

Sinteza bakterijskih zunajceličnih polisaharidov

Leon Marič, Ana Vaupotič, Janja Trček

Bakterije s pretvarjanjem enostavnih sladkorjev v sestavljene sintetizirajo in izločajo v okolje različne polisaharide, ki se razlikujejo po strukturi, funkciji in za človeka uporabni vrednosti. Polisaharidi po izločitvi iz celice ostanejo s površino celice povezani v obliki kapsule ali pa izgubijo stik s celico in se izločijo v okolje kot sluz. Ti bakterijski polisaharidi pa se lahko uporabljajo v živilski industriji (na primer kot emulgatorji, zgoščevalci in protimikrobne snovi) in medicini (na primer kot matrice za inženiring tkiv, kot nosilci za zdravila ali kot obliži za rane). Nekateri od teh biopolimerov postopno razpadajo *in vivo*, zaradi česar so uporabni tudi pri presajanju tkiv in nadzorovanem sproščanju zdravil.

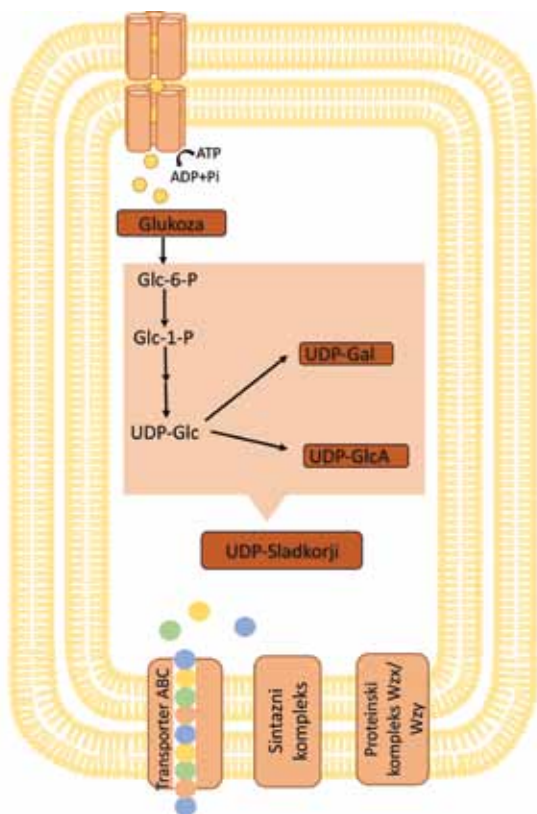
Biološka funkcija zunajceličnih polisaharidov

V naravi se bakterije nahajajo v planktonski obliki ali pa oblikujejo kolonije v obliki biofilmov. Zunajcelični polisaharidi sodelujejo pri oblikovanju biofilma in z adhezijo na podlago ter nadaljnjo mikrobnobno kolonizacijo biotskih ali abiotskih površin omogočajo dolgotrajno pritrjenost biofilma. Pomembni so tudi pri agregaciji bakterijskih celic, ker celice povezujejo in začasno imobilizirajo. Zunajcelični polisaharidi imajo veliko sposobnost zadrževanja vode, zaradi česar je mikrookolje biofilma vedno vlažno, biofilm pa se tako ne izsuši. Kohezijo biofilma omogočajo tako, da tvorijo mrežo (matriks biofilma), vzdržujejo mehansko stabilnost (pogosto v povezavi s kationi) in določajo obliko biofilma. So vir ogljika, dušika in fosforja za bakterije v biofilmu. Predstavljajo zaščitno bariero in tako omogočajo odpornost proti specifičnim in nespecifičnim

obrambnim mehanizmom gostitelja med okužbo, odpornost proti protimikrobnim spojinam in varujejo celico pred vplivom kisika, kadar so nanj občutljivi specifični encimi v celici. Zunajcelični polisaharidi lahko vežejo na površino organske spojine in anorganske ione, omogočajo kopičenje hranil iz okolja in vezavo ksenobiotikov. Tvorijo gel, kar omogoča izmenjavo ionov, oblikovanje mineralov in kopičenje toksičnih kovinskih ionov, s čimer prispevajo k razstrupljanju okolja. Omogočajo tudi vezavo encimov ter sproščanje nekaterih sestavin iz celice. Zaradi vseh teh lastnosti so lahko povezani tudi z boleznimi, kot so cistična fibroza, otitis (vnetje ušes), parodontoz (vnetje dlesni), karies, kostno-mišične okužbe in bakterijski prostatitis.

Zgradba zunajceličnih polisaharidov

Glede na strukturo delimo zunajcelične polisaharide na homopolisaharide in heteropolisaharide. Homopolisaharidi so sestavljeni iz zaporedja enakih sladkornih enot; med njimi so najpogostejši glukani (zaporedje glukoze), fruktani (zaporedje fruktoze) in galaktani (zaporedje galaktoze). Heteropolisaharidi so sestavljeni iz različnih monosaharidnih enot, najpogosteje iz D-glukoze, D-galaktoze, L-ramnoze, na te enote pa so lahko vezane tudi enote N-acetilglukozamina, N-acetilgalaktozamina, glukuronske kisline, fosfatni, acetilni, glicerolni radikali in drugi. Sinteza polisaharidov se začne v celici, nato se enote pri prehodu skozi membrano med seboj povežejo. Za sintezo nekaterih homopolisaharidov je potrebno bakteriji v gojišču zagotoviti specifičen substrat, na primer za sintezo fruktanov saharozo. Količina nastalih zunajceličnih polisaharidov,



Slika 1: Shema nastanka zunajceličnih polisaharidov. Povzeto po Ates (2015).

tudi enakih, se med različnimi bakterijskimi vrstami močno razlikuje. Razumevanje temeljnih procesov sinteze zunajceličnih polimerov je pomembno, saj lahko na podlagi teh znanj polimere modificiramo ter tako izboljšamo njihove lastnosti za uporabo v medicini in biotehnoški industriji.

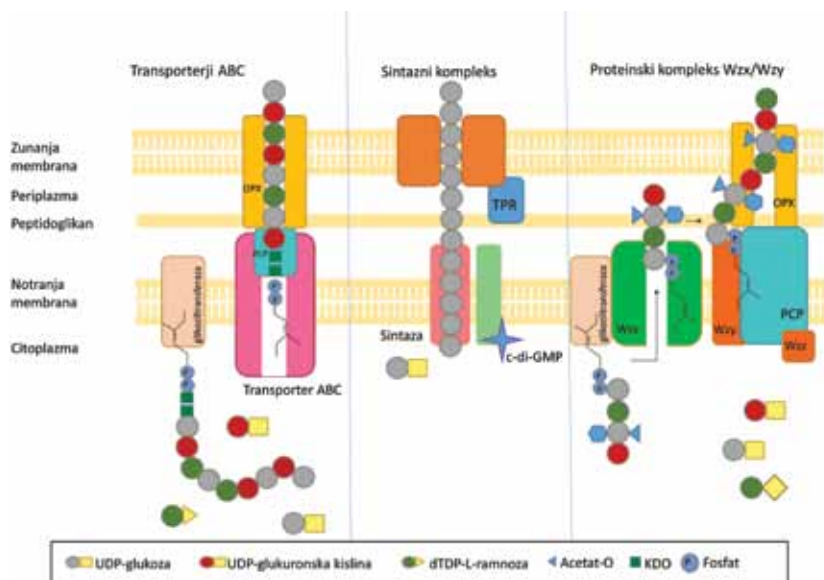
Sinteza bakterijskih zunajceličnih polisaharidov

Zunajcelični polisaharidi nastajajo med rastjo bakterij v pozni logaritemski ali pa tudi stacionarni fazi. Količina proizvedenih polisaharidov je odvisna od različnih dejavnikov, ki delujejo na bakterije, na primer pomanjkanja hranil, povečane slanosti, odstopanj od optimalne temperature, vrednosti pH za rast posameznega mikroorganizma in podobno. Nastanek zunajceličnih polisaharidov poteka v štirih korakih: privzem

substrata, sinteza posameznih podenot, polimerizacija in sproščanje. V prvem koraku enostavni ali sestavljeni sladkorji vstopajo v celico z aktivnim transportom, difuzijo ali ob uporabi molekularnih prenašalcev ter se nato po potrebi razgradijo do monosaharidov. Sladkorna enota, na primer glukoza, se nato fosforilira v glukozo-6-fosfat (Glc-6-P, slika 1), pri čemer sodeluje encim heksokinaza. Nastali produkt nato encim fosfoglukomutaza pretvori v glukozo-1-fosfat (Glc-1-P, slika 1). Encim UDP-glukozapirofosforilaza pretvori glukozo-1-fosfat v UDP-glukoza (uridin difosfat glukoza; UDP-Glc, slika 1), iz katere lahko nastane UDP-glukuronska kislina (UDP-GlcA, slika 1) in UDP-galaktoza (UDP-Gal). Enote nastalih UDP-sladkorjev se nato polimerizirajo, pri čemer sodelujejo encimi glikoziltransferaze, ki se sintetizirajo v citoplazemski membrani bakterijske celice. V zadnji, četrti fazi se polisaharidi lahko modificirajo v procesih, kot so acetilacija, acilacija, sulfatacija in metilacija. Modificirani polisaharidi se nato prenesejo do celične površine in se s pomočjo proteinov Wzx/Wzy, sintaz ali transporterjev ABC izločijo iz celice v obliki verige ali kapsule (slika 1).

Polimerizacija in sproščanje v okolico

Bakterijski polisaharidi se kopičijo v celici (znotrajcelični) ali zunaj celice (zunajcelični). Prvi se nalagajo v celici (na primer glikogen) kot rezervna oblika vira ogljika, zunajcelični polisaharidi pa oblikujejo kapsularne ali pa nekapsularne polisaharide. Kapsularni polisaharidi po sintezi ostanejo povezani s površino bakterije, nekapsularni polisaharidi pa se izločijo v okolico celice.



Slika 2:
Mehanizmi
polimerizacije
in izločanja
zunajceličnih
polisaharidov.
Povzeto po Schmid
s sod. (2015).

Mehanizmi nastanka zunajceličnih polisaharidov so različni: večinoma sinteza poteka v celici, lahko pa tudi zunaj celice. Za nastanek polisaharidov so potrebne predhodne molekule, ki nastanejo s pomočjo različnih encimov znotraj celice.

Eden izmed mehanizmov polimerizacije in izločanja zunajceličnih polisaharidov temelji na uporabi proteinskega kompleksa Wzx/Wzy. V tem primeru se posamezne enote polisaharida povežejo z molekulo undekaprenil difosfat, zaradi česar jih prepozna encim glikoziltransferaza. Glikoziltransferaza se nahaja v citoplazemski membrani bakterije in omogoča povezovanje enot v krajše polimere. Polisaharid se nato prenese preko citoplazemske membrane v periplazmo s pomočjo proteina Wzx (flipaza) ter proteina Wzy (proteaza), ki omogoči tudi polimerizacijo polisaharida. Pri prehodu polisaharida skozi zunanjo membrano sodeluje tudi polimeraza PCP (polisaharid ko-polimeraza), ki polimer usmeri tudi skozi kanal v zunanji membrani, ki ga sestavljajo proteini OPX (proteini za izločanje polisaharidov). Za polisaharide, ki nastanejo po opisani poti, je značilno, da so zgrajeni iz 4 do 5 različnih sladkornih enot (na primer ksantan) (slika 2).

Pri nastanku kapsularnih polisaharidov pogosto sodelujejo transporterji ABC. Tako kot pri nastanku polisaharidov s pomočjo proteinskega kompleksa Wzx/Wzy se tudi v tem primeru enote združijo v manjše odseke s pomočjo glikoziltransferaze na citoplazemski strani notranje membrane celice. Prenos polisaharidnih enot skozi citoplazemsko membrano do površine celice omogoči kompleks, sestavljen iz transporterja ABC, proteina PCP in proteina OPX. Tako nastali kapsularni polisaharidi imajo na končnem delu verige vezan glikolipid, sestavljen iz fosfatidilglicerola in poli-2-keto-3-deoksioktulosonične kisline (KDO). KDO prepozna protein OPX, ki poveže enote v polimerno molekulo (slika 2).

Nekateri zunajcelični polisaharidi nastajajo s sintazami. V tem primeru nastanejo končni polisaharidi že v notranjosti celice in se kot celota izločijo preko membrane in celične stene bakterije. Povezovanje polisaharidnih enot omogoči sintaza, ki ima poleg tega tudi vlogo, da prenese polisaharide skozi kanal, ki se nahaja na zunanji membrani. Sintaza se v tem primeru nahaja na notranji membrani, proteinski kompleks, ki vključuje membranski kanal in proteine TPR (pona-

vljajoče enote tetratrikopeptidov), pa se nahaja na zunanji membrani bakterijske celice. Sintaza posreduje polimer skozi kanal, prenos iz sintaze do kanala pa omogočajo proteini TPR. S pomočjo sintaze nastajajo homopolisaharidi iz ene sladkorne enote, na primer kurdlan, ki je zgrajen samo iz β -(1-3)-glukočnih podenot, in bakterijska celuloza, ki je sestavljena iz β -(1-4)-glukočnih podenot (slika 2).

Običajno biosinteza predhodnih molekul polisaharida poteka v celici s pomočjo encimov, polimerizacija in izločanje polisaharida pa sta vezani na celično ovojnico. Pri nekaterih polisaharidih, na primer dekstranu in levanu, pa njihova sinteza poteka s pomočjo glikoziltransferaz, ki so pritrjene na celično površino in omogočajo sintezo polisaharidov

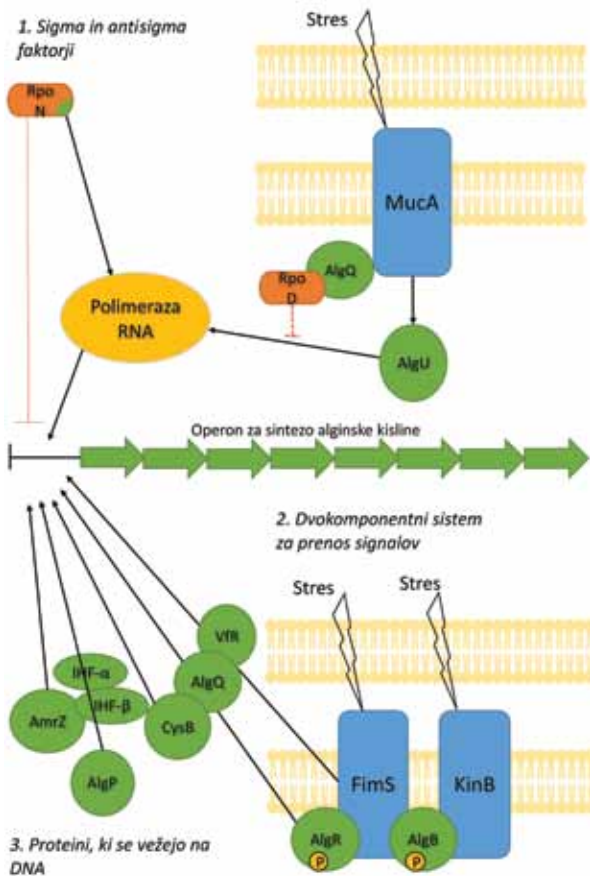
na zunanji strani celice.

Bakterijski zunajcelični polisaharidi se med seboj razlikujejo po kemijski zgradbi in fizikalnih lastnostih. Pri nastanku sodelujejo geni, ki kodirajo različne vrste glikoziltransferaz, kanalčke ter encime za polimerizacijo posameznih enot. Ti geni so združeni v operon na kromosomu ali pa na velikem plazmidu bakterij ter jih je mogoče v genomski sekvenci identificirati. Kljub temu, da je že zelo dolgo poznanih veliko genov, ki so odgovorni za nastanek zunajceličnih polisaharidov, natančna vloga in aktivnost vseh genov in proteinov še nista poznana.

Regulacija biosinteze zunajceličnih polisaharidov

Regulacija sinteze zunajceličnih polisaharidov je kompleksna in deluje na več ravneh, večinoma pa na ravni transkripcije ob aktivaciji dvokomponentnega sistema za prenos signalov iz okolja v celico, sistema *quorum sensing*, alternativnih sigma in antisigma faktorjev za uravnavanje aktivnosti RNA-polimeraze ter mehanizmov, pri katerih sodelujejo ciklični di-GMP in faktor IHF (angl. *integration host factor*).

Indukcijo biosinteze zunajceličnih polisaharidov velikokrat sproži tudi pomanjkanje dušika. Številni polisaharidi, kot so celuloza, alginska kislina in ksantan, so regulirani s cikličnim di-GMP, ki služi kot alosterični regulator celuloza sintaze in alginat sintaze. Najbolj preučeni regulatorni mehanizem je pri sintezi alginske



Slika 3: Regulatorni mehanizem sinteze alginske kisline. Povzeto po Hay s sod. (2014).

kislina, saj je njena sinteza pomembna pri patogenih bakterijah, na primer bakteriji *Pseudomonas aeruginosa*. Najpomembnejši regulator pri sintezi alginske kisline, ki zavaruje celično steno pred dejavniki okoljskega stresa, je sigma faktor AlgU. Antisigma faktor MucA prepozna signal stresa iz okolja. Vključen je v citoplazemsko membrano in v primeru stresa spodbudi delovanje AlgU. Poleg faktorja AlgU deluje v stresnih razmerah še faktor AlgQ, ki blokira glavni sigma faktor RpoD in s tem omogoča faktorju AlgU indukcijo transkripcije operona za biosintezo alginske kisline. Faktor RpoD v razmerah brez stresa utiša delovanje AlgU. Na izražanje genov za sintezo alginske kisline vpliva tudi alternativni sigma faktor RpoN, ki se v razmerah, bogatih z dušikom, veže na promotor *algD* in s tem utiša produkcijo alginske kisline. V primeru, ko bakteriji primanjkuje dušika, pa faktor RpoN spodbudi delovanje RNA-polimeraze in omogoči izražanje genov za sintezo alginske kisline. V regulacijo sinteze alginske kisline so vključeni tudi proteini, ki se vežejo na DNA ter dvokomponentni sistem transdukcije signala. V posttranskripcijsko regulacijo sta vključena nekodirajoča sRNA in ciklični di-GMP. Regulacija biosinteze ostalih zunajceličnih polisaharidov je podobna kot pri alginski kislini (slika 3).

Umetno konstruiranje zunajceličnih polisaharidov

Raziskovanje zunajceličnih polisaharidov je zaradi njihove uporabne vrednosti zelo aktualno, z njihovo modifikacijo na genetski ravni ali tudi po njihovi sintezi pa lahko njihove lastnosti še izboljšamo. To lahko na primer dosežemo z zamenjavo ali čezmernim izražanjem določenih genov in operonov ali pa s spreminjanjem domen glikoziltransferaz, ki so vključene v biosintezo zunajceličnih polisaharidov. Novejše tehnike sekvenciranja pa so skupaj s sodobnimi bioinformatičnimi orodji omogočile identifikacijo novih genov, vključenih v biosintezo

bakterijskih polisaharidov. Kot zelo uporabno orodje sintezne biologije so se pokazali tudi regulatorni delci, ki predstavljajo umetno konstruirane sekvence DNA, ki jih lahko s pomočjo restriktivnih encimov vstavimo na želena mesta v genomu. Primer takega delca je umetno konstruirani promotor, ki omogoči tarčno indukcijo sinteze zelenega zunajceličnega polisaharida. Kot dobra tarča za preoblikovanje polisaharida je tudi glikoziltransferaza, saj na ta način lahko vplivamo na zaporedje dodajanja enot v polisaharid. Polisaharid lahko modificiramo tudi s proteini ali pa tudi encimatsko ter tako proizvedemo nove biomateriale s specifičnimi lastnostmi za uporabo v medicini in različnih vrstah industrije.

Literatura:

- Ates, O., 2015: *Systems biology of microbial exopolysaccharides production*. *Frontiers of Bioengineering and Biotechnology*, 3: 200.
- Hay, I. D., Wang, Y., Moradali, M. F., Rehman, Z. U., Rehm, B. H. A., 2014: *Genetics and regulation of bacterial alginate production*. *Environmental Microbiology*, 16 (10): 2997–3011.
- Mishra, A., Jha, B., 2013: *Microbial exopolysaccharides*. V: Rosenberg, E., DeLong, E. F., Thompson, F., Lory, S., Stackebrandt, E., (ur.): *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer. 179–192.
- Nwodo, U. U., Green, E., Okoh, A. I., 2012: *Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (11), 14002–14015.
- Schmid, J., Sieber, V., Rehm, B., 2015: *Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies*. *Frontiers in Microbiology*, 6: 496.

Slovarček:

Acetilacija opisuje uvajanje acetilne skupine (CH_3CO) v molekulo.

Acilacija opisuje uvajanje acilne skupine (RCO) v molekulo.

Ciklični di-GMP je signalna molekula, vključena v izražanje nekaterih genov v bakterijski celici.

Faktor IHF (angl. host integration factor) je manjša proteinska molekula, ki se veže na DNA v nekaterih po Gramu negativnih

bakterijah in omogoča vključitev novih fragmentov DNA v bakterijski genom.

Logaritemska in stacionarna faza opisujeta stopnji v rasti bakterijske populacije: v prvi se populacija zaradi ugodnih razmer pomnožuje z eksponentno hitrostjo, v drugi pa se zaradi poslabšanih razmer rast upočasni in je število novo nastalih celic enako številu umrlih celic.

Metilacija opisuje uvajanje metilne skupine (CH₃) v molekulo.

Periplazma opisuje prostor med citoplazem-

sko membrano in zunanjo membrano pri po Gramu negativnih bakterijah.

Quorum sensing opisuje vrsto komunikacije pri bakterijah, ki jim omogoča detekcijo gostote bakterijske populacije in odziv z izražanjem specifičnih genov.

Sulfatacija opisuje vezavo sulfatne skupine (SO₄) v molekulo.

Metulji monarhi ogroženi • Ekologija

Metulji monarhi ogroženi

Jurij Kurillo

Ameriški dnevni metulji monarhi (*Danaus plexippus* L.) so pri biologih že od nekdaj veljali za primer največjega selivca v svojem žuželčjem redu. Od južne Kanade in severnih predelov Združenih držav Amerike namreč več milijonov osebkov sleherno jesen premeri okoli štiritisočkilometrsko pot na jug – zahodna populacija se ustavi ob tihomorski obali Kalifornije, vzhodna pa se poda še naprej v osrednjo Mehiko. Na kalifornijskem ozemlju se zadržujejo predvsem okrog Montereyskega zaliva, južno od San Francisca; največ jih je v naselju Pacific Grove, v tako imenovanem *Monarchs Grove Sanctuary*. Za svoje preživetje potrebujejo prav posebna bivališča in mikroklimatske razmere. Izberejo zavetne drevesne nasade blizu oceana, ki pa morajo biti zavarovani pred hudimi zimskimi mrazovi in viharji. Najbolj primerna so gosta drevesa, rastoča v polkrogu, ki je odprt proti soncu, proti vetru pa zavarovan. Svoje dni so monarhi našli take ugodne življenjske razmere v nasadih montereyskega bora (*Pinus radiata*), montereyške ciprese (*Cupressus maculatum*) in obalne sekvoje (*Sequoia sempervirens*), v

zadnjem stoletju pa so se močno usmerili na sestoje evkaliptusa (*Eucalyptus parviflora*). Izsekavanje te neavtohtone, iz Avstralije uvožene drevesne vrste, pa tudi množična obolelost bora, so že v bližnji preteklosti ogrožali zimska bivališča metuljev.

Še pred desetletji so se pod težo tisočev in tisočev metuljev v zimovališčih dobesedno lomile veje, zvok njihovih krilc pa je bilo slišati kot »žuboreči potoček ali poletni dež«. Pred dvema desetletjema so v zimskih mesecih tako našteji v Kaliforniji približno 150 milijonov monarhov. Od takrat pa je število prezimujočih metuljev samo še padalo in naj bi jih bilo leta 2015 zgolj še 42 milijonov, kar bi pomenilo, da jih je manj za 80 odstotkov (po nekaterih podatkih celo 97 odstotkov). Slikovito rečeno: če bi leta 1990 metulji pokrivali devet nogometnih igrišč, bi pred dvema letoma zavzeli komaj eno! V lanskem novembru so prostovoljci znanstvenega programa *Western Monarch Thawsgiving Count* v Kaliforniji monarhe iskali zaman, saj se sploh niso prikazali. Nato se je pokazalo, da jih je bilo za 86 odstotkov