

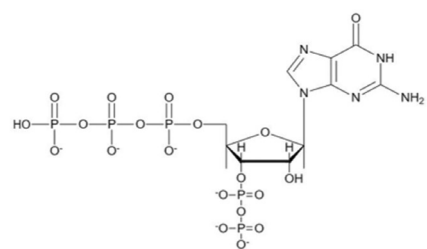
50-ta rocznica odkrycia „magicznych plamek” – najnowsze osiągnięcia w badaniach nad (p)ppGpp

STRESZCZENIE

Około 50 lat temu odkryto tzw. „magiczne plamki”, mediatory bakteryjnej odpowiedzi ścisłej, które później zidentyfikowano jako cztero- i pięcioletfosforan guanozyny (ppGpp i pppGpp; łącznie określane mianem (p)ppGpp). Początkowo wydawało się, że odpowiedź ścisła związana jest tylko z odpowiedzią bakterii na głód aminokwasowy, jednakże okazało się, że synteza (p)ppGpp zachodzi również pod wpływem innych stresów. Wspomniane alarmy występują u wszystkich poznanych gatunków bakterii oraz u roślin. W ostatnich latach poczyniono znaczące postępy w badaniach nad metabolizmem (p)ppGpp. Wiadomo też, że odpowiedź ścisła ma wpływ na wiele procesów komórkowych, z czego najlepiej poznano oddziaływanie na transkrypcję. Oprócz tego (p)ppGpp bierze udział w szlaku naprawy DNA związanym z transkrypcją. Dodatkowo, odpowiedź ścisła hamuje podziały komórkowe, głównie poprzez zatrzymanie replikacji DNA. (p)ppGpp ma także ważne znaczenie medyczne, jest niezbędne dla wirulencji wielu gatunków bakterii oraz do powstawania komórek przetrwałych, czyli komórek o zwiększonej tolerancji na wiele antybiotyków.

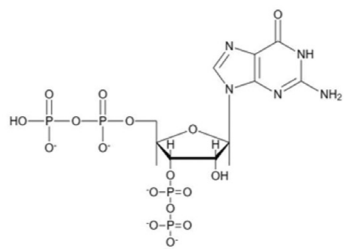
WPROWADZENIE

Bakterie dostosowują się do zmiennych warunków środowiskowych wykorzystując skomplikowane systemy modulujące powinowactwo polimerazy RNA do promotorów genów metabolizmu podstawowego. Jednym z systemów oddziałujących bezpośrednio i pośrednio na polimerazę RNA jest tzw. odpowiedź ścisła (ang. *stringent response*). Odpowiedź ta integruje wiele szlaków przystosowujących komórki do wystąpienia niedoborów, które mogą nastąpić w środowisku. Wyznacznikiem wystąpienia odpowiedzi ścisłej jest wzmożona synteza i akumulacja alarmonów komórkowych, które początkowo zostały nazwane „magicznymi plamkami” (MS, ang. *magic spot*), gdyż wykrywano je w ekstraktach komórkowych *Escherichia coli* za pomocą metody chromatografii cienkowarstwowej, jednakże nic nie było wiadomo na temat tego jak powstają, ani jakie związki je tworzą [1]. Dopiero później MSI został zidentyfikowany jako ppGpp (guanozyno-5'-difosforan, 3'-difosforan, inaczej czterofosforan guanozyny), a MS II jako pppGpp (guanozyno-5'-trifosforan, 3'-difosforan, inaczej pięcioletfosforan guanozyny) (Ryc. 1). Dla obydwóch alarmonów stosuje się łączną nazwę (p)ppGpp [2].



pppGpp

Guanozyno-5'-trifosforan, 3'-difosforan



ppGpp

Guanozyno-5'-difosforan, 3'-difosforan

Rycina 1. Wzory strukturalne pppGpp i ppGpp.

Chociaż minęło już prawie 50 lat od odkrycia „magicznych plamek”, mechanizm działania (p)ppGpp nadal nie jest do końca poznany. Początkowo wydawało się, że alarmy te odgrywają rolę tylko w transkrypcji i ekspresji genów, jednakże kolejne doniesienia pokazały, że (p)ppGpp odgrywa rolę także w replikacji DNA [3]. Ponadto związki te zostały również wykryte u roślin [4]. W niniejszej pracy skupiamy się na doniesieniach z ostatnich 10-ciu lat, które przyniosły istotny przełom w badaniach nad (p)ppGpp, a w szczególności: syntezą i hydrolizą (p)ppGpp; miejscem wiązania do polimerazy RNA; głębszym poznaniu wpływu (p)ppGpp na replikację DNA; wykazaniem roli alarmonów guanozynowych w

Maciej Dylewski*

Michał Sobala*

Bożena Bruhn-Olszewska

Katarzyna Potrykus✉

Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański, Gdańsk

✉Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański, ul. W. Stwosza 59, 80-308 Gdańsk; tel.: (58) 52 36 027, e-mail: katarzyna.potrykus@biol.ug.edu.pl

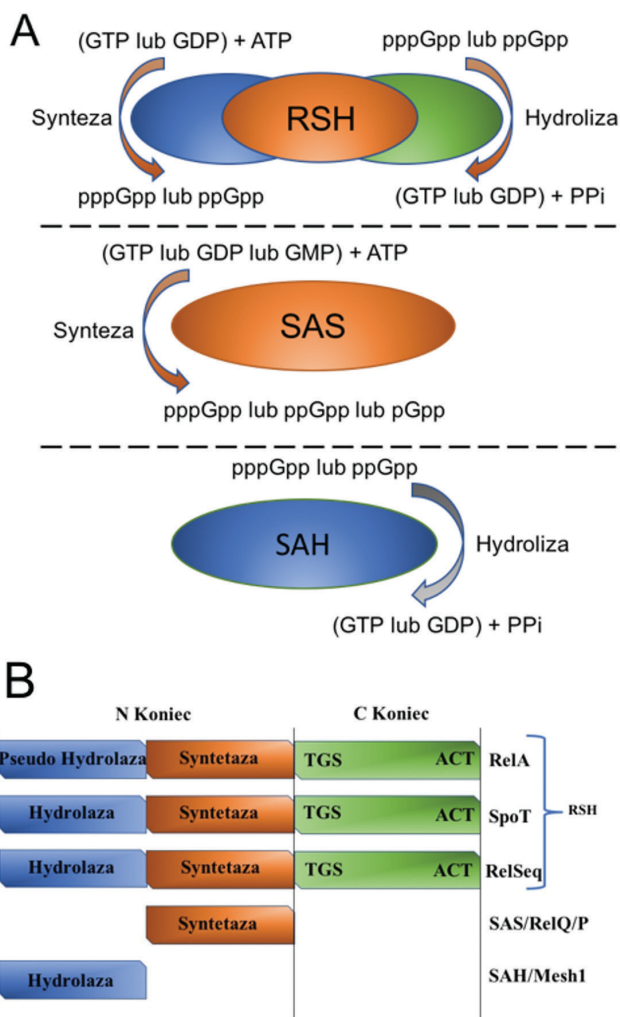
*równy współudział autorów w niniejszej pracy

Artykuł otrzymano 22 stycznia 2018 r.
Artykuł zaakceptowano 15 lutego 2018 r.

Słowa kluczowe: ppGpp, (p)ppGpp, odpowiedź ścisła, transkrypcja, naprawa DNA, komórki przetrwałe

Wykaz skrótów: ppGpp – guanozyno-5'-difosforan, 3'-difosforan, inaczej: czterofosforan guanozyny; pppGpp – guanozyno-5'-trifosforan, 3'-difosforan, inaczej: pięcioletfosforan guanozyny; (p)ppGpp – ppGpp i pppGpp; RSH – homolog RelA/SpoT, SAH – mała hydrolaza alarmonów, SAS – mała syntetaza alarmonów

Podziękowania: Badania prowadzone przez autorów niniejszej pracy przeglądowej są częściowo finansowane ze środków na naukę przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu UMO-2013/10/E/NZ1/00657.



Rycina 2. Metabolizm (p)ppGpp. **A)** Modulacja odpowiedzi ścisłej. Schemat przedstawia białka biorące udział w syntezie i hydrolizie (p)ppGpp. W reakcji syntezy, donorem reszty pirofosforanowej jest ATP, natomiast akceptorem GTP (powstaje pppGpp) lub GDP (ppGpp). Niektóre enzymy typu SAS (małe syntetazy alarmonów, ang. *small alarmone synthetases*) syntetyzują również pGpp (akceptorem jest GMP). W wyniku hydrolizy powstają odpowiednio - GTP lub GDP, gdy substratem było pppGpp lub ppGpp. Kolorem pomarańczowym zaznaczono białka posiadające domenę syntetazy (p)ppGpp (SAS), niebieskim - zaznaczono enzym typu SAH (mała hydrolaza alarmonów, ang. *small alarmone hydrolase*). Zielonym kolorem zaznaczono domenę regulatorową obecną w białkach typu RSH (homologu RelA/SpoT, ang. *RelA/SpoT homologues*), które posiadają zarówno domenę syntetazy jak i hydrolazy. **B)** Schemat budowy białek odpowiedzi ścisłej. Białka RelA i SpoT należą do rodziny białek RSH, jednakże domena hydrolazy białka RelA nie jest aktywna. Domena regulatorowa białek RSH zawiera także domeny TGS i ACT. Do rodziny białek SAS zaliczane są np. RelP i RelQ. Przedstawicielem enzymów typu SAH jest Mesh-1, występujący u organizmów wielokomórkowych. Zastosowano taką samą kolorystykę jak w (A).

naprawie DNA; oraz ich rolę w wirulencji i powstawaniu tzw. komórek przetrwałych.

SYNTEZA I HYDROLIZA (P)PPGPP

Odpowiedź ścisła występuje u wszystkich poznanych gatunków bakterii [5]. U *Escherichia coli* i innych *beta-* i *gamma-proteobacteria* (p)ppGpp są syntetyzowane przez białka RelA i SpoT (Ryc. 2A i B). Alarmony te powstają w wyniku bezpośredniego transferu pirofosforanu z ATP na GTP (pppGpp) lub GDP (ppGpp) (reakcja typu S_N2 , czyli substytucja nukleofilowa zachodząca poprzez mechanizm

dwucząsteczkowy) [6]. Dodatkowo, wspomniane bakterie posiadają specyficzny enzym zwany GppA-zą, który poprzez usuwanie jednej reszty fosforanowej z końca 5' pppGpp przekształca ten związek w ppGpp [2]. Powoduje to zwiększoną akumulację ppGpp w stosunku do pppGpp w komórkach. Co ciekawe, w komórkach *E. coli* czterofosforan guanozyny wydaje się być silniejszym efektem niż pięciofosforan guanozyny [7].

Sygnałem do syntezy (p)ppGpp są różnego rodzaju stresi środowiskowe, z tym, że RelA ulega aktywacji tylko w warunkach niedoboru aminokwasów i działa po związaniu się do rybosomów. SpoT odpowiada za syntezę wspomnianych alarmonów podczas pozostałych warunków stresowych, takich jak: niedobory fosforanowe, lipidowe i żelazowe, oraz w razie wystąpienia szoku cieplnego czy osmotycznego [2]. Białko SpoT, w przeciwieństwie do RelA, posiada także aktywność hydrolazy alarmonów dzięki czemu w przypadku poprawy warunków środowiskowych może dojść do szybkiego dostosowania metabolizmu komórkowego. U RelA, domena odpowiadająca domenie hydrolazy SpoT jest nieaktywna. Interesująco, wszystkie znane syntetazy (p)ppGpp wymagają kationów magnezu, natomiast hydrolazy kationów manganu [6].

U *Bacillus subtilis* oraz innych bakterii poza *beta-* i *gamma-proteobacteria*, enzym syntetyzujący (p)ppGpp zwany jest RSH (ang. *RelA SpoT Homologue*). Enzym ten odpowiada za syntezę (p)ppGpp zarówno w warunkach niedoboru aminokwasów, jak i podczas innych stresów środowiskowych i w niektórych przypadkach wydaje się działać w sposób niezależny od rybosomów [2]. *B. subtilis* nie posiada także GppA-zy, dzięki czemu dochodzi do zwiększonej akumulacji pppGpp i co ciekawe, u tych bakterii pppGpp wydaje się być silniejszym efektem niż ppGpp [2,8].

Zarówno RelA, jak i SpoT oraz RSH, oprócz domeny syntetazy i hydrolazy, posiadają również domeny regulatorowe, wśród których można wyróżnić domenę TGS i ACT (Ryc. 2). Domena TGS występuje głównie w GTPazach, syntetazach i hydrolazach (p)ppGpp. Niewiele wiadomo o jej funkcji [9]. Rola domeny ACT również nie została poznana, jednakże wiadomo, że występuje ona wśród wielu białek bakteryjnych zaangażowanych w regulację metabolizmu aminokwasów [10].

Analiza funkcjonalna białek odpowiedzi ścisłej w warunkach *in vitro* przez długi czas nie była możliwa, w głównej mierze przez ich toksyczny wpływ na komórki gospodarza w przypadku nadprodukcji tych enzymów w celu otrzymania czystych preparatów białkowych, a także ze względu na ich tendencję do agregowania w warunkach *in vitro*, wiązania się do powierzchni naładowanych dodatnio (membrany, powierzchnie plastików, szkła) i szybką utratę aktywności nawet przy przechowywaniu w -20°C [11,12]. Przełomem w badaniach nad odpowiedzią ścisłą było oczyszczenie i w konsekwencji otrzymanie struktury krystalicznej białka Rel_{Seq} ze *Streptococcus equisimilis* (białko typu RSH) [13]. Autorzy tej pracy pierwszy raz w historii badań nad alarmonami (p)ppGpp dokonali szczegółowej charakterystyki katalitycznych domen białka zaangażowanego w modulację odpowiedzi ścisłej.

WPLYW (p)ppGpp NA PROCES TRANSKRYPCJI U *Escherichia coli*

W ostatnich latach rozwój techniki mikroskopii krio-elektronowej pozwolił na określenie struktur wielu białek, które dzięki swoim właściwościom nie mogły zostać poddane badaniom krystalograficznym. Zastosowanie powyższej techniki umożliwiło poznanie struktury białka RelA z *Escherichia coli* wraz ze związanym rybosomem oraz dokładne scharakteryzowanie mechanizmu w jaki dochodzi do aktywacji syntetazy (p)ppGpp tego enzymu [14,15]. Pomimo, iż nie udało się otrzymać dokładnej struktury centrum katalitycznego RelA, dokonanie to uznaje się za wielkie odkrycie w badaniach nad odpowiedzią ścisłą.

Poza enzymami typu RSH, istnieją też inne, dodatkowe syntetazy i hydrolazy (p)ppGpp (Ryc. 2A i B). Są to tzw. małe syntetazy alarmonów (SAS, ang. *small alarmone synthetases*; czasami określane również mianem Rel, np. RelP i RelQ z *Enterococcus faecalis*, czy RelV z *Vibrio cholerae*) oraz małe hydrolazy alarmonów (SAH, ang. *small alarmone hydrolases*) [16]. Enzymy te posiadają tylko i wyłącznie domenę katalityczną, bez wyraźnie wyodrębnionej domeny regulatorowej.

Badania nad enzymami typu SAS wykazały, że poza (p)ppGpp, istnieje jeszcze trzeci alarmon – pGpp, który jest syntetyzowany przez białko RelQ z *Enterococcus faecalis*. Pokazano, że podobnie jak (p)ppGpp, w warunkach *in vitro* pGpp silnie hamuje aktywność enzymów biorących udział w syntetyzie GTP (kinazy guanylowej (Gmk) oraz fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej (HprT) pochodzących z tych bakterii, jednakże wpływ pGpp na polimerazę RNA jest niewielki [16].

Innym ważnym odkryciem było otrzymanie struktury krystalicznej białka SAS1 z *Bacillus subtilis* [17]. Organizacja centrum katalitycznego tego enzymu jest bardzo podobna do centrum katalitycznego Rel_{seq}. Autorzy za pomocą nowoczesnych technik biologii molekularnej scharakteryzowali aktywność enzymu SAS1 i wykazali jego tendencję do tetrameryzacji oraz modulację allosteryczną przez pppGpp.

Alarmony (p)ppGpp nie są syntetyzowane wyłącznie u bakterii. Przełomem w badaniach nad odpowiedzią ścisłą było odkrycie syntetaz (p)ppGpp u roślin [18]. Enzymy te są homologiczne do bakteryjnych, a (p)ppGpp regulują szereg procesów w chloroplastach, takich jak: transkrypcja, translacja i produkcja hormonów, lipidów i metabolitów [4].

Jeszcze jednym znaczącym przełomem w ostatnich latach było odkrycie u *Drosophila melanogaster* białka Mesh1 (ang. *Metazoan SpoT Homologue* – homolog SpoT pochodzący z wielokomórkowców), które wykazuje aktywność hydrolazy (p)ppGpp (Ryc. 2) [19]. Homologi Mesh1 występują u wielu organizmów wielokomórkowych, m.in. u myszy i człowieka. Mimo, iż nie udało się wykryć enzymu syntetyzującego (p)ppGpp u wielokomórkowców, to jednak wykazano istotność białka Mesh1 w rozwoju *D. melanogaster* oraz podobnie jak u bakterii, w modulacji reakcji na głód aminokwasowy [19]. Sugeruje to możliwość występowania u wyższych organizmów eukariotycznych mechanizmu podobnego do odpowiedzi ścisłej.

Alarmony odpowiedzi ścisłej regulują ekspresję około 1/3 genów bakteryjnych [20]. Dzięki takiemu przeprogramowaniu komórka jest w stanie przetrwać do czasu eliminacji czynnika stresowego ze środowiska. W przypadku *E. coli* (p)ppGpp wiąże się do polimerazy RNA i przyczynia się do zwiększenia wydajności transkrypcji bądź jej hamowania, w zależności od właściwości kinetycznych promotora oraz jego sekwencji [21]. (p)ppGpp hamuje inicjację transkrypcji zachodzącą z promotorów rybosomalnych (rRNA i tRNA), a jednocześnie prowadzi do zwiększenia wydajności transkrypcji w przypadku promotorów genów odpowiedzialnych za szlaki biosyntezy aminokwasów [2]. Poza bezpośrednim wpływem wspomnianych alarmonów na polimerazę RNA, ich efekt może być modulowany przez białkowe czynniki transkrypcyjne, takie jak DksA. Białko to oddziałuje z drugorzędowym kanałem polimerazy RNA, przez co zyskuje dostęp do centrum katalitycznego polimerazy. Wykazano, że DksA może wzmacniać działanie (p)ppGpp, zarówno w przypadku zahamowania jak i aktywacji transkrypcyjnej [22]. Niemniej jednak, znane są również przypadki, gdy czynniki te nie działają synergistycznie [23].

Jednym z ciekawszych doniesień ostatnich paru lat jest praca pokazująca, iż (p)ppGpp nie wpływa tylko na inicjację transkrypcji. DksA razem z (p)ppGpp mogą wzmacniać wydajność elongacji transkrypcji, a co za tym idzie zwiększają wierność syntezy RNA w wyniku spowolnienia włączania błędnych nukleotydów do nowo syntetyzowanego łańcucha RNA [24].

Mimo, iż wpływ (p)ppGpp na transkrypcję jest dosyć dobrze poznany, miejsce wiązania cztero- i pięciofosforanu guanozyny do polimerazy RNA do niedawna nie było dokładnie znane. Rdzeń polimerazy RNA jest dobrze poznana strukturą, która składa się z dwóch podjednostek α , podjednostki β i β' oraz ω [25]. Wcześniejsze badania dowodziły, że (p)ppGpp może wiązać się do jednej lub dwóch dużych podjednostek polimerazy RNA *E. coli*, tj. β lub β' , jednakże żadne z tych doniesień nie wskazało dokładnego miejsca wiązania alarmonu [2]. Dopiero badania krystalograficzne przeprowadzone w ciągu ostatnich pięciu lat pozwoliły szczegółowo określić, że miejsce wiązania (p)ppGpp znajduje się na pograniczu podjednostek β' i ω [7,26]. Tym nie mniej, doświadczenia typu transkrypcja *in vitro* wykorzystujące polimerazę RNA pozbawioną podjednostki ω wykazały, że polimeraza ta nadal jest wrażliwa na (p)ppGpp w obecności DksA [27]. Sugerowało to, iż prawdopodobnie istnieje jeszcze drugie, dodatkowe miejsce wiązania (p)ppGpp do polimerazy RNA.

W 2016 roku zostały opublikowane przełomowe badania, które potwierdziły, że rzeczywiście istnieją dwa miejsca wiązania ppGpp do polimerazy RNA, oddalone od siebie o 60Å [28]. Badania te nie obejmowały danych krystalograficznych, jednakże wykorzystując szereg mutantów punktowych w polimerazie RNA, wykazano, iż drugie miejsce wiązania (p)ppGpp jest współtworzone przez podjednostkę β' oraz białko DksA, niedaleko ujścia kanału drugorzęd-

dowego polimerazy. Przy braku DksA (p)ppGpp może się jedynie wiązać na pograniczu podjednostek β' i ω . Autorzy omawianej pracy zaproponowali również śmiałą hipotezę, iż wiedza na temat miejsc wiązania (p)ppGpp do polimerazy RNA może się przyczynić do zaprojektowania nowych antybiotyków, które umożliwiłyby skuteczne zahamowanie odpowiedzi ścisłej, a co za tym idzie ograniczyłyby wirulencję patogenów bakteryjnych [28]. Należy jednak pamiętać, że powyższe badania odnoszą się tylko i wyłącznie do polimerazy RNA *E. coli*.

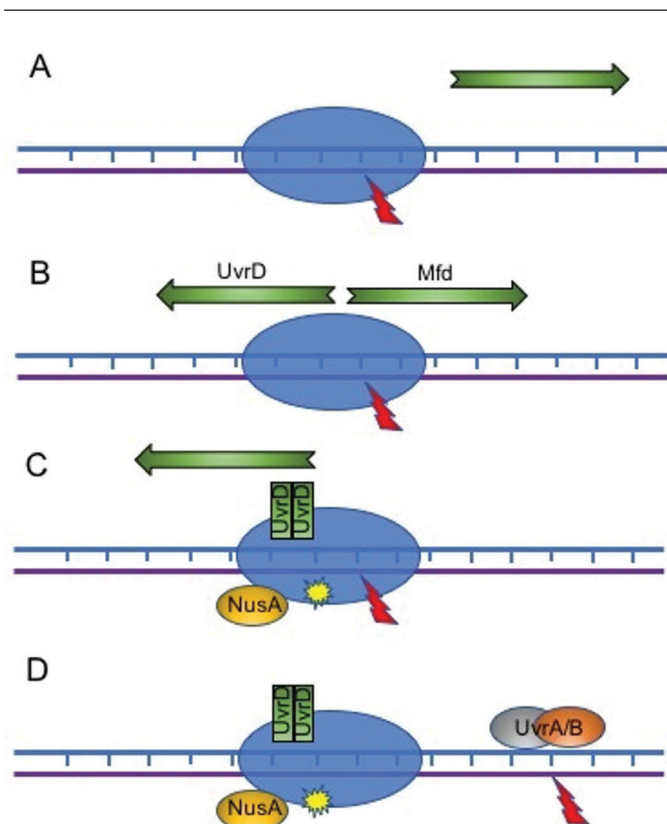
ALARMONY (p)ppGpp REGULUJĄ METABOLIZM GTP U *Firmicutes*

U większości poznanych gatunków bakterii istnieją dwa szlaki syntezy GTP: mechanizm syntezy *de novo* i cykl pozyskiwania GTP z odzysku (ang. *salvage pathway*). Oba szlaki skupiają się na inozynie 5'-monofosforanie (IMP), który jest produktem pośrednim w syntezie ATP i GTP [29]. Najważniejszymi białkami biorącymi udział w szlaku syntezy GTP są HprT i Gmk. Aktywność obu enzymów jest negatywnie regulowana przez (p)ppGpp u *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*, gdzie alarmony guanozynowe bezpośrednio wiążą się do tych białek [30]. Uważa się, że podobny mechanizm zachodzi u wszystkich bakterii typu *Firmicutes* [30]. Co ciekawe (p)ppGpp nie wiąże się do polimerazy RNA *B. subtilis*, natomiast regulacja transkrypcyjna u tej bakterii zachodzi właśnie poprzez modulację poziomu GTP. Nukleotyd ten jest wcielany jako pierwszy do nowo syntetyzowanych transkryptów rRNA *B. subtilis*, przez co jego stężenie ma znaczący wpływ na szybkość opuszczania rejonu promotora przez polimerazę RNA, a co za tym idzie jest czynnikiem ograniczającym częstość inicjacji nowej rundy transkrypcji zachodzącej z tych promotorów [31,32].

NAPRAWA DNA

Alarmony (p)ppGpp zaangażowane są także w procesy naprawy DNA, co zauważono badając szczepy *E. coli* z delecjami genów *ruvABC*, kodującymi białka biorące udział w rekombinacyjnej naprawie DNA. Szczepy takie posiadają zwiększoną wrażliwość na światło ultrafioletowe, pogłębianą dodatkowo przez delecję genów kodujących białka syntetyzujące (p)ppGpp (*relA* i *spoT*). Podejrzewano, że jest to związane z mniejszą stabilnością kompleksu transkrypcyjnego polimerazy RNA w obecności (p)ppGpp, co ułatwiałoby jego usunięcie przez polimerazę DNA podczas replikacji a zarazem promowało naprawę DNA [33].

Dopiero stosunkowo niedawno dokładniej poznano mechanizm działania (p)ppGpp na naprawę DNA związaną z transkrypcją. Przedstawia się on następująco: podczas procesu transkrypcji, przesuając się wzdłuż nici DNA, kompleks elongacyjny polimerazy RNA działa jako swojego rodzaju detektor uszkodzeń [34,35]. Po natrafieniu na uszkodzenie (np. dimer tymidynowy bądź chemiczne addukty) transkrypcja ulega zatrzymaniu, a kompleks transkrypcyjny pozostaje stabilnie związany do DNA. W celu naprawy DNA, musi on ulec translokacji do przodu lub do tyłu wzdłuż nici DNA. Proces ten wymaga udziału innych białek: Mfd powoduje translokację do przodu, natomiast helikaza UvrD oraz czynnik elongacji transkryp-



Rycina 3. Udział (p)ppGpp w naprawie DNA. **A)** Kompleks elongacyjny polimerazy RNA (niebieski owal) przeprowadza transkrypcję i porusza się po DNA w kierunku oznaczonym strzałką. Po natrafieniu na uszkodzenie DNA (błyskawica), kompleks ten ulega zatrzymaniu. **B)** Kompleks elongacyjny polimerazy RNA pozostaje związany z DNA w miejscu uszkodzenia. W celu zajęcia naprawy musi on ulec translokacji do przodu z pomocą białka Mfd lub cofnąć się przy udziale białka UvrD. **C)** (p)ppGpp (żółta gwiazda) wiąże się do polimerazy RNA. Powoduje to wzrost wrażliwości polimerazy na działanie UvrD. UvrD wiąże się w postaci dimeru do polimerazy i powoduje cofnięcie się polimerazy. Białko NusA wspomaga ten proces. **D)** Cofnięcie się polimerazy odsłania miejsce uszkodzenia DNA i umożliwia białkom UvrA i UvrB, zrekrutowanym przez UvrD, naprawę poprzez wycinanie nukleotydów.

cji NusA, powodują cofnięcie się kompleksu polimerazy do tyłu. Skutkuje to odsłonięciem uszkodzonego DNA co umożliwia naprawę przez wycinanie nukleotydów (system UvrABC) (Ryc. 3) [36].

Okazało się, iż (p)ppGpp uwrażliwia polimerazę RNA na działanie UvrD, przez co ułatwia cofnięcie się polimerazy i w efekcie naprawę DNA. Co ciekawe, sama obecność (p)ppGpp nie jest wystarczająca do zajęcia tego procesu [37]. Niezbędna jest także dimeryzacja UvrD, która w normalnych warunkach nie zachodzi ze względu na niskie stężenie tego białka w komórce. Dopiero włączenie innego mechanizmu stresowego - odpowiedzi SOS, powoduje wzrost stężenia UvrD i jego dimeryzację. Dzięki temu, UvrD jest zdolne do oddziaływania z polimerazą RNA jedynie przez niewielki okres czasu, przez co wspomagająca rola (p)ppGpp jest niezwykle ważna dla zajęcia procesu naprawy DNA [37].

Dodatkowo, inne właściwości (p)ppGpp również promują cofanie się polimerazy w przypadku natrafienia na uszkodzenie DNA. Obniżenie aktywności transkrypcyjnej wielu genów przez (p)ppGpp (szczególnie genów kodujących rybosomalne RNA), powoduje zmniejszenie ilości jed-

nocześnie aktywnych kompleksów transkrypcyjnych, które w normalnych warunkach znajdowałyby się zbyt blisko siebie na danym fragmencie DNA, uniemożliwiając cofanie się pojedynczych jednostek polimerazy RNA. Ponadto, ze względu na zsynchronizowanie transkrypcji i translacji u bakterii, rybosomy przeprowadzające translację na nowo transkrybowanej nici RNA również mogą utrudniać cofanie się polimerazy RNA. Odpowiedź ścisła powoduje zmniejszenie ilości rybosomów w komórce, co skutkuje obniżeniem aktywności translacyjnej [36]. Dodatkowo, badania wrażliwości różnych mutantów delecyjnych na czynniki uszkodzające DNA, a także badania *in vitro*, sugerują, że białko DksA podobnie jak (p)ppGpp wspomaga cofanie się polimerazy [37].

Pomimo znacznej ilości danych pochodzących z badań *in vivo* oraz *in vitro*, popierających wyżej wspomniany mechanizm działania, pojawiają się także dowody kwestionujące rolę UvrD oraz (p)ppGpp w naprawie DNA związanej z transkrypcją. W niedawno opublikowanej pracy wykazano, że obecność białka Mfd jest wystarczająca do zajścia naprawy, natomiast brak (p)ppGpp nie ma na nią wpływu [38]. Z pewnością kwestia ta wymaga jeszcze wielu badań, które pogłębią naszą wiedzę na ten temat.

REPLIKACJA DNA

Można podejrzewać, że (p)ppGpp jako główny czynnik odpowiadający za tempo wzrostu *E. coli* [39], wpływa na replikację DNA oraz cykl komórkowy bakterii. Replikacja składa się z trzech głównych etapów: inicjacji, elongacji i terminacji, a (p)ppGpp może być zaangażowane we wszystkie te procesy.

Najwcześniej odkrytym mechanizmem jest wpływ (p)ppGpp na inicjację replikacji. U *E. coli* odpowiedź ścisła powoduje obniżenie poziomu białka DnaA, niezbędnego do inicjacji replikacji. Efekt wywierany jest przez obniżenie intensywności transkrypcji zachodzącej z jednego z promotorów genu *dnaA* [40]. Podobny efekt widoczny jest także u *Caulobacter crescentus*, przedstawiciela grupy *Alphaproteobacteria*, gdzie dodatkowo stabilizowane jest białko CtrA, będące głównym regulatorem cyklu komórkowego, uniemożliwiające komórkom wejście w fazę replikacji [41]. Ponadto, wstrzymanie inicjacji replikacji podczas odpowiedzi ścisłej jest zależne od białka SeqA, wiążącego hemimetylowane motywy GATC oraz od metylazy Dam, metylującej adeniny w tych sekwencjach [42]. U plazmidów posiadających *ori* pochodzące od faga lambda, inicjacja replikacji jest zależna od aktywnej transkrypcji i w ten sposób jest regulowana przez odpowiedź ścisłą [43].

Ciekawym przykładem, uwidaczniającym różnice mechanizmu działania (p)ppGpp w obrębie różnych gatunków jest efekt wywierany na elongację replikacji. Prymaza DnaG jest białkiem syntetyzującym startery niezbędne do replikacji nici opóźnionej. Zarówno enzym pochodzący z *E. coli* jak i *B. subtilis* jest hamowany *in vitro* przez (p)ppGpp. Interesująco, w badaniach przeprowadzonych *in vivo*, odpowiedź ścisła powoduje gwałtowne zatrzymanie replikacji u *B. subtilis* podczas elongacji, natomiast synteza DNA u *E. coli* pozostaje bez zmian aż do rozpoczęcia kolejnej rundy re-

plikacji. Jedną z możliwości tłumaczących ten rozdzwięk może być wymiarczkowanie (p)ppGpp w *E. coli* przez polimerazę RNA, która w przeciwieństwie do polimerazy RNA *B. subtilis* wiąże (p)ppGpp [44]. Dodatkowo, u *E. coli* ppGpp wykazuje silniejsze działanie na DnaG niż pppGpp, natomiast u *B. subtilis* sytuacja jest odwrotna [45,46].

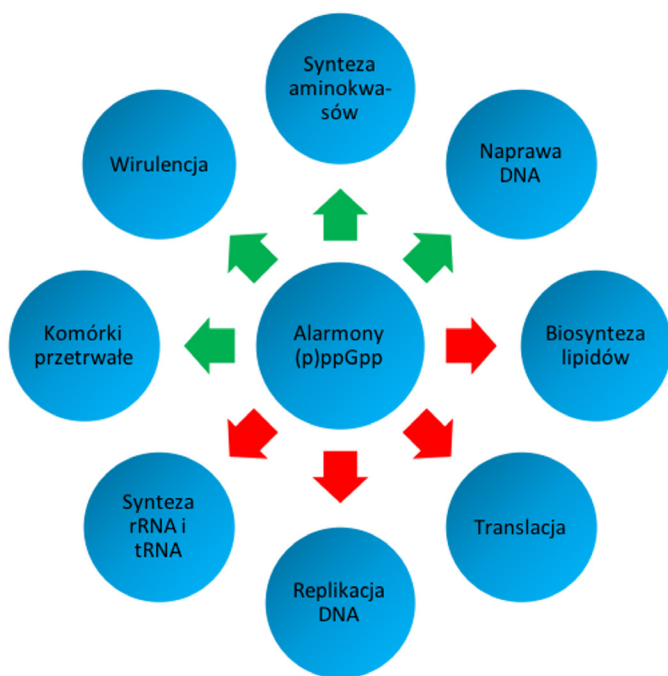
Podział komórki jest skomplikowanym procesem wymagającym wielu białek. Jednym z nich jest FtsZ, które polimeryzując, tworzy pierścień umożliwiający podział na dwie komórki potomne. Zauważono, że (p)ppGpp stymuluje transkrypcję operonu FtsZ_{QAQ}, a dodatkowo pewien podstawowy poziom tego alarmonu jest jednym z czynników niezbędnych do utrzymania prawidłowego poziomu FtsZ w komórce *E. coli* [47,48]. Inne badania, przeprowadzone z *Salmonella enterica serovar Paratyphi* sugerują, że zarówno zbyt duży jak i zbyt mały wewnątrzkomórkowy poziom (p)ppGpp ingeruje w proces polimeryzacji FtsZ [49,50]. Ponadto, istnieją przesłanki sugerujące, że odpowiedź ścisła prowadzi do zahamowania segregacji chromosomu, prawdopodobnie poprzez zmianę działania białka SeqA [42].

KOMÓRKI PRZETRWAŁE

Komórki przetrwałe są interesującym fenomenem współczesnej biologii. Są to komórki wprowadzone w stan bardzo powolnego wzrostu, niemalże całkowitego zatrzymanie metabolizmu, dzielące się rzadko. Stan ten jest odwracalny i prawdopodobnie służy jako forma umożliwiająca przetrwanie nieprzyjanych czy wręcz zabójczych dla normalnie rosnących komórek warunków. Jednym z czynników na które komórki przetrwałe wykazują zwiększoną tolerancję są antybiotyki. Tolerancja ta jest cechą fenotypową, niezależną od genetycznych determinant. Obecność komórek przetrwałych ma ogromne znaczenie medyczne i może być przyczyną niektórych przewlekłych zakażeń. Komórki wydają się wchodzić w stan przetrwalności losowo, choć częstość tego procesu może się zmieniać w odpowiedzi na warunki środowiska [51,52].

Mechanizm powstawania komórek przetrwałych wciąż nie jest do końca wyjaśniony, ale można podejrzewać, że (p)ppGpp jako główny regulator tempa wzrostu u *E. coli* [39], może mieć wpływ na tworzenie się takich komórek. Pokazano, że szczepy, które nie posiadają (p)ppGpp tworzą mniej komórek przetrwałych [53]. Dokładniejsze badania wykazały powiązanie (p)ppGpp z jednym z postulowanych mechanizmów powstawania komórek przetrwałych, angażującym systemy toksyna-antytoksyna. W systemach tych, jednocześnie produkowana jest toksyna jak i antytoksyna, która ją neutralizuje. Toksyny działają jako efekторы hamujące wiele procesów komórkowych i prawdopodobnie właśnie one wprowadzają komórki w stan przetrwalności [51,54].

Wzrost poziomu (p)ppGpp, prawdopodobnie losowo zachodzący w części komórek, powoduje kompetycyjne hamowanie hydrolazy polifosforanów (Ppx). W efekcie dochodzi do akumulacji polifosforanów w komórce, co z kolei aktywuje proteazę Lon, degradującą niektóre z antytoksyn. W ten sposób w komórkach pojawiają się aktywne (tzn. nie zneutralizowane) toksyny i powodują spowolnienie-



Rycina 4. Schematyczny wpływ „magicznych plamek” na procesy fizjologiczne bakterii. Zielone strzałki symbolizują pozytywną regulację przez (p)ppGpp. Czerwone strzałki symbolizują negatywną regulację.

nie metabolizmu. Co ciekawe, jedna z takich toksyn (HipA), uniemożliwia tworzenie naładowanych tRNA poprzez inaktywację syntetazy glutamyl-tRNA (GltX). Brak naładowanych tRNA z kolei może powodować uruchomienie syntezy (p)ppGpp przez białko RelA, czego skutkiem jest wytworzenie dodatkowego sprzężenia zwrotnego [51]. Z drugiej strony, występują również toksyny będące endonukleazami trawiącymi mRNA (toksyny takie jak RelE, YoeB, HigB, YhaV, YafO, YafQ, MazF, ChpB, MqsR i HicA) [53], co może ograniczać ilość aktywnych translacyjnie rybosomów, a tym samym ograniczać syntezę (p)ppGpp przez RelA; powstaje w ten sposób równoległa, negatywna pętla regulatorowa [51].

Kolejny, częściowo poznany mechanizm angażuje białko Obg, biorące udział w wielu ważnych procesach komórkowych, takich jak replikacja czy składanie rybosomów. Obg, za pomocą wciąż niezbadanego mechanizmu, zwiększa komórkowe stężenie toksyny HokB, która powoduje depolaryzację błony komórkowej i w konsekwencji obniżenie potencjału energetycznego komórki, prowadząc do przejścia w stan przetrwały. Jak wspomniano, dokładny mechanizm nie jest poznany, ale wykazano, że wymaga on obecności (p)ppGpp [51,55,56].

WIRULENCJA

Ważnym procesem, w który także zaangażowane jest (p)ppGpp jest wirulencja. Warunki występujące w gospodarzu jak i jego mechanizmy ochronne tworzą niezwykle stresujące środowisko dla atakujących patogenów. Wiele gatunków bakterii patogennych, pozbawionych mechanizmów odpowiedzi ściślejszej, wykazuje znacznie obniżoną wirulencję, objawiającą się mniejszą produkcją toksyn czy niezdolnością

do kolonizacji gospodarza. Dokładne mechanizmy są tak zróżnicowane jak bakterie, w których występują. Badania wykazały związek odpowiedzi ściślejszej z wirulencją u takich gatunków jak: *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Brucella abortus* oraz wiele innych [2,57]. Przykładem nowszych badań w tej dziedzinie jest *Francisella tularensis*, niebezpieczna bakteria wywołująca tularemie. (p)ppGpp okazało się niezbędne do tworzenia kompleksu czynników aktywujących transkrypcję regionów DNA zwanymi wyspami patogenności, czyli zgrupowań genów, których produkty determinują wirulencję danej bakterii [58]. Wykazano również, iż *Borrelia burgdorferi*, czynnik etiologiczny boreliozy, najprawdopodobniej wymaga (p)ppGpp do przeżycia w organizmie kleszcza podczas jego wielomiesięcznej głodówki. Co ciekawe ppGpp nie jest absolutnie niezbędne do późniejszej kolonizacji nowego żywiciela-ssaka [59].

PODSUMOWANIE

Odpowiedź ściśla jest skomplikowanym mechanizmem regulującym fizjologię komórki bakteryjnej. Jest zaangażowana w wiele procesów (Ryc. 4). Pomimo 50 lat badań nad „magiczną plamką” cały czas odkrywamy nowe aspekty tego szlaku regulatorowego. W ostatnich latach dokonano wielu przełomowych odkryć, które w perspektywie czasu pomogą w poznawaniu kolejnych mechanizmów regulowanych przez odpowiedź ściśłą. Najważniejszymi z tych odkryć są: poznanie struktur białek RelA [14, 15] i SAS [17]; dokładna identyfikacja miejsc wiązania (p)ppGpp do polimerazy RNA *E. coli* [25, 27]; udział (p)ppGpp w mechanizmie naprawy DNA [37]; udział (p)ppGpp w procesie podziału komórkowego [47]; zaangażowanie mechanizmów toksyna/antytoksyna zależnych od (p)ppGpp w powstawanie komórek przetrwałych [50]; oraz zaangażowanie odpowiedzi ściślejszej w wirulencję bakterii [56]. Tym niemniej, pomimo iż upłynęło wiele lat od odkrycia (p)ppGpp, alarmon ten cały czas skrywa jeszcze wiele tajemnic.

PIŚMIENNICTWO

- Cashel M, Gallant J (1969) Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature* 221: 838-841
- Potrykus K, Cashel M (2008) (p) ppGpp: still magical? *Annu Rev Microbiol* 62: 35-51
- Węgrzyn G. (1995) Czterofosforan guanozyny, ppGpp, jako czynnik ściślejszej kontroli replikacji DNA. *Postepy Biochem* 41: 23-32
- Dabrowska G, Prusinska J, Goc A (2006) Roślinny mechanizm adaptacyjnej odpowiedzi na warunki stresowe homologiczny do odpowiedzi ściślejszej bakterii. *Postepy Biochem* 52: 94-100
- Atkinson GC, Tenson T, Haurlyuk V (2011) The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PLoS One* 6: e23479
- Steinchen W, Bange G (2016) The magic dance of the alarmones (p) ppGpp. *Mol Microbiol* 101: 531-544
- Mechold U, Potrykus K, Murphy H, Murakami KS, Cashel M (2013) Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 41: 6175-6189
- Liu K, Bittner AN, Wang JD (2015) Diversity in (p) ppGpp metabolism and effectors. *Curr Opin Microbiol* 24: 72-79
- Wolf YI, Aravind L, Grishin NV, Koonin EV (1999) Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases - analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events. *Genome Res* 9: 689-710

10. Grant GA (2006) The ACT domain: a small molecule binding domain and its role as a common regulatory element. *J Biol Chem* 281: 33825-33829
11. Pedersen FS, Kjeldagan NO (1977) Analysis of the *relA* gene product of *Escherichia coli*. *FEBS J* 76: 91-97
12. Shyp V, Tankov S, Ermakov A, Kudrin P, English BP, Ehrenberg M, Haurlyuk V (2012) Positive allosteric feedback regulation of the stringent response enzyme RelA by its product. *EMBO Rep* 13: 835-839
13. Hogg T, Mechold U, Malke H, Cashel M, Hilgenfeld R (2004) Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response. *Cell* 117: 57-68
14. Loveland AB, Bah E, Madireddy R, Zhang Y, Brilot AF, Grigorieff N, Korostelev AA (2016) Ribosome RelA structures reveal the mechanism of stringent response activation. *Elife* 5: e17029
15. Brown A, Fernández IS, Gordiyenko Y, Ramakrishnan V (2016) Ribosome-dependent activation of stringent control. *Nature* 534: 277-280
16. Gaca AO, Kudrin P, Colomer-Winter C, Beljantseva J, Liu K, Anderson B, Wang J D, Rejman D, Potrykus K, Cashel M, Haurlyuk V, Gaca L (2015) From (p) ppGpp to (pp)ppGpp: Characterization of regulatory effects of pGpp synthesized by the small alarmone synthetase of *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 197: 2908-2919
17. Steinchen W, Schuhmacher JS, Altegoer F, Fage CD, Srinivasan V, Linne U, Bange G (2015) Catalytic mechanism and allosteric regulation of an oligomeric (p) ppGpp synthetase by an alarmone. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 13348-13353
18. Takahashi K, Kasai K, Ochi K (2004) Identification of the bacterial alarmone guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 4320-4324
19. Sun D, Lee G, Lee JH, Kim HY, Rhee HW, Park SY, Kim JD, Kim Y, Kim BY, Hong J, Park, Choy HC, Kim JH, Jeon YH, Chung J (2010) A metazoan ortholog of SpoT hydrolyzes ppGpp and functions in starvation responses. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1188-1194
20. Durfee T, Hansen AM, Zhi H, Blattner FR, Jin DJ (2008) Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190: 1084-1096
21. Vrentas CE, Gaal T, Berkmen MB, Rutherford ST, Haugen SP, Ross W, Gourse RL (2008) Still looking for the magic spot: the crystallographically defined binding site for ppGpp on RNA polymerase is unlikely to be responsible for rRNA transcription regulation. *J Mol Biol* 377: 551-564
22. Paul BJ, Berkmen MB, Gourse RL (2005) DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7823-7828
23. Magnusson LU, Gummesson B, Joksimovic P, Farewell A, Nystrom T (2007) Identical, independent, and opposing roles of ppGpp and DksA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189: 5193-5202
24. Roghanian M, Zenkin N, Yuzenkova Y (2015) Bacterial global regulators DksA/ppGpp increase fidelity of transcription. *Nucleic Acids Res* 43: 1529-1536
25. Murakami KS (2013) X-ray crystal structure of *Escherichia coli* RNA polymerase $\sigma 70$ holoenzyme. *J Biol Chem* 288: 9126-9134
26. Zuo Y, Wang Y, Steitz TA (2013) The mechanism of *E. coli* RNA polymerase regulation by ppGpp is suggested by the structure of their complex. *Mol Cell* 50: 430-436
27. Ross W, Vrentas CE, Sanchez-Vazquez P, Gaal T, Gourse RL (2013) The magic spot: a ppGpp binding site on *E. coli* RNA polymerase responsible for regulation of transcription initiation. *Mol Cell* 50: 420-429
28. Ross W, Sanchez-Vazquez P, Chen AY, Lee JH, Burgos HL, Gourse RL (2016) ppGpp binding to a site at the RNAP-DksA interface accounts for its dramatic effects on transcription initiation during the stringent response. *Mol Cell* 62: 811-823
29. Jensen KF, Dandanell G, Hove-Jensen B, Willemoës M (2008) Nucleotides, Nucleosides, and Nucleobases. *EcoSal Plus* 3
30. Liu K, Bittner AN, Wang JD (2015) Diversity in (p) ppGpp metabolism and effectors. *Curr Opin Microbiol* 24: 72-79
31. Krasny L, Gourse RL (2004) An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *EMBO J* 23: 4473-4483
32. Krasny L, Tiserova H, Jonak J, Rejman D, Sanderova H (2008) The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response to amino acid starvation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 69: 42-54
33. McGlynn P, Lloyd RG (2000) Modulation of RNA polymerase by (p) ppGpp reveals a RecG-dependent mechanism for replication fork progression. *Cell* 101: 35-45
34. Epshtein V, Kamarthapu V, McGary K, Svetlov V, Ueberheide B, Proshkin S, Mironov A, Nudler E (2014) UvrD facilitates DNA repair by pulling RNA polymerase backwards. *Nature* 505: 372-377
35. Pani B, Nudler E (2017) Mechanistic insights into transcription coupled DNA repair. *DNA Repair* 56: 42-50
36. Rasouly A, Pani B, Nudler E (2016) A magic spot in genome maintenance. *Trends Genet* 33: 58-67
37. Kamarthapu V, Epshtein V, Benjamin B, Proshkin S, Mironov A, Cashel M, Nudler E (2016) ppGpp couples transcription to DNA repair in *E. coli*. *Science* 352: 993-996
38. Adebali O, Sancar A, Selby CP (2017) Mfd translocase is necessary and sufficient for transcription-coupled repair in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 292: 18386-18391
39. Potrykus K, Murphy H, Philippe N, Cashel M (2011) ppGpp is the major source of growth rate control in *E. coli*. *Environ Microbiol* 13: 563-575
40. Chiaramello AE, Zyskind JW (1990) Coupling of DNA replication to growth rate in *Escherichia coli*: a possible role for guanosine tetraphosphate. *J Bacteriol* 172: 2013-2019
41. Hallez R, Delaby M, Sanselicio S, Viollier PH (2017) Hit the right spots: cell cycle control by phosphorylated guanosines in alphaproteobacteria. *Nat Revs Microbiol* 15: 137-148
42. Ferullo DJ, Lovett ST (2008) The stringent response and cell cycle arrest in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics* 4: e1000300
43. Szalewska-Palasz A, Wegrzyn A, Herman A, Wegrzyn G (1994) The mechanism of the stringent control of lambda plasmid DNA replication. *EMBO J* 13: 5779-5785
44. Maciag M, Kochanowska M, Łyżeń R, Wegrzyn G, Szalewska-Palasz A (2010) ppGpp inhibits the activity of *Escherichia coli* DnaG primase. *Plasmid* 63: 61-67
45. Wang JD, Sanders GM, Grossman AD (2007) Nutritional control of elongation of DNA replication by (p)ppGpp. *Cell* 128: 865-875
46. Maciag-Dorszyńska M, Szalewska-Palasz A, Wegrzyn G (2013) Different effects of ppGpp on *Escherichia coli* DNA replication *in vivo* and *in vitro*. *FEBS Open Bio* 3: 161-164
47. Nazir A, Harinarayanan R (2016) (p)ppGpp and the bacterial cell cycle. *J Biosciences* 41: 277-282
48. Nazir A, Harinarayanan R (2016) Inactivation of cell division protein FtsZ by SulA makes Lon indispensable for the viability of a ppGpp⁰ strain of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 198: 688-700
49. Yamaguchi T, Iida KI, Shiota S, Nakayama H, Yoshida SI (2015) Elevated guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate level inhibits bacterial growth and interferes with FtsZ assembly. *FEMS Microbiol Lett* 362: fnv187
50. Yamaguchi T, Iida KI, Shiota S, Nakayama H, Yoshida SI (2015) Filament formation of *Salmonella Paratyphi A* accompanied by FtsZ assembly impairment and low level ppGpp. *Can J Microbiol* 61: 955-964
51. Harms A, Maisonneuve E, Gerdes K (2016) Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science* 354: aaf4268
52. Haurlyuk V, Atkinson GC, Murakami KS, Tenson T, Gerdes K (2015) Recent functional insights into the role of (p) ppGpp in bacterial physiology. *Nat Rev Microbiol* 13: 298-309
53. Maisonneuve E, Castro-Camargo M, Gerdes K (2013) (p) ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell* 154: 1140-1150

54. Gerdes K, Maisonneuve E (2012) Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci. *Annu Rev Microbiol* 66: 103-123
55. Wout P, Pu K, Sullivan SM, Reese V, Zhou S, Lin B, Maddock JR (2004) The *Escherichia coli* GTPase CgtAE cofractionates with the 50S ribosomal subunit and interacts with SpoT, a ppGpp synthetase/hydrolase. *J Bacteriol* 186: 5249-5257
56. Verstraeten N, Knapen WJ, Kint CI, Liebens V, Van den Bergh B, Dewachter L, Joran EM, Qiang F, Charlotte CD, Fierro CA, Marchal K, Bierlant J, Versees W, Hofkens J, Jansen M, Fauvart M, Michels J (2015) Opg and membrane depolarization are part of a microbial bet-hedging strategy that leads to antibiotic tolerance. *Mol Cell* 59: 9-21
57. Dalebroux ZD, Svensson SL, Gaynor EC, Swanson MS (2010) ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 171-199
58. Cuthbert BJ, Ross W, Rohlfing AE, Dove SL, Gourse RL, Brennan RG, Schumacher MA (2017) Dissection of the molecular circuitry controlling virulence in *Francisella tularensis*. *Genes Develop* 31: 1549-1560
59. Drecktrah D, Lybecker M, Popitsch N, Rescheneder P, Hall LS, Samuels DS (2015) The *Borrelia burgdorferi* RelA/SpoT homolog and stringent response regulate survival in the tick vector and global gene expression during starvation. *PLoS Pathogens* 11: e1005160

50th anniversary of discovering „magic spots” – the latest advances in (p)ppGpp research

Maciej Dylewski*, Michał Sobala*, Bożena Bruhn-Olszewska and Katarzyna Potrykus[✉]

Department of Bacterial Molecular Genetics, Faculty of Biology, University of Gdańsk, 59 W. Stwosza St., 80-308 Gdańsk, Poland

[✉]e-mail: katarzyna.potrykus@biol.ug.edu.pl

*these authors contributed equally to this work

Key words: ppGpp, (p)ppGpp, stringent response, transcription, DNA repair, persister cells

ABSTRACT

About 50 years ago, „magic spots” – mediators of the bacterial stringent response, were discovered and were later identified as guanosine tetra- and pentaphosphate (ppGpp and pppGpp, jointly referred to as (p)ppGpp). At first, it seemed that stringent response is associated only with bacterial response to amino acid starvation, however, it soon turned out that (p)ppGpp is synthesized in response to other stresses as well. The mentioned alarmones are found to exist in all known bacterial species, as well as in plants. In recent years, a significant progress has been made in research on (p)ppGpp metabolism. It is also known that the stringent response affects many cellular processes, among which its effect on transcription is the best characterized. Moreover, (p)ppGpp is involved in the DNA repair pathway associated with transcription. In addition, the stringent response inhibits cell division, mainly by hindering DNA replication. (p)ppGpp is also of significant medical importance – it is necessary for virulence of many bacterial species and for turning them into persisters, i.e. cells which have elevated tolerance to many antibiotics.