R' - označava vodik, metil ili etil, ovisno o vrsti elongacijskih jedinica

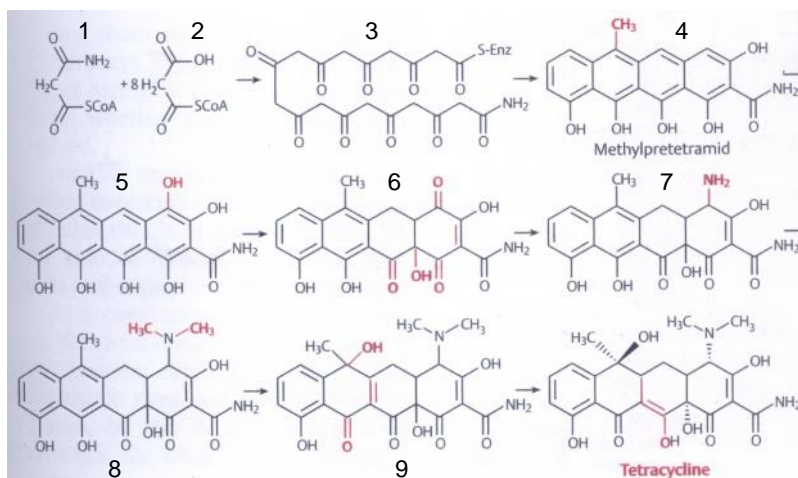
- Rezultat biosinteze poliketida je lanac s naizmjeničnim keto i metilenskim grupama. Lanac je vrlo reaktivan i stoga ima tendenciju tvorbe stabilnije strukture (aromske prstene, kinone, heterocikličke spojeve, makrocikličke laktone i dr.) obično aldolnom kondenzacijom i uklanjanjem vode između keto i metilenske grupe (aromske jezgre). Ponekad je prvi stabilan proizvod i glavni metabolit, no općenito on je podvrgnut daljnjim modifikacijama da bi se dobio glavni metabolit.

Poliketid sintaza (PKS) – multifunkcionalni i multimodularni enzim



- Poliketid sintaza (PKS) se sastoji od više modula, a svaki modul sadrži domene koje su odgovorne za elongaciju poliketida
- Domene PKS:** SAT - starter „acyl-carrier” protein (ACP) transacilaza; KS – ketoacil sintaza; AT – aciltransferaza; ER – enoil reduktaza; DH – dehidrataza; KR - β -ketoacil reduktaza; ACP – „acyl-carrier” protein; TE – tioesteraza. Crvenom bojom je označen minimalni set domena, a zelenom neobavezne domene, prisutne samo u nekim modulima

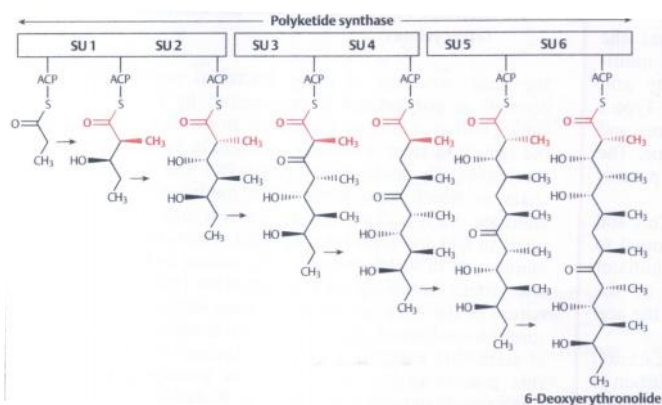
1. Poliketidni put biosinteze sekundarnih metabolita –
AROMATSKI POLIKETIDI – TETRACIKLIN



Biosinteza tetraciklina poliketid sintazom (type II PKS) u *Streptomyces aureofaciens*.

1. malonil-CoA
2. malonil-CoA
3. poliketidni lanac
4. 4-hidroksi-6-metil pretetramid
5. 4-oksido-anhidrotetraciklin
6. 4-aminoanhidrotetraciklin
7. anhidrotetraciklin
8. dehidrotetraciklin
9. tetraciklin

1. Poliketidni put biosinteze sekundarnih metabolita
makrolidnih antibiotika – eritromicin

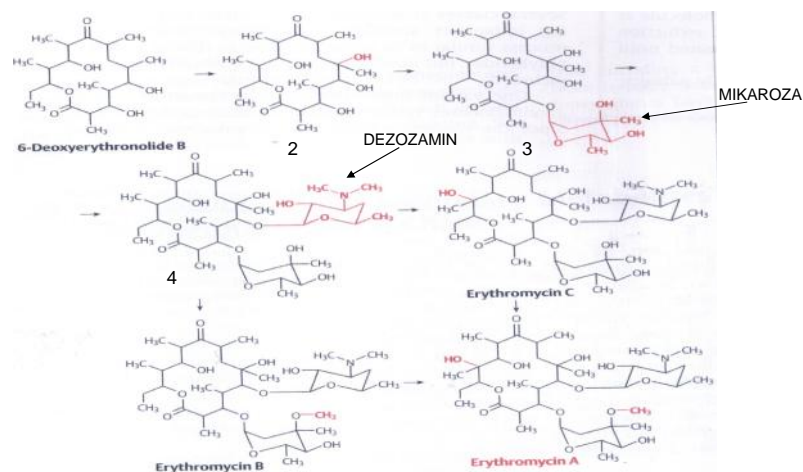


Gradnja lanca makrocikla kog laktona, 6 deoksieritronolida B (eritromicina) u *Saccharopolyspora erythraea* s poliketid sintazom (type I PKS). SU – jedinica sintaze; ACP – acil carrier protein. Propionatne jedinice, pridodane u svakom stupnju elongacije, su označene crveno.

1. Poliketidni put biosinteze sekundarnih metabolita makrolidnih antibiotika – eritromicin

- ERITROMICIN – makrocikli ki lakton (14 atoma) s keto, hidroksilnim i metilnim grupama i dva še era.
- Makrocikli ki lakton pri poliketidnom procesu zapo inje iniciraju om jedinicom propionata i 6 metilmalonat-produžavaju ih jedinica. Enzimski kompleks PKS (type I) je sastavljen od 3 multifunkcionalna proteina od kojih svaki uklju uje 2 funkcionalne jedinice (poput FAS (fatty acid synthase)). Ukupno 6 funkcionalnih jedinica i svaka je odgovorna za jedan od šest elongacijskih ciklusa u gradnji lanca. Svaki ciklus uklju uje kondenzaciju jednog metil malonata s rastu im lancem i pripadaju u totalnu, djelomi nu ili ne-redukciju β -keto grupa. Rastu i lanac se prebacuje od jedne do susjedne jedinice, tako da poredak jedinica determinira poredak kemijskih grupa u kona noj molekuli. Dobiveni linearni lanac se zatim zatvara oblikuju i makrocikli ki lakton (temeljna struktura makrolidnih antibiotika).

1. Poliketidni put biosinteze sekundarnih metabolita makrolidnih antibiotika – eritromicin



Metaboli ki put konverzije 6-deoksietritronolida B u eritromicine (novo dodane grupe su istaknute crveno)

2 – eritronolid B, 3 – 3- α -L-mikarozil eritronolid B, 4 – eritromicin D

2. Kondenzacija aminokiselina u oligopeptide BIOSINTEZA POLIPEPTIDNIH ANTIBIOTIKA

- Dva osnovna polimerizacijska mehanizma biosinteze polipeptidnih antibiotika:
 - a) biosinteza na ribosomu
 - b) biosinteza na ne-ribosomskoj peptid sintetazi (NRPS), mehanizmom tiokalupa (thiotemplate mechanism)

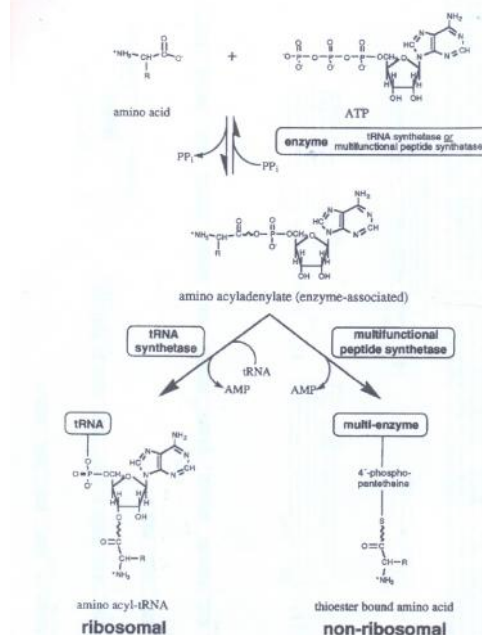
a) Sintetza polipeptidnih antibiotika na ribosomu

- Manja grupa peptidnih antibiotika se sintetizira op im translacijskim i transkripcijskim mehanizmom sinteze proteina (lantibiotici, nelantibioti ki bakteriocini, mikrocin, endogeni antibioti ki peptidi – defenzini)
- LANTIBIOTICI – kona na molekula antibiotika se izvodi iz ve eg ribosomski sintetiziranog peptida (prelantibiotik) u kojem su uklju eni vode i (leader) peptid i aminokiselinska sekvenca koja dobiva antibioti ku strukturu tek posttranslacijskim enzimskim procesom (u D-aminokiseline i neuobi ajene aminokiseline, lantionin i oksidne kiseline). Posljednji stupanj u biosintezi je cijepanje vode eg peptida.

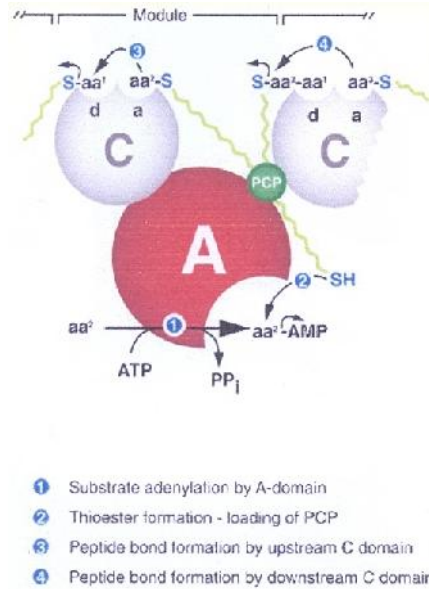
b) sinteza polipeptidnih antibiotika na ne-ribosomskoj peptid sintetazi (NRPS) mehanizmom tiokalupa (thiotemplate mechanism)

- Većina polipeptidnih antibiotika je sintetizirana ovim mehanizmom.
- Naziv „mehanizam tiokalupa” izražava glavnu karakteristiku sustava u kojoj je sekvenca aminokiselina u molekuli antibiotika determinirana redom kojim se prekursori (aminokiseline) vežu kao tioestri na **ne-ribosomsku peptid sintetazu** (NRPS).
- Proces uključuje: aktivaciju aminokiselina kao adenilata (ATP), kondenzaciju karboksilne skupine s tiolnom skupinom enzima, oblikovanje tioestera i stupnjevitu polimerizaciju. Polimerizacija započinje oblikovanjem peptidne veze između karboksilne grupe prve aminokiseline i amino grupe druge aminokiseline (energiju osigurava cijepanje tioesterske veze). Zatim dolazi do cijepanja tioesterske veze oblikovanog dipeptida sa enzimom, a karboksilna skupina oblikuje novu (druhu) peptidnu vezu sa trećom aminokiselinom. Kondenzacija se ponavlja do dovršenja peptidnog lanca koji se oslobađa s tioesterazom.

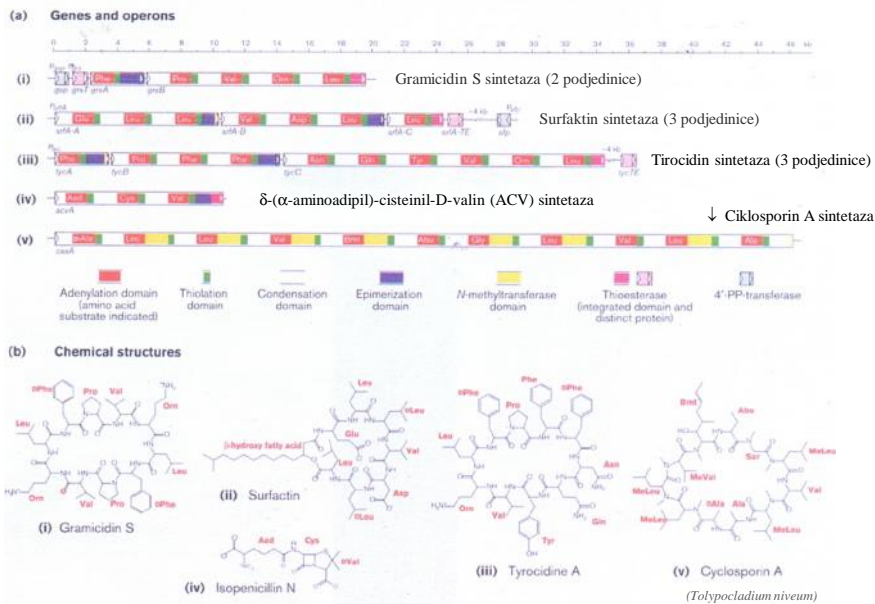
Usporedba aktivacije aminokiselina na t-RNA sintetazi (ribosomska sinteza peptida) i na ne-ribosomskoj peptid sintetazi (ne-ribosomska sinteza peptida)



Minimalni set domena unutar jednog modula ne-ribosomske peptid sintetaze za ukljuivanje jedne aminokiseline u rastu i peptidni lanac



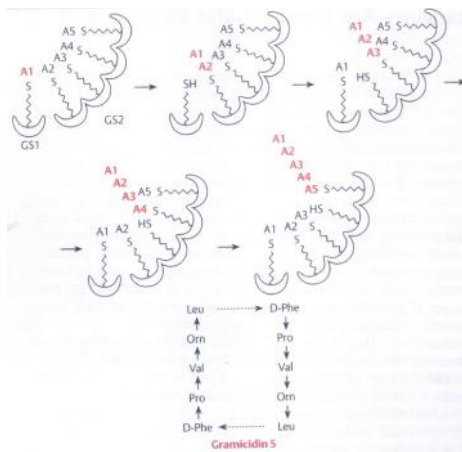
Geni koji kodiraju za NE-RIBOSOMSKU PEPTID SINTETAZU (NRPS) za biosintezu POLIPEPTIDNIH ANTIBIOTIKA



b) sinteza polipeptidnih antibiotika na ne-ribosomskoj peptid sintetazi (NRPS) mehanizmom tiokalupa (thiotemplate mechanism)

- Ne-ribosomska peptid sintetaza sadrži domene na kojima se odvijaju enzimske reakcije (aktivacija jedne aminokiseline, njenu esterifikacija s tiolnom skupinom panteteinskog ostatka i oblikovanje peptidne veze). Ponekad je na domeni mogu e kataliziranje izomerizacije (L u D) aminokiselina ili metiliranje novo oblikovanog amida.
- Sustav donekle podsje a na poliketid sintazu u biosintezi eritromicina. Analogija: prijenos rastu eg polipeptidnog lanca se obavlja posredstvom PCP (peptidyl-carrier protein) na svakoj domeni, koji sadrži 4'-fosfopantetein, analogno ACP (acyl-carrier protein) na poliketid sintazi.

b) sinteza polipeptidnih antibiotika na ne-ribosomskoj peptid sintetazi (NRPS) mehanizmom tiokalupa (nastavak)



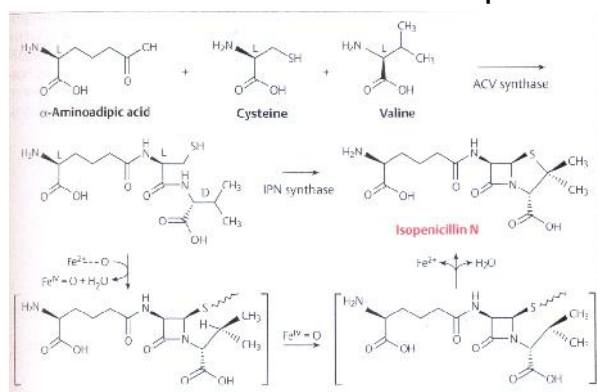
Biosinteza antibiotika gramicidina S s *Bacillus brevis* katalizirana je s dva enzima: gramicidin sintetaza GS1 (Mr = 130000) i gramicidin sintetaza GS2 (Mr = 500000). GS1 katalizira aktivaciju fenilalanina, racemizaciju i vezanje kao tioestera D-izomera, koji je iniciraju a molekula. GS2 enzim katalizira druga 4 prekursora. Nakon završene polimerizacije dva pentapeptidna lanca vežu se peptidnim vezom po sustavu glava-rep. Gramicidin S je ciklički peptid sastavljen od dva identična pentapeptidna lanca.

Slikovni prikaz ukazuje da gramicidin sintetaza GS1 ima jedno sintetazno mjesto i nosi D-fenil alanin (A1). Gramicidin sintetaza GS2 ima četiri sintetazna mjesta: za prolin (A2), valin (A3), ornitin (A4) i leucin (A5). Panteteinska "ruka" koja prenosi rastući lanac s jednog na iduće mjesto na enzimu je označena SH

Biosinteza β -laktamskih antibiotika (penicilina i cefalosporina) pomoću NRPS-ACV sintetaze

- Klasični β -laktamski antibiotici (penicilini i cefalosporini) su izolirani iz sojeva različitih funga (plijesni). Dugo vremena se mislilo da prokarioti ne mogu sintetizirati ove strukture. Danas se zna da aktinomiceti sintetiziraju penicilin N, cefalosporin C i cefamicine (7-metoksi cefalosporini).
- Prva reakcija biosintetskog puta je povezivanje L- α -aminoadipinske kiseline, L-cisteina i L-valina u tripeptid L- δ -aminoadipil-L-cisteinil-D-valin.
- Oligomerizacija se provodi u skladu s mehanizmom tiokalupa na ne-ribosomskoj peptid sintetazi **ACV sintetazi** (L- δ -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valin sintetazi) koja je izolirana i pročišćena i iz funga i iz prokariota.

Biosinteza penicilina

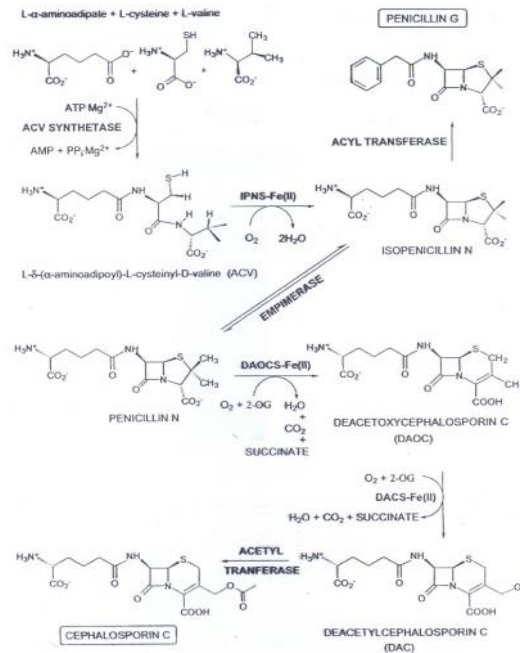


Penicilin N je uobičajeni prekursor penicilina, cefalosporina i cefamicina.

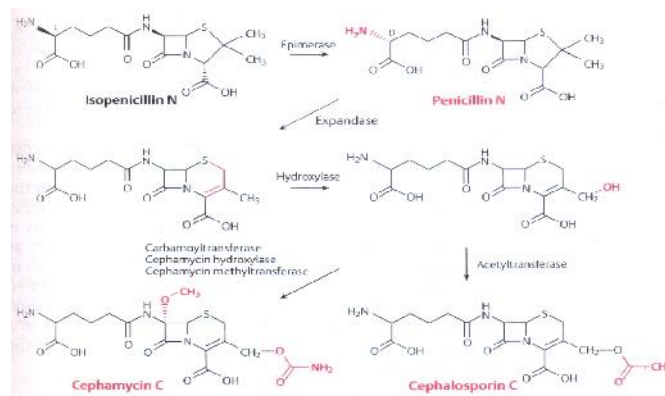
ACV, L- δ -aminoadipil-L-cisteinil-D-valin; IPN, izopenicilin N.

Ne-ribosomska peptid sintetaza ACV sintetaza aktivira i veže tri aminokiseline kao tioestere (L- α -aminoadipinska kiselina preko δ -karboksilne skupine) provode i inverziju L-valina u D-oblik i zatim kondenzacijske stupnjeve. Iduća reakcija je ciklizacija s enzimom izopenicilin N sintazom u izopenicilin N posljednji zajednički intermedijer biosinteze penicilina i cefalosporina. Ciklizacija uključuje dva desaturacijska stupnja u kojima je kisik akceptor vodika, a Fe^{2+} je kofaktor. Najprije se oblikuje β -laktamski prsten, a zatim i tiazolidinski prsten. U funga, izopenicilin N se može prevesti u penicilin G, druge hidrofobne peniciline ili izomerizirati u penicilin N koji se zatim podvrgava daljnjim pretvorbama za dobivanje cefalosporina.

Biosinteza penicilinskih i cefalosporinskih antibiotika

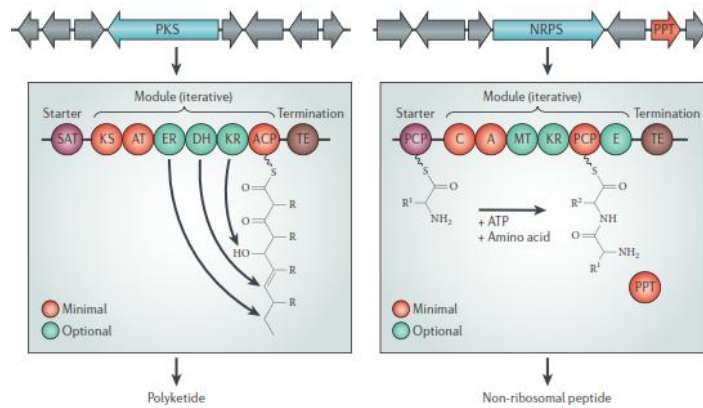


Biosintetski put β -laktamskih antibiotika u streptomiceta (*S. clavuligerus*, *S. lipmanii* i *Nocardia lactamdurans*)



U prokariota petoro lani prsten penicilina N se proširuje u šestero lani prsten s enzimom deacetoksicefalosporin C sintazom (tzv. ekspandaza). Mehanizam ove reakcije je vrlo sličan onom pri formiranju izopenicilina N i također zahtijeva kisik kao kosupstrat i Fe^{2+} kao kofaktor. Slijedi i je stupanj oksidacija i hidroksilacija 3-metil grupe. Dobiveni deacetylcefalosporin C je posljednji zajednički metabolit u biosintezi cefalosporina i cefamicina.

Analogija biosinteze antibiotika sa poliketid sintazom (PKS) i ne-ribosomskom peptid sintetazom (NRPS)

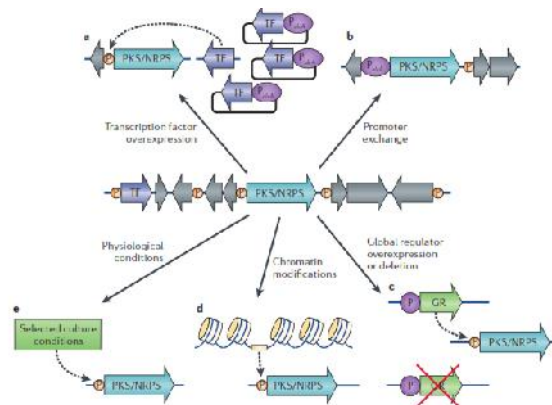


Domene PKS: SAT - starter „acyl-carrier” protein (ACP) transacilaza; KS – ketoacil sintaza; AT – aciltransferaza; ER – enoil reduktaza; DH – dehidrataza; KR - β -ketoacil reduktaza; ACP – „acyl-carrier” protein; TE – tioesteraza;

Domene NRPS: PCP – „peptidyl-carrier” protein, C – kondenzacija; A – adenilacija; MT – metiltransferaza; KR - β -ketoacil reduktaza; E – epimerizacija; PPT – 4'-fosfopantetein (4'PP) transferaza

Brakhage et al. (2013) *Nature Reviews Microbiology* 11, 21-32.

Nove strategije u otkrivanju novih sekundarnih metabolita



a – povećana ekspresija 'transkripcijskog faktora' (TF), specifičan za klaster gena za PKS/NRPS

b – zamjena promotora za biosintezu ili TF sa promotorom za alkohol dehidrogenazu A

c – povećana ekspresija ili delecija globalnog regulacijskog gena (GR)

d – modifikacija kromatina

e – simulacija parametara uzgoja (fizioloških uvjeta) koji će aktivirati 'silent' gene

Brakhage et al. (2013) *Nature Reviews Microbiology* 11, 21-32.

Regulacija sekundarnog metabolizma

- Sekundarni metabolizam je poput ostalih diferencijacijskih procesa visoko reguliran.
- Sekundarni metaboliti se najčešće sintetiziraju nakon eksponencijalne faze rasta ili pri brzinama rasta manjim od maksimalne.
- Uobičajeni nazivi ovih dviju faza rasta su:
TROFOFAZA – eksponencijalna faza ili faza uravnoteženog rasta
IDIOFAZA – stacionarna faza ili faza proizvodnje sekundarnih metabolita (IDIOLITA)
- Razlikovanje ovih dviju faza ponekad je izrazito, ali u nekim slučajevima idiofaza se preklapa s trofofazom.
- Na razlikovanje dviju faza može se utjecati sastavom hranjive podloge:
(1) dvije faze su često jasno odvojene, s hranjivom podlogom koja potiče brzi rast stanica i
(2) djelomično ili potpuno preklapanje faza je stimulirano hranjivom podlogom koja podržava spori rast stanica.

Regulacija sekundarnog metabolizma

- SEKUNDARNI METABOLITI su nazvani “sekundarni” zato jer nisu uključeni, odnosno nisu bitni za vegetativni rast kulture koja ih proizvodi, a ne zato što se sintetiziraju nakon završetka aktivnog rasta kulture (npr. uklanjanje proizvodnje sekundarnih metabolita mutacijom neće usporiti ili zaustaviti rast kulture).
- OTPOREČNJE SEKUNDARNOG METABOLIZMA kontroliraju faktori koji su kompleksni, slabo razumljivi i nedovoljno razjašnjeni. Međutim, oni bi trebali uključivati faktore uključujući mehanizme globalne kontrole, kao što su: katabolna represija, obvezujuć odgovor (stringent response), odgovor na gladovanje na ugljiku, sustavi s primjenom alternativnih sigma faktora i sustavi koji iskazuju povremenu kontrolu (sporulacija, dioba stanica). Brzina rasta i nedostatak određenih hranjivih faktora je također važno, iako su uključeni mehanizmi nepoznati.
- Sustavi sekundarnog metabolizma su izvjesno genetički po svojoj prirodi, iako ekspresija može velikim dijelom biti pod utjecajem okoliša i okolišnih uvjeta.
- Geni za sekundarni metabolizam (npr. antibiotika, kao i geni za rezistenciju na antibiotike) obično su na jednom klasteru u bakterija (uključujući streptomicete) i nekih gljiva (*Penicillium*, *Aspergillus*). U drugih gljiva, kao npr. *Acremonium chrysogenum* (*Cephalosporium acremonium*) geni za proizvodnju cefalosporina su na različitim kromosomima.

REGULACIJA SA IZVOROM UGLJIKA (KATABOLI KA REPRESIJA UGLJIKOM)

- Glukoza koja je za mnoge mikroorganizme "izvrstan" izvor ugljika, esto interferira sa sintezom mnogih sekundarnih metabolita (antibiotika). Polisaharidi (škrob), oligosaharidi (laktoza), ulja (sojino) i drugi polagano asimiliraju i izvori ugljika su esto prikladniji za dobivanje visokih prinosa antibiotika. Ukoliko hranjiva podloga sadrži brzo i sporo asimiliraju i izvor ugljika, lako trošivi izvor ugljika e osigurati brži rast stanica, bez sinteze sekundarnog metabolita (vjerojatno zbog kataboli ke represije ugljikom). Nakon utroška lako asimiliraju eg izvora ugljika, u idiofazi e se trošiti sporo asimiliraju i, prestaje represija i sintetizira se sekundarni metabolit (antibiotik).
- To an mehanizam kataboli ke represije ugljikom za sekundarne metabolite nije još u potpunosti razjašnjen.
- Vjerojatno sustav funkcionira sli no kao u Gram-pozitivnih bakterija gdje je fosforilacijsko stanje PTS proteina HPr važno u kontroliranju ekspresije gena modulona determiniranjem aktivnosti proteina CcpA (Catabolite control protein – globalni represor) koji reagira s DNA elementima – *cre* promotorima (catabolite responsive elements promotori).

REGULACIJA IZVOROM DUŠIKA

- Na mnoge puteve sekundarnog metabolizma negativno utje e izvor dušika koji je pogodan za rast, npr. amonijeve soli. Stoga, kompleksne hranjive podloge za proizvodnju antibiotika uklju uju i izvor proteina (npr. sojino brašno), tako da hranjiva podloga sadrži i polako asimiliraju e aminokiseline kao izvore dušika (npr. prolin) da bi se osigurala dobra proizvodnja sekundarnih metabolita. Negativno djelovanje amonijevog kationa poznato je pri biosintezi penicilina, cefalosporina, eritromicina, streptomcina i mnogih drugih antibiotika. Sam mehanizam je vrlo malo prou en i da li stvarno sli i na Ntr (nitrogen regulation) sustav koji kontrolira asimilaciju u bakterija nije do sada istraženo. U nekim je slu ajevima dokazana represija i inhibicija enzima uklju enih u biosintezi antibiotika.

REGULACIJA IZVOROM FOSFORA

Regulacija izvorom fosfora uključuje specifičnu i globalnu kontrolu.

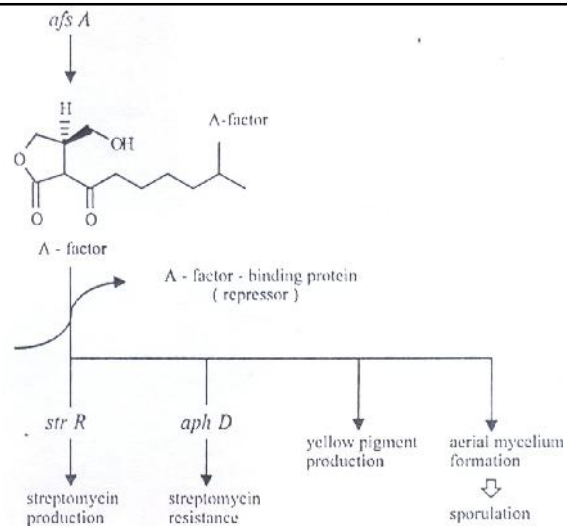
- Specifični negativni efekt anorganskog fosfata pripisuje se sposobnosti da inhibira i/ili reprimira fosfataze. Isto su intermedijeri određenog sekundarnog metabolita fosforilirani, dok konačni proizvod nije, te su fosfataze uključene u biosintezu. Npr. pri biosintezi streptomicina su barem tri stupnja cijepanja fosfata i proces je vrlo osjetljiv na koncentraciju fosfata. Posljednji enzim koji uklanja fosfat s dihidrostreptomycin-6-fosfata je inhibiran anorganskim fosfatom.
- Fosfat može imati manje općenitosti u inak od navedenog.
- Interferira u mnogim putevima sekundarnog metabolizma, te se mnoge proizvodnje sekundarnih metabolita provode pri niskim koncentracijama slobodnog fosfata (obično ispod 10 mM) koje su suboptimalne za rast. Da li je intracelularni efektor regulacije fosfatom sam anorganski fosfat nije poznato.

KONTROLA I REGULACIJA SA SPECIFIČNIM REGULACIJSKIM MEHANIZMIMA

- FEEDBACK REGULACIJA u kontroli sekundarnog metabolizma uključuje inhibiciju ili represiju vlastitog metaboličkog puta sekundarnim metabolitom (bacitracin, gramicidin S, eritromicin, tetraciklin itd.)
- KONTROLA BRZINE RASTA je izgleda važna u sekundarnom metabolizmu. Može biti faktor koji se može prevladati u slučajevima kada je ograničavanje koncentracije hranjiva potrebno za proizvodnju sekundarnih metabolita. Brzinom rasta regulirana biosinteza sekundarnih metabolita
- REGULACIJOM PREKURSORIMA se može regulirati proizvodnja antibiotika posebno kada je specifična sintetaza već prisutna u stanicama. Dodatak prekursora isto značajno usmjerava i ubrzava (olakšava) biosintezu metabolita, te povećava njihov prinos. Primjer: feniloctena kiselina + penicilin → benzilpenicilin + diaminoadipinska kiselina (enzimi su acil-CoA-ligaza i acil-CoA-transferaza)
- REGULACIJA METALNIM KATIONIMA
 Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} su ključni za rast mikroorganizama, ali su i najvažniji mikroelementi potrebni u biosintezi mnogih sekundarnih metabolita.

KONTROLA SEKUNDARNOG METABOLIZMA UKLJU UJE
VJEROJATNO SVE POZNATE REGULACIJSKE MECHANIZME

- Globalna kontrola s A-faktorom i sli nima spojevima
Sekundarni metabolizam i diferencijacija stanica u rodu *Streptomyces* (proizvodni mikroorganizam za cca 3000 antibiotika) su kontrolirani s rasprostranjenim supstancijama male molekulske mase nazvanim autoregulatori
- A-faktor (2-(6-metilheptanoil)-3R-hidroksimetil-4-butirolakton) i nekoliko desetaka srodnih γ -butirolaktona su specifi ni regulatorni metaboliti. Oni se podudaraju s alormonima ili autoinduktorima koji imaju ulogu u "quorum sensing" sustavu.
- A-faktor je efektor koji utje e na globalnu kontrolu sekundarnog metabolizma. Inducira morfološku i kemijsku diferencijaciju u *Streptomyces griseus* i *S. bikiniensis* i dovodi do formiranja zra nog micelija, konidija, pigmenta, sinteze streptomcina i samog streptomcina. A-faktor kontrolira najmanje 10 proteina u *S. griseus* na razini transkripcije. Jedan od njih je streptomycin-6-fosfotransferaza, enzim odgovoran za sintezu streptomcina i rezistenciju na streptomycin.

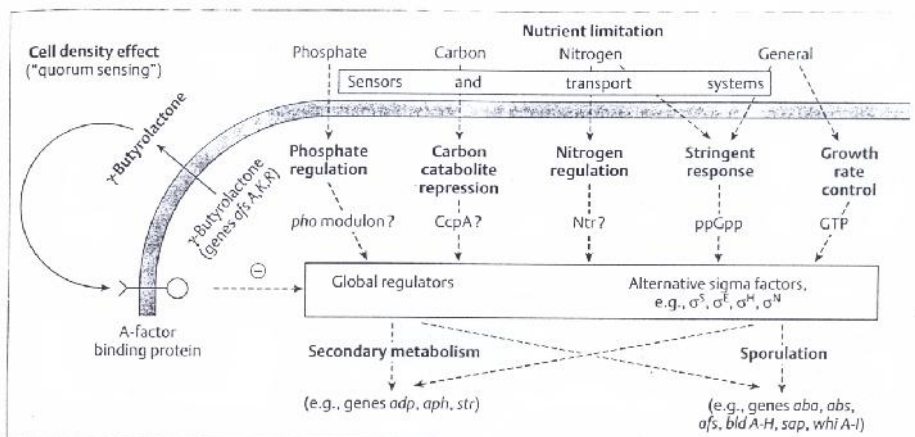


Regulacijska kaskada koja uklju uje A-faktor i "A-factor-binding protein"
afsA – gen odgovoran za sintezu A-faktora i "A-factor-binding protein". Pozitivni signal se prenosi preko nekih dodatnih regulacijskih proteina do *strR* (regulacijski gen u klasteru gena za biosintezu streptomcina), do *aphD* (gena koji kodira za streptomycin-6-fosfotransferazu) i do gena koji su odgovorni za proizvodnju žutog pigmenta i sporulaciju.

SUMARNA SHEMA POZNATIH STIMULANSA UKLJU ENIH U OTPO INJANJE PRIJELAZA IZ TROFOFAZE U IDIOFAZU STREPTOMICETA (vidi slijede i slajd)

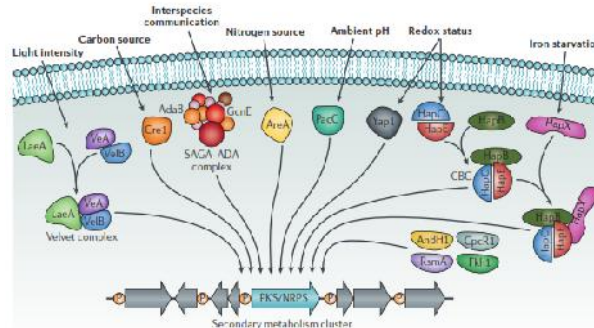
- Dok su u inak ograničavanja hranjiva i γ -butirolaktona dobro poznati, regulacijski mehanizmi još nisu potpuno razjašnjeni
- Analogijom sa ostalim sustavima općih regulacijskih mreža u Gram-pozitivnih bakterija, pretpostavljene su bitne uloge: *pho* regulona, CcpA i *cre* promotora, nitrogen (dušik) regulatora Ntr, obvezujućeg odgovora (stringent response) i različitih alternativnih sigma faktora npr. onih uključeni u gladovanje na ugljiku i stres kontrolu. Kontrola brzine rasta izgleda da uključuje GTP-ovisni mehanizam, dok je „A-faktor vežući protein“ uključeni u „quorum sensing“. Regulacijska povezivanja su označena isprekidanim strelicama.

SUMARNA SHEMA POZNATIH STIMULANSA UKLJU ENIH U OTPO INJANJE PRIJELAZA IZ TROFOFAZE U IDIOFAZU STREPTOMICETA



Dok su u inak ograničavanja hranjiva i γ -butirolaktona dobro poznati, nikakvi regulacijski mehanizmi nisu identificirani. Analogijom s ostalim sustavima općih regulacijskih mreža u Gram-pozitivnih bakterija, pretpostavljene su bitne uloge: *pho* regulona, CcpA i *cre* promotora, nitrogen (dušik) regulatora Ntr, obvezujućeg odgovora (stringent response) i različitih alternativnih sigma faktora npr. onih uključeni u gladovanje na ugljiku i stres kontrolu. Kontrola brzine rasta izgleda da uključuje GTP-ovisni mehanizam, dok je A-faktor vežući protein izgleda uključeni u „quorum sensing“. Regulacijska povezivanja su označena isprekidanim strelicama.

Regulacijski proteini uključeni u regulaciju (modulaciju) ekspresije genskih klastera za sekundarne metabolite u **fungima**



Regulacija ekspresije genskih klastera, odgovornih za sekundarni metabolizam funga, kontroliran je kompleksnom regulacijskom mrežom koja uključuje regulacijske proteine koji reagiraju na promjene u okolišu, kao što su: izvori ugljika i dušika, temperatura, svjetlost, pH, aminokiseline, nastajanje biofilмова i dostupnost željeza. Regulacijski proteini također reagiraju i na metabolite drugih mikroorganizama