

# Programirana stanična smrt bakterija

---

**Boras, Maša**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:163108>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Maša Boras**

6815/BT

**PROGRAMIRANA STANIČNA SMRT BAKTERIJA**  
**ZAVRŠNI RAD**

**Modul: Molekularna genetika**

**Mentor: Prof. dr. sc. *Višnja Bačun-Družina***

**Zagreb, 2016.**

# DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Završni rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

## PROGRAMIRANA STANIČNA SMRT BAKTERIJA

*Maša Boras, 6815/BT*

**Sažetak:** Programirana stanična smrt je proces koji je uobičajeno povezan s višestaničnim eukariotima. Međutim, nedavno je pronađena u jednostaničnim eukariotima i u bakterijama. U bakterijama ima ulogu u opstanku stanica tijekom stresnih uvjeta kao što su nedostatak nutrijenata i izloženost antibioticima. U takvim uvjetima dio kolonije umire kako bi se omogućio opstanak ostalih stanica. Programirana stanična smrt također ima važnu ulogu u mnogo razvojnih procesa u bakterijama, primjerice u autolizi stanice majke u sporulaciji, autolizi stanica tijekom formiranja plodišta u miksobakterijama, transformaciji DNA oslobođenoj iz stanica streptokoka koje su autolizirale, diferencijaciji hifa streptomiceta i razvoju biofilma. Iako nisu poznati mehanizmi koji kontroliraju staničnu smrt i lizu, pretpostavlja se da je opći mehanizam induciranja programirane stanične smrti pomoću sustava toksin-antitoksin.

**Ključne riječi:** programirana stanična smrt, sustavi toksin-antitoksin, stresni uvjeti, evolucija bakterija

**Rad sadrži:** 33 stranice, 6 slika, 81 literaturni navod

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom obliku i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *Prof. dr. sc. Višnja Bačun-Družina*

**Pomoć pri izradi:**

**Rad predan:** Lipanj, 2016

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**University of Zagreb**

**Final work**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Undergraduate studies Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering**

**Laboratory for Biology and Microbial Genetics**

### **BACTERIAL PROGRAMMED CELL DEATH**

*Maša Boras, 6815/BT*

**Abstract:** Programmed cell death is a process commonly associated with eukaryotic multicellular organisms. However, recently, programmed cell death have also been found in unicellular eukaryotes and in bacteria. In bacteria it has a role in cell survival under various stressing conditions as nutrient deprivation and antibiotic exposure. Under these conditions, part of the colony dies to sustain the survival of the remaining cells. Programmed cell death has also an important role in a number of developmental processes, such as autolysis of the mother cell in sporulation, autolysis of bacterial cells during the formation of fruiting body in myxobacteria, DNA transformation liberated from cells of streptococci undergoing autolysis, hyphae differentiation in streptomyces and biofilm development. Although the molecular mechanisms controlling cell death and lysis are unknown, it has been hypothesized that a common mechanism to induce programmed cell death in bacteria is through toxin-antitoxin systems.

**Key words:** programmed cell death, toxin-antitoxin systems, stressful conditions, bacterial evolution

**Thesis contains:** 33 pages, 6 figures, 81 references

**Original in:** Croatian

**Final work is printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *Ph. D. Višnja Bačun-Družina, Full Professor*

**Technical support and assistance:**

**Thesis delivered:** June 2016

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GLAVNI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.2. Mehanizmi programirane stanične smrti bakterija .....	3
2.1.1. Sustavi toksin-antitoksin .....	3
2.2.1.1. Tipovi sustava toksin-antitoksin .....	4
2.2.2. Sustav kolin i endolizin .....	7
2.2.3. Regulatorni sustav Cid/Lrg .....	7
2.2.3.1. Sličnosti regulatornog sustava Cid/Lrg i apoptoze .....	8
2.2.4. Peptidoglikan hidrolaze .....	8
2.3. Programirana stanična smrt bakterija u stresnim uvjetima .....	9
2.3.1. Modelni put programirane stanične smrti bakterija .....	10
2.3.2. Sustavi programirane stanične smrti u <i>Escherichia coli</i> .....	11
2.3.2.1. Smrt posredovana sustavom MazEF .....	11
2.3.2.2. Smrt bakterijskih stanica nalik apoptozi .....	14
2.3.3. Perzisteri .....	15
2.4. Programirana stanična smrt u bakterijskom razvoju .....	16
2.4.1. Autoliza i kanibalizam tijekom sporulacije <i>Bacillus subtilis</i> .....	16
2.4.2. Autoliza u razvoju bakterije <i>Myxococcus xanthus</i> .....	17
2.4.3. Diferencijacija hifa streptomiceta .....	18
2.4.4. Transformacija DNA kod streptokoka .....	20
2.4.5. Kuglasti oblik u bakterije <i>Helicobacter pylori</i> .....	21
2.4.6. Uloga programirane stanične smrti u razvoju biofilma .....	21
2.4.6.1. Otpuštanje molekula ekstracelularne DNA u bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	24
2.4.6.2. Otpuštanje molekula ekstracelularne DNA u bakterije <i>Staphylococcus aureus</i> .....	24

<b>3. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>25</b>
<b>4. LITERATURA .....</b>	<b>26</b>

# 1. UVOD

Programirana stanična smrt (*engl.* programmed cell death, PCD) se odnosi na sve genski kodirane procese koji dovode do samouništenja stanice (Engelberg-Kulka i sur., 2006). Detaljno je opisana u višestaničnim eukariotima kod kojih je važna za razvoj, održavanje homeostaze i odgovor na stresne uvjete. Nedavno je programirana stanična smrt otkrivena i u jednostaničnim eukariotama i prokariotama. Mišljenje da je bakterijska smrt i liza pasivan proces, zamijenjeno je onim da je to složen, genski kodiran i strogo reguliran proces. Najveća prepreka u otkriću programirane smrti bakterija je bila što se naizgled čini besmisleno da jednostaničan organizam aktivira program koji će dovesti do njegove smrti. Međutim, bakterije se u određenim uvjetima organiziraju u višestanične oblike kao što su kolonije, agregati i biofilm (Claessen i sur., 2014). Takva organizacija pruža brojne pogodnosti kao što su povećana zaštita od nepovoljnih uvjeta, veća dostupnost hrane i veća genetska raznolikost. U njoj bakterije koriste programiranu staničnu smrt tijekom stresnih uvjeta kojom žrtvuju dio populacije kako bi osigurale opstanak ostalih stanica. Osim kao odgovor na stres, programirana stanična smrt bakterija ima ključnu ulogu u procesima razvoja kao što su stvaranje plodnog tijela u miksobakterijama (Wierman i Dvorkin, 1977), diferencijacija hifa streptomiceta (Manteca i sur., 2006; Miguelez i sur., 1999), sporulacija bacila (González-Pastor i sur., 2003), transformacija DNA kod streptokoka (Claverys i Håvarstein, 2007; Håvarstein i sur., 2006) i stvaranje biofilma (Webb i sur., 2003).

## 2. GLAVNI DIO

### 2.1. Programirana stanična smrt u eukariotima

Programirana stanična smrt je detaljno proučena u višestaničnim životinjama gdje je nužna za razvoj i održavanje homeostaze. Oblici programirane stanične smrti u višestaničnim životinjama su apoptoza, autofagija i programirana nekroza (Ouyang i sur., 2012). Među njima je najbolje proučena apoptoza, mehanizam kojim stanica uz utrošak energije pokreće vlastitu smrt kao odgovor na fiziološke ili razvojne signale. Ona omogućuje eliminaciju oštećenih ili suvišnih stanica bez upotrebe imunskog sustava. Apoptozu karakteriziraju kondenzacija kromatina, fragmentacija DNA, “pupanje” dijelova stanične membrane, smanjenje stanice i stvaranje apoptotskih tjelešaca koja se razgrađuju procesom fagocitoze (Kerr i sur., 1972). Autofagija je proces koji počinje formiranjem autofagosoma, struktura s dvostrukom membranom koja okružuju citoplazmatske makromolekule i organele predodređene za ponovno iskorištavanje. Uloga autofagije je održavanje homeostaze u stresnim uvjetima. Nova otkrića su pokazala da oštećene stanice kod kojih se odvija autofagija mogu sebe usmrtniti i da se način njihove stanične smrti razlikuje od apoptoze i programirane nekroze (Balik i sur., 2010). Nekroza je proces koji se inducira nakon znatnijeg oštećenja stanice različitim fizikalno-kemijskim agensima. Oštećena stanica bubri, povećava joj se propusnost citoplazmatske membrane te dolazi do istjecanja staničnog sadržaja u okolinu. Pokazano je da ti procesi mogu biti strogo regulirani što je dovelo do izraza programirana nekroza (Boujrad i sur., 2007).

Biljke također održavaju homeostazu i iniciraju staničnu smrt kao odgovor na oštećenja s mnogim karakteristikama različitim od apoptoze (Vanvushin i sur., 2004). Biljke nemaju imunski sustav te je stoga manja potreba za tvorbu apoptotskih tjelešaca i preciznom eliminacijom stanica. Isto tako, u većini slučajeva stanična stijenka ostaje nerazgrađena. U biljkama postoji više glavnih tipova PCD: razvojna PCD, PCD inducirana patogenima i abiotička PCD.

Programirana stanična smrt je opisana i u 9 vrsta jednostaničnih eukariota koji pripadaju u 4 divergirajuće grane eukariotskog filogenetskog stabla. Prednosti takvog programa bi mogle biti selekcija za preživljavanje najsposobnijih stanica u koloniji jednostaničnih eukariota, optimalnu prilagodbu broja stanica na uvjete okoliša i regulaciju



životnog ciklusa i diferencijacije kao odgovor na promjene u okolišu. Fenotip stanične smrti kinetoplastida, trepetljikaša i dinoflagelata dijeli karakteristike apoptoze uključujući fragmentaciju DNA (Ameisen, 2002). Fenotip smrti nalik onom apoptoze je eksperimentalno induciran u kvascu (Madeo i sur., 1999) te je analiza kvašćevog genoma pokazala da nekoliko kvašćevih proteina dijele homologiju s apoptotskim proteinima viših eukariota.

## 2.2. Mehanizmi programirane stanične smrti bakterija

### 2.1.1. Sustavi toksin-antitoksin

U bakterija je programirana stanična smrt posredovana različitim sustavima, od kojih su najbolje proučeni sustavi toksin-antitoksin (*engl.* toxin- antitoxin, TA). To su jedinstveni genski sustavi koji se sastoje od para gena koji kodiraju stabilan toksin i nestabilan antitoksin (Engelberg-Kulka i sur., 2005). Prvobitno su otkriveni na plazmidima gdje su nazvani „ovisni moduli“ (Yarmolinsky, 1995) jer čine bakterijsku stanicu ovisnom o pristunosti plazmida. Pristuni su i na kromosomima brojnih bakterija, od kojih su najviše istraženi sustavi TA bakterije *Escherichia coli* među koje pripada sustav MazEF (Aizenman i sur., 1996; Engelberg-Kulka i sur., 2005). Osim za prevladavanje stresnih uvjeta sustavi TA su važni za: (a) sintezu peptidoglikana; (b) očuvanje pokretnih genetičkih elemenata; (c) zaštitu od unosa strane DNA; (d) zaštitu od djelovanja antibiotika i (e) stvaranje biofilma. Većina bakterija i arheja ima TA mjesto u genomu, često u više kopija prisutnih u kromosomalnoj i ekstrakromosomalnoj DNA. Mjesta TA u genomu su organizirana u operone s dva konstitutivna gena koja kodiraju toksin i antitoksin koji sprječava toksično djelovanje toksina (Yamaguchi i sur., 2011). Molekularni mehanizam djelovanja sustava TA počiva na različitoj stabilnosti njegove dvije komponente. Slobodni antitoksin je nestabilan u odnosu na toksin te se u stanicama koje normalno rastu mora neprestano sintetizirati kako bi formirao stabilan kompleks s toksinom i tako inhibirao njegovu funkciju. U slučaju oštećenja stanice ili stresnih uvjeta antitoksini se razgrade omogućavajući slobodnom toksinu da se veže na svoju staničnu metu (Allocati i sur., 2015). Sustavi TA se mogu podijeliti na tri tipa ovisno o prirodi antitoksina i načinu njegovog djelovanja (Yamaguchi i sur., 2011). Dok su toksini uvijek proteini, antitoksini mogu biti RNA molekule ili proteini. Nedavno su identificirana još dva tipa sustava TA: tip III i tip IV (Mruk i Kobayashi, 2014; Schuster i Bertram, 2013).

### 2.2.1.1. Tipovi sustava toksin-antitoksin

Kod tipa I sustava TA ekspresija gena za toksin je regulirana s antisense RNA koja je transkribirana s gena susjednim s genom koji kodira toksin, ali u obrnutoj orijentaciji (Yamaguchi i sur., 2011). Tako je antitoksin antisense RNA koja se komplementarno veže na mRNA koja kodira toksin i sprječava njegovu translaciju (slika 1a). Toksini su mali hidrofobni proteini, a molekularni mehanizam kojim toksini ubijaju vjerojatno je povezan s depolarizacijom i povećanom propusnosti stanične membrane. Jedan od tipova I sustava TA je sustav Hok/Sok koji se nalazi na R1 plazmidu u *Escherichia coli*. On posreduje održavanje plazmida inducirajući smrt u stanicama bez plazmida. Tijekom diobe dvije stanice kćeri naslijede toksin Hok te malu količinu antitoksina Sok koji se brzo degradira zbog svoje nestabilnosti. Ako stanica tijekom diobe izgubi plazmid R1, ne može sintetizirati antitoksin te se ne inhibira translacija nasljeđene Hok mRNA i dolazi do smrti stanice (Fozo i sur., 2010; Unoson i Wagner, 2008).

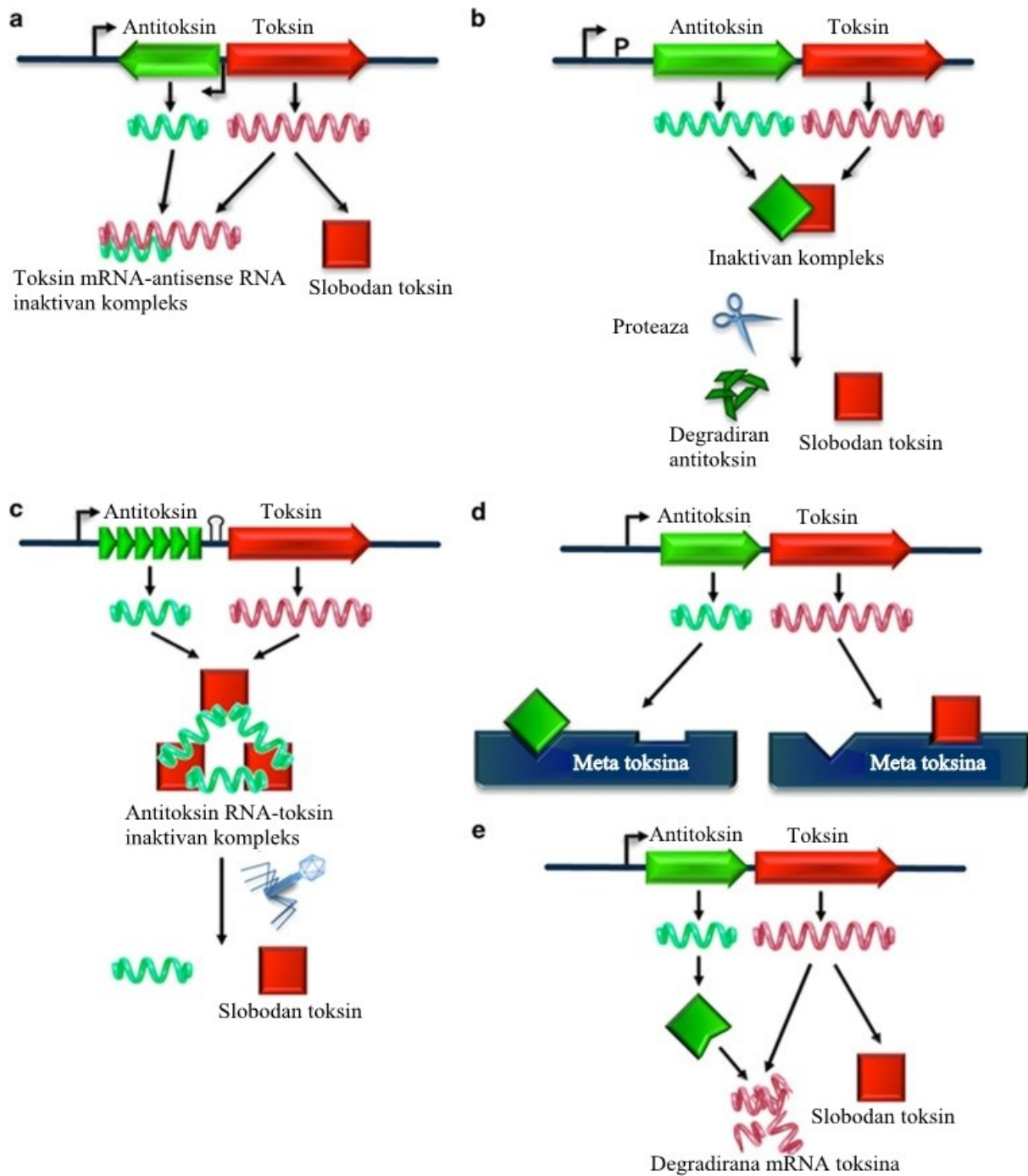
Tip II sustava TA se sastoji od dva gena koja kodiraju toksin i antitoksin. Oni se nalaze u operonu i regulirani su na razini transkripcije. Toksin i antitoksin su dva mala proteina koja formiraju stabilni TA kompleks koji inhibira štetne učinke toksina (slika 1b). Tijekom oštećenja stanice, stresom inducirane proteaze razgrade antitoksin oslobađajući toksin što dovodi do inhibicije rasta stanice ili njene smrti (Yamaguchi i sur., 2011). Najbolje proučena vrsta tipa II je sustav MazEF koji je široko raširen kod bakterija. Protein MazE je antitoksin, a MazF toksin koji je endoribonukleaza što specifično cijepa ACA sekvence u mRNA i tako inhibira translaciju (Zhang i sur., 2003). To zaustavlja stanični rast, ali još nije potvrđeno kako uzrokuje smrt. Najbolje proučen sustav MazEF je onaj iz *Escherichia coli*. Tipovi II sustava TA su uključeni i u bakterijsku rezistenciju (Yamaguchi i sur., 2011) i stvaranje biofilma (Wang i Wood, 2011).

Tip III se sastoji od antitoksina, molekule RNA, koja inhibira toksin stvarajući s njim RNA-protein kompleks (Fineran i sur., 2009, slika 1c). Primjer je sustav ToxIN u kojem smrt stanice smanjuje infekciju bakteriofagom unutar populacije bakterija. Gen *toxN* kodira toksin, endoribonukleazu dugu 170 aminokiselina. Uzvodno je regija ToxI s 5.5 uzastopno ponovljene sekvencije duge 36 nukleotida. Svako 36 nukleotida dugo ToxI RNA ponavljanje može inhibirati aktivnost ToxN. ToxIN kompleks se sastoji od 3 ToxN proteina povezanih s tri ToxI RNA protein-RNA interakcijama u trokutastom obliku (Blower i sur., 2012). Tijekom infekcije bakteriofagom omjer ToxI:ToxN se mijenja zbog promjena u transkripciji ili

translaciji ili degradacijom bakterijske DNA što rezultira oslobađanjem aktivnog toksina koji cijepa stanične RNA i molekule RNA bakteriofaga (Fineran i sur., 2009).

Kod tipa IV sustava TA antitoksin ne inhibira toksin izravnim vezanjem nego neutralizira njegovu toksičnost stabilizirajući proteine na koje toksin djeluje (Masuda i sur., 2012, slika 1d). Primjer tih sustava je modul YeeU/YeeV (CbeA/CbtA) koji je uključen u regulaciju proteina citoskeleta. Toksin CbtA inhibira polimerizaciju proteina citoskeleta MreB i FtsZ. Antitoksin YeeU uzrokuje suprotni efekt, sudjelujući u interakcijama s dva proteina koji pomažu združivanje filamenata. Tijekom stresnih uvjeta, YeeU je degradiran, pa je omogućeno vezanje CbtA na svoje mete što uzrokuje promjene u citoskeletu i inhibiciju stanične diobe (Masuda i sur., 2012).

Kod tipa V antitoksin djeluje kao endoribonukleaza koja degradira mRNA koja kodira toksin (slika 1e). Takav sustav koristi bakterija *Escherichia coli* u kojem endoribonukleaza GhoS specifično degradira mRNA koja kodira membranski litički peptid GhoT (Wang i sur., 2012).



Slika 1. Bakterijski sustavi TA se sastoje od toksina i antitoksina koji neutralizira njegov učinak. Klasificirani su na osnovi funkcije antitoksina i sastava sustava TA. U svim sustavima TA, kao odgovor na razne stimulanse, antitoksin je degradiran omogućavajući toksinu da djeluje na svoju metu što općenito rezultira zaustavljanjem bakterijskog rasta ili staničnom smrću. (a) tip I: antisense RNA antitoksin se veže za mRNA koja kodira toksin blokirajući njenu translaciju. Gubitak nestabilne antisense mRNA omogućava transkripciju sense lanca.

(b) Tip II: toksin i antitoksin su generalno transkribirani u istom operonu i tvore inaktivan kompleks. (c) Tip III: antitoksin RNA se veže na toksin i inaktivira ga. (d) Tip IV: antitoksin sprječava učinak toksina vežući se na metu toksina. Opet kao odgovor na stres, degradacija antitoksina omogućava vezanje toksina na svoju metu. (e) Tip V: antitoksin se veže i cijepa mRNA koja kodira toksin. Izvor:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4669768/figure/fig1/>, preuzeto 20.5.2016.

### **2.2.2. Sustav kolin i endolizin**

Primjer regulirane smrti bakterijskih stanica i lize je kontrola litičkog ciklusa bakteriofaga. Bakteriofagi s dvolančanom DNA, kako bi vremenski regulirali smrt i lizu bakterijskih stanica domaćina tijekom litičkog ciklusa, koriste sustav kolin i endolizin. Kontrolom vremena lize bakterijskih stanica postiže se ravnoteža posljedica rane terminacije replikacije bakteriofaga unutar stanice domaćina s pogodnostima postizanja logaritamskog umnožavanja u drugoj stanici domaćina tijekom sljedeće infekcije (Rice i Bayles, 2008).

Sustav kolin i endolizin čine kolin, mali hidrofobni protein koji se akumulira u citoplazmatskoj membrani stanice domaćina i tamo inducira stvaranje pukotina, te endolizin, enzim koji ima aktivnost peptidoglikan hidrolaze. Endolizin se akumulira u citoplazmi stanice domaćina tijekom razvoja čestica faga sve dok kolin ne inducira stvaranje pora u membrani. Stoga kolin ima ulogu u određivanju kada će doći do lize domaćina (Young i Wang, 2006). Kod nekih faga, kao što su oni koji inficiraju *Streptococcus pneumoniae*, permeabilizacija membrane uzrokovana kolinom može aktivirati autolizu bakterija. U bakterije *Streptococcus pneumoniae* se aktivira autolizin LytA koji uz endolizin posreduje bakterijsku lizu i oslobađanje faga. To omogućuje optimalnu lizu stanice domaćina i oslobađanje virusnih čestica (Frias i sur., 2009). U preciznom podešavanju vremena lize kod bakteriofaga s dvolančanom DNA sudjeluje antikolin koji regulira aktivnost kolina prema signalima iz okoliša (Allocati i sur., 2015).

### **2.2.3. Regulatorni sustav Cid/Lrg**

Otkriće operona *cid i lrg* je proizašlo iz identifikacije novog dvokomponentnog regulatornog sustava u *Staphylococcus aureus* nazvanog LytSR koji utječe na aktivnost

peptidoglikan hidrolaze i autolizu (Brunskill i Bayles, 1996). Operoni *cidABC* i *lrgAB* su široko rasprostranjeni u bakterija. Gen *cidA* kodira hidrofobni protein CidA za koji se pretpostavlja da raspršuje membranski potencijal i tako aktivira peptidoglikan hidrolaze, dok gen *lrgA* kodira hidrofobni protein LrgA koji inhibira aktivnost CidA. Protein LrgA ima 23% sekvence aminokiselina iste kao protein CidA. Ti proteini imaju sličnu strukturu i funkciju kao i kolini i antikolini iz bakteriofaga. S obzirom na te sličnosti kao i na posljedice u fenotipu prilikom mutacija u operonima *cid* i *lrg* predloženo je da proteini LrgA i CidA reguliraju aktivnost peptidoglikan hidrolaze analogno kolinima i antikolinima. Protein CidA preuzima ulogu kolina, a LrgA inhibira njegov učinak analogno inhibitornom učinku antikolina (Rice i Bayles, 2008). Geni *cidB* i *lrgB* također kodiraju homologne hidrofobne proteine čija je funkcija nepoznata, a *cidC* kodira piruvat oksidazu koja bi mogla doprinosti akumulaciji acetata u hranjivom mediju prilikom rasta u prisutnosti viška glukoze (Patton i sur., 2005). Operon *cid* ima ulogu u lizi stanica tijekom stresnih uvjeta i tijekom razvoja biofilma gdje CidA posreduje lizu dijela bakterijske populacije u kojoj dolazi do otpuštanja ekstracelularne DNA, važne komponente matriksa biofilma (Rice i sur., 2007).

#### **2.2.3.1. Sličnosti regulatornog sustava Cid /Lrg i apoptoze**

Regulatorni sustav *cid* i *lrg* je široko rasprostranjen u bakterijama što sugerira da je to karakterističan mehanizam koji kontrolira staničnu smrt bakterija. Ovaj mehanizam pokazuje velike sličnosti s mehanizmima regulacije apoptoze koji su posredovani porodicom proteina Bcl-2 (Bayles, 2014). Proteini Bcl-2 su velika porodica proteina koji kao kolini bakteriofaga uzrokuju permeabilizaciju stanične membrane u procesu za koji je potrebna oligomerizacija proteina. Istraživanja pokazuju da proteini CidA i LrgA također oligomeriziraju unutar stanične membrane bakterija (Ranjit i sur., 2011) što dovodi do pretpostavke da pokazuju analognu funkciju onoj kod proapoptotskih proteina porodice Bcl-2 kao efektorima stanične smrti.

#### **2.2.4. Peptidoglikan hidrolaze**

Liza bakterijske stanice je posredovana peptidoglikan hidrolazama. To je skupina enzima koji kataliziraju reakcije cijepanja strukturnih komponenata peptidoglikana koji je važan dio stanične stijenke bakterija. Imaju ulogu u brojnim procesima tijekom staničnog

rasta, diobe i sporulacije. Peptidoglikan hidrolaze koje sudjeluju u degradaciji stanične stijenke koja dovodi do lize stanica poznate su pod nazivom autolizini. Peptidoglikan hidrolaze se klasificiraju prema specifičnosti mjesta cijepanja. Peptidoglikan amidaze cijepaju amidnu vezu između *N*-acetyl-muraminske kiseline i L-alanina. Peptidoglikan peptidaze cijepaju peptidne veze unutar peptida ili uklanjaju C-terminalne aminokiseline. *N*-acetyl-muramidaze, lizozimi i litičke transglikozilaze kataliziraju reakciju cijepanja *N*-acetyl-muraminske kiseline, a *N*-acetylglukozaminidaze hidroliziraju glikozidnu vezu između *N*-acetylglukozamina i susjednih monosaharida (Vollmer i sur., 2008).

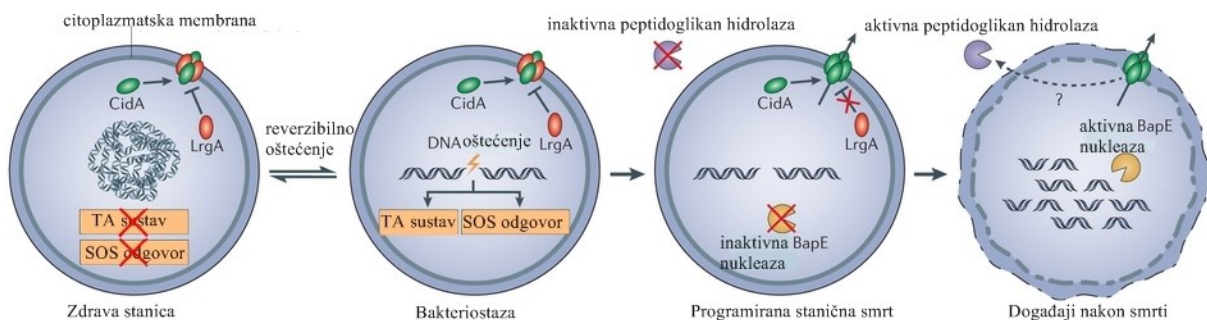
### **2.3. Programirana stanična smrt bakterija u stresnim uvjetima**

Pretpostavlja se da PCD tijekom stresnih uvjeta, kao što su (a) visoka temperatura (b) gladovanje; (c) infekcija bakteriofagom; (d) oksidativni stres; (e) izloženost radijaciji i (f) izloženost antibioticima služi kao altruistički mehanizam u kojem stanice sebe usmrćuju kako bi doprinjele opstanku zajednice u kojoj se nalaze. U tim uvjetima stanica aktivira sustav TA te mehanizme popravka. Temom debate je da li sustav TA uzrokuje PCD ili bakteriostazu. U modelnom putu PCD bakterija su Allocati i sur. (2015) predložili da aktivnost sustava TA rezultira zaustavljanjem staničnog rasta te ukoliko je šteta nepopravljiva dolazi do stanične smrti djelovanjem proteina CidA i LrgA ili alternativno djelovanjem sustava TA. S druge strane, Engelberg-Kulka i sur. (2006) tvrde da djelovanje jednog od najproučenijih sustava TA, sustava MazEF bakterije *Escherichia coli*, uzrokuje ireverzibilni gubitak viabilnosti što je dokaz da izravno uzrokuje staničnu smrt. Osim stanične smrti posredovane sustavom MazEF pronađena je i smrt nalik apoptozi za koju se smatra da je rezervni sustav stanične smrti (Erental i sur., 2012).

Najbolji pokazatelj za PCD oštećenih stanica je proizašao iz otkrića stanica koje preživljavaju u stresnim uvjetima tzv. perzistera. U bakterijskoj populaciji klonova bi PCD u stresnim uvjetima mogla rezultirati smrću svih stanica. Međutim, Lewis (2000) je predložio da perzisteri imaju defektan mehanizam PCD što im omogućava preživljavanje.

### 2.3.1. Modelni put programirane stanične smrti bakterija

Stanica u stresnim uvjetima inducira sustave toksin-antitoksin i mehanizme popravka kao što je odgovor SOS (slika 2). Proteini CidA i LrgA, koji su nalik kolinima iz bakteriofaga, su eksprimirani, ali inaktivni u ovoj fazi. Inaktivni su zbog inhibicije efekorskog proteina programirane stanične smrti CidA koja je posredovana proteinom LrgA. Aktivnost sustava TA dovodi do zaustavljanja rasta odnosno reverzibilne bakteriostaze (Bayles, 2014). Pretpostavlja se da inhibicija rasta služi kako bi se pokušala popraviti nastala šteta jer smanjuje metaboličku aktivnost ili čak daje energiju za odgovor na stres. Sva energija i resursi se usmjeravaju na pokušaj popravka štete. Reverzibilna je jer može ponovno rezultirati staničnim rastom. Pokazano je da prekomjerna ekspresija antitoksina MazE u bakteriji *Escherichia coli* može poništiti letalno djelovanje toksina MazF i spasiti bakterije unutar šest sati nakon što je došlo do prekomjerne proizvodnje toksina. Kada se premaši vremenski period od 6 sati, ta mogućnost značajno opada (Amitai i sur., 2004). Ako stanica nije mogla popraviti štetu, dostiže se „točka bez povratka“ i nepoznatim mehanizmom se otpušta inhibični učinak LrgA na CidA te slijedi programirana stanična smrt. Signaliziranje post-mortem, nakon smrti, rezultira aktivacijom procesa nalik apoptozi (*engl.* Apoptosis Like Death, ALD) i/ili autolizom. Dolazi do aktivacije nukleaza kao što je BapE, promjena na membrani i degradacije stanične stijenke djelovanjem peptidoglikan hidrolaze (Bayles, 2014).



Slika 2. Modelni put bakterijske programirane stanične smrti. Izvor:

[http://www.nature.com/nrmicro/journal/v12/n1/fig\\_tab/nrmicro3136\\_F1.html](http://www.nature.com/nrmicro/journal/v12/n1/fig_tab/nrmicro3136_F1.html), preuzeto

22.5.2016.



### 2.3.2. Sustavi programirane stanične smrti u *Escherichia coli*

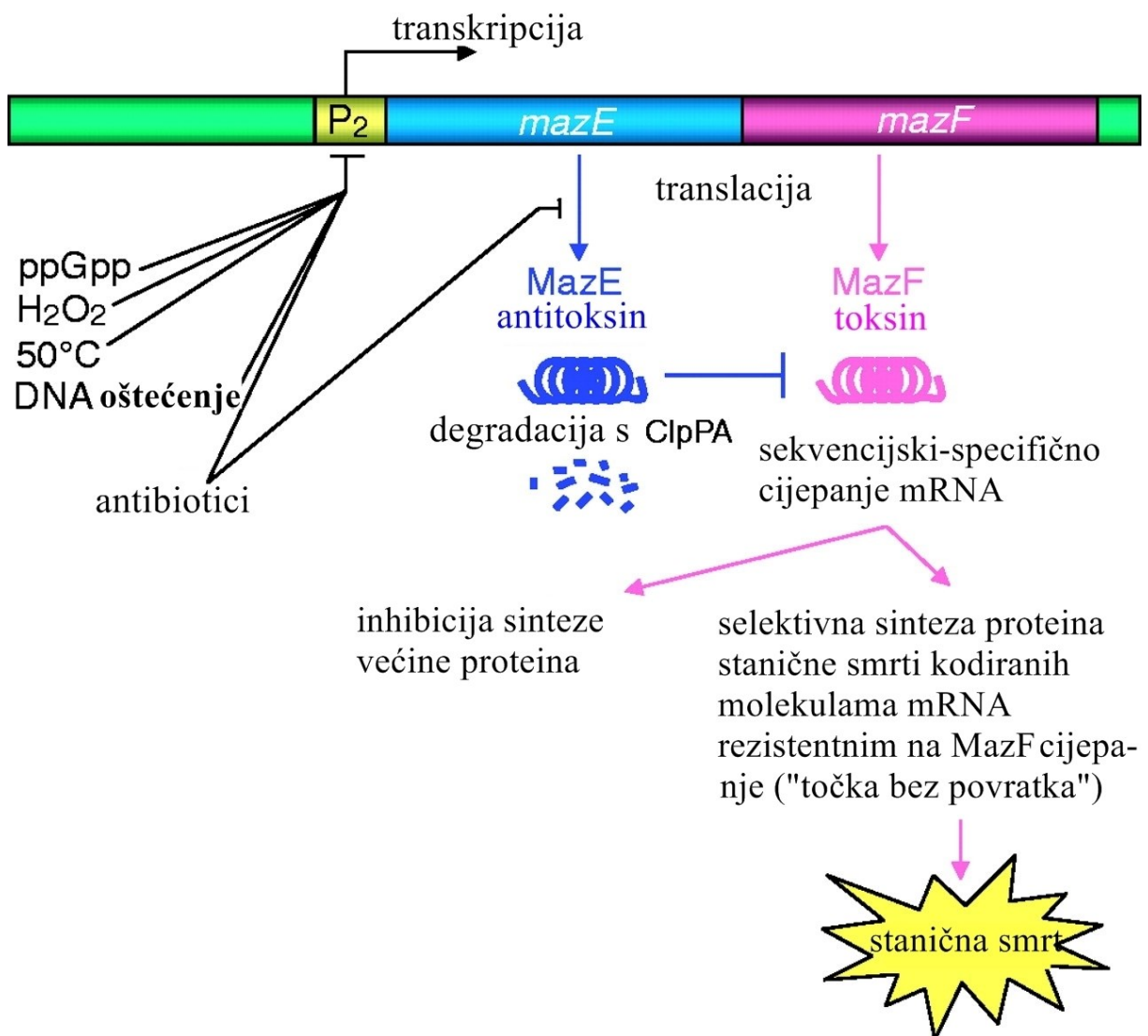
U bakteriji *Escherichia coli* postoje barem dva različita puta programirane stanične smrti. Jedan je posredovan sustavom MazEF (Aizenman i sur., 1996), a za drugi je predloženo da pokazuje karakteristike apoptoze (Erental i sur., 2012).

#### 2.3.2.1. Smrt posredovana sustavom MazEF

Geni *mazEF* bakterije *Escherichia coli* se nalaze nizvodno od gena *reIA* (Metzger i sur., 1988), a čiji produkt sintetizira 3',5'-bispirofosfat (ppGpp). Gen *mazF* kodira stabilan toksin, MazF, dok je produkt gena *mazE* labilan antitoksin, MazE, kojeg proteolitički cijepa serin proteaza ClpPA. Proteini MazE i MazF stupaju u interakcije (Aizenman i sur., 1996). Oni se zajedno eksprimiraju, a njihova je ekspresija regulirana na nivou transkripcije. Proteini MazE i MazF negativno djeluju na promotor *mazEF* P<sub>2</sub> (Marianovsky i sur., 2001). Nadalje, akumulacija 3',5'-bispirofosfata, koja se odvija tijekom gladovanja na aminokiselinama, negativno regulira transkripciju gena *mazEF* i dovodi do stanične smrti (Aizenman i sur., 1996). Ostali stresni uvjeti u kojima MazEF posreduje staničnu smrt su: (a) gladovanje na timinu (Sat i sur., 2003); (b) prisutnost antibiotika koji inhibiraju translaciju ili transkripciju poput rifampicina, kloramfenikola i spektinomocina (Sat i sur., 2001); (c) visoka temperatura i oksidativni stres (Engelberg-Kulka i sur., 2005) i (d) izloženost mitomicinu C, nalidiksinskoj kiselini i UV zračenju (Hazan i sur., 2004). Tada se koncentracija MazE u stanici smanjuje jer je degradirana proteazom ClpPA zbog čega se otpušta toksin MazF. Slobodan MazF inhibira sintezu proteina specifično cijepajući molekule mRNA (Christensen i sur., 2003; Zhang i sur., 2003, slika 3). On djeluje kao endoribonukleaza specifično cijepajući sekvencije ACA, a aktivnost mu je ribosomski neovisna (Zhang i sur., 2003). Iako ima veći afinitet za cijepanje jednolančane mRNA, MazF također cijepa molekulu tmRNA (Christensen i sur., 2003) koja je hibrid tRNA i mRNA. Hibrid tmRNA vjerojatno tada ne može izvršiti svoju funkciju koja podrazumijeva vezanje na A mjesto ribosoma koji sadrže skraćenu mRNA omogućavajući normalnu terminaciju translacije. Dakle, djelovanjem MazF se inhibira translacija čime stanice prestaju rasti, odnosno ulaze u bakteriostazu i aktivira se kaskadna reakcija. Ukoliko kaskadna reakcija nije zaustavljena na vrijeme dostiže se „točka bez povratka“ i dolazi do smrti bakterijske stanice. Pretpostavka je da se sprječavanje kaskadne reakcije postiže selektivnom sintezom proteina stanične smrti koji su kodirani molekulama mRNA otpornim na cijepanje s MazF (slika 3). Otporne mRNA vjerojatno nemaju ciljna mjesta ACA ili su

nekim drugim mehanizmom zaštićena od djelovanja proteina MazF (Engelberg-Kulka i sur., 2005).

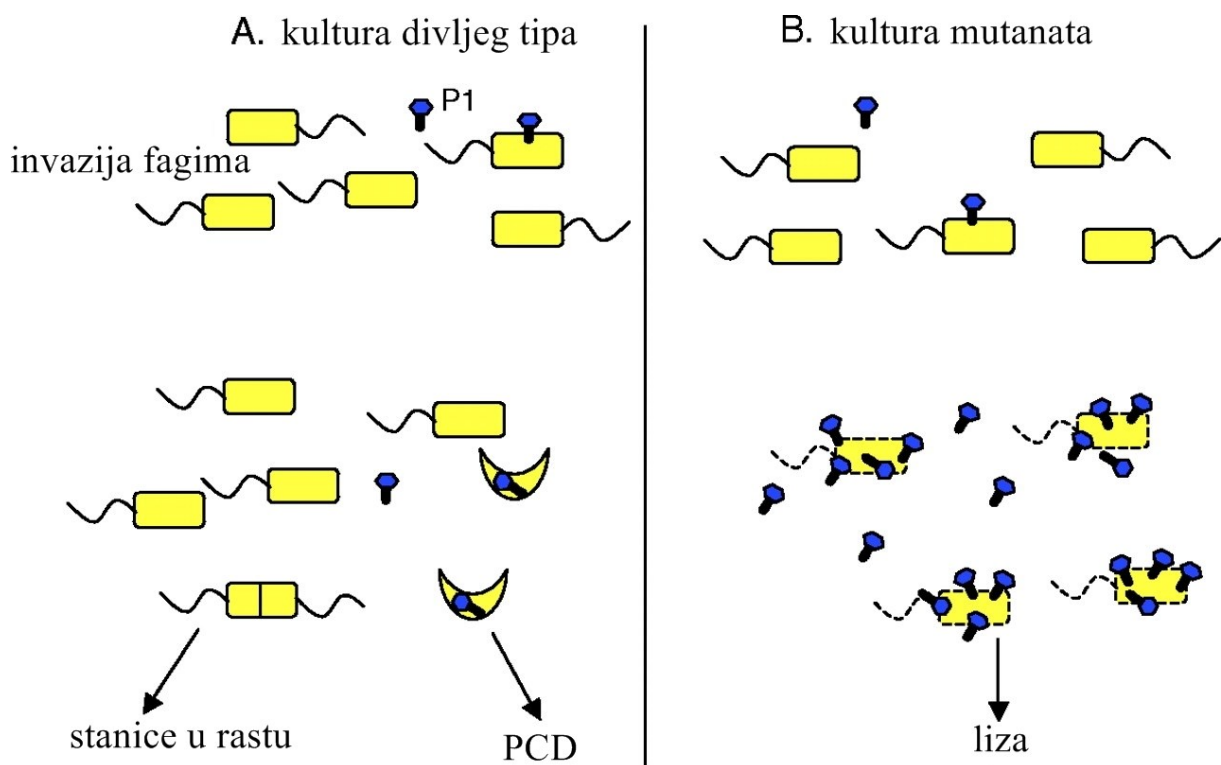
Aktivnost MazF značajno pojačava linearni pentapeptid NNWNN. To je faktor detekcije kvoruma (*engl.* quorum sensing, QS) koji se naziva ekstracelularni faktor smrti (*engl.* extracellular death factor, EDF). Njegova prisutnost je potrebna za staničnu smrt posredovanu sustavom MazEF. Općenito, detekcija kvoruma omogućava bakterijama međusobnu komunikaciju da bi podesile ekspresiju gena kao odgovor na gustoću populacije. Nedavno je otkriveno da staničnu smrt bakterije *Escherichia coli* posredovanu sustavom MazEF mogu potaknuti ekstracelularni faktori smrti iz Gram-pozitivne bakterije *Bacillus subtilis* i Gram-negativne bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. To su prvi primjeri QS faktora koji sudjeluju u bakterijskoj staničnoj smrti između različitih vrsta bakterija (Kumar i sur., 2013).



Slika 3. Shematski prikaz stanične smrti u bakteriji *Escherichia coli* uz sustav MazEF. Izvor:

<https://translate.google.hr/translate?hl=hr&sl=en&u=http://jcs.biologists.org/content/118/19/4327&prev=search>, preuzeto: 24.5.2016.

Stanična smrt bakterija posredovana sustavom MazEF služi kao opskrba nutrijentima preživjelim stanicama tijekom uvjeta gladovanja (Aizenman i sur., 1996). Umire većina bakterijske populacije, a omogućen je opstanak male subpopulacije koja će obnoviti populaciju kada prođu stresni uvjeti (Amitai i sur., 2009). Također, stanična smrt posredovana sustavom MazEF može djelovati kao obrambeni mehanizam koji sprječava širenje bakteriofaga (Hazan i Engelberg-Kulka, 2004). Bakteriofagi P1 postoje kao virulentne čestice koje se razvijaju u stanicama svog domaćina bakterije *Escherichia coli* i šire umnoženi njihovom lizom ili kao lizogeni profagi koji se repliciraju zajedno s bakterijskim kromosomom. Lizogeni bakteriofagi ulaze u litički ciklus kada im se inaktivira represor koji im omogućava replikaciju u stanicama domaćina bez njihove lize (Engelberg-Kulka i sur., 2006). Kad se mutanti  $\Delta mazEF$  *Escherichia coli* koja sadrži profage P1 zagriju, čime se inaktivira temperaturno osjetljiv represor, većina stanica lizira. S druge strane, pri tim uvjetima u divljem tipu P1 lizogenih bakterija lizira samo mali dio stanica te proizvodi značajno više bakteriofaga od mutanta (slika 2). Slični rezultati se dobiju kad se mutanti  $\Delta mazEF$  i divlji soj inficiraju virulentnim bakteriofagom P1. Time se pokazalo da stanična smrt koju posreduje sustav MazEF sprječava širenje bakteriofaga P1. Općenita uloga sustava MazEF bi mogla biti zaštita populacije od širenja bakteriofaga (Hazan i Engelberg-Kulka, 2004). Još jedna njegova uloga bi mogla biti zaštita bakterijskog kromosoma. U slučaju da mehanizmi staničnog popravka nisu uspjeli popraviti oštećenja na kromosomu, sustav MazEF bi mogao eliminirati stanice s oštećenim genomom i tako održati genomsku stabilnost populacije (Engelberg-Kulka i sur., 2006).



Slika 3. Model za ponašanje bakterijskih kultura divljeg tipa (*engl.* Wild Type, WT) i kulture mutanata  $\Delta mazEF$  tijekom napada faga P1. (A) U stanicama WT, *mazEF* posreduje smrt inficiranih stanica. Kao posljedica, ograničen je razvoj faga, titar faga je malen i kultura preživljava. (B) U  $\Delta mazEF$  kulturama ništa ne interferira s infekcijom faga: inficirane stanice liziraju i šire inficirajuće čestice do ostalih stanica u kulturi. Zato, WT kultura može preživjeti infekciju fagima dok kultura mutanata  $\Delta mazEF$  umire. PCD, programirana stanična smrt.

Izvor: <http://jcs.biologists.org/content/118/19/4327.long>, preuzeto 20.5.2016.

### 2.3.2.2. Smrt bakterijskih stanica nalik apoptozi

Nedavno otkriven put stanične smrti je smrt bakterijskih stanica nalik apoptozi (*engl.* apoptosis-like death, ALD) za kojeg je predloženo da inhibira put stanične smrti posredovan sustavom MazEF (Erental i sur., 2012) i da inhibira odgovor SOS (Erental i sur., 2012). Smrt nalik apoptozi je posredovana sustavom *recA-lexA*, a karakterizira ju depolarizacija membrane i fragmentacija DNA što su karakteristike apoptoze. Smrt nalik apoptozi je, za razliku od sustava MazEF koji je potaknut brojnim stresnim uvjetima te djeluje na većinu bakterijske populacije, aktivirana samo DNA oštećenjem te djeluje na razini individualne stanice. Pretpostavlja se da bi ALD mogla biti rezervni sustav za staničnu smrt posredovanu sustavom MazEF. Bakterijska smrt stanice će se odvijati ovim putem ukoliko je inaktivirana neka komponenta puta posredovanog sustavom MazEF (Erental i sur., 2012).

Istraživanje kojeg su proveli Dwyer i sur. 2012. godine pokazalo je da ALD, osim fizičkim i kemijskih sredstvima koji uzrokuju oštećenje DNA, može biti aktivirana antibioticima uključujući spektinomycin, ampicilin i gentamicin. Oni su osim depolarizacije membrane i fragmentacije DNA kao karakteristike ALD naveli kondenzaciju kromosoma i ekstracelularnu izloženost fosfatidilserinu. Koristili su različitu podlogu i sojeve bakterije *Escherichia coli* te je moguće da su otkrili ALD jer njihov soj nije imao ekstracelularni faktor smrti (Erental i sur., 2014) koji je potreban za pojačanje aktivnosti MazF (Kolodkin-Gal i sur., 2008) i za inhibiciju ALD (Erental i sur., 2012).

### 2.3.3. Perzisteri

Predloženo je da smrt bakterija nakon tretiranja s bakteriocidnim agensima nije rezultat direktnog djelovanja agenasa, već programirane stanične smrti i autolize (Lewis, 2000). Bakteriocidni antibiotici inhibiraju stanični rast, a za staničnu smrt je potrebna složena kaskada provođenja signala unutar bakterijske stanice da se aktiviraju litički enzimi koji razgrađuju staničnu stijenu tijekom autolize. Problem kod poimanja PCD je da bi kao odgovor na oštećenje stanice, primjerice nastalo djelovanjem antibiotika, mogla eliminirati sve stanice u populaciji klonova, te bi kao takva bila kontraproduktivna. Međutim, čini se da su bakterije razvile strategiju kako bi izbjegle smrt cijele populacije. Mali dio stanica su otporne na lizu i nazivaju se perzisteri. U većini stanica će se aktivirati mehanizmi popravka štete ili autolize dok je program stanične smrti u perzisterima onemogućen (Lewis, 2000). Perzisteri su otkriveni još 1944. godine kad je primjećeno da nakon dodatka penicilina, mali dio stanica bakterija *Staphylococcus* ( $10^{-6}$ ) ostaje živ (Bigger, 1944). Te stanice nisu mutanti jer je njihov rast osjetljiv na djelovanje penicilina i stanice nastale njihovom diobom nisu otpornije na penicilin u odnosu na originalnu populaciju. Dakle, stanice perzistera su subpopulacija bakterija koje su visoko tolerantne na antibiotike i to postižu bez genskih promjena. U biofilmu se za takve stanice misli da su odgovorne za perzistenciju kroničnih infekcija jer antibiotici uzrokuju smrt većine stanica dok perzisteri ostaju živi i nakon što se doza antibiotika smanji oni obnove populaciju biofilma. Iako su perzisteri pronađeni u brojnim bakterijskim vrstama pri različitim štetnim faktorima, malo se zna o mehanizmu njihovog nastanka i njihovoj prirodi. Njihovo postojanje sugerira da bakterijske stanice imaju mogućnost izabrati da li će živjeti ili umrijeti (Lewis, 2000).

## 2.4. Programirana stanična smrt u bakterijskom razvoju

### 2.4.1. Autoliza i kanibalizam tijekom sporulacije *Bacillus subtilis*

Bakterije iz rodova *Bacillus*, *Clostridium* i drugih sporuliraju u nepovoljnim uvjetima kao što su nedostatak hrane i vode te nagomilavanje toksičnih produkata metabolizma. Spore su metabolički neaktivne i otporne su na nepovoljne uvjete kroz duga razdoblja. Procesom germinacije prilikom ponovnog uspostavljanja povoljnih uvjeta vraćaju se u žive stanice. Diobom stanice tijekom sporulacije nastaje mala nascentna spora ili forespora i velika stanica majka. U posljednjem (VII) stadiju sporulacije se odvija programirana stanična smrt kako bi se otpustila nastala spora. U stanici majci se proizvodi jedan ili više autolizina što rezultira lizom i oslobađanjem spore (Duraković i Redžepović, 2003). U bakterije *Bacillus subtilis* su za autolizu stanice majke odgovorne peptidoglikan hidrolaze LytC i CwlC (Vollmer i sur., 2008). U *Bacillus subtilis* postoji još jedna vrsta programirane stanične smrti. Ona se odvija tijekom ranih stadija sporulacije dok proces sporulacije nije postao ireverzibilan odnosno dok nije došlo do tvorbe asimetričnog septuma koji dijeli sporulirajuću stanicu na nascentnu sporu i stanicu majku (González-Pastor, 2011). Dio stanica u biofilmu *Bacillus subtilis* proizvodi ekstracelularne antimikrobne faktore koji induciraju smrt i „kanibaliziraju“ stanice sestre (González-Pastor i sur., 2003). Otpuštanjem nutrijenata iz stanica sestara odgađa se ili potpuno zaustavlja sporulacija. Tako kanibalizam održava mali postotak spora u populaciji *Bacillus subtilis*. Zbog toga što proces sporulacije zahtijeva mnogo vremena i utroška energije, a spore se u slučaju uspostavljanja povoljnih uvjeta ne vraćaju u aktivan rast tako efikasno kao vegetativne stanice, odgađanje procesa sporulacije pruža brojne pogodnosti. Osim na genski istovrsne stanice, antimikrobni produkti djeluju i na susjedne osjetljive stanice drugih vrsta te tako kanibalizam u miješanoj populaciji daje prednost *Bacillus subtilis* nad njemu kompetitivnim organizmima (Allocati i sur., 2015).

Glavni regulatorni protein sporulacije je SpoOA. Signali iz okoliša i fiziološki signali koji uzrokuju sporulaciju se prenose različitim signalnim putevima koji rezultiraju fosforilacijom SpoOA. Fosforilirani SpoOA je odgovoran za aktivaciju najmanje sedam gena potrebnih za sporulaciju (White, 2000). González-Pastor i sur. (2003) su konstruirajući knjižnicu gena pod kontrolom SpoOA otkrili dva lokusa koja su vrlo eksprimirana u stanicama koje su ušle u sporulaciju i mutacije u tim lokusima ubrzavaju sporulaciju. To su operoni *skfABCDEFGH* i *sdpABC*. Iako nisu potpuno okarakterizirani genski produkti za koje

kodira operon *skfABCDEFGH*, čini se da su slični proteinima koji su uključeni u proizvodnju peptidnih antibiotika (Kolter i Moreno, 1992). Gen *skfA* kodira faktor smrti tijekom sporulacije (*engl.* sporulating killing factor, SKF), a *sdpC* za peptidni toksin, protein odgađanja sporulacije (*engl.* sporulation delaying protein, SDP, González-Pastor i sur., 2003). Toksine SKF i SDP proizvode stanice *Bacillus subtilis* koje su otporne na njihovo djelovanje i pomoću njih liziraju ostale stanice. Protein SDP djeluje na proton motornu silu susjednih stanica inhibirajući pokretljivost i sekreciju proteina i inducirajući staničnu lizu. Toksin SDP ima ulogu i u obrani od nekih vrsta invazivnih bakterija jer poremećaj proton motorne sile inhibira pokretljivost njihovih flagela (Lamsa i sur., 2012).

#### **2.4.2. Autoliza u razvoju bakterije *Myxococcus xanthus***

Miksobakterije su gram-negativne klizajuće bakterije koje su jedinstvene među prokariotima po tome što tvore višestanična plodišta. Njihov životni ciklus uključuje vegetativnu fazu i fazu razvoja. U vegetativnoj fazi se stanice kreću kao koherentna grupa tražeći nutrijente, hrane se i rastu, a tijekom faze razvoja koja je potaknuta nedostatkom nutrijenata većina se stanica agregira u stotine agregacijskih središta od kojih se svaki sastoji od približno 100 000 stanica. Agregacijska središta se razvijaju u višestanična plodišta unutar kojih dio stanica diferencira u miksospore, a dio u periferne stanice koje se nalaze okolo i između plodišta. Miksospore su metabolički neaktivne i sposobne su preživjeti nepovoljne uvjete. Kako bi se zajedničke kretale prilikom traženja nutrijenata i formiranja plodišta miksobakterije su razvile sustav interstaničnog signaliziranja (White, 2000).

Tijekom razvoja plodnih tijela u *Myxococcus xanthus* dolazi do programirane stanične smrti. Oko 80% stanica lizira otpuštajući svoj sadržaj koji služi kao izvor nutrijenata stanicama koje će diferencirati u miksospore (Wireman i Dworkin, 1977). Čini se da koliko stanica lizira tijekom razvoja plodišta ovisi o soju *Myxococcus xanthus* i svojstvima korištenog medija. Liza stanica je regulirana atipičnim sustavom toksin-antitoksin koji se sastoji od transkripcijskog regulatora MrpC koji djeluje kao antitoksin i mRNaze MazF-mx koja ima ulogu toksina. Delecijom gena *mazF* (*mazF-mx*) je smanjena liza stanica u uvjetima gladovanja u odnosu na divlji tip. Nadalje, mutant  $\Delta mazF-mx$  kasnije agregira i proizvodi manje spora od divljeg tipa. Protein MrpC je esencijalan transkripcijski faktor gena potrebnih za razvoj, u koje pripada gen *mazF-mx*. On djeluje kao antitoksin jer neutralizira toksičnost MazF-mx stvarajući s njim kompleks (Nariya i Inouye, 2008). On se tijekom rane i srednje

faze razvoja eksprimira u visokim razinama (Nariya i Inouye, 2006), a prije iniciranja sporulacije degradira što aktivira MazF-mx mRNA interferaznu funkciju te dolazi do autolize (Nariya i Inouye, 2008). U nekim sojevima *Myxococcus xanthus* protein MazF nije nužan za programiranu staničnu smrt (Lee i sur., 2012) te se čini da u različitim sojevima različiti putevi vode do autolize.

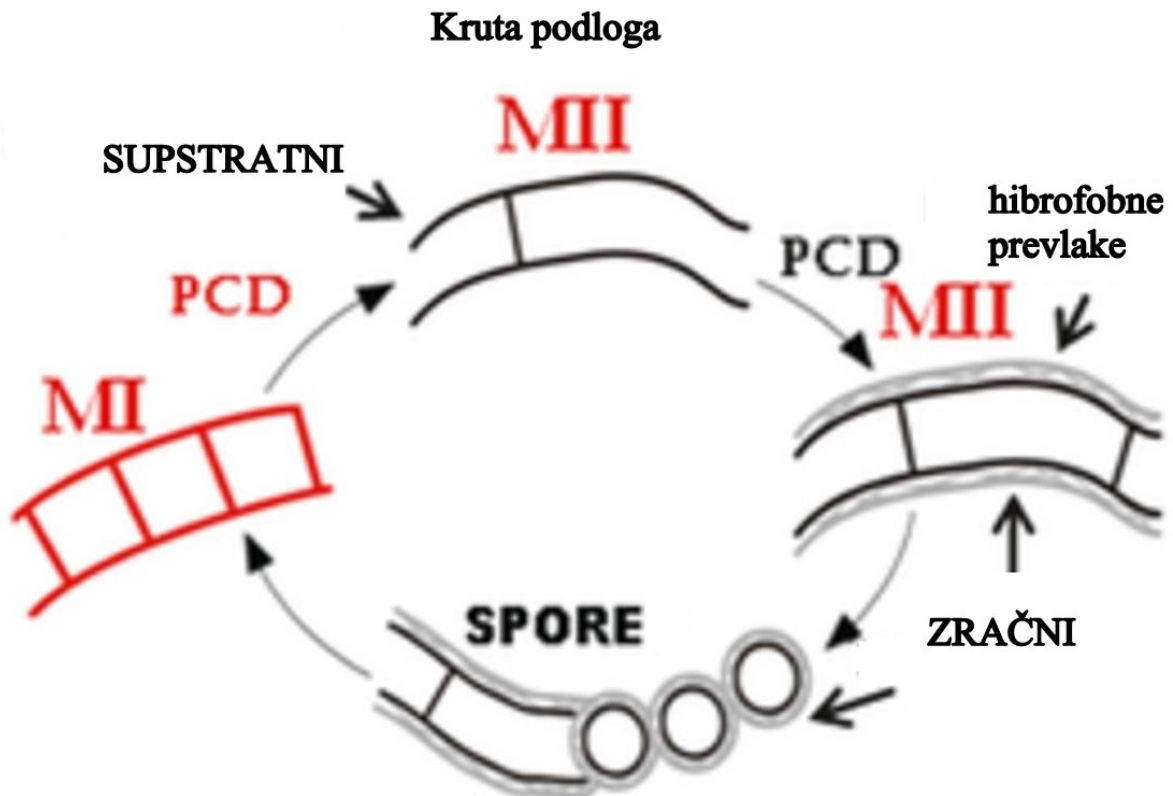
### 2.4.3. Diferencijacija hifa streptomiceta

*Streptomyces* je rod zrakastih, gram-pozitivnih, micelijskih bakterija koje su producenti najvećeg broja antibiotika. Streptomiceti imaju složeni životni ciklus koji počinje germinacijom spora iz kojih nastaju razgranate hife koje na čvrstom mediju urastaju u podlogu i tvore vegetativni ili supstratni micelij. U pomanjkanju hranjivih tvari razvijaju se zračne hife tvoreći zračni micelij (Chater, 1993). Za rast zračnog micelija koriste se produkti litičke razgradnje vegetativnog micelija. Istovremeno s rastom zračnog micelija, sintetiziraju se sekundarni metaboliti kao što su antibiotici i pigmenti (Chater, 2006). Nakon rasta se u vršnim dijelovima zračnih hifa tvore poprečne pregrade dajući spore s jednom kopijom kromosoma. Spore su obavijene posebnom ovojnicom koja im omogućava preživljavanje u nepovoljnim životnim uvjetima te sadrže skladišne tvari koje im služe kao hranjive tvari u ranoj fazi sporulacije. Spore u povoljnim uvjetima germiniraju i ponovno se formira vegetativni micelij. Nedavno je životni ciklus nadopunjen otkrićem novih faza razvoja prije sporulacije (slika 4). Okarakteriziran je prvi razdijeljen micelij (*engl.* first compartmentalized mycelium, MI) koji nastaje klijanjem spore. Dijelovi tog micelija diferenciraju u drugi višejezgreni micelij (*engl.* second multinucleated mycelium, MII). Prvo se formira tip micelija MII koji urasta u krutu podlogu koji se tradicijski naziva supstratni micelij, dok drugi tip micelija MII raste u zrak, zračni micelij, i presvučen je hidrofobnim slojem (Manteca i sur., 2007).

Programirana stanična smrt se kod streptomiceta odvija u dvije faze tijekom životnog ciklusa. Tijekom razvoja supstratnog micelija (Manteca i sur., 2006), te prije sporulacije (Miguelz i sur., 1999, slika 4). Segmenti prvog micelija (MI) prolaze programiranu staničnu smrt, a ostale stanice tog micelija diferenciraju u drugi micelij (MII). Dio stanica nastalog supstratnog micelija je podvrgnut novoj fazi PCD, otpuštajući nutrijente potrebne za tvorbu zračnog micelija (Allocati i sur., 2015). Tijekom PCD se proizvode proteini kao što su nukleaze, proteaze i enzimi uključeni u degradaciju membrane (Manteca i sur., 2006).



Njihovom aktivnošću u miceliju dolazi do degradacije stanične stijenke, stanične membrane, proteina i nukleinskih kiselina DNA i RNA. Nejasna je biološka funkcija ovih događaja. Pretpostavlja se da je programirana stanična smrt osim za opskrbu nutrijentima za tvorbu zračnog micelija i spora (Migueluez i sur., 1999), važna za kompetenciju kojom bi se ugradnjom DNA fragmenata MI micelija transformacijom dobio velik broj različitih spora (Yagüe i sur., 2013).



Slika 4. Životni ciklus *Streptomyces* na krutim podlogama. Crveno, novo opisane strukture i predložena nomenklatura: MI, prvi razdijeljeni micelij; MII, drugi višejezgreni micelij. Klasična nomenklatura (supstratni i zračni micelij) i hidrofobni slojevi su također označeni. PCD, programirana stanična smrt. Izvor: <http://femsle.oxfordjournals.org/content/342/2/79>, preuzeto 22.5. 2016.

#### 2.4.4. Transformacija DNA kod streptokoka

Bratoubojstvo se odnosi na proces u kojem dio populacije bakterija ubija srodne stanice. Odvija se tijekom prirodne genetske transformacije bakterije *Streptococcus pneumoniae*. Prirodno kompetentne stanice su sposobne primiti DNA iz okoline i integrirati je u svoju DNA rekombinacijom. Kompetentne stanice *Streptococcus pneumoniae* proizvode litičke faktore koji ubijaju nekompetentne stanice sestara nakon čega ugrade njihovu DNA (Claverys i Håvarstein, 2007, Håvarstein i sur., 2006). Nekompetentne stanice prolaze alolizu, lizu stanica induciranu drugim stanicama iste vrste. Iako nije posredovana unutarstaničnim programom smrti, čime ne odgovara definiciji programirane stanične smrti, aloliza je oblik PCD jer je genetički reguliran proces ključan za razvoj i diferencijaciju (Chater, 1993). Kompetencija stanica *Streptococcus pneumoniae* je kontrolirana detekcijom kvoruma koji je reguliran ekstracelularnom akumulacijom peptida koji stimulira kompetenciju (*engl.* competence stimulating peptide, CSP). To je peptidni feromon kodiran genom *comC*. Ekstracelularni CSP aktivira *comDE*, dvokomponentni regulatorni sustav za regulaciju kompetentnosti. Protein CSP stupa u interakciju s ComD, histidin kinazom, vezanom na staničnu membranu i uzrokuje njenu autofosforilaciju. Zatim se fosforilna grupa prenosi na regulator odgovora ComE i fosforilani ComE naizmjenice aktivira transkripciju ranih *com* gena. Jedan od njih je *comX* koji kodira sigma faktor X ( $\sigma^X$ ) koji aktivira ekspresiju mnogih kasnih gena *com*. Kasni geni *com* su odgovorni za unos DNA i rekombinaciju (Rice i Bayles, 2008).

Kompetentne stanice liziraju nekompetentne pomoću litičkih faktora. To su peptidoglikan hidrolaze CbpD, LytA i LytC te bakteriocini CibAB. Nužan litički faktor je CbpD (*engl.* choline-binding protein D) koji posreduje otpuštanje DNA i aktivira peptidoglikan hidrolaze LytA i LytC (Allocati i sur., 2015). Mutanti *lytA* pokazuju smanjeno kompetencijom inducirano otpuštanje  $\beta$ -galaktozidaze i kromosomske DNA (Moscoso i Claverys, 2004; Steinmoen i sur., 2002., 2003). Inaktivacijom *lytC* smanjuje se liza tijekom razvoja kompetentnosti (Moscoso i Claverys, 2004). Proteine LytC i LytA mogu sintetizirati kompetentne ili nekompetentne stanice (Guiral i sur., 2005; Håvarstein i sur., 2006).

U lizu nekompetentnih stanica su uključeni i dvopeptidni bakteriocini CibAB. Oni se ugrađuju u staničnu membranu čime stvaraju pore i uzrokuju promjenu membranskog potencijala (Guiral i sur., 2005). Da bi se kompetentne stanice zaštitile od djelovanja litičkih faktora moraju imati određene faktore imuniteta (Rice i Bayles, 2008). Zasada su pronađeni

proteini CibC i ComM. Protein CibC je produkt gena *cibC*, trećeg gena operona *cibABC* koji je eksprimiran samo u kompetentnim stanicama (Guiral i sur., 2005), dok je protein ComM kodiran nekim od ranih gena *com* (Håvarstein i sur., 2006). Točan način na koji ti proteini sprječavaju lizu kompetentnih stanica nije određen.

Bratoubojstvo *Streptococcus pneumoniae* osim što služi za unos homologne DNA, doprinosi virulentnosti jer se lizom stanica otpuštaju faktori virulentnosti, kao što je penumolizin (Claverys i Håvarstein, 2007).

#### **2.4.5. Kuglasti oblik u bakterije *Helicobacter pylori***

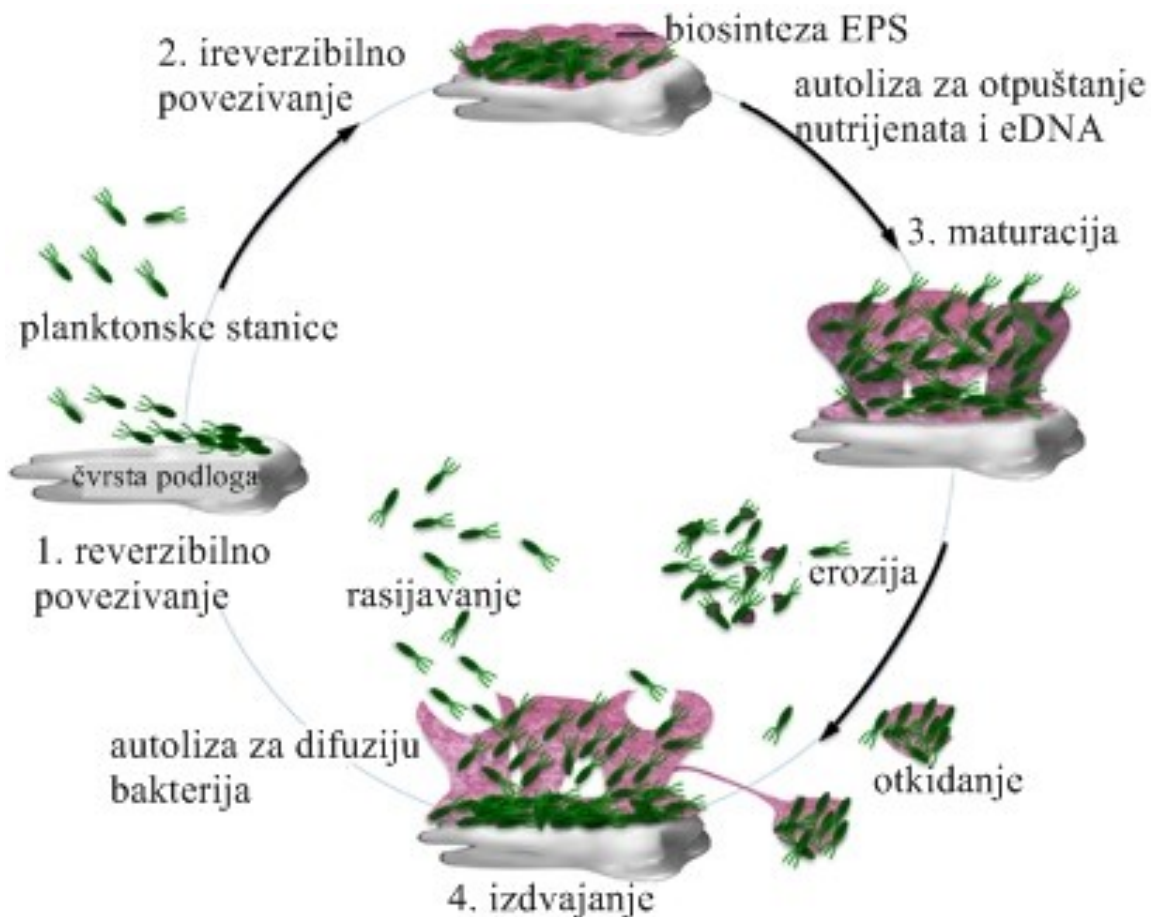
Bakterija *Helicobacter pylori* je mikroaerofilna, štapičasta spiralnog oblika, Gram-negativna bakterija. Infekcija ovom bakterijom dovodi do gastritisa i važan je rizični čimbenik za razvoj čira na želucu i dvanaesniku. Ukoliko je izložena okolišnom stresu, može poprimiti kuglast oblik koji je rezistentan. U takvoj populaciji, dio stanica ulazi u stanje niske metaboličke aktivnosti i prestaje se dijeliti. Neke od kuglastih stanica prolaze programiranu staničnu smrt koja nalikuje apoptozi u višim eukariotima. Vjerojatno, programirana stanična smrt služi kako bi ova bakterija smanjila gustoću stanica kada je to potrebno i tako preživjela i ponovno se počela dijeliti u povoljnim okolišnim uvjetima (Cellini i sur., 2001).

#### **2.4.6. Uloga programirane stanične smrti u razvoju biofilma**

Biofilm je kompleksna sesilna zajednica mikroorganizama čije su stanice ireverzibilno povezane sa supstratom i međusobno, te uklopljene u ekstracelularni matriks polisaharidnih polimera koji su same proizvele, a koji se sastoji od ekstracelularnih polimernih supstanci (*engl.* extracellular polymeric substances, EPS) ispresijecanih vodenim kanalićima. Stanice ispoljavaju izmijenjen fenotip uslijed promijenjene brzine razmnožavanja i transkripcije gena koje ne uočavamo u planktonskih organizama (Donlan, 2002). Komponente matriksa su lipopolisaharidi, glikolipidi, lipidi, proteini, polisaharidi i nukleinske kiseline. Kemijska građa biofilma ovisi o genetici bakterija te o okolišu u kojem se razvija matriks (Montanaro i sur., 2011). Bakterijske stanice u biofilmu mogu biti iste ili različitih vrsta (Elias i Banin, 2012; Hall-Stoodley i sur., 2004), a biofilm im omogućava vezanje za različite površine kao što su ljudska tkiva, plastika, kamen i medicinski implantati. Također, stanice biofilma su za razliku

od planktonskih organizama sposobne preživjeti u prisutnosti ekstremno visokih koncentracija antimikrobnih reagensa (Lewis, 2000). Za procjenu stanične gustoće stanice koriste signalne molekule. Nakupljanje signalnih molekula u okolišu omogućuje svakoj bakterijskoj stanici procjenu ukupnog broja bakterija, a ta se pojava naziva detekcija kvoruma (*engl.* quorum sensing, QS). Kad se dostigne kritična koncentracija signalnih molekula dolazi do aktivacije gena uključenih u sintezu faktora virulencije ili sekundarnih metabolita (Hentzer i Givskov, 2003).

Ulogu u diferencijaciji i razvoju bakterija unutar biofilma ima mehanizam kontrole stanične smrti i lize stanica. Važan je i za rasprostranjivanje bakterija u okoliš jer tijekom gladovanja dio stanica se autolizira osiguravajući nutrijente ostalim bakterijama biofilma koje koloniziraju nova područja (Webb i sur., 2003). Disperzija bakterijskih stanica u potrazi za novim izvorom hranjivih tvari se može odvijati na najmanje 3 načina, a to su: erozija, otkidanje i rasijavanje. Erozija predstavlja kontinuirano otpuštanje pojedinačnih stanica ili male skupine stanica tijekom razvoja biofilma. Otkidanje je proces koji se odvija tijekom kasnijih faza stvaranja biofilma, a podrazumijeva otkidanje agregata stanica. Disperzija rasijavanjem je aktivan proces u kojem se otpušta veliki broj pojedinačnih stanica iz unutrašnjosti biofilma (Kaplan, 2010). Autolizom stanica se osim nutrijenata otpušta i ekstracelularna DNA (eDNA). Ona je važna komponenta matriksa biofilma, a njena prisutnost u biofilmu je prvobitno opisana kod *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans* i *Streptococcus intermedius* (Whitchurch i sur., 2002). Molekula eDNA u biofilmu ima ulogu u međusobnom povezivanju stanica (Nemoto i sur., 2003; Whitchurch i sur., 2002) te je važan dio mehanizma prijenosa gena. Ona predstavlja dinamičnu zalihu gena iz koje prirodno kompetentne stanice mogu primiti genetičku informaciju horizontalnim prijenosom gena. Taj prijenos gena može dovesti do brzog širenja virulentnosti kao i antibiotske rezistencije (Montanaro i sur., 2011). Autoliza stanice koja dovodi do otpuštanja molekula eDNA je posredovana detekcijom kvoruma.



Slika 5. Stvaranje i razvoj biofilma. Prvo dolazi do adherencije planktonskih stanica za čvrstu površinu (1) i proizvodnje ekstracelularnih polimernih supstanci (*engl.* extracellular polymeric substances, EPS) što stabilizira koloniju (2). Neke stanice autoliziraju otpuštajući nutrijente i eDNA što potiče rast i maturaciju biofilma (3). Stanice su dispergirane iz biofilma i mogu kolonizirati druga mjesta putem tri mehanizma, a to su: erozija, otkidanje i rasijavanje (4). Rasijavanje je aktivan proces autolize koji rezultira otpuštanjem pojedinačnih bakterijskih stanica.

Izvor: [http://www.nature.com/cddis/journal/v6/n1/fig\\_tab/cddis2014570f3.html#figure-title](http://www.nature.com/cddis/journal/v6/n1/fig_tab/cddis2014570f3.html#figure-title), preuzeto: 6.6.2016.

#### **2.4.6.1. Otpuštanje molekula ekstracelularne DNA u bakterije *Pseudomonas aeruginosa***

Stanična smrti i liza stanica u *Pseudomonas aeruginosa* tijekom razvoja se odvija unutar privremenih struktura, mikrokolonija (Webb i sur., 2003). Liza stanica *Pseudomonas aeruginosa* je kontrolirana detekcijom kvoruma. Molekule eDNA koje pritom nastaju osim u međusobnom povezivanju imaju ulogu u održavanju stabilnosti biofilma. Otpuštanje molekula eDNA je posredovano putem barem dva različita puta. Put koji nije povezan s detekcijom kvoruma je odgovoran za proizvodnju molekula eDNA na bazalnom nivou, dok je onaj ovisan o detekciji kvoruma odgovoran za akumulaciju većih količina molekula eDNA tijekom kasne log faze (Allesen-Holm i sur., 2006). Stanična smrt unutar mikrokolonija *Pseudomonas aeruginosa* je slična autolizi potrebnoj za razvoj plodišta u *Myxococcus xanthus*. Pretpostavlja se da geni koji kontroliraju razvoj plodišta i staničnu smrt u *Myxococcus xanthus* mogu na sličan način utjecati na razvoj u *Pseudomonas aeruginosa* (Webb i sur., 2003).

#### **2.4.6.2. Otpuštanje molekula ekstracelularne DNA u bakterije *Staphylococcus aureus***

U bakterije *Staphylococcus aureus* je liza stanica ovisna o peptidoglikan hidrolazama koje su kontrolirane operonom *cidABC*. Operon *cidABC* zajedno s operonom *lrgAB* regulira staničnu lizu i toleranciju na antibiotike. Operon *cid* povećava aktivnost peptidoglikan hidrolaza i smanjuje toleranciju na penicilin dok operon *lrg* ima suprotno djelovanje (Montanaro i sur., 2011). Nakon dodatka DNaze u biofilm *Staphylococcus aureus* divljeg tipa dolazi do destabilizacije biofilma, dok sličan postupak s mutantom *cidA* pokazuje minimalan učinak na njegovu destabilizaciju. Također, tretiranjem biofilma inhibitorom peptidoglikan hidrolaze dolazi do redukcije adherencije biofilma. To potvrđuje strukturnu ulogu molekule eDNA u biofilmu *Staphylococcus aureus* te indicira na ulogu eDNA u koheziji biofilma (Rice i sur., 2007).

### 3. ZAKLJUČAK

PCD ima značajnu ulogu u odgovoru na nepovoljne uvjete kao i u razvoju bakterijske populacije. Pogodnosti postojanja takvog procesa su eliminacija oštećenih ili mutiranih stanica, ograničavanje replikacije virusa te smanjenje kompeticije za nutrijente te tako PCD predstavlja altruistični događaj koji doprinosi opstanku bakterijske populacije kao cjeline. To ukazuje da je potrebna promjena u našem poimanju bakterija kao jednostaničnih organizama. Bakterijske populacije pokazuju ponašanja nalik višestaničnim organizmima, od kojih je jedna PCD.

Postoje sličnosti između PCD prokariota i eukariota. Primjerice regulatorni sustav Cid/Lrg koji je široko rasprostranjen u bakterijama pokazuje velike sličnosti s mehanizmima regulacije apoptoze životinja, a smrt nalik apoptozi u bakteriji *Escherichia coli* ima biokemijske i morfološke karakteristike apoptoze što sugerira na zajedničko podrijetlo prokariota i eukariota. Moguće je da su se mitohondriji i njihov mehanizam apoptoze razvili tijekom endosimbioze između proteobakterije i primitivne eukariotske stanice. Zbog pronalaska PCD u prokariotima, jednostaničnim eukariotima i biljkama može se zaključiti da je to osnovni biološki proces koji je potreban za život gotovo svih živih organizama.

Potrebno je provesti još mnogo istraživanja kako bi se potpuno razumjeli mehanizmi koji dovode do stanične smrti i lize bakterija te oni koji određuju koje će stanice umrijeti. Ta istraživanja bi mogla otkriti postoji li evolucijska poveznica između PCD u eukariotima i prokariotima te bi mogla pridonjeti razvoju novih antibiotika i proširiti naše razumijevanje ravnoteže između života i smrti u bakterija.

## 4. LITERATURA

Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., Glaser, G. (1996) An *Escherichia coli* chromosomal “addiction module” regulated by 3',5'-bispyrophosphate: A model for programmed bacterial cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 6059-6063.

Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., i sur. (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* **59**, 1114-1128.

Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., De Laurenzi, V. (2015) Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria. *Cell Death & Disease* [online] **6**, e:1609, <<http://www.nature.com/cddis/journal/v6/n1/full/cddis2014570a.html>> . Pristupljeno 20. ožujka 2016.

Ameisen, J. C. (2002) On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ.* **9**, 367-393.

Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hananya-Meltabashi, M., Sacher, A., Engelberg-Kulka, H. (2009) *Escherichia coli* MazF leads to the simultaneous selective synthesis of both “death proteins” and “survival proteins.” *PLoS Genet.* [online] **5**, e1000390, <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000390>> . Pristupljeno 23. svibnja 2016.

Amitai, S., Yassin, Y., Engelberg-Kulka, H. (2004) MazF-mediated cell death in *Escherichia coli*: a point of no return. *J. Bacteriol.* **186**, 8295-8300.

Bayles, K. W. (2014) Bacterial programmed cell death making sense of a paradox, *Nature Reviews Microbiology* **12**, 63-69.

Bialik, S., Zalckvar, E., Ber, Y., Rubinstein, A. D., Kimchi, A. (2010) Systems biology analysis of programmed cell death. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 556-564.

Bigger, J.W. (1944) Treatment of staphylococcal infections with penicillin. *Lancet* **244**, 497-500.

Blower, T. R., Short, F. L., Rao, F., Mizuguchi, K., Pei, X. Y., Fineran, P. C. i sur. (2012) Identification and classification of bacterial Type III toxin-antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. *Nucleic Acids Res.* **40**, 6158-6173.



- Boujrad, H., Gubkina, O., Robert, N., Krantic, S., Susin, S. A. (2007) AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. *Cell Cycle* **6**, 2612-2619.
- Brunskill, E. W., Bayles, K. W. (1996) Identification and molecular characterization of a putative regulatory locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**, 611-618.
- Cellini, L., Robuffo, I., Maraldi, N. M., Donelli, G. (2001) Searching the point of no return in *Helicobacter pylori* life: necrosis and/or programmed death? *J. Appl. Microbiol.* **90**, 727-732.
- Chater, K. F. (1993) Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**, 685-713.
- Chater, K. F. (2006) *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **361**, 761-768
- Christensen, S. K., Pedersen, K., Hensen, F. G., Gerdes, K. (2003) Toxin-antitoxin *loci* as stress-response elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated mRNAs and are counteracted by tmRNA. *J. Mol. Biol.* **332**, 809-819.
- Claessen, D., Rozen, D. E., Kuipers, O. P., Sogaard-Andersen, L., van Wezel, G. P. (2014) Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 115-124.
- Claverys, J. P., Håvarstein, L. S. (2007) Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'etre. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 219-229.
- Donlan, R. M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 881-90.
- Duraković, S., Redžepović S. (2003) Uvod u opću mikrobiologiju, knj.1., Kugler, Zagreb
- Dwyer, D. J., Camacho, D. M., Kohanski, M. A., Callura, J. M., Collins, J. J. (2012) Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis. *Mol. Cell* **46**, 561-572.
- Elias, S., Banin, E. (2012) Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 990-1004.

- Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hazan, R. (2006) Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genet.* [online] **2**, e135, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17069462>> . Pristupljeno 19. travnja 2016.
- Engelberg-Kulka, H., Hazan, R., Amitai, S. (2005) mazEF: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria. *J. Cell Sci.* **118**, 4327-4332.
- Erental, A., Kalderon, Z., Saada, A., Smith, Y., Engelberg-Kulka, H. (2014) Apoptosis-like death, an extreme SOS response in *Escherichia coli*. *mBio* [online] **5**, e01426-01414, <<http://mbio.asm.org/lens/mbio/5/4/e01426-14>> . Pristupljeno 19. travnja 2016.
- Erental, A., Sharon, I., Engelberg-Kulka, H. (2012) Two programmed cell death systems in *Escherichia coli*: an apoptotic-like death is inhibited by the *mazEF* mediated death pathway. *PLoS Biol.* [online] **10**, e1001281, <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001281>> . Pristupljeno 23. svibnja 2016.
- Fineran, P. C., Blower, T. R., Foulds, I. J., Humphreys, D. P., Lilley, K. S., Salmond, G. P. (2009) The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **106**, 894-899.
- Fozo, E. M., Makarova, K. S., Shabalina, S. A., Yutin, N., Koonin, E. V., Storz, G. (2010) Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. *Nucleic Acids Res.* **38**, 3743-3759.
- Frias, M. J., Melo-Cristino, J., Ramirez, M. (2009) The autolysin LytA contributes to efficient bacteriophage progeny release in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **191**, 5428-5440.
- González-Pastor, J. E. (2011) Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 415-424.
- González-Pastor, J. E., Hobbs, E. C., Losick, R. (2003) Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* **301**, 510-513.
- Guiral, S., Mitchell, T. J., Martin, B., Claverys, J. P. (2005) Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 8710-8715.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95-108.

- Håvarstein, L. S., Martin, B., Johnsborg, O., Granadel, C., Claverys, J. P. (2006) New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol. Microbiol.* **59**, 1297-1307.
- Hazan, R., Engelberg-Kulka, H. (2004). *Escherichia coli mazEF* mediated cell death as a defense mechanism that prevents spreading of phage P1. *Mol. Genet. Genomics* **272**, 227-234.
- Hentzer, M., Givskov, M. (2003) Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.* **112**, 1300-1307.
- Kaplan, J. B. (2010) Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J. Dent. Res.* **89**, 205-218.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257.
- Kolodkin-Gal, I., Sat, B., Keshet, A., Engelberg-Kulka, H. (2008) The communication factor EDF and the toxin–antitoxin module *mazEF* determine the mode of action of antibiotics. *PLoS Biol.* [online] **6**, e319, <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0060319>> . Pristupljeno 23. svibnja 2016.
- Kolter, R., Moreno, F. (1992) Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 141-163.
- Kumar, S., Kolodkin-Gal, I., Engelberg-Kulka, H. (2013) Novel Quorum-Sensing Peptides Mediating Interspecies Bacterial Cell Death, *mBio* [online] **4**, e00314-13, <<http://mbio.asm.org/content/4/3/e00314-13.full>> . Pristupljeno 23. svibnja 2016.
- Lamsa, A., Liu, W. T., Dorrestein, P. C., Pogliano, K. (2012) The *Bacillus subtilis* cannibalism toxin SDP collapses the proton motive force and induces autolysis. *Mol. Microbiol.* **84**, 486-500.
- Lee, B., Holkenbrink, C., Treuner-Lange, A., Higgs, P. I. (2012) *Myxococcus xanthus* developmental cell fate production: heterogeneous accumulation of developmental regulatory proteins and reexamination of the role of MazF in developmental lysis. *J. Bacteriol.* **194**, 3058-3068.
- Lewis, K. (2000) Programmed Death in Bacteria, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 503-514.

- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H., Fröhlich, K. U. (1999) Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell. Biol.* **145**, 757-767.
- Manteca, A., Claessen, D., Lopez-Iglesias, C., Sanchez, J. (2007) Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiol. Lett.* **274**, 118-125.
- Manteca, A., Fernandez, M., Sanchez, J. (2006) Cytological and biochemical evidence for an early cell dismantling event in surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Res. Microbiol.* **157**, 143-152.
- Marianovsky, I., Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., Glaser, G. (2001) The regulation of the *Escherichia coli* mazEF promoter involves an unusual alternating palindrome. *J. Biol. Chem.* **278**, 5975-5984.
- Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K. P., Inouye, M. (2012) YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **84**, 979-989.
- Metzger, S., Dror, I. B., Aizenman, E., Schreiber, G., Toone, M., Friesen, J. D., Cashel, M., Glaser, G. (1988) The nucleotide sequence and characterization of the *relA* gene of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**, 15699-15704.
- Migueluez, E. M., Hardisson, C., Manzanal, M. B. (1999) Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion equivalent to apoptosis in a multicellular prokaryote. *J. Cell. Biol.* **145**, 515-525.
- Montanaro, L., Poggi, A., Visai, L., Ravaioli, S., Campoccia, D., Speziale, P., i sur. (2011) Extracellular DNA in biofilms. *Int. J. Artif. Organs* **34**, 824-831.
- Moscoso, M., Claverys, J. P. (2004) Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. *Mol. Microbiol.* **54**, 783-794.
- Mruk, I., Kobayashi, I. (2014) To be or not to be: regulation of restriction-modification systems and other toxin-antitoxin systems. *Nucleic Acids Res.* **42**, 70-86.

- Nariya, H., Inouye, M. (2008) MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development. *Cell* **132**, 55-66.
- Nariya, H., Inouye, S. (2006) A protein Ser/Thr kinase cascade negatively regulates the DNA-binding activity of MrpC, a smaller form of which may be necessary for the *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* **60**, 1205-1217.
- Nemoto, K., Hirota, K., Murakami, K., Taniguti, K., Murata, H., Viducic, D., Miyake, Y. (2003) Effect of Varidase (streptodornase) on biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy* **49**, 121-125.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B., Bao, J. K. (2012) Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* **45**, 487-498.
- Patton, T. G., Rice, K. C., Foster, M. K., Bayles, K. W. (2005) The *Staphylococcus aureus* *cidC* gene encodes a pyruvate oxidase that affects acetate metabolism and cell death in stationary phase. *Mol. Microbiol.* **56**, 1664-1674.
- Ranjit, D. K., Endres, J. L., Bayles, K. W. (2011) *Staphylococcus aureus* CidA and LrgA proteins exhibit holin-like properties. *J. Bacteriol.* **193**, 2468-2476.
- Rice, K. C., Bayles, K. W. (2008) Molecular Control of Bacterial Death and Lysis, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**, 85-109.
- Rice, K. C., Mann, E. E., Endres, J. L., Weiss, E. C., Cassat, J. E. , Smeltzer, M. S., Bayles, K. W. (2007) The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 8113-8118.
- Sat, B., Hazan, R., Fisher, T., Khaner, H., Glaser, G., Engelberg-Kulka, H. (2001) Programmed cell death in *Escherichia coli*: some antibiotics can trigger the *MazEF* lethality. *J. Bacteriol.* **183**, 2041-2045.
- Sat, B., Reches, M., Engelberg-Kulka, H. (2003) The *Escherichia coli* chromosomal 'suicide module' *mazEF* is involved in thymine-less death. *J. Bacteriol.* **185**, 1803-1807.
- Schuster, C. F., Bertram, R. (2013) Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. *FEMS Microbiol. Lett.* **340**, 73-85.

- Steinmoen, H., Knutsen, E., Håvarstein, L. S. (2002) Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7681-7686.
- Steinmoen, H., Teigen, A., Håvarstein, L. S. (2003) Competence-induced cells of *Streptococcus pneumoniae* lyse competence-deficient cells of the same strain during cocultivation. *J. Bacteriol.* **185**, 7176-7183.
- Unoson, C., Wagner, E. G. (2008) A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **70**, 258-270.
- Vanvushin, B. F., Bakeeva, L. E., Zamayatnina, V. A., Aleksandrushkina, N. I. (2004) Apoptosis in plant: Specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents. *Int. Rev. Cytol.* **233**, 135-179.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., Foster, S. (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 259-286.
- Wang, X., Lord, D. M., Cheng, H. Y., Osbourne, D. O., Hong, S. H., Sanchez-Torres, V. i sur. (2012) A new typeV toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 855-861.
- Wang, X., Wood, T. K. (2011) Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 5577-5583.
- Webb, J. S., Givskov, M., Kjelleberg, S. (2003) Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 578-585.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., Mattick, J. S. (2002) Extracellular DNA is required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**, 1487.
- White, D. (2000) *The Physiology & Biochemistry of Prokaryotes*, 2.izd., OUP Oxford, SAD
- Wireman, J. W., Dworkin, M. (1977) Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **129**, 798-802.
- Yagüe, P., López-García, M. T., Rioseras, B., Sánchez, J., Manteca, A. (2013) Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and future perspectives. *FEMS Microbiol. Lett.* **342**, 79-88.

Yamaguchi, Y., Park, J. H., Inouye, M. (2011) Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. *Annu. Rev. Genet.* **45**, 61-79.

Yarmolinsky, M. B. (1995) Programmed cell death in bacterial populations. *Science* **267**, 836-837.

Young, R., Wang, I. N. (2006) Phage lysis. *The Bacteriophages* (Calendar, R., ured.), Oxford University Press, New York, str. 104-128.

Zhang, Y., Zhang, J., Hoeflich, K. P., Ikura, M., Quing, G., Inouye, M. (2003) MazF cleaves cellular mRNA specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* **12**, 913-923.