

## THE STRINGENT RESPONSE AND ITS INVOLVEMENT IN THE REACTIONS OF BACTERIAL CELLS TO STRESS

Julia Berdychowska, Justyna Boniecka\*, Grażyna B. Dąbrowska

Department of Genetics, Nicolaus Copernicus University in Toruń

Received in September 2018, accepted in April 2019

**Abstract:** The stringent response is a form of bacterial response to adverse environmental conditions. Its effectors are guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate [(p)ppGpp], which are synthesized by RelA, SpoT and their homologs (RSH). RelA, a (p)ppGpp synthase, is activated when there is a shortage of amino acids, whereas SpoT, which has the ability to synthesize and hydrolyze (p)ppGpp, responds to fatty acids, iron and carbon limits. Accumulation of (p)ppGpp causes an inhibition of translation, replication, a decrease in the transcription of many genes, e.g. rRNA, tRNA, encoding ribosomal proteins, and an increase in the transcription of genes whose proteins are important in bacterial stress response. The stringent response alarmones are crucial for bacterial resistance to oxidative stress and antibiotics. They also regulate the production of specific molecules, the so-called quorum sensing autoinducers, which help bacteria communicate the density of their own population, which enables them to adjust their metabolism to the prevailing conditions, to form a biofilm – a community of microorganisms attached to a certain surface, ensuring them appropriate conditions to survive in an unfavourable environment, and to colonize new niches. (p)ppGpp has a positive impact on biofilm formation not only via the regulation of quorum sensing, but also by stimulating the synthesis of potential elements of the biofilm. It also appears that the stringent response alarmones decrease the ability of *Agrobacterium tumefaciens* bacteria to transform plants and thus their potential to cause disease. (p)ppGpp enables the bacteria to perform swarming motility, a movement that increases their resistance to adverse environmental factors.

1. Introduction. 2. RelA, SpoT and RSH proteins – enzymes that metabolize the alarmones of the stringent response. 2.1. The regulation of transcription via stringent response alarmones in Gram-negative bacteria. 2.2. The regulation of transcription via (p)ppGpp in Gram-positive bacteria. 2.3. The influence of stringent response alarmones on translation and replication. 3. The role of the stringent response in the regulation of other physiological processes. 3.1. The role of the stringent response in the production of siderophores and antibiotics. 4. Bacterial cell resistance to stress and the stringent response. 4.1. The participation of the stringent response in quorum sensing regulation. 4.2. The regulation of exopolysaccharide production and biofilm formation dependent on the stringent response. 4.3. The role of the stringent response in the regulation of bacterial swarming motility. 5. Summary

### ODPOWIEDŹ ŚCISŁA I JEJ ZAANGAŻOWANIE W REAKCJE KOMÓREK BAKTERYJNYCH NA STRESY

**Streszczenie:** Odpowiedź ścisła jest reakcją bakterii na niekorzystne warunki środowiska. Jej efektorami są alarmony, czterofosforan i pięćfosforan guanozyny [(p)ppGpp], syntetyzowane przez enzymy RelA, SpoT oraz ich homologi (RSH). Enzym RelA, będący syntazą (p)ppGpp, jest aktywowany w odpowiedzi na niedobór aminokwasów, natomiast enzym SpoT, posiadający zdolność syntezy i hydrolizy (p)ppGpp, w odpowiedzi na niedobór kwasów tłuszczowych, żelaza oraz węgla. Akumulacja (p)ppGpp powoduje zahamowanie translacji, replikacji oraz obniżenie transkrypcji wielu genów, np. rRNA, tRNA, kodujących białka rybosomalne, a podwyższenie tych których białka są istotne w odpowiedzi bakterii na stres. Alarmony odpowiedzi ścisłej zapewniają bakteriom oporność na stres oksydacyjny i antybiotyki. Regulują również produkcję specyficznych cząsteczek, tzw. autoinduktorów quorum sensing, pomagających bakteriom we wzajemnej komunikacji odnośnie gęstości ich własnej populacji, co umożliwia im dostosowanie metabolizmu do panujących warunków, formowanie biofilmu – swego rodzaju społeczności mikroorganizmów zapewniającej sobie odpowiednie warunki do przetrwania w niesprzyjającym środowisku, oraz zasiedlanie nowych nisz. (p)ppGpp wpływają pozytywnie na formowanie biofilmu nie tylko poprzez regulację quorum sensing ale i poprzez stymulację syntezy potencjalnych elementów biofilmu. Wydaje się, że alarmony odpowiedzi ścisłej obniżają zdolność bakterii *Agrobacterium tumefaciens* do transformacji gospodarzy roślinnych, a tym samym ich zdolności chorobotwórcze. (p)ppGpp odpowiadają również za ruch mrowiący bakterii, który zwiększa ich oporność na niekorzystne czynniki środowiska.

1. Wprowadzenie. 2. Białka RelA, SpoT i RSH – enzymy metabolizmu alarmonów odpowiedzi ścisłej. 2.1. Regulacja transkrypcji przez alarmony odpowiedzi ścisłej u bakterii Gram-ujemnych. 2.2. Regulacja transkrypcji przez (p)ppGpp u bakterii Gram-dodatnich. 2.3. Wpływ alarmonów odpowiedzi ścisłej na translację i replikację. 3. Rola odpowiedzi ścisłej w regulacji innych procesów fizjologicznych bakterii 3.1. Rola odpowiedzi ścisłej w produkcji sideroforów i antybiotyków. 4. Oporność komórek bakteryjnych na stres a odpowiedź ścisła. 4.1. Udział odpowiedzi ścisłej w regulacji quorum sensing. 4.2. Regulacja produkcji egzopolisacharydów i tworzenia biofilmu zależne od odpowiedzi ścisłej. 4.3. Rola odpowiedzi ścisłej w regulacji ruchu mrowiącego bakterii. 5. Podsumowanie

**Key words:** biofilm, stringent response, (p)ppGpp, quorum sensing, RelA/SpoT

**Słowa kluczowe:** biofilm, odpowiedź ścisła, (p)ppGpp, quorum sensing, RelA/SpoT

\* Corresponding author: Justyna Boniecka, Department of Genetics, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Lwowska 1, 87-100, Toruń, Poland; phone: +48 56 611 45 76; e-mail: jboniecka@umk.pl

## 1. Introduction

In the course of evolution, living organisms have developed mechanisms allowing them to survive in unfavourable conditions. The adaptation of bacterial cells to conditions abnormal for their growth and survival in a new, changed environment is the result of the cells' response to stress. In stressful conditions, changes in metabolism occur with a view to protecting a cell. One of the adaptive mechanisms is the stringent response, observed for the first time in *Escherichia coli* [16] and defined as the physiological response of a bacterium to a deficiency in amino acids, fatty acids, other nutritional substances or a different kind of stress, e.g. changes in temperature [7, 27, 29, 36, 41, 85, 97, 109]. Stringent response alarmones, jointly referred to as (p)ppGpp, are guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate, ppGpp and pppGpp, respectively, which, i.a., by directly interacting with RNA polymerase, contribute to changes in gene expression, as well as DNA replication. The aim of this work is to summarize the contemporary state of knowledge with regard to bacterial stringent response, which is significant due to its involvement in the reactions of microorganisms to the effects of stress factors, with particular emphasis on this mechanism in bacteria interacting with plants. The activation of the stringent response in bacteria gives them a chance to colonize new niches and, to an extent, guarantees their survival, even in extreme conditions.

## 2. RelA, SpoT and RSH proteins – enzymes that metabolize the alarmones of the stringent response

The main effectors of the stringent response in bacteria are (p)ppGpp. These molecules, often referred to as stringent response alarmones, are synthesized by the RelA and SpoT enzymes (in Beta- and Gammaproteobacteria; Fig. 1) and their homologues known as RSH (RelA/SpoT Homologues; in other bacteria).

Alarmones influence the metabolism of a bacterial cell, i.a., by lowering the transcription of genes encoding rRNA, tRNA and ribosomal proteins and increasing the expression of those encoding proteins involved in the synthesis of amino acids and the response to stress [22, 44, 85, 103]. The level of (p)ppGpp in cells also regulates the process of translation and DNA repair. Functioning of the stringent response is observed in both Gram-negative and Gram-positive bacteria, and its psychological effects also include the inhibition of DNA replication [4, 23, 25, 66], which slows down the division and growth of cells [10, 23].

The RelA enzyme is a ribosome-associated protein that “senses” a deficiency in amino acids by directly monitoring the translational efficiency of a cell. Over the course of the correct growth of a cell, amino acids, in the form of aminoacyl-tRNA, are delivered to the A-site of a ribosome and added to a nascent polypeptide. In conditions of amino acid starvation, deacylated

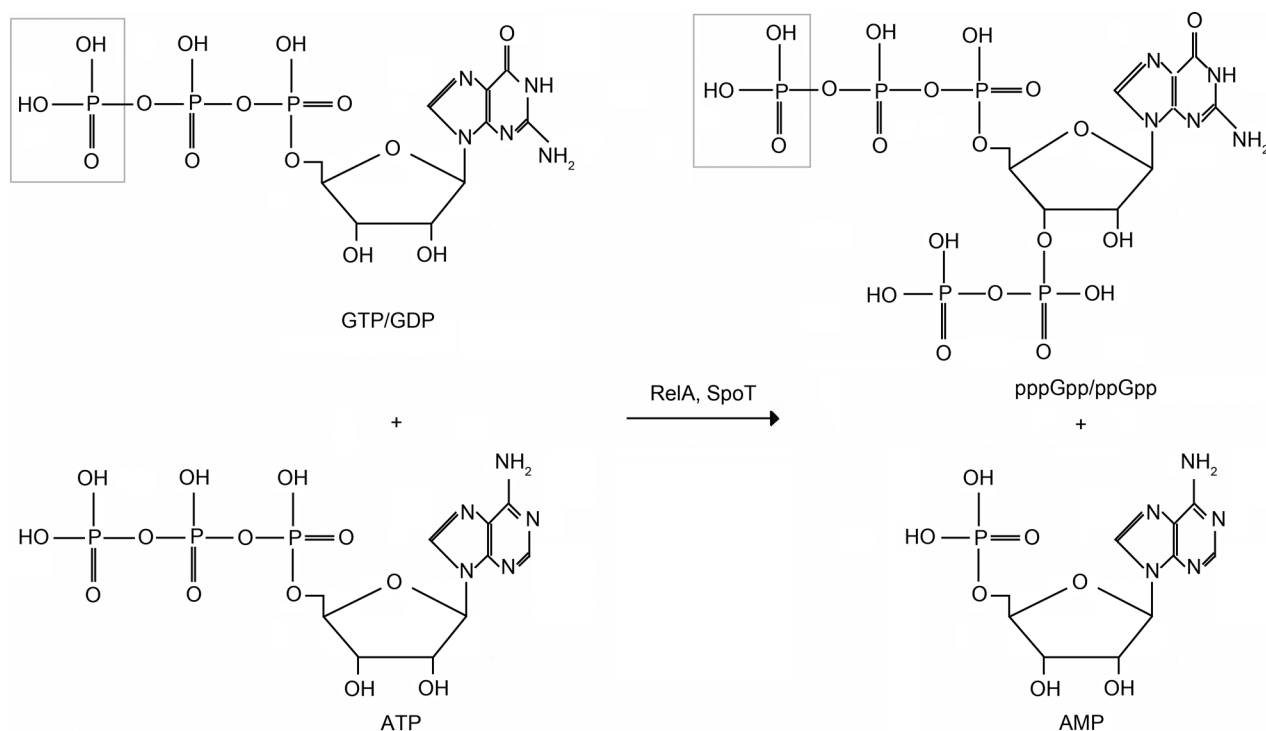


Fig. 1. Synthesis of (p)ppGpp in *E. coli*.

The ppGpp and pppGpp are synthesized from GDP and GTP, respectively, as well as from ATP by the RelA and SpoT enzymes, in response to a deficiency in nutritional substances. As a result of these reactions, AMP is also produced. Phosphate groups marked in grey are present only in the case of GTP and pppGpp.

tRNA forms are accumulated in a bacterial cell and block a ribosome at the A-site and, subsequently, the RelA protein binds to the ribosome and synthesizes (p)ppGpp [41, 44] which reduces the enzyme's affinity to the ribosome. RelA, which is able to move from one ribosome to the next, monitors the translational activity of a cell [112]. A different model assumes that RelA performs a few cycles of (p)ppGpp synthesis after disconnecting from the ribosome, which would indicate the possession of "molecular memory" by this protein [27]. Subsequent studies have shown, however, that RelA may bind to the ribosome even in the absence of tRNA, and the presence of deacylated tRNA stabilizes this complex and enables the synthesis of (p)ppGpp [67]. Interestingly, the ppGpp molecule itself may exert a positive influence on the activity of RelA, and thus stimulate the production of stringent response alarmones by way of a feedback loop [98]. Despite the existence of various models describing the functioning of RelA, the fact that it is the main enzyme responsible for (p)ppGpp synthesis in *E. coli* in conditions of amino acids deficiency remains unchanged. The functioning of the stringent response is not limited to regulating the metabolism of bacterial cells only in this situation; it also takes place in the event of a response to other stress factors, such as a deficiency in fatty acids, iron, the depletion of a carbon source or a heat shock. Then, it is SpoT that becomes the enzyme which performs the function of synthesizing (p)ppGpp [27, 29, 97, 109]. Unlike RelA, this protein also demonstrates the activity of hydrolysing stringent response alarmones in a situation when environmental conditions improve [47, 53, 144]. The SpoT enzyme is therefore responsible for maintaining a balance in the level of alarmones, and its dysfunction, along with the simultaneous presence of the RelA functional enzyme, results in the death of cells. This stems from the fact that, in mutants lacking the SpoT protein, alarmones are produced without the simultaneous possibility to hydrolyse them [114]. In conditions when cells have unlimited access to nutritional substances, GTP-ase CgtA/Obg which, e.g., is involved in assembling ribosomes, interacts with the SpoT protein, which most likely causes an increase in its hydrolytic activity and, consequently, a decrease in the level of (p)ppGpp [87]. Another protein that regulates the activity of SpoT is the Acyl Carrier Protein (ACP), which also interacts with this enzyme. In a situation when a cell has enough nutritional substances at its disposal, ACP promotes the enzyme's hydrolytic activity, whereas in stressful conditions resulting from a deficiency in fatty acids, it promotes synthetase activity [7].

In bacteria that do not have RelA and SpoT, there are enzymes designated as RSH [formerly Rel, described as ones belonging to the so-called "long" RSHs (similarly

as RelA and SpoT)] which are responsible for the synthesis of (p)ppGpp, both in conditions of amino acid starvation, as well as in response to other stress factors. They also have a domain responsible for the hydrolysis of stringent response alarmones. In addition to the RelA, SpoT and RSH enzymes, selected bacteria also contain Small Alarmone Synthetases (SAS), which are also designated as Rel, which only have the domain responsible for the synthesis of (p)ppGpp (sometimes also referred to as short RSHs) [3, 103].

### 2.1. The regulation of transcription via stringent response alarmones in Gram-negative bacteria

The initiation of transcription in bacteria consists of the core of RNA polymerase (RNAP) combined with the  $\sigma$  factor (together forming the RNAP holoenzyme) binding to the -35 and -10 promoter sequences. The RNAP core consists of five subunits:  $\alpha$ I,  $\alpha$ II – binding regulatory proteins,  $\beta$  – associating reaction substrates,  $\beta'$  – binding DNA (both  $\beta$  subunits are part of the active site of RNAP) and  $\omega$  subunit [13, 74]. Transcription from the majority of *E. coli* promoters (e.g., rRNA promoters) is carried out by RNA polymerase containing the  $\sigma^A$  factor ( $\sigma 70$ , RpoD), whereas alternative sigma factors are used for the transcription of some genes encoding proteins which enable survival in unfavourable environmental conditions [13]. Unwinding of the DNA duplex across a section of several nucleotides (i.e. the creation of an open complex) allows for transcription to be initiated by means of synthesizing short, so-called abortive RNAs, and subsequently transition into the elongation complex, which leaves the area of the promoter [13].

In *E. coli*, the transcription of genes encoding rRNA is mainly regulated at the level of transcription initiation, which is in general influenced, i.a., by proteins that bind to DNA promoter regions – activators and repressors, as well as the level of the transcription initiating nucleotide [6, 13, 34]. The stability of the RNA polymerase complex with the promoter sequence of a given gene is extremely sensitive to the concentration of this nucleotide. When the concentration of the initiating nucleotide rises, the polymerase complex with the promoter becomes more stable, which favours the initiation of transcription [34]. However, because in *E. coli* it is the ATP and not the GTP that is the initiating nucleotide, the accumulation of (p)ppGpp, which leads to the exhaustion of GTP, does not really influence the concentration of the initiating nucleotide, as is the case for the Gram-positive *B. subtilis* bacterium, for which it is GTP that is the nucleotide which initiates rRNA transcription [13].

Stringent response alarmones regulate the transcription of *E. coli* by binding directly to RNA polymerase.

Experiments have shown that RNA polymerase has two sites in which it may bind (p)ppGpp. One of them is located approximately 30 Å from the active site of the enzyme, in a cavity surrounded by  $\alpha$ ,  $\beta'$  and  $\omega$  subunits. There, alarmones interact with the DPBB domain (Double Psi  $\beta$ -Barrel) of the  $\beta'$  subunit and with the N-terminus of the  $\omega$  subunit. Fragments of the  $\beta$ ,  $\beta'$  subunits, as well as  $\alpha$  subunits, and fragments of the  $\beta$ ,  $\beta'$  and  $\omega$  subunits constitute two mobile RNAP modules known as the core and shelf respectively, which together form the so-called claw. The RNAP catalytic site is located deep inside the clamp cleft. The binding of alarmones in the afore-mentioned spot probably reduces the dynamics of the RNAP claw, which prevents the chamber of the active site from closing, which happens when a nucleotide binds to a DNA template strand during the nascent RNA synthesis. This, in turn, may slow down the process of adding nucleotides and destabilize the transcription initiation complex [44, 71, 91, 117]. The second site of (p)ppGpp binding is located 60 Å from the first one, it is created by the  $\beta'$  subunit and the DksA transcription factor binding to RNAP, located near the entrance to the secondary RNA polymerase channel [73, 79, 90].

Depending on the kinetic properties of the promoter, gene expression is reduced or increased as a result of RNAP interacting with (p)ppGpp. Because the presence of (p)ppGpp destabilizes the RNAP-promoter complex, it significantly reduces the transcription of those genes that have promoters, which allow for the formation of a short-lived complex. Promoter sequences of genes encoding rRNA have a sequence rich in GC pairs, which interacts with the  $\sigma$  RNAP subunit, in the area  $-10 - +1$  (the so-called discriminator). This results in the formation of extremely unstable open complexes with RNA polymerase [5, 43], whose destabilization is additionally increased by (p)ppGpp binding. However, promoters of genes encoding proteins responsible for synthesizing amino acids have a sequence rich in AT pairs in the same spot, which increases the stability of RNA polymerase-DNA interactions and reduces its sensitivity to destabilization caused by alarmones [5, 102].

Another form in which (p)ppGpp regulate transcription is the indirect activation of genes responding to stress by stimulating the dissociation of the  $\sigma^{70}$  subunit from the RNAP holoenzyme. At that moment, there are more free particles of the RNAP core in a cell, to which alternative sigma factors may bind, for instance  $\sigma^S$  ( $\sigma^{38}$ , RpoS),  $\sigma^H$  ( $\sigma^{32}$ , RpoH),  $\sigma^N$  ( $\sigma^{54}$ , RpoN) and  $\sigma^E$  ( $\sigma^{24}$ , RpoE) [85, 102].

Stringent response alarmones also facilitate the reparation of errors generated in the process of DNA transcription, taking part in the so-called TCR repair (Transcription Coupled Repair). Mutants lacking stringent response enzymes are less resistant to mutagenic

factors, they are characterized by slower removal of cyclobutane pyrimidine dimers induced by UV light [54]. This is due to the fact that they do not produce (p)ppGpp, which, as has been demonstrated, cause the relaxation of the RNA polymerase clamp located on DNA in the process of transcription elongation which, in cooperation with the UvrD protein, enables the backtracking of the polymerase on the transcribed DNA strand and, therefore, the correction of errors [54].

## 2.2. The regulation of transcription via (p)ppGpp in Gram-positive bacteria

Gram-positive bacteria belonging to the *Firmicutes* type do not have homologues of the DksA transcription factor or a sequence of discriminators rich in GC, while (p)ppGpp do not interact directly with RNA polymerase. In these bacteria, alarmones are important in the transcription of e.g. rRNA, as they regulate the concentration of the nucleotide which initiates this process, that is, GTP [35, 59]. An increase in the content of (p)ppGpp causes a decrease in the level of this nucleotide, which stems not only from the fact that it is used for the production of (p)ppGpp, but also because of the influence of (p)ppGpp on GTP synthesis pathways. It has been demonstrated that in *Bacillus subtilis* (p)ppGpp inhibit the activity of Gmk and HprT enzymes, which are involved in the production of GTP [60].

It is assumed that guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate regulate the metabolism of Gram-positive bacteria, including by means of the CodY transcription factor regulation. CodY is a negative regulator of the expression of over one hundred genes encoding proteins involved in sporulation, adaptation to unfavourable environmental conditions or virulence, during the exponential growth of bacteria, which is characterized by a high level of GTP. In the stationary phase of growth, the RelA enzyme, by reducing the level of GTP for the purpose of producing stringent response alarmones which, in turn, reduce the activity of Gmk and HprT, therefore further reducing the level of GTP in a cell, limits the repression of transcription caused by CodY [44, 60, 101].

## 2.3. The influence of stringent response alarmones on translation and replication

Stringent response alarmones not only regulate transcription, but also cause a decrease in the efficiency of translation, i.e. by repressing the transcription of machinery associated with protein synthesis, including tRNA, rRNA, as well as genes encoding ribosomal proteins [44, 53]. Furthermore, they reduce the efficiency of translation by interacting with guanosine triphosphatases involved in assembling large (50S)

and small (30S) ribosomal subunits into the 70S complex (e.g. BipA, Obg).

The BipA protein is involved in regulating e.g. swarming motility, virulence, symbiosis or biofilm formation. In combination with GTP, this protein is able to bind to the 70S bacterial ribosome at the same site as where it interacts with Ef-G, Ef-Tu and Ef4. As a result of this interaction, BipA is able to regulate the translation process, in particular with regard to proteins involved in the response of bacteria to stress. The involvement of the BipA protein in the biogenesis of ribosomal subunits and assembling the 70S monosome is evidenced by the fact that the *bipA* *E. coli* mutant, when growing at a temperature of 20°C, is characterized by a different level of 30S and 50S subunits compared to a wild type strain. Moreover, higher ratio of 30S to 50S subunits and a higher ratio of the content of both these subunits to 70S monosomes were observed. This suggests that BipA is most likely involved in the biogenesis of the 50S subunit. It has also been suggested that this protein performs a vital role in assembling ribosomes, likely by means of regulating the translation of specific mRNAs, whose proteins are involved in this process [21, 61]. In the case when there is an accumulation of alarmones within a cell (e.g. in conditions of amino acid starvation) these nucleotides interact with the BipA protein and effect such conformational changes in it that it does not bind to the 70S ribosome, but to the 30S subunits, which simultaneously prevents the formation of the 70S complex [24, 103].

The Obg proteins are enzymes which are important for the growth of a cell, involved in DNA replication, the biogenesis of ribosomes and adaptation to stress. The ObgE protein is mainly responsible for the correct assembly of the 50S subunit. Furthermore, ObgE, by binding to this subunit, prevents the formation of the 70S complex and, therefore, the initiation of translation. In turn, by interacting with ObgE, stringent response alarmones increase the affinity of this enzyme to the immature 50S subunit, which causes delays in its correct assembly and hinders the formation of the 70S complex [28].

Stringent response alarmones may also hinder the formation of the initiating complex by interacting with the If2 translation initiation factor. At the same site of the If2 factor, GTP or (p)ppGpp can bind, however, the negative charge of pyrophosphate at the position 3' (p)ppGpp "protrudes" beyond the If2 protein and potentially disrupts its function [102]. In addition, it has been demonstrated that, in *in vitro* conditions, (p)ppGpp may inhibit the Ef-G [40] and Ef-Tu [84, 102, 103] translation elongation factors.

DNA replication is a process necessary for the duplication of genetic material and cell division, whose initiation requires the so-called primers. In bacteria, it is the DnaG primase that is the enzyme which synthesizes

these short RNA sequences. It has been demonstrated that in *B. subtilis* the direct attachment of (p)ppGpp to this enzyme results in the inhibition of DNA replication at the elongation phase [111], while in *E. coli* this is mostly true only at the initiation phase [68]. Alarmones bind to the DnaG primase in a way similar to standard nucleotides, however, because of the additional phosphate groups, they lead to conformational changes of this protein by causing the above-mentioned effect. Studies have shown that (p)ppGpp inhibits replication by interacting with the primase's active site [94, 103].

### 3. The role of the stringent response in the regulation of other physiological processes

Microarray analyses of gene expression in the wild strain *Pectobacterium atrosepticum* (formerly *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*) – a Gram-negative bacterium that is a plant pathogen which causes the rotting and diseases of potatoes [9, 11, 83], and the *relA* deletion mutant during the exponential and early stationary phases of growth have shown that the stringent response is active mainly in conditions of high bacterial density. In the *relA* mutant, during the exponential phase of growth, changes in expression were recorded only in the case of five genes, whereas in samples taken during the stationary phase, the number of genes whose level of transcripts changed increases to over a thousand (358 – reduction and 930 – increase) compared to the control strain. Transcription in the *relA* mutant is increased in the case of many genes, which confirms the fact that the high accumulation of (p)ppGpp, characteristic for the stationary phase of bacterial growth, reduces the level of transcription [11]. Among these transcripts, there are those that encode proteins related to DNA replication and cell division, which proves the significant role of the stringent response in regulating these processes. In addition, the expression of genes encoding functions related to translation and the structure of ribosomes is also significantly increased, which may be classified as an observation typical of the "relaxed" response. Surprisingly, genes whose expression increases the most are related to metabolizing branched-chain amino acids. Additionally, the increased expression of *citW-citG* genes encoding enzymes associated with the catabolism of citrate and the gene encoding the Fis protein, which is a global regulator, [11] was also noted. This regulator causes the transcriptional activation of genes related to translation and transcription, as well as stimulates replication and site-specific recombination [30]. In the case of genes encoding proteins related to cell movement or protein secretion and virulence, a decrease in expression was observed, which indicates

the positive influence of stringent response alarmones on these processes. A decrease was also demonstrated in the expression of almost all genes whose products are associated with iron uptake, e.g. by means of the siderophore known as achromobactin, as well as those associated with metabolizing xylose/xylulose and the anaerobic metabolization of formate and assimilation of hydrogen. The greatest reduction in expression was recorded in the case of genes most likely encoding Zn-dependent alcohol dehydrogenases, as well as the LysE-type exporter of amino acids. This indicates that (p)ppGpp influences the processes of fermentation and export of amino acids [11].

### 3.1. The role of the stringent response in the production of siderophores and antibiotics

The stringent response regulates the production of substances secreted by bacteria, including siderophores, i.e. carriers of iron ions. One of such compounds is pyoverdine, which demonstrates fluorescence and bactericidal properties. In conditions of iron deficiency, its amount is significantly reduced in deletion mutants *relA* and *relA/spoT* *Pseudomonas syringae* – a Gram-negative bacterium that is a pathogen of plants such as bean, soybean or pea, and is elevated in the *spoT* mutant. It seems, therefore, that (p)ppGpp play the role of transmitters controlling the production of pyoverdine in response to an iron deficiency [19]. Similarly in *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, in conditions of an iron deficiency, stringent response alarmones enable the production of pyoverdine and in *relA*, *relA/spoT* and *relA/spoT/fprel* deletion mutants (*rel* – a gene encoding the SAS protein) the level of this siderophore is reduced by between three and ten times [20].

Alarmones demonstrate a significant influence on the metabolism and production of antibiotics in the Gram-positive bacterium *Streptomyces coelicolor* which belongs to the group of *Actinobacteria*, just like the *Streptomyces scabiei* bacterium which causes plant diseases. *Streptomyces* bacteria live in soil and marine sediments as saprophytes, they are immobile, spread by means of spores and, during the transition from the phase of logarithmic growth to the stationary phase, their metabolism is reprogrammed, which results in the production of various secondary metabolites, e.g. antibiotics (they synthesize 70% of all the known ones). In response to the limited access to amino acids or nitrogen, (p)ppGpp nucleotides accumulate towards the end of the exponential phase of growth, as well as during the so-called transitional phase, and are probably responsible for the production of antibiotics, which confirms the inability of the *relA* mutant to produce actinorhodin and other metabolites [17, 46].

### 4. Bacterial cell resistance to stress and the stringent response

The stringent response is not only a form of response to a deficiency in nutritional substances, but it is probably induced by many stress factors that influence bacteria, both on the surface and inside of plants, among which the following may be enumerated: UV radiation [48, 54] or fluctuations in temperature [49] and the content of water [77,107]. Many studies have shown that (p)ppGpp play an extremely important role in numerous processes related to microorganisms adapting to such conditions. This is confirmed for example by the fact that stringent response alarmones control the expression of genes and the activity of proteins encoded by them, involved in regulating the level of  $H_2O_2$  – a compound that plays a significant role in the response of organisms to stress [23, 57, 69].

Many studies on the contribution of the stringent response to bacterial metabolism have been conducted on the Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, which is a pathogen for not only humans, but also for alfalfa, the thale cress and basil; it causes chloroses, damage and maceration of plant tissues [99], as well as root necroses which ultimately leads to the weakening of plants and even their death, and as a consequence, to a reduction in their yielding [38, 110]. In this bacterium, the defence against the oxidative stress caused by the presence of  $H_2O_2$  is the responsibility of, i.a., KatA and KatB catalases, which break down hydrogen peroxide into water and oxygen. In bacteria, the *katA* gene is expressed constitutively and the protein encoded by it is the dominant catalase during the logarithmic phase of growth and, in particular, in the stationary phase, and it plays a role in resistance to  $H_2O_2$  and virulence. The expression of *katB* is induced by the exogenous  $H_2O_2$  [57], as well as by paraquat [89] which induces oxidative stress, by osmotically active substances such as sodium chloride, sucrose, glycerol, mannitol, sorbitol, polyethylene glycol [18] and it influences acquired resistance [57]. In *P. aeruginosa*, the expression of genes related to the defence against oxidative stress is regulated, i.a., by the Las and Rhl global regulators, as well as by RpoS, the  $\sigma$  subunit of RNA polymerase [42, 57, 105, 108], which is confirmed by the fact that in the *rpoS* mutant *P. aeruginosa* catalase activity only amounts to 35% of the activity recorded for cells of the wild type strain [57]. The production of stringent response alarmones is needed for the expression of the gene which encodes the RpoS protein [23, 37]. Therefore, it is not surprising that the *relA/spoT* mutant (deletion) is also characterized by very low activity of the afore-mentioned catalases – it also reaches 35% of activity compared to the wild type. In turn, in the *relA/spoT/rpoS* mutant, the activity of these enzymes decreases even more and only

amounts to 15% of the activity recorded for the wild type strain. This suggests that the stringent response regulates the activity of catalases, both by regulating the expression of the gene which encodes the RpoS protein, as well as by using other mechanisms [57].

Other studies have demonstrated that the *P. aeruginosa relA/spoT* deletion mutant is characterized by a reduced activity of superoxide dismutase and catalase, and that it is also more sensitive to oxidants than bacteria of the wild type, which confirms the importance of the stringent response in the proper functioning of the antioxidant system in bacteria [76]. This is also confirmed by other studies that have shown that planktonic (free-living) cells lacking stringent response enzymes demonstrate lower resistance to  $H_2O_2$  than planktonic cells of the wild type. A similar situation takes place in the case of bacteria that form a biofilm, that is, a certain community of microorganisms growing in an extracellular matrix produced by them, in which bacteria demonstrate an increased resistance to adverse conditions compared to planktonic cells living individually in the environment (biofilm description in Chapter 4.2). Cells lacking stringent response enzymes are characterized by a much higher sensitivity to  $H_2O_2$  than bacteria of the wild type, which were able to function well in the presence of a 150 times higher concentration of this substance than the concentration with which planktonic bacteria were treated. Moreover, in the cells of the *relA/spoT* mutant, an increased level of the endogenous  $H_2O_2$  is recorded, both in those forming a biofilm, as well as in planktonic cells in the stationary phase. Thus, the *relA/spoT* mutant is unable to maintain a low level of hydrogen peroxide and it is more sensitive to the oxidative stress induced by this molecule. This shows that the stringent response plays a key role in the induction of resistance to oxidative stress in *P. aeruginosa* [57].

Chatnaparat *et al.* [19] also noted that the stringent response is required for the tolerance of *P. syringae* bacteria to hydrogen peroxide. Under the treatment of these bacteria with  $H_2O_2$  the survival of *relA*, *spoT* and *relA/spoT* mutants was drastically reduced, the survival rate equalled only a few percent, while it amounted to 72.3% in the wild type [19]. The SpoT enzyme acts as a synthase and a hydrolase of stringent response alarmones. However, its main function, to a large extent, is (p)ppGpp hydrolysis. Therefore, both the low survival rate of *spoT* mutant's cells, as well as its increased sensitivity to oxidative stress may result from the general, originally low survival of these bacteria, resulting from the excessive accumulation of alarmones [114]. Complementation of *relA* and *relA/spoT* mutations by means of *relA* and *relA* plus *spoT*, respectively, gene expression *in trans* partially restored the resistance of the bacteria to  $H_2O_2$ . However, complementation of the

*spoT* mutation resulted in a still higher sensitivity of cells to this compound [19].

The significant role of (p)ppGpp in tolerance of bacterial cells to hydrogen peroxide was also recorded in *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. After being exposed to  $H_2O_2$ , less than 5% cells of the *relA/spoT/fprel* and *relA/spoT* mutants survived, while 29.5% percent survived of the wild type [20]. Considering the fact that plants produce significant amounts of reactive oxygen species while being attacked by pathogens, including hydrogen peroxide [62], the role of the stringent response in the survival of these microorganisms on the surface or inside plant tissues is exceptionally important.

The research results suggest that pathways of the bacteria's response to oxidative stress, which are regulated, i.a., by stringent response alarmones, also regulate the bacteria's resistance to antibiotics. Nguyen *et al.* [76] demonstrated that stringent response inactivation in *P. aeruginosa* causes a drastic decrease in resistance to antibiotics, both for cells in conditions of starvation, as well as for those within a biofilm [76]. The *P. aeruginosa* mutant lacking functional RelA and SpoT proteins is more sensitive to the antibiotic ofloxacin than bacteria of the wild type, which is probably the result of the reduced enzyme activity of the antioxidant system in the mentioned mutant. As a consequence, this causes the accumulation of reactive oxygen species and the death of cells [57]. Chatnaparat *et al.* [19] also noted that the stringent response is required for the tolerance of *P. syringae* to antibiotics. They observed that *relA* and *relA/spoT* mutants demonstrate increased sensitivity to rifampicin.

In conditions of starvation, that is, ones which induce the stringent response, *P. atrosepticum* cells obtain increased resistance to numerous stress factors, such as hydrogen peroxide, heat shock or antibiotics. When cells in the logarithmic phase of growth were subjected to oxidative stress induced by  $H_2O_2$ , a significant decrease in their number within six hours was observed. The number of cells subjected to the stress of starvation (at the beginning of the experiment, this number was the same as the number of cells collected in the logarithmic phase of growth) also decreased after treating them with  $H_2O_2$ , however, the number of these bacteria returned to a relatively high state as soon as after approximately two hours. The cells subjected to the stress of starvation were also characterized by a greater resistance to rifampicin and high temperature. The number of cells collected in the logarithmic phase of growth and exposed to elevated temperature (50°C) dropped to zero and did not increase after 24 hours. In turn, in the case of cells subjected to the stress of starvation, their number also decreased under high temperature, however, after some time, it was observed that their number returned to the original value [83].

The stringent response functioning in conditions of starvation allows bacteria to survive in an environment containing antibiotics, i.a., by stimulating the expression of the *intI1* gene. This gene is located in integrons, elements of the genome containing cassettes of resistance to antibiotics. It encodes the integrase protein responsible for the insertion or excision of the above-mentioned cassettes, which enables their dissemination and thus raises the resistance of bacteria to antibiotics. Originally, it was thought that it was the SOS response [known to be induced by antibiotics and horizontal gene transfer (e.g. transformation and conjugation)], which influences integron expression. However, increased expression of the *intI1* gene in a biofilm, where some of the cells are in starvation conditions, stimulating the production of stringent response alarmones, depends not only on the SOS response, but, as shown by experiments carried out on *E. coli*, also on other factors. After eliminating the influence of the SOS response, higher expression of the *IntI1* encoding gene was still observed in *E. coli* cells in a biofilm. In order to check the regulation of *intI1* expression, mutants lacking global regulators, such as RelA and SpoT or the Lon protease, were constructed. None of the mutants demonstrated any changes in the ability to form a biofilm, but an increase in *intI1* expression, characteristic of cells forming a biofilm, was not noticed in them which points to *intI1* expression being regulated by (p)ppGpp and the Lon protease. Thus, in the absence of (p)ppGpp, an increase in *intI1* expression, and thus, the propagation of cassettes that provide resistance to antibiotics, does not occur [104]. This is another example which proves that the stringent response may increase the adaptation of bacteria to functioning in an environment in which there occur factors that are harmful to them and make it easier for microorganisms to survive on the surface or inside organisms, e.g. plants.

#### 4.1. The participation of the stringent response in quorum sensing regulation

Once they reach a high level of concentration, bacterial cultures modulate their phenotype so as to make it possible for themselves to produce secondary metabolites, enzymes and virulence factors and, therefore, to colonize new niches [93, 113]. Along with an increase in the size of the population, bacterial cells generate molecules known as autoinducers [15] which, produced inside of a cell, are subject to being secreted into the environment. After exceeding the threshold level, autoinducers stimulate the processes leading to a change in the expression of genes that enable the synchronization of bacteria's metabolism. The process of communication between bacteria, in which the bacteria take advantage of the production and detection of autoinducers in order to monitor the density of the population is

called quorum sensing. This phenomenon is important with respect to controlling processes such as biofilm formation, secretion of virulence factors, bioluminescence, production of antibiotics, sporulation, competence and other ones [75].

In the case of Gram-negative Gammaproteobacteria, acyl-HomoSerine Lactones (acyl-HSLs) constitute the main class of autoinducers. They are specific to a given species of bacteria and are only used for the purpose of communication between representatives of the same species [75]. One of the quorum sensing systems is *las* as well as *rhl*, which have been investigated comprehensively in *P. aeruginosa* [75, 78, 80, 81], and *tra* in *Agrobacterium tumefaciens*. The latter regulates the transfer of Ti plasmid between bacterial cells via conjugation [33]. These systems consist of autoinducer synthases, designated with the letter "I" at the end of a protein's name (e.g. LuxI), as well as cytoplasmic receptors of these autoinducers, designated with the "R" symbol (e.g. LuxR) [75].

When the amount of autoinducers exceeds the threshold concentration, in *P. aeruginosa* the LasR and RhlR transcription regulators are activated, which induce the expression of selected genes, e.g. the ones encoding LasI and RhlI proteins, responsible for the production of autoinducers (stimulating the production of autoinducers by way of a feedback loop), and other proteins significant for pathogenicity or involved in biofilm formation. The *las* system consists of LasI – the synthase of the autoinducer N-3-oxododecanoylhomoserine lactone (3-oxo-C12-HSL), which activates the LasR protein that simultaneously serves as the receptor of this autoinducer, as well as the activator of transcription of genes responsible for the synthesis of a series of secretory proteins – those associated with bacterial virulence, such as elastase encoded by the *lasB* gene, protease encoded by the *lasA* gene, alkaline protease (*apr*) and the exotoxin A (*toxA*) [82]. In turn, the *rhl* system consists of the RhlI protein responsible for the synthesis of N-butanoylhomoserine lactone (C4-HSL) and RhlR, which is the receptor of autoinducers and the activator of transcription [75]. This system stimulates the synthesis of rhamnolipids characterized by their biosurfactant properties, which may have an adverse influence on human cells, as well as survival of other bacteria [2, 39, 51, 63, 95, 116], and the activity of the LasA protein, as well as the expression of the *lasB* gene, as in the case of the *las* system [12]. The *rhl* system also promotes the synthesis of pyocyanin, a blue pigment with oxidoreductive properties, which inhibits the growth of other bacteria [12, 50].

Gram-positive bacteria mainly use modified oligopeptides as inducers [52, 100]. In this case, the signal is received by membrane receptors, and the information is transduced by way of phosphorylation [75].



The phenomenon of quorum sensing is vital for the functioning of both symbiotic and pathogenic microorganisms interacting with plants. There exists much evidence that the stringent response is an important element regulating quorum sensing in these and other bacteria. It has been demonstrated that overexpression of the *relA* gene in *P. aeruginosa* causes an increase in the expression of *lasR* and *rhlR* genes, encoding proteins significant for the functioning of quorum sensing [108]. Bowden *et al.* [11] have observed that the *relA/spoT* *P. aeruginosa* mutant accumulates the N-3-oxohexanoylhomoserine lactone (3-oxo-C6-HSL) autoinducer to a much smaller extent [11]. Interestingly, in *P. aeruginosa* cells, as many as 40% of the genes regulated by quorum sensing are also regulated by the RpoS factor [96], whose expression depends on the stringent response [37, 108]. The fact of quorum sensing being regulated by the RpoS factor has also been observed in bacterium *Ralstonia solanacearum*, a plant pathogen [31].

It has been demonstrated that stringent response alarmones also play an important role in relaying the signal related to a change in membrane fluidity, which takes place in response to stress. LPA acyltransferase (LptA) participates in the biosynthesis of phospholipids that are part of cell membranes. It was observed that the *P. aeruginosa* mutant lacking this enzyme was characterized by reduced bacterial membrane fluidity. During the phase of logarithmic growth, the premature production of quorum sensing autoinducers – N-butanoylhomoserine lactone C4-HSL and N-hexanoylhomoserine lactone C6-HSL – was observed in it. In turn, at the beginning of the stationary phase, a reduced production of PQS (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone), a signal molecule whose production is regulated by LasR, was observed. The PQS molecule positively influences the expression of *lasR*, *lasB*, *rhlR*, *rhlI* and *rpoS* and the level of virulence determinants such as rhamnolipids, LecA and pyocyanin, as well as proteins related to iron uptake [8, 26, 70]. In the phase of logarithmic growth, as well as in the stationary phase, the accumulation of anthranilic acid, a PQS precursor, occurred. The increased expression of *rhlI*, *lasI*, *lasB*, as well as a decreased expression of *pqsC* and *pqsA* (genes related to PQS synthesis), as well as the increased expression of *relA* were observed [8]. The increased *relA* expression in the *lptA* mutant in the early phases of bacterial growth suggests that the stringent response promotes the synthesis of autoinducers, which in the case of the mutant were produced already in the logarithmic phase. This assumption is partially confirmed by the fact that in the *relA* mutant which does not produce (p)ppGpp, premature production of C4-HSL and C-6HSL was not observed, similarly as in the double *lptA/relA* mutant. It is assumed that the accumulation of (p)ppGpp as a form of response to stress, which is accompanied

e.g. by changes in the physical condition of the lipid bilayer of the cell membrane, stimulates the production of autoinducers, which, in turn, allows for the formation of biofilm, thus increasing the survival of symbiotic or pathogenic microorganisms on plants, as well as promotes their resistance to antibacterial substances secreted by plants [8].

Another, indirect, piece of evidence that the stringent response and the production of autoinducers are related to each other is the fact that the cells of mutants of the *las* and *rhl* systems growing on basil roots are longer than those of the wild type strain [110], which resembles the phenotype of the cells of *P. syringae* and *E. amylovora* *relA* and *relA/spoT* stringent response mutants [1, 19, 20]. The above information suggests that the accumulation of (p)ppGpp promotes the production of autoinducers, and thus stimulates the *las* and *rhl* systems, as well as prevents cells from investing in growth in conditions of high bacterial density.

The pathogenic *A. tumefaciens* bacterium from the *Rhizobiaceae* family causes crown gall by inserting a fragment of bacterial DNA (T-DNA) located on the Ti plasmid into a plant's genome. When T-DNA, which carries genes responsible for e.g. the synthesis of opines, is introduced into a plant's genome, small organic compounds (opines) are produced in tissues as a result of transformation. Opines indirectly stimulate the expression of the *traR* gene in bacteria which encodes the protein that promotes the expression of genes dependent on quorum sensing, e.g. the ones that are involved in the production of autoinducers (in order to amplify the quorum sensing response), the replication of Ti plasmids, as well as horizontal transfer of the latter via conjugation. Thanks to this, the "spreading" of plasmids which carry virulence genes, including those enabling the transport of T-DNA to host cells, between bacterial cells is possible. This mechanism raises the pathogenicity of the bacterial population to the host, as well as the efficiency of transformation. Thus, the reduction in the efficiency of quorum sensing negatively affects the development of crown gall [64].

Surprisingly, in *A. tumefaciens* bacteria in the stationary phase of growth, the level of N-3-oxooctanoyl homoserine lactone (3-oxo-C8-HSL) decreases, and thus, the intercellular quorum sensing communication also decreases. This results from the fact that in the stationary phase of growth, there increases the level of the BlcC protein (also known as AttM), responsible for the degradation of 3-oxo-C8-HSL. This is correlated with the high level of (p)ppGpp which indirectly stimulates the expression of the gene encoding this protein. This is confirmed e.g. by the fact that in the *relA* mutant, in the stationary phase of growth, the level of BlcC protein does not increase. Until the bacterium enters this phase of growth, the level of the BlcC protein

remains low, because it is negatively regulated by the AttJ factor, produced in a cell during its growth. This is confirmed by the results of constitutive expression of *blcC* in bacteria with a mutation in the *attJ* gene. This constitutive expression is not dependent on the level of the RelA protein, which suggests that (p)ppGpp do not have a direct influence on *blcC* expression, but only take part in overcoming the repression of its expression by AttJ [115].

Stringent response alarmones seem to negatively affect the ability of *A. tumefaciens* bacteria to transfer the Ti plasmid, probably by enabling the expression of the BlcC protein, the enzyme responsible for the degradation of the afore-mentioned autoinducer [115]. However, due to the fact that the metabolites produced by plants at the spots where outgrowths are located can regulate the activity of the BlcC protein in the cells of colonizing bacteria, this activity may depend on the metabolic state of the host [64]. Nevertheless, it seems right that *A. tumefaciens* used for the transformation of plants should be cultured on a medium rich in all essential nutrients. Moreover, for maximum effectiveness, the transformation of plants should be carried out using bacteria in the logarithmic phase of growth.

#### 4.2. The regulation of exopolysaccharide production and biofilm formation dependent on the stringent response

The stringent response, by regulating quorum sensing, indirectly influences the functioning of a biofilm. A biofilm (a biological membrane) is a community of microorganisms that grow attached to a certain surface while remaining submerged and connected to each other in the extracellular matrix produced by them, consisting of extracellularly secreted polymeric substances, the so-called EPS (Extracellular Polymeric Substances) – mainly exopolysaccharides, serving as a scaffolding for carbohydrates, proteins, nucleic acids and lipids, protecting them against the influence of external factors [32, 58].

In a biofilm, microorganisms may function in conditions, in which the survival of individual cells would be difficult and, in many cases, even impossible. They also demonstrate characteristics different from cells living in a free form, thanks to e.g. the expression of specific genes in response to quorum sensing autoinducers, which are produced by bacteria living in a biofilm. On the one hand, a biofilm ensures that microorganisms remain attached to the surface of tissues or objects, thus making it difficult to wash them away with water or blood [86]. On the other hand, within the biofilm, bacteria are protected against desiccation, the host's immune system, antibacterial substances, or being digested by protozoans or leukocytes [88]. Within this

structure, there prevail conditions of limited oxygen and nutrient accessibility, therefore, cells are characterized by a slow rate of metabolism and growth. As a result, the bacteria are less susceptible to antibiotics, which are known to target dividing cells [86].

A biofilm demonstrates the spatial and temporal distribution of subpopulations involved in processes such as sporulation and matrix formation. There, some bacterial cells constitute reservoirs of pathogens, which may be reactivated in favourable environmental conditions, the so-called persister cells [56]. A biofilm, by reducing the mobility of bacteria and increasing their density on a specific surface, facilitates the exchange of plasmids by way of conjugation, and may also contribute to the spreading of resistance to antibiotics [45, 86].

Apart from the afore-mentioned indirect role of the stringent response in regulating the metabolism of biofilm-forming bacteria by stimulating quorum sensing, the accumulation of (p)ppGpp also seems to affect the formation of this structure directly, by regulating the synthesis of exopolysaccharides. Ruffing and Chen [92] noted that in the Gram-negative bacterium *Agrobacterium* sp. ATCC 31749, the stringent response is essential for the biosynthesis of a curdlan, a glucose polymer. It is suspected that this exopolysaccharide performs a protective function in microorganisms, but its participation in any important process has not been confirmed thus far. This compound is used in the construction and food industries. This is likely a compound that is important for the functioning of these bacteria because its synthesis takes place in response to a deficiency in nitrogen, similarly to other sugar polymers important for the structure of a biofilm. Furthermore, like with other exopolysaccharides, its highest concentration is observed in the stationary phase of growth. Analysis of the transcriptome of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 in conditions of a nitrogen deficiency – in the stationary phase of growth, showed that gene expression of the operon of curdlan production, *crdASC*, increased by 100 times compared to the logarithmic phase of growth of these bacteria. During the production of curdlan, there also increases the expression of the gene encoding the RelA and SpoT homologue (*rsh*). In similar conditions, the *rsh* mutant (insertion knock-out) demonstrates a 57 times lower expression of the *crdS* gene encoding the catalytic subunit of the  $\beta$ -1,3-glucan synthase involved in the production of curdlan compared to the wild type strain, as well as a total lack of curdlan accumulation [92]. In turn, a mutant lacking the RpoN RNA polymerase subunit, a regulator of transcription in conditions of a nitrogen deficiency e.g. in *E. coli* [65], produces approximately 30% more curdlan than bacteria of the wild type. This may indicate that the production of curdlan does not depend on RpoN, and, moreover, that the lack of a functional RpoN polypep-

tide enables a faster and/or more stable binding of  $\sigma$  factors other than RpoN (the production and functioning of which very often requires the presence of stringent response alarmones [23]) to the core of the RNA polymerase, which allows for a more intensive production of curdlan [92]. The lower expression of the *crdS* gene in the *rsh* mutant and the lack of curdlan production confirm that the stringent response plays an important role in the production of this polymer, which is most likely involved in the formation of a biofilm.

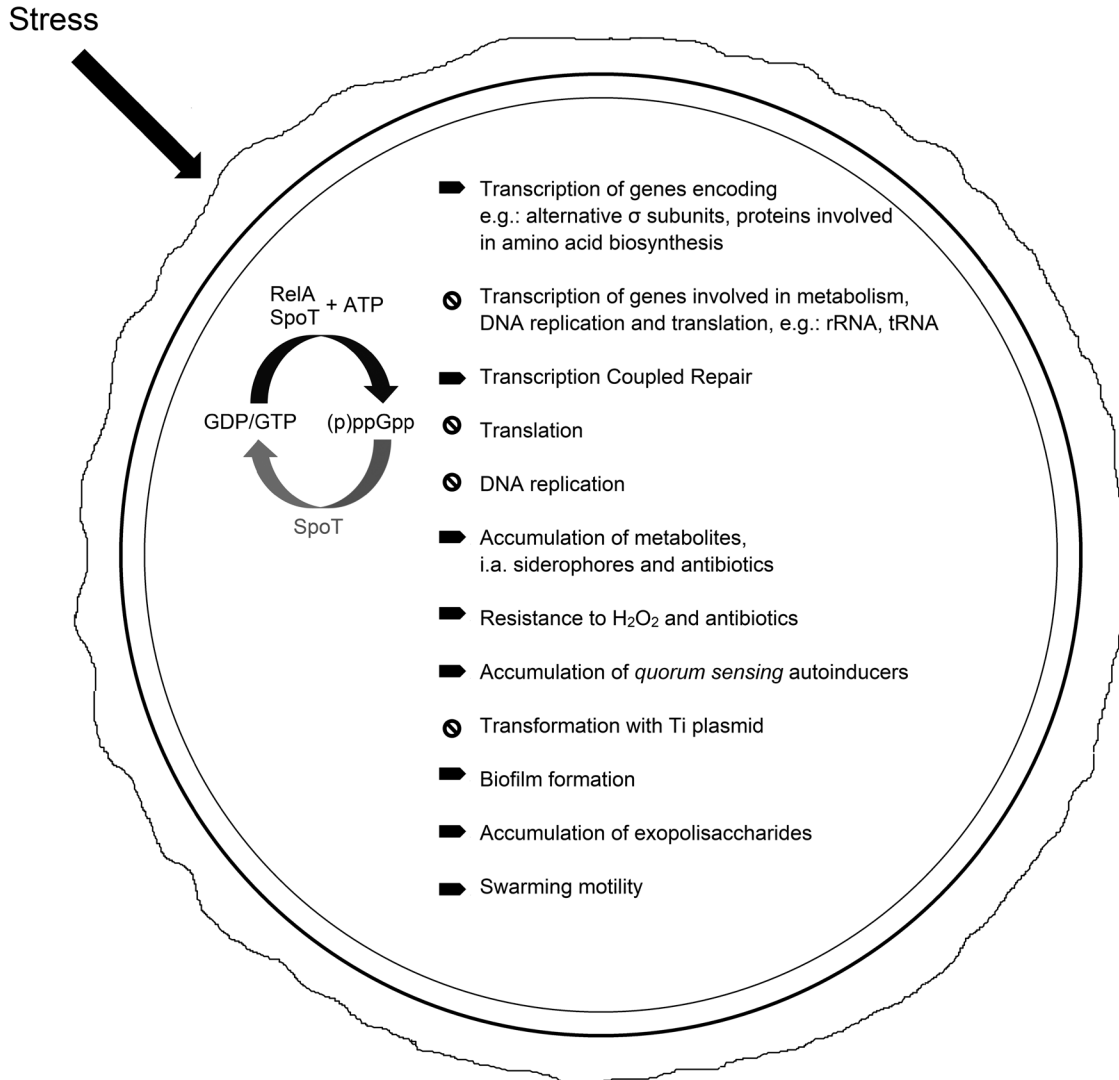
The stringent response has an impact not only on the expression of a gene essential for the synthesis of curdlan but also impedes the activity of an indirect inhibitor of this polymer's synthesis, namely the Ppx polyphosphatase which decomposes polyphosphate in cells. Due to the fact that the biosynthesis of curdlan is a process which requires much energy, polyphosphate may serve as its source. The accumulation of polyphosphate in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 increases in stress conditions and in the stationary phase of growth, which is correlated with the high level of (p)ppGpp and curdlan. Stringent response alarmones, by inhibiting the activity of polyphosphatase, maintain a high level of polyphosphate, thus allowing for the synthesis of curdlan, which explains its high level in the stationary phase of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 growth. The described research results confirm the involvement of stringent response alarmones in the synthesis of exopolysaccharides and the regulation of the metabolism of microorganisms in conditions of a deficiency in nutritional substances [92]. Therefore, it seems that the use of bactericides may be effective when cells are in the logarithmic phase of growth, characterized by the low intensity in the production of (p)ppGpp, and, consequently, the low level of exopolysaccharides, important for the formation of a stable biofilm structure.

Examples of research on the function of the stringent response in biofilm formation include experiments carried out on the Gram-positive pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes* which causes the occurrence of listeriosis in humans, manifested by ailments of the digestive system (vomiting, diarrhoea and high fever). The bacterium *L. monocytogenes* is capable of adhering to and forming biofilm on various surfaces, on food or on plants. It has been demonstrated that the attachment of *L. monocytogenes* cells to a hydrophobic surface – polystyrene, correlates with the heightened level of expression of the *relA* gene. The *L. monocytogenes* mutant with an insertion in this gene is characterized by a lesser ability to adhere to the afore-mentioned surface and limited growth after attaching to the surface. Furthermore, the mutant is avirulent to mice, although the haemolytic activity and the composition of proteins secreted by the bacterium remain unchanged. The result of the experiment provides evidence of the

important role of guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate in the development of a biofilm by *L. monocytogenes* and the pathogenicity of the bacterium [106]. It may be suspected that in other Gram-positive bacteria, e.g. from the *Clavibacter* genus, which cause plant diseases [72], the stringent response also plays an important role in adapting to the adverse conditions prevailing on the organisms being attacked. The formation of biofilm is one of such adaptations. Therefore, directing the production of bactericides at elements of bacterial stringent response seems to be of great importance for agricultural production.

#### 4.3. The role of the stringent response in the regulation of bacterial swarming motility

Swarming motility is the synchronized movement of bacteria equipped with flagella and located in a population characterized by high density that allows the established “bacterial raft” to move about in the environment. This constitutes an alternative to biofilm in which bacteria demonstrate reduced mobility [55]. In most bacteria, this motility requires the presence of a biosurfactant, which reduces surface tension and allows for the rapid expansion of colonies. In populations of bacteria that perform swarming motility, increased resistance to numerous antibiotics has been observed, which results not only from the fact that they were in an environment characterized by high bacterial density, but also from their ability to “escape” from a place with a high concentration of antibacterial substances [14]. The presence of guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate seems to be necessary for the bacteria to be able to perform swarming motility. *P. syringae* mutants lacking stringent response enzymes do not demonstrate swarming motility, which is probably due to the lack of RelA- and SpoT-dependent expression of the gene encoding the SalA protein, which positively regulates SyfA and SyfR, proteins involved in the production of syringafactin, a biosurfactant important for the performance of swarming motility. The overexpression of the *salA* gene in *relA*, *spoT* and *relA/spoT* mutants results in a partial restoration of the ability to perform this motility. However, in bacteria of the wild type with *salA* overexpression, reduced swarming motility is observed, which is characterized by a different morphology. According to researchers, this is most likely due to the fact that regulating the SalA protein is not the only way in which the stringent response regulates swarming motility [19]. The *P. syringae* pv. *tomato* DC 3000 *relA/spoT/fprel* mutant also does not have the ability to perform swarming motility, while *relA* and *relA/spoT* mutants demonstrate a reduced ability to perform this process. The complementation of mutations



**Fig. 2. The stringent response and its involvement in the response of bacteria to stress.**

Description included in the summary. Pentagon – a positive influence of (p)ppGpp on a given process, prohibition sign – a negative influence of (p)ppGpp on a given process.

with the *relA* or *fprel* genes in the *relA/spot/fprel* mutant partially restores swarming motility, while, surprisingly, the complementation of *relA/spot* mutations by means of expressing the *relA* or *spoT* genes *in trans* results in the presence of a more reduced swarming motility [20].

## 5. Summary

The stringent response is the reaction of bacteria to stress, and its effectors are guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate, synthesized by the RelA, SpoT and RSH enzymes. The RelA enzyme is activated in response to a deficiency in amino acids, which is manifested by the presence of deacylated tRNA in a cell. The SpoT enzyme is a bifunctional protein – it is a synthase and hydrolase of stringent response alarmones (Fig. 2). Alarmones regulate transcription and the

accompanying DNA repair, translation and DNA replication. These nucleotides play an extremely important role in regulating physiological processes and adapting bacteria to unfavourable environmental conditions. This may be evidenced by their impact not only on the expression of many genes, but also on the production of secondary metabolites. Stringent response alarmones are involved in the regulation of cell growth, the production of antibiotics and siderophores, the induction of bacteria's resistance to  $H_2O_2$  and antibiotics, the synthesis of quorum sensing (i.e. a form of communication and detecting the density of the population by bacteria) autoinducers, as well as the biosynthesis of compounds that seem to be important for the formation of a biofilm, that is, a bacterial community immersed in the extracellular matrix, which demonstrates increased resistance to stress conditions, or in the regulation of the bacteria's swarming motility (Fig. 2).

### Acknowledgments

We would like to thank the Reviewers for their substantive input, as well as any other suggestions that made improving the present work possible.

The research experiments conducted by the authors, which results were an inspiration to write the present paper, are financed from the funds of the National Science Centre in Poland (grant Miniatura 1, 2017/01/X/NZ1/01981; Justyna Boniecka) and the Ministry of Science and Higher Education in Poland [the statutory fund of the Faculty of Biology and Environmental Protection of the Nicolaus Copernicus University in Toruń (Justyna Boniecka, Grażyna B. Dąbrowska), as well as the 1189-B research grant (Justyna Boniecka)].

The article was translated by EURO-ALPHABET from Polish into English under agreement 659 / P-DUN / 2018 and funded by the Ministry of Science and Higher Education.

### References

- Ancona V., Lee J.H., Chatnaparat T., Oh J., Hong J-I., Zhao Y.: The bacterial alarmone (p)ppGpp activates the type III secretion system in *Erwinia amylovora*. *J. Bacteriol.* **197**, 1433–1443 (2015)
- Aranda F.J., Espuny M.J., Marques A., Teruel J.A., Manresa Á., Ortiz A.: Thermodynamics of the interaction of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* with phospholipid membranes. *Langmuir*, **23**, 2700–2705 (2007)
- Atkinson G.C., Tenson T., Hauryliuk V.: The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PLoS One*, **6**, e23479 (2011)
- Autret S., Levine A., Vannier F., Fujita Y., Séror S.J.: The replication checkpoint control in *Bacillus subtilis*: identification of a novel RTP-binding sequence essential for the replication fork arrest after induction of the stringent response. *Mol. Microbiol.* **31**, 1665–1679 (1999)
- Barker M.M., Gaal T., Josaitis C.A., Gourse R.L.: Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation *in vivo* and *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **305**, 673–688 (2001)
- Bartlett M.S., Gourse R.L.: Growth rate-dependent control of the *rrnB P1* core promoter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**, 5560–5564 (1994)
- Battesti A., Bouveret E.: Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol. Microbiol.* **62**, 1048–1063 (2006)
- Baysse C., Cullinane M., Déneraud V., Burrowes E., Dow J.M., Morrissey J.P., Tam L., Trevors J.T., O’Gara F.: Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. *Microbiology*, **151**, 2529–2542 (2005)
- Bell K.S., Toth I.K. *et al.*: Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 11105–11110 (2004)
- Bergman J.M., Hammarlöf D.L., Hughes D.: Reducing ppGpp level rescues an extreme growth defect caused by mutant EF-Tu. *PLoS One*, **9**, e90486 (2014)
- Bowden S.D., Eyres A., Chung J.C.S., Monson R.E., Thompson A., Salmond G.P.C., Spring D.R., Welch M.: Virulence in *Pectobacterium atrosepticum* is regulated by a coincidence circuit involving quorum sensing and the stress alarmone, (p)ppGpp. *Mol. Microbiol.* **90**, 457–471 (2013)
- Brint J.M., Ohman D.E.: Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J. Bacteriol.* **177**, 7155–7163 (1995)
- Browning D.F., Busby S.J.W.: Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 638–650 (2016)
- Butler M.T., Wang Q., Harshey R.M.: Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 3776–3781 (2010)
- Cámara M., Williams P., Hardman A.: Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 667–676 (2002)
- Cashel M., Gallant J.: Two compounds implicated in function of RC gene of *Escherichia coli*. *Nature*, **221**, 838–841 (1969)
- Chakraborty R., Bibb M.: The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J. Bacteriol.* **179**, 5854–5861 (1997)
- Chakravarty D., Banerjee M., Waghmare N., Ballal A.: Cyanobacterial Mn-catalase ‘KatB’: molecular link between salinity and oxidative stress resistance. *Commun. Integr. Biol.* **9**, e1216738 (2016)
- Chatnaparat T., Li Z., Korban S.S., Zhao Y.: The bacterial alarmone (p)ppGpp is required for virulence and controls cell size and survival of *Pseudomonas syringae* on plants. *Environ. Microbiol.* **17**, 4253–4270 (2015)
- Chatnaparat T., Li Z., Korban S.S., Zhao Y.: The stringent response mediated by (p)ppGpp is required for virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and its survival on tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* **28**, 776–789 (2015)
- Choudhury P., Flower A.M.: Efficient assembly of ribosomes is inhibited by deletion of *bipA* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **197**, 1819–1827 (2015)
- Dalebroux Z.D., Svensson S.L., Gaynor E.C., Swanson M.S.: ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 171–199 (2010)
- Dąbrowska G., Prusińska J., Goc A.: The stringent response – bacterial mechanism of an adaptive stress response. *Post. Bioch.* **52**, 87–93 (2006)
- DeLivron M.A., Robinson V.L.: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium BipA exhibits two distinct ribosome binding modes. *J. Bacteriol.* **190**, 5944–5952 (2008)
- DeNapoli J., Techranchi A.K., Wang J.D.: Dose-dependent reduction of replication elongation rate by (p)ppGpp in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **88**, 93–104 (2013)
- Diggle S.P., Winzer K., Chhabra S.R., Worrall K.E., Cámara M., Williams P.: The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol. Microbiol.* **50**, 29–43 (2003)
- English B.P., Hauryliuk V., Sanamrad A., Tankov S., Dekker N.H., Elf J.: Single-molecule investigations of the stringent response machinery in living bacterial cells. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 365–373 (2011)
- Feng B., Gao N. *et al.*: Structural and functional insights into the mode of action of a universally conserved Obg GTPase. *PLoS Biol.* **12**, e1001866 (2014)
- Flårdh K., Axberg T., Albertson N.H., Kjelleberg S.: Stringent control during carbon starvation of marine *Vibrio* sp. strain S14: molecular cloning, nucleotide sequence, and deletion of the *relA* gene. *J. Bacteriol.* **176**, 5949–5957 (1994)
- Flåtten I., Skarstad K.: The Fis protein has a stimulating role in initiation of replication in *Escherichia coli in vivo*. *PLoS One*, **8**, e83562 (2013)

31. Flavier A.B., Schell M.A., Denny T.P.: An RpoS ( $\sigma^S$ ) homologue regulates acylhomoserine lactone-dependent autoinduction in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol.* **28**, 475–486 (1998)
32. Flemming H.-C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S.: Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 563–575 (2016)
33. Fuqua W.C., Winans S.C.: A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J. Bacteriol.* **176**, 2796–2806 (1994)
34. Gaal T., Bartlett M.S., Ross W., Turnbrough C.L.Jr., Gourse R.L.: Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria. *Science*, **278**, 2092–2097 (1997)
35. Gaca A.O., Colomer-Winter C., Lemos J.A.: Many means to a common end: the intricacies of (p)ppGpp metabolism and its control of bacterial homeostasis. *J. Bacteriol.* **197**, 1146–1156 (2015)
36. Gallant J., Palmer L., Pao C.C.: Anomalous synthesis of ppGpp in growing cells. *Cell*, **11**, 181–185 (1977)
37. Gentry D.R., Hernandez V.J., Nguyen L.H., Jensen D.B., Cashel M.: Synthesis of the stationary-phase sigma factor  $\sigma^S$  is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.* **175**, 7982–7989 (1993)
38. Goldberg J.B.: *Pseudomonas*: global bacteria. *Trends Microbiol.* **8**, 55–57 (2000)
39. Haba E., Pinazo A., Jauregui O., Espuny M.J., Infante M.R., Manresa A.: Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol. Bioeng.* **81**, 316–322 (2003)
40. Hamel E., Cashel M.: Role of guanine nucleotides in protein synthesis. Elongation factor G and guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**, 3250–3254 (1973)
41. Haseltine W.A., Block R.: Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**, 1564–1568 (1973)
42. Hassett D.J., Iglewski B.H. *et al.*: Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol. Microbiol.* **34**, 1082–1093 (1999)
43. Haugen S.P., Berkmen M.B., Ross W., Gaal T., Ward C., Gourse R.L.: rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of  $\sigma$  region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase. *Cell*, **125**, 1069–1082 (2006)
44. Hauryliuk V., Atkinson G.C., Murakami K.S., Tenson T., Gerdes K.: Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 298–309 (2015)
45. Hausner M., Wuertz S.: High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3710–3713 (1999)
46. Hesketh A., Sun J., Bibb M.: Induction of ppGpp synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown under conditions of nutritional sufficiency elicits actII-ORF4 transcription and actinorhodin biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **39**, 136–144 (2001)
47. Hogg T., Mechold U., Malke H., Cashel M., Hilgenfeld R.: Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response. *Cell*, **117**, 57–68 (2004)
48. Huang L., McCluskey M.P., Ni H., LaRossa R.A.: Global gene expression profiles of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 in response to irradiation with UV-B and white light. *J. Bacteriol.* **184**, 6845–6858 (2002)
49. Itikawa H., Fujita H., Wada M.: High temperature induction of a stringent response in the *dnaK* (Ts) and *dnaJ* (Ts) mutants of *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **99**, 1719–1724 (1986)
50. Jayaseelan S., Ramaswamy D., Dharmaraj S.: Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J. Microb. Biot.* **30**, 1159–1168 (2014)
51. Jensen P.Ø., Høiby N. *et al.*: Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing – controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **153**, 1329–1338 (2007)
52. Ji G., Beavis R.C., Novick R.P.: Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 12055–12059 (1995)
53. Kalia D., Merey G., Nakayama S., Zheng Y., Zhou J., Luo Y., Guo M., Roembke B.T., Sintim H.O.: Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 305–341 (2013)
54. Kamarthapu V., Epshtein V., Benjamin B., Poroshkin S., Mironov A., Cashel M., Nudler E.: ppGpp couples transcription to DNA repair in *E. coli*. *Science*, **352**, 993–996 (2016)
55. Kearns D.B.: A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 634–644 (2010)
56. Keren I., Shah D., Spoering A., Kaldalu N., Lewis K.: Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 8172–8180 (2004)
57. Khakimova M., Ahlgren H.G., Harrison J.J., English A.M., Nguyen D.: The stringent response controls catalases in *Pseudomonas aeruginosa* and is required for hydrogen peroxide and antibiotic tolerance. *J. Bacteriol.* **195**, 2011–2020 (2013)
58. Kołwzan B.: Analysis of biofilms – their formation and functioning. *Ochr. Śr.* **33**, 3–14 (2011)
59. Krasny L., Gourse R.L.: An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription. *EMBO J.* **23**, 4473–4483 (2004)
60. Kriel A., Bittner A.N., Kim S.H., Liu K., Tehranchi A.K., Zou W.Y., Rendon S., Chen R., Tu B.P., Wang J.D.: Direct regulation of GTP homeostasis by (p)ppGpp: a critical component of viability and stress resistance. *Mol. Cell*, **48**, 231–241 (2012)
61. Kumar V., Chen Y., Ero R., Ahmed T., Tan J., Li Z., See Weng Wong A., Bhushan S., Gao Y.-G.: Structure of BipA in GTP form bound to the ratcheted ribosome. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **112**, 10944–10949 (2015)
62. Kuźniak E., Urbanek H.: The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. *Acta Physiol. Plant.* **22**, 195–203 (2000)
63. Laabei M., Jamieson W.D., Lewis S.E., Diggle S.P., Jenkins A.T.A.: A new assay for rhamnolipid detection – important virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 7199–7209 (2014)
64. Lang J., Faure D.: Functions and regulation of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Front. Plant Sci.* DOI:10.3389/fpls.2014.00014 (2014)
65. Leigh J.A., Dodsworth J.A.: Nitrogen regulation in bacteria and archaea. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 349–377 (2007)
66. Levine A., Vannier F., Dehbi M., Henckes G., Séror S.J.: The stringent response blocks DNA replication outside the ori region in *Bacillus subtilis* and at the origin in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **219**, 605–613 (1991)
67. Loveland A.B., Bah E., Madireddy R., Zhang Y., Brilot A.F., Grigorieff N., Korostelev A.A.: Ribosome•RelA structures reveal the mechanism of stringent response activation. *Elife*, **5**, e17029 (2016)
68. Maciąg-Dorszyńska M., Szalewska-Pałasz A., Węgrzyn G.: Different effects of ppGpp on *Escherichia coli* DNA replication *in vivo* and *in vitro*. *FEBS Open Bio.* **3**, 161–164 (2013)
69. Martins D., McKay G., Sampathkumar G., Khakimova M., English A.M., Nguyen D.: Superoxide dismutase activity confers (p)ppGpp mediated antibiotic tolerance to stationary-phase *Pseudomonas aeruginosa*. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **115**, 9797–9802 (2018)

70. McKnight S.L., Iglewski B.H., Pesci E.C.: The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**, 2702–2708 (2000)
71. Mechold U., Potrykus K., Murphy H., Murakami K.S., Cashel M.: Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **41**, 6175–6189 (2013)
72. Metzler M.C., Laine M.J., De Boer S.H.: The status of molecular biological research on the plant pathogenic genus *Clavibacter*. *FEMS Microbiol. Lett.* **150**, 1–8 (1997)
73. Molodtsov V., Sineva E., Zhang L., Huang X., Cashel M., Ades S.E., Murakami K.S.: Allosteric effector ppGpp potentiates the inhibition of transcript initiation by DksA. *Mol. Cell.* **69**, 1–12 (2018)
74. Murakami K.S.: X-ray crystal structure of *Escherichia coli* RNA polymerase  $\sigma^{70}$ . *J. Biol. Chem.* **288**, 9126–9134 (2013)
75. Ng W-L., Bassler B.L.: Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 197–222 (2009)
76. Nguyen D., Singh P.K. *et al.*: Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*, **334**, 982–986 (2011)
77. Okada Y., Makino S., Tobe T., Okada N., Yamazaki S.: Cloning of *rel* from *Listeria monocytogenes* as an osmotolerance involvement gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1541–1547 (2002)
78. Passador L., Cook J.M., Gambello M.J., Rust L., Iglewski B.H.: Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science*, **260**, 1127–1130 (1993)
79. Paul B.J., Berkmen M.B., Gourse R.L.: DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 7823–7828 (2005)
80. Pearson J.P., Gray K.M., Passador L., Tucker K.D., Eberhard A., Iglewski B.H., Greenberg E.P.: Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 197–201 (1994)
81. Pearson J.P., Passador L., Iglewski B.H., Greenberg E.P.: A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 1490–1494 (1995)
82. Pearson J.P., Pesci E.C., Iglewski B.H.: Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* **179**, 5756–5767 (1997)
83. Petrova O., Gorshkov V., Daminova A., Ageeva M., Moleleki L.N., Gogolev Y.: Stress response in *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 under starvation conditions: adaptive reactions at a low population density. *Res. Microbiol.* **165**, 119–127 (2014)
84. Pingoud A., Block W.: The elongation factor Tu•guanosine tetraphosphate complex. *Eur. J. Biochem.* **116**, 631–634 (1981)
85. Potrykus K., Cashel M.: (p)ppGpp: still magical? *Annu. Rev. Microbiol.* **62**, 35–51 (2008)
86. Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., Sintim H.O.: Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem.* **7**, 493–512 (2015)
87. Raskin D.M., Judson N., Mekalanos J.J.: Regulation of the stringent response is the essential function of the conserved bacterial G protein CgtA in *Vibrio cholerae*. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 4636–4641 (2007)
88. Rasmussen T.B., Givskov M.: Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**, 149–161 (2006)
89. Rocha E.R., Smith C.J.: Regulation of *Bacteroides fragilis katB* mRNA by oxidative stress and carbon limitation. *J. Bacteriol.* **179**, 7033–7039 (1997)
90. Ross W., Sanchez-Vazquez P., Chen A.Y., Lee J-H., Burgos H.L., Gourse R.L.: 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 (2016)
91. Ross W., Vrentas C.E., Sanchez-Vazquez P., Gaal T., Gourse R.L.: The magic spot: a ppGpp binding site on *E. coli* RNA polymerase responsible for regulation of transcription initiation. *Mol. Cell.* **50**, 420–429 (2013)
92. Ruffing A.M., Chen R.R.: Transcriptome profiling of a curd-lan-producing *Agrobacterium* reveals conserved regulatory mechanisms of exopolysaccharide biosynthesis. *Microb. Cell Fact.* DOI:10.1186/1475-2859-11-17 (2012)
93. Rumbaugh K.P., Griswold J.A., Hamood A.N.: The role of quorum sensing in the *in vivo* virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect.* **2**, 1721–1731 (2000)
94. Rymer R.U., Solorio F.A., Techranchi A., Chu C., Corn J.E., Keck J.L., Wang J.D., Berger J.M.: Nucleotide-bound structures of the DnaG catalytic core reveal how metal•NTP substrates are bound during primer synthesis and blocked by stringent response alarmones. *Structure*, **20**, 1478–1489 (2012)
95. Sánchez M., Aranda F.J., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa Á., Ortiz A.: Permeabilization of biological and artificial membranes by a bacterial dirhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Colloid Interf. Sci.* **341**, 240–247 (2010)
96. Schuster M., Hawkins A.C., Harwood C.S., Greenberg E.P.: The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol. Microbiol.* **51**, 973–985 (2004)
97. Seyfzadeh M., Keener J., Nomura M.: *spoT*-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 11004–11008 (1993)
98. Shyp V., Tankov S., Ermakov A., Kudrin P., English B.P., Ehrenberg M., Tenson T., Elf J., Haurlyuk V.: Positive allosteric feedback regulation of the stringent response enzyme RelA by its product. *EMBO Rep.* **13**, 835–839 (2012)
99. Silo-Suh L., Suh S-J., Sokol P.A., Ohman D.E.: A simple alfalfa seedling infection model for *Pseudomonas aeruginosa* strains associated with cystic fibrosis shows AlgT (sigma-22) and RhlR contribute to pathogenesis. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 15699–15704 (2002)
100. Solomon J.M., Lazazzera B.A., Grossman A.D.: Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* **10**, 2014–2024 (1996)
101. Sonenshein A.L.: CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 203–207 (2005)
102. Srivatsan A., Wang J.D.: Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 100–105 (2008)
103. Steinchen W., Bange G.: The magic dance of the alarmones (p)ppGpp. *Mol. Microbiol.* **101**, 531–544 (2016)
104. Strugeon E., Tilloy V., Ploy M-C., Da Re S.: The stringent response promotes antibiotic resistance dissemination by regulating integron integrase expression in biofilms. *MBio.* **7**, e00868-16 (2016)
105. Suh S-J., Silo-Suh L., Woods D.E., Hassett D.J., West S.E.H., Ohman D.E.: Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181**, 3890–3897 (1999)
106. Taylor C.M., Beresford M., Epton H.A.S., Sigeo D.C., Shama G., Andrew P.W., Roberts I.S.: *Listeria monocytogenes relA* and *hpt* mutants are impaired in surface-attached growth and virulence. *J. Bacteriol.* **184**, 621–628 (2002)
107. Trigui H., Dudyk P., Oh J., Hong J-I., Faucher S.P.: A regulatory feedback loop between RpoS and SpoT supports the survival of *Legionella pneumophila* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 918–928 (2015)
108. Van Delden C., Comte R., Bally M.: Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent

- gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**, 5376–5384 (2001)
109. Vinella D., Albrecht C., Cashel M., D'Ari R.: Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **56**, 958–970 (2005)
110. Walker T.S., Bais H.P., Déziel E., Schweizer H.P., Rahme L.G., Fall R., Vivanco J.M.: *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiol.* **134**, 320–331 (2004)
111. Wang J.D., Sanders G.M., Grossman A.D.: Nutritional control of elongation of DNA replication by (p)ppGpp. *Cell*, **128**, 865–875 (2007)
112. Wendrich T.M., Blaha G., Wilson D.N., Marahiel M.A., Nierhaus K.H.: Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Mol. Cell*, **10**, 779–788 (2002)
113. Winzer K., Williams P.: Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**, 131–143 (2001)
114. Zhang H-B., Wang C., Zhang L-H.: The quorum degradation system of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by starvation signal and stress alarmone (p)ppGpp. *Mol. Microbiol.* **52**, 1389–1401 (2004)
115. Zulianello L., Canard C., Köhler T., Caille D., Lacroix J-S., Meda P.: Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **74**, 3134–3147 (2006)
116. Zuo Y., Wang Y., Steitz T.A.: The mechanism of *E. coli* RNA polymerase regulation by ppGpp is suggested by the structure of their complex. *Mol. Cell*, **50**, 430–436 (2013)



## ODPOWIEDŹ ŚCISŁA I JEJ ZAANGAŻOWANIE W REAKCJE KOMÓREK BAKTERYJNYCH NA STRESY

Julia Berdychowska, Justyna Boniecka\*, Grażyna B. Dąbrowska

Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wpłynęło we wrześniu 2018 r., zaakceptowano w kwietniu 2019 r.

**Streszczenie:** Odpowiedź ścisła jest reakcją bakterii na niekorzystne warunki środowiska. Jej efektorami są alarmony, czterofosforan i pięciofosforan guanozyny [(p)ppGpp], syntetyzowane przez enzymy RelA, SpoT oraz ich homologi (RSH). Enzym RelA, będący syntazą (p)ppGpp, jest aktywowany w odpowiedzi na niedobór aminokwasów, natomiast enzym SpoT, posiadający zdolność syntezy i hydrolizy (p)ppGpp, w odpowiedzi na niedobór kwasów tłuszczowych, żelaza oraz węgla. Akumulacja (p)ppGpp powoduje zahamowanie translacji, replikacji oraz obniżenie transkrypcji wielu genów, np. rRNA, tRNA, kodujących białka rybosomalne, a podwyższenie tych których białka są istotne w odpowiedzi bakterii na stres. Alarmony odpowiedzi ścisłej zapewniają bakteriom oporność na stres oksydacyjny i antybiotyki. Regulują również produkcję specyficznych cząsteczek, tzw. autoinduktorów quorum sensing, pomagających bakteriom we wzajemnej komunikacji odnośnie gęstości ich własnej populacji, co umożliwia im dostosowanie metabolizmu do panujących warunków, formowanie biofilmu – swego rodzaju społeczności mikroorganizmów zapewniającej sobie odpowiednie warunki do przetrwania w niesprzyjającym środowisku, oraz zasiedlanie nowych nisz. (p)ppGpp wpływają pozytywnie na formowanie biofilmu nie tylko poprzez regulację quorum sensing ale i poprzez stymulację syntezy potencjalnych elementów biofilmu. Wydaje się, że alarmony odpowiedzi ścisłej obniżają zdolność bakterii *Agrobacterium tumefaciens* do transformacji gospodarzy roślinnych, a tym samym ich zdolności chorobotwórcze. (p)ppGpp odpowiadają również za ruch mrowiący bakterii, który zwiększa ich oporność na niekorzystne czynniki środowiska.

1. Wprowadzenie. 2. Białka RelA, SpoT i RSH – enzymy metabolizmu alarmonów odpowiedzi ścisłej. 2.1. Regulacja transkrypcji przez alarmony odpowiedzi ścisłej u bakterii Gram-ujemnych. 2.2. Regulacja transkrypcji przez (p)ppGpp u bakterii Gram-dodatnich. 2.3. Wpływ alarmonów odpowiedzi ścisłej na translację i replikację. 3. Rola odpowiedzi ścisłej w regulacji innych procesów fizjologicznych bakterii. 3.1. Rola odpowiedzi ścisłej w produkcji sideroforów i antybiotyków. 4. Oporność komórek bakteryjnych na stres a odpowiedź ścisła. 4.1. Udział odpowiedzi ścisłej w regulacji quorum sensing. 4.2. Regulacja produkcji egzopolisacharydów i tworzenia biofilmu zależne od odpowiedzi ścisłej. 4.3. Rola odpowiedzi ścisłej w regulacji ruchu mrowiącego bakterii. 5. Podsumowanie

### THE STRINGENT RESPONSE AND ITS INVOLVEMENT IN THE REACTIONS OF BACTERIAL CELLS TO STRESS

**Abstract:** The stringent response is a form of bacterial response to adverse environmental conditions. Its effectors are guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate [(p)ppGpp], which are synthesized by RelA, SpoT and their homologs (RSH). RelA, a (p)ppGpp synthase, is activated when there is a shortage of amino acids, whereas SpoT, which has the ability to synthesize and hydrolyze (p)ppGpp, responds to fatty acids, iron and carbon limits. Accumulation of (p)ppGpp causes an inhibition of translation, replication, a decrease in the transcription of many genes, e.g. rRNA, tRNA, encoding ribosomal proteins, and an increase in the transcription of genes whose proteins are important in bacterial stress response. The stringent response alarmones are crucial for bacterial resistance to oxidative stress and antibiotics. They also regulate the production of specific molecules, the so-called quorum sensing autoinducers, which help bacteria communicate the density of their own population, which enables them to adjust their metabolism to the prevailing conditions, to form a biofilm – a community of microorganisms attached to a certain surface, ensuring them appropriate conditions to survive in an unfavourable environment, and to colonize new niches. (p)ppGpp has a positive impact on biofilm formation not only via the regulation of quorum sensing, but also by stimulating the synthesis of potential elements of the biofilm. It also appears that the stringent response alarmones decrease the ability of *Agrobacterium tumefaciens* bacteria to transform plants and thus their potential to cause disease. (p)ppGpp enables the bacteria to perform swarming motility, a movement that increases their resistance to adverse environmental factors.

1. Introduction. 2. RelA, SpoT and RSH proteins – enzymes that metabolize the alarmones of the stringent response. 2.1. The regulation of transcription via stringent response alarmones in Gram-negative bacteria. 2.2. The regulation of transcription via (p)ppGpp in Gram-positive bacteria. 2.3. The influence of stringent response alarmones on translation and replication. 3. The role of the stringent response in the regulation of other physiological processes. 3.1. The role of the stringent response in the production of siderophores and antibiotics. 4. Bacterial cell resistance to stress and the stringent response. 4.1. The participation of the stringent response in quorum sensing regulation. 4.2 The regulation of exopolysaccharide production and biofilm formation dependent on the stringent response. 4.3. The role of the stringent response in the regulation of bacterial swarming motility. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** biofilm, odpowiedź ścisła, (p)ppGpp, quorum sensing, RelA/SpoT

**Key words:** biofilm, stringent response, (p)ppGpp, quorum sensing, RelA/SpoT

\* Autor korespondencyjny: Justyna Boniecka, Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń; tel. nr: +48 (56) 611 45 76; e-mail: jboniecka@umk.pl

## 1. Wprowadzenie

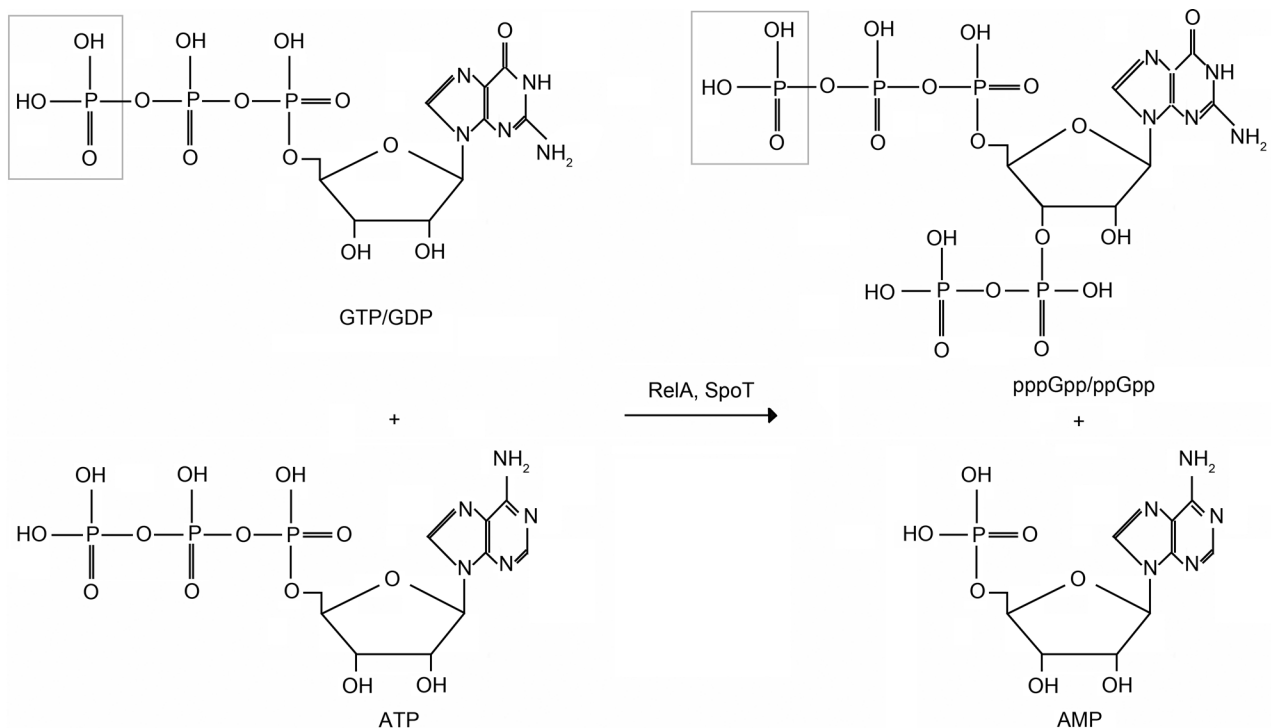
Organizmy żywe w drodze ewolucji wykształciły mechanizmy umożliwiające im przeżycie w niekorzystnych warunkach. Adaptacja komórek bakteryjnych do nietypowych dla wzrostu warunków i przetrwanie w nowym, zmienionym środowisku jest wynikiem reakcji komórek na stres. W warunkach stresu, w celu ochrony komórki dochodzi do zmiany w metabolizmie. Jednym z mechanizmów adaptacyjnych jest odpowiedź ścisła, zaobserwowana po raz pierwszy u *Escherichia coli* [16] i definiowana jako odpowiedź fizjologiczna bakterii na niedobór aminokwasów, kwasów tłuszczowych, innych składników odżywczych bądź innego rodzaju stres, np. zmiany temperatury [7, 27, 29, 36, 41, 85, 97, 109]. Alarmonami odpowiedzi ścisłej, określanymi wspólnie jako (p)ppGpp, są cztero- i pięciofosforan guanozyny, odpowiednio ppGpp i pppGpp, które m.in. poprzez bezpośrednie oddziaływanie z polimerazą RNA wpływają na zmiany w ekspresji genów oraz replikacji DNA. Celem pracy jest podsumowanie aktualnego stanu wiedzy na temat bakteryjnej odpowiedzi ścisłej istotnej ze względu na jej zaangażowanie w reakcje mikroorganizmów na działanie czynników stresowych, ze szczególnym uwzględnieniem tego mechanizmu u bakterii wchodzących w interakcje z roślinami. Aktywacja odpowiedzi ścisłej u bakterii daje szansę na zasiedlanie nowych nisz i jest niejako gwarantem przetrwania nawet w warunkach ekstremalnych.

## 2. Białka RelA, SpoT i RSH – enzymy metabolizmu alarmonów odpowiedzi ścisłej

Głównymi efektorami odpowiedzi ścisłej u bakterii są (p)ppGpp. Cząsteczki te, często określane jako alarmony odpowiedzi ścisłej, są syntetyzowane przez enzymy RelA i SpoT (u Beta- i Gammaproteobakterii; Ryc. 1) oraz ich homologi zwane RSH (RelA/SpoT Homologs; u pozostałych bakterii).

Alarmony wpływają na metabolizm komórki bakteryjnej m.in. poprzez obniżenie transkrypcji genów kodujących rRNA, tRNA, białka rybosomalne i podwyższenie ekspresji tych kodujących białka biorące udział w syntezie aminokwasów oraz genów zaangażowanych w odpowiedź na stres [22, 44, 85, 103]. Poziom (p)ppGpp w komórkach reguluje także proces translacji i naprawy DNA. Działanie odpowiedzi ścisłej zaobserwowane zarówno u bakterii Gram-ujemnych jak i Gram-dodatnich a jej efektem fizjologicznym jest również zahamowanie replikacji DNA [4, 23, 25, 66] co jest przyczyną spowolnienia podziałów i wzrostu komórek [10, 23].

Enzym RelA jest białkiem związanym z rybosomem, które poprzez bezpośrednie monitorowanie wydajności translacyjnej komórki „wyczuwa” niedobór aminokwasów. Podczas prawidłowego wzrostu komórki aminokwasy w formie aminoacylo-tRNA są dostarczane do miejsca A rybosomu i dodawane do powstającego polipeptydu. W warunkach głodu aminokwasowego,



Ryc. 1. Synteza (p)ppGpp u *E. coli*

ppGpp i pppGpp są syntetyzowane odpowiednio z GDP i GTP oraz z ATP przez enzymy RelA i SpoT, w odpowiedzi na niedobór składników odżywczych. W wyniku tych reakcji powstaje również AMP. Grupy fosforanowe zaznaczone szarą ramką są obecne tylko w przypadku GTP i pppGpp.

w komórce bakteryjnej akumulowane są deacylowane formy tRNA, które blokują rybosom w miejscu A, a wówczas do niego przyłącza się białko RelA i syntezuje (p)ppGpp [41, 44], co zmniejsza powinowactwo enzymu do rybosomu. RelA, który może przemieszczać się od jednego rybosomu do drugiego monitoruje aktywność translacyjną komórki [112]. Inny model zakłada, że RelA przeprowadza kilka rund syntezy (p)ppGpp już po odłączeniu się od rybosomu, co wskazywałoby na posiadanie przez to białko „molekularnej pamięci” [27]. Kolejne badania pokazały jednak, że RelA może łączyć się z rybosomem nawet podczas nieobecności tRNA, a obecność deacylowanego tRNA stabilizuje ten kompleks i umożliwia syntezę (p)ppGpp [67]. Co ciekawe, sama cząsteczka ppGpp może wpływać pozytywnie na aktywność RelA, a tym samym na zasadzie pętli zwrotnej stymulować produkcję alarmonów odpowiedzi ścisłej [98]. Pomimo różnych modeli funkcjonowania białka RelA niezmiennym jest fakt, że jest to główny enzym odpowiedzialny za syntezę (p)ppGpp u *E. coli* w warunkach niedoboru aminokwasów. Funkcjonowanie odpowiedzi ścisłej nie zawęża się do regulacji metabolizmu komórek bakteryjnych tylko w tej sytuacji, ale ma miejsce również w przypadku reakcji na inne czynniki stresowe, takie jak niedobór kwasów tłuszczowych, żelaza czy źródła węgla oraz szok cieplny. Wówczas to, SpoT jest enzymem, który pełni funkcję syntetazy (p)ppGpp [27, 29 97, 109]. Białko to, w przeciwieństwie do RelA, wykazuje również aktywność hydrolazy alarmonów odpowiedzi ścisłej, w sytuacji kiedy warunki środowiska ulegają poprawie [47, 53, 114]. Enzym SpoT odpowiada zatem za utrzymanie równowagi w poziomie alarmonów, a jego dysfunkcja przy jednoczesnej obecności funkcjonalnego enzymu RelA skutkuje śmiercią komórek. Wynika to z tego, że u mutantów pozbawionych białka SpoT dochodzi do produkcji alarmonów przy jednoczesnym braku możliwości ich hydrolizy [114]. W warunkach kiedy komórki mają nieograniczony dostęp do substancji odżywczych GTP-aza CgtA/Obg, biorąca udział m.in. w składaniu rybosomów, wchodzi w interakcje z białkiem SpoT, co powoduje najprawdopodobniej zwiększenie jego aktywności hydrolitycznej, a tym samym obniżenie poziomu (p)ppGpp [87]. Kolejnym białkiem, które reguluje aktywność SpoT jest Acyl Carrier Protein (ACP), które także wchodzi w interakcje z tym enzymem. W przypadku, kiedy komórka dysponuje wystarczającą ilością składników odżywczych, ACP promuje aktywność hydrolityczną enzymu, natomiast w warunkach stresu niedoboru kwasów tłuszczowych, aktywność syntetazy [7].

U bakterii, które nie posiadają RelA i SpoT istnieją enzymy, oznaczane jako RSH [wcześniej Rel, określane jako te przynależące do tzw. długich RSH (podobnie jak RelA i SpoT)], które są odpowiedzialne za syntezę

(p)ppGpp zarówno w warunkach głodu aminokwasowego jak i w odpowiedzi na inne stresy. Enzymy te posiadają jednocześnie domenę odpowiedzialną za hydrolizę alarmonów odpowiedzi ścisłej. Oprócz enzymów RelA, SpoT i RSH u wybranych bakterii odkryto też małe syntetazy alarmonów SAS (Small Alarmone Synthetases), oznaczane również jako Rel, które posiadają tylko domenę odpowiedzialną za syntezę (p)ppGpp (czasami określane również jako krótkie RSH) [3, 103].

## 2.1. Regulacja transkrypcji przez alarmony odpowiedzi ścisłej u bakterii Gram-ujemnych

Inicjacja transkrypcji u bakterii polega na wiązaniu się rdzenia polimerazy RNA (RNAP) połączonego z czynnikiem  $\sigma$  (tworzących razem holoenzym RNAP) do sekwencji  $-35$  i  $-10$  promotora. Rdzeń RNAP zbudowany jest z pięciu podjednostek:  $\alpha$ I,  $\alpha$ II – wiążących białka regulatorowe,  $\beta$  – przyłączającej substraty reakcji,  $\beta'$  – wiążącej DNA (obie podjednostki  $\beta$  wchodzi w skład centrum aktywnego enzymu) i  $\omega$  [13, 74]. Transkrypcja z większości promotorów *E. coli* (np. promotorów rRNA) prowadzona jest przez polimerazę RNA zawierającą czynnik  $\sigma^A$  ( $\sigma$ 70, RpoD). Natomiast alternatywne czynniki sigma wykorzystywane są do transkrypcji niektórych genów kodujących białka umożliwiające przetrwanie w niekorzystnych warunkach środowiska [13]. Rozsuniecie nici DNA na odcinku kilkunastu nukleotydów (czyli powstanie kompleksu otwartego) umożliwia rozpoczęcie transkrypcji poprzez syntezę krótkich, tzw. abortywnych RNA, a następnie przejście w kompleks elongacyjny, który opuszcza rejon promotora [13].

U *E. coli* transkrypcja genów kodujących rRNA regulowana jest głównie na poziomie inicjacji transkrypcji, na którą wpływ mają m.in. białka wiążące się z rejonami promotorowymi DNA – aktywatory i represory, oraz poziom nukleotydu inicjującego [6, 13, 34]. Wynika to z tego, że stabilność kompleksu polimerazy RNA z sekwencją promotorową danego genu jest niezwykle wrażliwa na ilość tego nukleotydu. Kiedy poziom nukleotydu inicjującego wzrasta, dochodzi do stabilizacji kompleksu polimerazy z promotorem co sprzyja inicjacji transkrypcji [34]. Jednakże w związku z tym, że u *E. coli* nukleotydem inicjującym jest ATP a nie GTP, akumulacja (p)ppGpp, która doprowadza do zużycia GTP, nie wpływa raczej na stężenie nukleotydu inicjującego, jak ma to miejsce w przypadku bakterii Gram-dodatniej *B. subtilis*, dla której GTP jest nukleotydem inicjującym transkrypcję rRNA [13].

Alarmony odpowiedzi ścisłej regulują transkrypcję u *E. coli* wiążąc się bezpośrednio z polimerazą RNA. Eksperymenty wykazały, że polimeraza RNA posiada dwa miejsca wiązania (p)ppGpp. Jedno z nich znajduje się około  $30 \text{ \AA}$  od miejsca aktywnego enzymu,

w zagłębieniu otoczonym podjednostkami  $\alpha$ ,  $\beta'$  oraz  $\omega$ . Alarmony oddziałują tam z domeną DPBB (Double Psi  $\beta$ -Barrel) podjednostki  $\beta'$  i z końcem N podjednostki  $\omega$ . Fragmenty podjednostek  $\beta$ ,  $\beta'$  oraz podjednostki  $\alpha$  i fragmenty podjednostek  $\beta$ ,  $\beta'$  oraz  $\omega$  stanowią dwa mobilne moduły RNAP nazywane odpowiednio core i shelf, które razem tworzą tzw. klamrę. W szczelinie jej zacisku znajduje się centrum katalityczne RNAP. Wiązanie się alarmonów we wcześniej wspomnianym miejscu obniża dynamikę klamry RNAP, co zapobiega zamykaniu komory centrum aktywnego, mającym miejsce wówczas kiedy nukleotydy przyłącza się do nici matrycowej DNA, podczas syntezy nowo powstającego RNA. To z kolei może spowalniać dodawanie nukleotydów i destabilizować kompleks inicjujący transkrypcję [44, 71, 91, 117]. Drugie z miejsc wiązania (p)ppGpp, oddalone o 60 Å od pierwszego, jest tworzone przez podjednostkę  $\beta'$  i czynnik transkrypcyjny DksA łączący się z RNAP, niedaleko ujścia kanału drugorzędowego polimerazy RNA [73, 79, 90].

W zależności od właściwości kinetycznych promotora, ekspresja genów jest obniżona bądź podwyższona w wyniku interakcji RNAP z (p)ppGpp. Ponieważ obecność (p)ppGpp powoduje destabilizację kompleksu RNAP-promotor, wpływa to znacząco na obniżenie transkrypcji genów posiadających promotory, które pozwalają na formowanie kompleksu o krótkim czasie funkcjonowania. Sekwencje promotorowe genów kodujących rRNA posiadają w obszarze  $-10 +1$  (tzw. dyskryminator) sekwencję bogatą w pary GC wchodzącą w interakcję z podjednostką  $\sigma$  RNAP. Powoduje to formowanie ekstremalnie niestabilnych otwartych kompleksów z polimerazą RNA [5, 43], których destabilizację zwiększa dodatkowo przyłączanie się (p)ppGpp. Natomiast promotory genów kodujących białka odpowiedzialne za syntezę aminokwasów mają w tym miejscu sekwencję bogatą w pary AT, co zwiększa stabilność oddziaływań polimeraza RNA-DNA i obniża wrażliwość na destabilizację powodowaną działaniem alarmonów [5, 102].

Inną formą regulacji transkrypcji przez (p)ppGpp jest pośrednia aktywacja genów odpowiedzi na stres poprzez stymulację dysocjacji podjednostki  $\sigma^{70}$  z holoenzymu RNAP. W komórce znajduje się wówczas więcej wolnych cząstek rdzenia RNAP, do których mogą przyłączyć się alternatywne czynniki sigma, jak np.  $\sigma^S$  ( $\sigma^{38}$ , RpoS),  $\sigma^H$  ( $\sigma^{32}$ , RpoH),  $\sigma^N$  ( $\sigma^{54}$ , RpoN) i  $\sigma^E$  ( $\sigma^{24}$ , RpoE) [85, 102].

Alarmony odpowiedzi ścisłej ułatwiają także naprawę błędów powstających podczas transkrypcji DNA, biorąc udział w tzw. naprawie TCR (Transcription Coupled Repair). Mutanty pozbawione enzymów odpowiedzi ścisłej są mniej odporne na czynniki mutagenne, charakteryzują się wolniejszym usuwaniem dimerów cyklobutano-pyrimidynowych indukowanych

światłem UV [54]. Wynika to z tego, że nie produkują (p)ppGpp, które jak wykazano podczas elongacji transkrypcji powodują rozluźnienie klamry polimerazy RNA znajdującej się na DNA, co umożliwia, przy współpracy z białkiem UvrD, „cofanie się” polimerazy na transkrybowanej nici DNA, a tym samym naprawę błędów [54].

## 2.2. Regulacja transkrypcji przez (p)ppGpp u bakterii Gram-dodatnich

Bakterie Gram-dodatnie należące do typu *Firmicutes* nie posiadają homologów czynnika transkrypcyjnego DksA oraz sekwencji dyskryminatorów bogatych w GC, a (p)ppGpp nie wchodzi w bezpośrednie interakcje z polimerazą RNA. Alarmony mają u tych bakterii istotne znaczenie w procesie transkrypcji, m.in. rRNA, regulując stężenie nukleotydu inicjującego ten proces, którym w głównej mierze jest GTP [35, 59]. Wzrost zawartości (p)ppGpp powoduje spadek poziomu tego nukleotydu, co nie wynika tylko z faktu, że jest on zużywany do produkcji (p)ppGpp, ale również z wpływu (p)ppGpp na szlaki syntezy GTP. Wykazano, że u *Bacillus subtilis* (p)ppGpp hamują aktywność enzymów Gmk oraz HprT, które biorą udział w produkcji GTP [60].

Zakłada się, że cztero- oraz pięcioletfosforan guanozyny regulują metabolizm u bakterii Gram-dodatnich m.in. poprzez czynnik transkrypcyjny CodY, który jest negatywnym regulatorem ekspresji ponad stu genów kodujących białka zaangażowane w sporulację, adaptację do niekorzystnych warunków środowiska czy wirulencję w fazie wzrostu ekspotencjalnego bakterii, charakteryzującej się wysokim poziomem GTP. W fazie stacjonarnej wzrostu, enzym RelA obniżając poziom GTP na cele produkcji alarmonów odpowiedzi ścisłej, a te obniżając aktywność Gmk i HprT, a tym samym jeszcze bardziej poziom GTP w komórce, ogranicza represję transkrypcji powodowanej przez CodY [44, 60, 101].

## 2.3. Wpływ alarmonów odpowiedzi ścisłej na translację i replikację

Alarmony odpowiedzi ścisłej regulują nie tylko transkrypcję ale powodują też spadek wydajności translacji, m.in. poprzez represję transkrypcji maszynierii związanej z syntezą białek, w tym tRNA, rRNA, a także genów kodujących białka rybosomalne [44, 53]. Co więcej, obniżają wydajność translacji wchodząc w interakcje z trifosforatazami guanozyny zaangażowanymi w składanie rybosomalnych dużych (50S) i małych (30S) podjednostek w kompleks 70S (np. BipA, Obg).

Białko BipA bierze udział w regulacji m.in. ruchu mrowiącego, wirulencji, symbiozy czy formowania biofilmu. W połączeniu z GTP, białko to jest w stanie łączyć się z bakteryjnym rybosomem 70S w miejscu

tożsamym z miejscem interakcji z z Ef-G, Ef-Tu i Ef4. W wyniku tej interakcji BipA może regulować przebieg procesu translacji, w szczególności białek zaangażowanych w odpowiedź bakterii na stres. O zaangażowaniu białka BipA w biogenezę podjednostek rybosomalnych i/lub składanie kompleksu 70S świadczy fakt, że mutant *bipA E. coli*, podczas wzrostu w temperaturze 20°C, charakteryzuje się odmiennym poziomem zawartości podjednostek 30S i 50S w porównaniu do szczepu dzikiego. Co więcej, odnotowano wyższy stosunek zawartości podjednostki 30S do podjednostki 50S oraz obu podjednostek do kompleksu 70S. Sugeruje to, że BipA jest najprawdopodobniej zaangażowany w biogenezę podjednostki 50S. Zaproponowano również, że białko to pełni istotną rolę w składaniu rybosomów, prawdopodobnie na drodze regulacji translacji specyficznych mRNA, których białka są zaangażowane w ten proces [21, 61]. W przypadku gdy w komórce dochodzi do akumulacji alarmonów (np. w warunkach głodu aminokwasowego) nukleotydy te wchodzi w interakcje z białkiem BipA i powodują takie jego zmiany konformacyjne, że nie wiąże się ono do rybosomu 70S ale do podjednostki 30S, co jednocześnie uniemożliwia powstanie kompleksu 70S [24,103].

Białka Obg są enzymami istotnymi dla wzrostu komórek, zaangażowanymi w replikację DNA, biogenezę rybosomów i adaptację do stresu. Białko ObgE jest odpowiedzialne głównie za prawidłowe złożenie podjednostki 50S. Co więcej, ObgE łącząc się z tą podjednostką zapobiega formowaniu się kompleksu 70S, a tym samym inicjacji translacji. Z kolei alarmony odpowiedzi ścisłej, wchodząc w interakcje z ObgE, zwiększają powinowactwo tego enzymu do niedojrzałej podjednostki 50S, co powoduje opóźnienie w jej poprawnym złożeniu oraz utrudnia tworzenie kompleksu 70S [28].

Alarmony odpowiedzi ścisłej mogą także utrudniać formowanie kompleksu inicjującego wchodząc w interakcje z czynnikiem inicjacji translacji If2. W tym samym miejscu czynnika If2 wiąże się GTP lub (p)ppGpp, jednak negatywny ładunek difosforanu w pozycji 3' (p)ppGpp „wystaje” poza białko If2 i potencjalnie zaburza jego funkcję [102]. Ponadto wykazano, że (p)ppGpp w warunkach *in vitro* mogą powodować inhibicję czynników elongacji translacji Ef-G [40] i Ef-Tu [84, 102, 103].

Replikacja DNA jest procesem niezbędnym do podwojenia materiału genetycznego i podziału komórki, do której zapoczątkowania konieczne są tzw. primery (startery). U bakterii to prymaza DnaG jest enzymem, który syntetyzuje te krótkie odcinki RNA. Wykazano, że u *B. subtilis* bezpośrednie przyłączenie się (p)ppGpp do tego enzymu powoduje inhibicję replikacji DNA w fazie elongacji [111], a u *E. coli* raczej tylko w fazie inicjacji [68]. Alarmony łączą się z prymazą DnaG podobnie jak standardowe nukleotydy, jednakże z powodu dodatko-

wych grup fosforanowych powodują zmiany konformacyjne tego białka wywołując wspomniany efekt. Badania wykazały, że (p)ppGpp hamują replikację wchodząc w interakcje z miejscem aktywnym prymazy [94, 103].

### 3. Rola odpowiedzi ścisłej w regulacji innych procesów fizjologicznych bakterii

Analizy mikromacierzowe ekspresji genów u szczepu dzikiego *Pectobacterium atrosepticum* (wcześniej *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*) – Gram-ujemnej bakterii będącej patogenem roślin powodującej gnicie i choroby ziemniaków [9, 11, 83], oraz u mutantu delecyjnego *relA* podczas eksponencjalnej i wczesnej stacjonarnej fazy wzrostu wykazały, że odpowiedź ścisła funkcjonuje głównie w warunkach dużego zagęszczenia bakterii. U mutantu *relA* podczas eksponencjalnej fazy wzrostu zmiany w ekspresji odnotowano tylko w przypadku pięciu genów. Natomiast w próbkach pobranych w fazie stacjonarnej liczba genów, których poziom transkryptów uległ zmianie, wzrasta do ponad tysiąca (358 – obniżenie i 930 – podwyższenie) w porównaniu do szczepu kontrolnego. Transkrypcja w większości przypadków u mutantu *relA* jest podwyższona, co potwierdza, że wysoka akumulacja (p)ppGpp, charakterystyczna dla fazy stacjonarnej wzrostu bakterii, obniża poziom transkrypcji [11]. Wśród tych transkryptów znajdują się takie, które kodują białka związane z replikacją DNA oraz z podziałem komórki, co dowodzi znaczącej roli odpowiedzi ścisłej w regulacji tych procesów. Dodatkowo, ekspresja genów kodujących funkcje związane z translacją i strukturą rybosomów także jest znacznie podwyższona, co można sklasyfikować jako obserwację typową dla „odpowiedzi rozluźnionej”. Co zaskakujące, geny, których ekspresja wzrasta najsilniej są związane z metabolizmem aminokwasów rozgałęzionych. Zauważono także podwyższoną ekspresję genów *citW-citG* kodujących enzymy związane z katabolizmem cytrynianu oraz genu kodującego białko Fis będące globalnym regulatorem [11]. Regulator ten powoduje aktywację transkrypcyjną genów związanych z translacją i transkrypcją a także stymuluje replikację i rekombinację miejscowo-specyficzną [30]. W przypadku genów kodujących białka związane z ruchem komórki lub wydzielaniem białek oraz wirulencją stwierdzono obniżenie ekspresji, co wskazuje na pozytywny wpływ alarmonów odpowiedzi ścisłej na te procesy. Wykazano także spadek ekspresji prawie wszystkich genów, których produkty związane są z pobieraniem żelaza, m.in. poprzez siderofor achromobacynę, a także związanych z metabolizmem ksylozy/ksylulozy, metabolizmem beztlenowym mrówczanu i asymilacją wodoru. Największe obniżenie ekspresji zauważono w przypadku genów kodujących najpraw-

dopodobniej dehydrogenazy alkoholowe zależne od Zn a także eksportera aminokwasów typu LysE. Wskazuje to, że (p)ppGpp wpływają na procesy fermentacji oraz eksport aminokwasów [11].

### 3.1. Rola odpowiedzi ścisłej w produkcji sideroforów i antybiotyków

Odpowiedź ścisła reguluje produkcję wydzielanych przez bakterie substancji, w tym sideroforów, czyli nośników jonów żelaza. Jednym z takich związków jest piowerdyna, która wykazuje fluorescencję oraz właściwości bakteriobójcze. W warunkach niskiego poziomu żelaza jej ilość jest w znacznym stopniu obniżona u mutantów delecyjnych *relA* i *relA/spoT* *Pseudomonas syringae* – Gram-ujemnej bakterii będącej patogenem roślin, takich jak fasola, soja czy groszek, a podwyższona u mutantu *spoT*. Wydaje się zatem, że (p)ppGpp pełnią rolę przekaźników kontrolujących produkcję piowerdyny w odpowiedzi na niedobór żelaza [19]. Podobnie u *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 w warunkach niedoboru żelaza alarmony odpowiedzi ścisłej umożliwiają produkcję piowerdyny, a u mutantów delecyjnych *relA*, *relA/spoT* oraz *relA/spoT/fprel* (*rel* – gen kodujący białko SAS) poziom tego sideroforu jest trzy- do dziesięciokrotnie zredukowany [20].

Alarmony wykazują istotny wpływ na metabolizm oraz produkcję antybiotyków u bakterii Gram-dodatniej *Streptomyces coelicolor* należącej do grupy *Actinobacteria*, tak samo jak powodująca choroby roślin bakteria *Streptomyces scabiei*. Bakterie *Streptomyces* żyją w glebach i osadach morskich jako saprofity, są nieruchliwe, rozprzestrzeniają się przez spory i podczas przejścia z fazy wzrostu logarytmicznego do fazy stacjonarnej dochodzi u nich do przeprogramowania metabolizmu, wynikiem czego jest produkcja różnych metabolitów wtórnych, m.in. antybiotyków (syntetyzują 70% znanych). W odpowiedzi na ograniczony dostęp do aminokwasów lub azotu, nukleotydy (p)ppGpp akumulują się pod koniec eksponencjalnej fazy wzrostu oraz podczas tak zwanej fazy przejściowej i są prawdopodobnie odpowiedzialne za produkcję antybiotyków, co potwierdza niezdolność mutantu *relA* do produkcji aktynorodyny i innych metabolitów [17, 46].

### 4. Oporność komórek bakteryjnych na stres a odpowiedź ścisła

Odpowiedź ścisła nie jest tylko formą odpowiedzi na niedobór substancji odżywczych, ale prawdopodobnie jest indukowana wieloma czynnikami stresowymi jakie oddziałują na bakterie zarówno na powierzchni jak i wewnątrz roślin, wśród których można wymienić: pro-

mieniowanie UV [48, 54] czy fluktuacje temperatury [49] i zawartości wody [77, 107]. Wiele badań pokazało, że (p)ppGpp odgrywają niezwykle istotną rolę w licznych procesach związanych z przystosowaniem mikroorganizmów do takich warunków. Potwierdza to m.in. fakt, że alarmony odpowiedzi ścisłej kontrolują ekspresję genów i aktywność białek przez nie kodowanych, zaangażowanych w regulację poziomu  $H_2O_2$  – związku odgrywającego znaczną rolę w odpowiedzi organizmów na stres [23, 57, 69].

Wiele badań nad udziałem odpowiedzi ścisłej w metabolizmie bakterii przeprowadzono na Gram-ujemnej bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, patogenie nie tylko człowieka ale i m.in. lucerny, rzodkiewnika, bazylii, powodującej u roślin chlorozy, uszkodzenia tkanek i ich macerację [99], a także nekrozy korzeniowe, prowadzące ostatecznie do osłabienia roślin, a nawet ich śmierci, a w konsekwencji do obniżenia plonowania [38, 110]. U bakterii tej za obronę przed stresem oksydacyjnym spowodowanym obecnością  $H_2O_2$  są odpowiedzialne m.in. katalazy *KatA* i *KatB*, które rozkładają nadtlenek wodoru do wody i tlenu. U bakterii gen *katA* jest ekspresjonowany konstytutywnie i kodowane przez nie białko jest dominującą katalazą podczas fazy wzrostu logarytmicznego i w szczególności w fazie stacjonarnej oraz odgrywa rolę w oporności na  $H_2O_2$  i w wirulencji. Natomiast ekspresja *katB* jest indukowana przez egzogenne  $H_2O_2$  [57], a także indukujący stres oksydacyjny parakwat [89], substancje osmotycznie czynne, takie jak chlorek sodu, sacharoza, glicerol, mannitol, sorbitol, glikol polietylenowy [18] i wpływa na oporność nabytą [57]. U *P. aeruginosa* ekspresja genów związanych z obroną przed stresem oksydacyjnym jest regulowana m.in. przez globalne regulatory *Las* i *Rhl*, a także podjednostkę  $\sigma$  polimerazy *RpoS* [42, 57, 105, 108], co potwierdza fakt, że u mutantu *rpoS* *P. aeruginosa* aktywność katalaz wynosi tylko 35% aktywności w porównaniu do tej odnotowanej dla komórek typu dzikiego [57]. Do ekspresji genu kodującego białko *RpoS* potrzebna jest produkcja alarmonów odpowiedzi ścisłej [23, 37]. Dlatego też, nie jest zaskakującym fakt, że również mutant *relA/spoT* (delecyjny) charakteryzuje się bardzo niską aktywnością wspomnianych katalaz – także osiąga ona poziom 35% aktywności typu dzikiego. Z kolei u mutantu *relA/spoT/rpoS* aktywność tych enzymów spada jeszcze bardziej i wynosi tylko 15% aktywności odnotowanej dla szczepu dzikiego. Sugeruje to, że odpowiedź ścisła reguluje aktywność katalaz zarówno poprzez regulację ekspresji genu kodującego białko *RpoS*, jak i inne mechanizmy [57].

Inne badania wykazały, że mutant *P. aeruginosa* *relA/spoT* (również delecyjny) charakteryzuje się obniżoną aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy oraz jest bardziej wrażliwy na oksydanty niż bakterie szczepu dzikiego, co potwierdza istotność odpowie-

dzi ścisłej w prawidłowym funkcjonowaniu systemu antyoksydacyjnego u bakterii [76]. Potwierdzają to również inne badania, które pozwoliły zaobserwować, że komórki planktoniczne (wolno żyjące) pozbawione enzymów odpowiedzi ścisłej wykazują mniejszą oporność na  $H_2O_2$  niż komórki planktoniczne typu dzikiego. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku bakterii tworzących biofilm, czyli swego rodzaju społeczność mikroorganizmów rosnących w produkowanej przez siebie macierzy zewnątrzkomórkowej, w której to bakterie wykazują podwyższoną oporność w porównaniu do komórek planktonowych, występujących w środowisku pojedynczo (opis biofilmu w rozdziale 4.2). Komórki pozbawione enzymów odpowiedzi ścisłej charakteryzują się znacznie wyższą wrażliwością na  $H_2O_2$  niż bakterie typu dzikiego, które były w stanie dobrze funkcjonować w obecności 150-razy większego stężenia tej substancji niż stężenie, którym potraktowano bakterie planktoniczne. Co więcej, w komórkach mutantu *relA/spoT* odnotowuje się podwyższony poziom endogenego  $H_2O_2$ , zarówno w tych tworzących biofilm, jak i w komórkach planktonowych znajdujących się w fazie stacjonarnej. Zatem mutant *relA/spoT* nie jest w stanie utrzymywać niskiego poziomu nadtlenu wodoru i jest bardziej wrażliwy na stres oksydacyjny zaindukowany tą cząsteczką. Pokazuje to, że odpowiedź ścisła odgrywa kluczową rolę w indukcji oporności na stres oksydacyjny u bakterii *P. aeruginosa* [57].

Chatneparat i wsp. [19] również zauważyli, że odpowiedź ścisła jest wymagana dla tolerancji bakterii *P. syringae* na nadtlenek wodoru. Pod wpływem ekspozycji tych bakterii na  $H_2O_2$  przeżycie mutantów *relA*, *spoT* i *relA/spoT* było drastycznie obniżone, wskaźnik przeżywalności wynosił tylko kilka procent, podczas gdy u szczepu dzikiego 72,3% [19]. Enzym SpoT pełni rolę syntazy oraz hydrolazy alarmonów odpowiedzi ścisłej. Jednakże w dużej mierze jego główną funkcją jest hydroliza (p)ppGpp. Dlatego zarówno niska przeżywalność komórek tego mutantu oraz jego podwyższona wrażliwość na stres oksydacyjny mogą wynikać z generalnej, pierwotnie niskiej przeżywalności tych bakterii, wynikającej z nadmiernej akumulacji alarmonów [114]. Komplementacja mutacji *relA* i *relA/spoT* poprzez ekspresję genów, odpowiednio *relA* i *relA* oraz *spoT*, *in trans* częściowo przywróciła oporność bakterii na działanie  $H_2O_2$ . Jednakże komplementacja mutacji *spoT* skutkowałą wciąż wyższą wrażliwością komórek na ten związek [19].

Znaczącą rolę (p)ppGpp w tolerancji komórek bakterijnych na nadtlenek wodoru odnotowano także u *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Po ekspozycji na  $H_2O_2$  przeżyło mniej niż 5% komórek mutantów *relA/spoT/fprel* i *relA/spoT*, podczas gdy bakterii typu dzikiego przetrwało 29,5% [20]. Biorąc pod uwagę fakt, że rośliny podczas ataku patogenów produkują

znaczne ilości reaktywnych form tlenu, w tym nadtlenu wodoru [62], rola odpowiedzi ścisłej w przetrwaniu tych mikroorganizmów na powierzchni czy we wewnątrz tkanek roślinnych jest niezwykle istotna.

Wyniki badań sugerują, że szlaki odpowiedzi bakterii na stres oksydacyjny, które są regulowane m.in. przez alarmony odpowiedzi ścisłej, regulują także oporność bakterii na antybiotyki. Nguyen i wsp. [76] zademonstrowali, że inaktywacja odpowiedzi ścisłej u *P. aeruginosa* powoduje drastyczny spadek antybiooporności zarówno komórek znajdujących się w warunkach głodu, jak i w biofilmie [76]. Mutant *P. aeruginosa* pozbawiony funkcjonalnych białek RelA i SpoT jest bardziej wrażliwy na antybiotyk ofloksacyne niż bakterie szczepu dzikiego, co prawdopodobnie jest wynikiem obniżonej aktywności enzymów układu antyoksydacyjnego u wspomnianego mutantu. W konsekwencji powoduje to akumulację reaktywnych form tlenu i śmierć komórek [57]. Również Chatneparat i wsp. [19] zauważyli, że odpowiedź ścisła jest wymagana dla tolerancji bakterii *P. syringae* na antybiotyki. Zaobserwowali, że mutanty *relA* oraz *relA/spoT* wykazują zwiększoną wrażliwość na ryfampicyne.

W warunkach głodu, czyli indukujących odpowiedź ścisłą, komórki *P. atrosepticum* uzyskują podwyższoną oporność na liczne czynniki stresowe, takie jak nadtlenek wodoru, szok cieplny czy traktowanie antybiotykami. Kiedy komórki będące w fazie wzrostu logarytmicznego poddano stresowi oksydacyjnemu zaindukowanemu  $H_2O_2$ , zaobserwowano znaczny spadek ich liczby w ciągu sześciu godzin. Liczba komórek poddanych stresowi głodu (na początku eksperymentu taka sama jak tych pobranych w fazie logarytmicznej wzrostu) także spadła po potraktowaniu ich  $H_2O_2$ , jednak bakterie te powróciły do stanu relatywnie wysokiej liczebności już po około dwóch godzinach. Komórki poddane stresowi głodu charakteryzowały się także większą opornością na ryfampicyne i wysoką temperaturę. Liczba komórek pobranych w fazie wzrostu logarytmicznego, wystawionych na działanie podwyższonej temperatury (50°C), spadła do zera i nie wzrosła przez dobę. Z kolei w przypadku komórek poddanych stresowi głodu ich liczba także spadła, jednak po pewnym czasie obserwowano wzrost ich liczebności do wartości początkowej [83].

Odpowiedź ścisła funkcjonująca w warunkach głodu umożliwia bakteriom przeżycie w środowisku zawierającym antybiotyki, m.in. poprzez stymulację ekspresji genu integrazy *intI1*. Gen ten zlokalizowany jest w integronach, elementach genomu zawierających kasety oporności na antybiotyki. Koduje on białko integrazę odpowiedzialną za insercję lub wycinanie wspomnianych kaset, co umożliwia ich rozprzestrzenianie się, a tym samym wzrost oporności bakterii na antybiotyki. Pierwotnie uważano, że wpływ na

ekspresję integronów ma odpowiedź SOS, która może zostać zaindukowana przez antybiotyki i horyzontalny transfer genów (np. transformację i koniugację). Podwyższona ekspresja genu *intI1* w biofilmie, gdzie część z komórek znajduje się w warunkach głodu, stymulujących produkcję alarmonów odpowiedzi ścisłej, zależy nie tylko od odpowiedzi SOS, ale, jak wynika z doświadczeń przeprowadzonych na *E. coli*, również od innych czynników. Po wyeliminowaniu wpływu odpowiedzi SOS nadal obserwowano wyższą ekspresję genu kodującego *IntI1* w komórkach *E. coli* w biofilmie. W celu sprawdzenia regulacji ekspresji *intI1* skonstruowano mutanty pozbawione globalnych regulatorów, m.in. *RelA* i *SpoT* czy proteazy *Lon*. Żaden z mutantów nie wykazywał zmian w zdolności do formowania biofilmu, jednak nie zauważono u nich wzrostu ekspresji *intI1* charakterystycznego dla komórek tworzących biofilm, co wskazuje na regulację ekspresji *intI1* przez (p)ppGpp oraz proteazę *Lon*. Zatem w przypadku braku (p)ppGpp nie dochodzi do zwiększenia ekspresji *intI1*, a co za tym idzie rozprzestrzeniania kaset zapewniających oporność na antybiotyki [104]. Jest to kolejny przykład, który dowodzi, że odpowiedź ścisła może zwiększać przystosowanie bakterii do funkcjonowania w środowisku, w którym występują szkodliwe dla nich czynniki i ułatwiać mikroorganizmom przeżycie na powierzchni czy we wnętrzu organizmów, np. roślinnych.

#### 4.1. Udział odpowiedzi ścisłej w regulacji quorum sensing

Kultury bakterii osiągając stan wysokiego zagęszczenia modulują swój fenotyp tak aby umożliwić sobie produkcję metabolitów wtórnych, enzymów oraz czynników wirulencji, a tym samym zasiedlanie nowych nisz [93, 113]. Wraz ze wzrostem liczebności populacji komórki bakteryjne wytwarzają cząsteczki nazywane autoinduktorami [15], które produkowane wewnątrz komórki podlegają sekrecji do środowiska. Po przekroczeniu poziomu progowego, autoinduktory stymulują procesy prowadzące do zmiany ekspresji genów, które umożliwiają zsynchronizowanie metabolizmu bakterii. Proces komunikacji pomiędzy bakteriami, w którym to bakterie wykorzystują produkcję i detekcję autoinduktorów, aby monitorować zagęszczenie populacji, nazywa się quorum sensing. Zjawisko to jest istotne w kontroli takich procesów jak formowanie biofilmu, sekrecja czynników wirulencji, bioluminescencja, produkcja antybiotyków, sporulacja, kompetencja oraz innych [75].

W przypadku Gram-ujemnych Gammaproteobakterii główną klasę autoinduktorów stanowią acylowane laktony homoseryny AHL (acyl-HSLs, acyl-HomoSerine Lactones). Są one unikalne dla gatunku bakterii i służą do porozumiewania się jedynie pomiędzy

przedstawicielami tego samego gatunku [75]. Jednymi z systemów autoindukcji są *las* i *rhl* dobrze poznane u *P. aeruginosa* [75, 78, 80, 81] oraz *tra* u *Agrobacterium tumefaciens*. Ten ostatni reguluje transfer plazmidu Ti pomiędzy komórkami bakterii na drodze koniugacji [33]. Na systemy te składają się syntazy autoinduktorów, oznaczane literą „I” na końcu nazwy białka (np. *LuxI*), oraz receptory cytoplazmatyczne tych autoinduktorów, oznaczane symbolem „R” (np. *LuxR*) [75].

W momencie, gdy ilość autoinduktorów przekracza stężenie progowe, u *P. aeruginosa*, dochodzi do aktywacji regulatorów transkrypcyjnych *LasR* i *RhlR*, które indukują ekspresję wybranych genów, m.in. kodujących białka *LasI* i *RhlI*, odpowiedzialne za produkcję autoinduktorów (stymulacja produkcji autoinduktorów na zasadzie sprzężenia zwrotnego) i inne białka istotne dla chorobotwórczości czy biorące udział w formowaniu biofilmu. System *las* składa się z *LasI* – syntazy autoinduktora N-3-oksododekanolowego laktonu homoseryny 3-oxo-C12-HSL (N-3-oxododecanoylhomoserine lactone), który aktywuje białko *LasR* będące jednocześnie receptorem tego autoinduktora jak i aktywatorem transkrypcji genów odpowiedzialnych za syntezę szeregu białek sekrecyjnych – związanych z wirulencją bakterii, takich jak elastaza kodowana przez gen *lasB*, proteaza kodowana przez gen *lasA*, alkaliczna proteaza (*apr*) i egzotoksyna A (*toxA*) [82]. Z kolei system *rhl* składa się z białka *RhlI* odpowiadającego za syntezę N-butyrylowego laktonu homoseryny C4-HSL (N-butanoylhomoserine lactone) i *RhlR*, które jest receptorem autoinduktorów i aktywatorem transkrypcji [75]. System ten stymuluje syntezę ramnolidów posiadających właściwości biosurfaktantów, które mogą wywierać niekorzystny wpływ na komórki człowieka a także innych bakterii [2, 39, 51, 63, 95, 116], i aktywność białka *LasA* oraz ekspresję genu *lasB*, podobnie jak w przypadku systemu *las* [12]. System *rhl* promuje również syntezę picyjaniny, niebieskiego barwnika o właściwościach oksydoredukcyjnych, powodującego zahamowanie wzrostu innych bakterii [12, 50].

Bakterie Gram-dodatnie jako autoinduktory wykorzystują głównie modyfikowane oligopeptydy [52, 100]. W tym przypadku sygnał jest odbierany przez receptory błonowe, a informacja przekazywana na drodze fosforylacji [75].

Zjawisko quorum sensing jest niezbędne dla funkcjonowania zarówno mikroorganizmów symbiotycznych, jak i patogennych, wchodzących w interakcje z roślinami. Istnieje wiele dowodów na to, że odpowiedź ścisła jest istotnym elementem regulującym quorum sensing u tych i innych bakterii. Wykazano, że nadekspresja genu *relA* u *P. aeruginosa* powoduje podwyższenie ekspresji genów *lasR* i *rhlR*, kodujących białka istotne dla funkcjonowania quorum sensing [108]. Bowden i wsp. [11] zaobserwowali, że mutant *relA/spoT* *P. aeruginosa*



akumuluje na znacznie niższym poziomie autoinduktor N-3-oksoheksanoilowy lakton homoseryny 3-oxo-C6-HSL (N-3-oxohexanoilhomoserine lactone) [11]. Co ciekawe, w komórkach *P. aeruginosa* aż 40% genów regulowanych poprzez quorum sensing jest również regulowana przez czynnik RpoS [96], którego ekspresja jest zależna od odpowiedzi ścisłej [37, 108]. Regulację quorum sensing przez czynnik RpoS zaobserwowano również u bakterii *Ralstonia solanacearum* będącej patogenem roślin [31].

Wykazano, że alarmony odpowiedzi ścisłej odgrywają również istotną rolę w przekazywaniu sygnału o zmianie płynności błony (membrane fluidity), mającej miejsce w odpowiedzi na stres. Acyltransferaza LPA (LptA) bierze udział w biosyntezie fosfolipidów wchodzących w skład błon komórkowych. Zaobserwowano, że mutant *P. aeruginosa* pozbawiony tego enzymu charakteryzuje się zmniejszoną płynnością błony bakteryjnej. Podczas fazy wzrostu logarytmicznego zaobserwowano u niego przedwczesną produkcję autoinduktorów quorum sensing – N-butyrylowych laktonów homoseryny C4-HSL i N-heksonylo laktonów homoseryny C6-HSL. Z kolei na początku fazy stacjonarnej obserwowano zmniejszone wytwarzanie 2-heptyl-3-hydroksy-4-chinolonu, PQS (2-heptyl-3-hydroksy-4-quinolone), cząsteczki sygnałowej, której produkcja jest regulowana przez LasR. Cząsteczka PQS wpływa pozytywnie na ekspresję *lasR*, *lasB*, *rhlR*, *rhlI* i *rpoS* oraz na poziom determinantów wirulencji, takich jak ramnolipidy, LecA i piocyjanina, a także białek związanych z pobieraniem żelaza [8, 26, 70]. W fazie wzrostu logarytmicznego oraz stacjonarnej dochodziło do akumulacji kwasu antranilowego, prekursora PQS. Zauważono zwiększoną ekspresję *rhlI*, *lasI*, *lasB* oraz obniżoną ekspresję *pqsC* oraz *pqsA* (genów związanych z syntezą PQS), a także zwiększoną ekspresję *relA* [8]. Podwyższona ekspresja *relA* u mutantu *lptA* we wczesnych fazach wzrostu bakterii sugeruje, że odpowiedź ścisła promuje syntezę autoinduktorów biorących udział w mechanizmie quorum sensing, produkowanych w tym przypadku już w fazie logarytmicznej. Założenie to jest po części potwierdzone faktem, że u mutantu *relA*, który nie wytwarza (p)ppGpp, nie zaobserwowano przedwczesnej produkcji C4-HSL i C6-HSL, podobnie jak i u podwójnego mutantu *lptA/relA*. Przypuszcza się, że akumulacja (p)ppGpp jako forma odpowiedzi na stres, któremu towarzyszą m.in. zmiany stanu fizycznego dwuwarstwy lipidowej błony komórkowej, stymuluje produkcję autoinduktorów, co z kolei umożliwia formowanie biofilmu, a tym samym zwiększanie przeżywalności mikroorganizmów symbiotycznych lub patogennych na roślinach oraz promuje ich oporność na substancje antibakteryjne wydzielane przez rośliny [8].

Innym, pośrednim dowodem na to, że odpowiedź ścisła i produkcja autoinduktorów są powiązane jest

fakt, że komórki mutantów systemu *las* i *rhl* rosnące na korzeniach bazylii są dłuższe niż te szczepu dzikiego [110], co przypomina fenotyp komórek mutantów odpowiedzi ścisłej *P. syringae* i *E. amylovora* *relA* i *relA/spoT* [1, 19, 20]. Powyższe informacje sugerują, że akumulacja (p)ppGpp promuje produkcję autoinduktorów, a tym samym stymuluje system *las* i *rhl*, a także nie pozwala komórkom inwestować we wzrost w warunkach wysokiego zagęszczenia bakterii.

Patogenna bakteria *A. tumefaciens* z rodziny *Rhizobiaceae* powoduje guzowatość korzeni poprzez insercję do genomu rośliny fragmentu bakteryjnego DNA (T-DNA) znajdującego się na plazmidzie Ti. Gdy T-DNA, niosące m.in. geny syntezy opin, jest wprowadzone do genomu rośliny, w wyniku transformacji w tkankach produkowane są niewielkie związki organiczne nazywane opinami. Opiny stymulują pośrednio u bakterii ekspresję genu *traR* kodującego białko promujące ekspresję genów zależnych od quorum sensing, zaangażowanych m.in. w produkcję autoinduktorów (w celu amplifikacji odpowiedzi quorum sensing), replikację plazmidów Ti oraz horyzontalny transfer tych ostatnich na drodze koniugacji. Dzięki temu możliwe jest „rozprowadzenie” plazmidów niosących geny kodujące białka wirulencji, w tym te umożliwiające transport T-DNA do komórek gospodarza, pomiędzy komórkami bakteryjnymi. Mechanizm ten podnosi patogeniczność populacji bakterii w stosunku do gospodarza oraz wydajność transformacji. Zatem obniżenie wydajności komunikacji quorum sensing wpływa negatywnie na rozwój guzowatości korzeni [64].

Co zaskakujące, u bakterii *A. tumefaciens* w fazie stacjonarnej poziom autoinduktora N-3-oksooktanoilowego laktonu homoseryny, 3-oxo-C8-HSL (N-3-oxooctanoilhomoserine lactone) obniża się, a tym samym komunikacja międzykomórkowa quorum sensing również spada. Wynika to z faktu, że w fazie stacjonarnej wzrasta poziom białka BlcC (nazywanego także AttM) odpowiedzialnego za degradację 3-oxo-C8-HSL. Koreluje to z wysokim poziomem (p)ppGpp, który pośrednio stymuluje ekspresję genu kodującego to białko. Potwierdza to m.in. fakt, że u mutantu *relA* w fazie stacjonarnej poziom białka BlcC nie wzrasta. Do momentu wejścia bakterii w tę fazę wzrostu poziom białka BlcC jest niski, gdyż jest negatywnie regulowany przez czynnik AttJ, wytwarzany w komórce podczas jej wzrostu. Potwierdzają to wyniki konstytutywnej ekspresji *blcC* u bakterii z mutacją w genie *attJ*. Ta konstytutywna ekspresja nie jest zależna od poziomu białka RelA, co sugeruje, że (p)ppGpp nie mają bezpośredniego wpływu na ekspresję *blcC*, a jedynie biorą udział w przezwycięzeniu represji jego ekspresji przez AttJ [115].

Alarmony odpowiedzi ścisłej wydają się oddziaływać negatywnie na zdolność *A. tumefaciens* do przekazywania plazmidu Ti przez bakterie, prawdopodobnie

poprzez umożliwienie ekspresji białka BlcC, enzymu odpowiedzialnego za rozkład wspomnianego autoinduktora [115]. Jednakże, w związku z tym, że metabolity produkowane przez rośliny w miejscach narośli mogą regulować aktywność białka BlcC w komórkach bakterii kolonizujących, może ona zależeć od stanu metabolicznego gospodarza [64]. Niemniej jednak, wydaje się słusznym aby komórki *A. tumefaciens* używane do transformacji roślin były hodowane w medium bogatym we wszystkie niezbędne im składniki odżywcze. Co więcej, dla maksymalnej skuteczności, transformacja roślin powinna być prowadzona z wykorzystaniem bakterii znajdujących się w logarytmicznej fazie wzrostu.

#### 4.2. Regulacja produkcji egzopolisacharydów i tworzenia biofilmu zależne od odpowiedzi ścisłej

Odpowiedź ścisła regulując quorum sensing wpływa pośrednio na funkcjonowanie biofilmu. Biofilm (błona biologiczna) jest społecznością mikroorganizmów, które rosną przytwierdzone do pewnej powierzchni, jednocześnie pozostając zanurzone i połączone ze sobą w produkowanej przez siebie macierzy zewnątrzkomórkowej, składającej się z substancji polimerowych wydzielanych pozakomórkowo, tzw. EPS (Extracellular Polymeric Substances) – głównie egzopolisacharydów, służących jako rusztowanie dla węglowodanów, białek, kwasów nukleinowych i lipidów, chroniącej je przed działaniem czynników zewnętrznych [32, 58].

Mikroorganizmy w biofilmie mogą funkcjonować w warunkach, w których przetrwanie pojedynczych komórek byłoby trudne, a w wielu przypadkach nawet niemożliwe. Wykazują też odmienne cechy niż komórki żyjące w postaci wolnej, m.in. dzięki ekspresji specyficznych genów w odpowiedzi na autoinduktory quorum sensing, które są produkowane przez bakterie żyjące w biofilmie. Z jednej strony biofilm zapewnia mikroorganizmom przytwierdzenie do powierzchni tkanek lub przedmiotów, utrudniając tym samym ich zmycie wodą lub krwią [86]. Z drugiej strony, wewnątrz biofilmu bakterie są chronione przed desykcją, systemem immunologicznym gospodarza, substancjami antybakteryjnymi, czy strawieniem przez pierwotniaki oraz leukocyty [88]. Wewnątrz tej struktury panują warunki ograniczonej dostępności tlenu oraz substancji odżywczych, więc komórki charakteryzuje powolne tempo metabolizmu i wzrostu. Dzięki temu bakterie są mniej wrażliwe na antybiotyki, których celem są komórki dzielące się [86].

Biofilm wykazuje czasoprzestrzenny rozdział subpopulacji zaangażowanych w takie procesy jak sporulacja i formowanie macierzy. Niektóre komórki bakteriacyjne stanowią tam rezerwuary patogenów, które

mogą ulec reaktywacji w korzystnych warunkach środowiska, tzw. komórki przetrwałe (persister cells) [56]. Biofilm, zmniejszając ruchliwość bakterii i zwiększając ich gęstość na określonej powierzchni, ułatwia wymianę plazmidów poprzez koniugację, a także może przyczyniać się do rozprzestrzeniania antybiotykooporności [45, 86].

Oprócz wspomnianej, pośredniej roli odpowiedzi ścisłej w regulacji metabolizmu bakterii tworzących biofilm poprzez stymulację quorum sensing, akumulacja (p)ppGpp wydaje się również wpływać bezpośrednio na formowanie tej struktury, poprzez regulację syntezy egzopolisacharydów. Ruffing i Chen [92] zauważyli, że u bakterii Gram-ujemnej *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 odpowiedź ścisła jest niezbędna dla biosyntezy kurdlanu, polimeru glukozy. Podejrzewa się, że ten egzopolisacharyd pełni u mikroorganizmów funkcję ochronną, jednak jak do tej pory nie potwierdzono jego udziału w żadnym istotnym procesie. Związek ten znalazł zastosowanie w przemyśle budowlanym i spożywczym. Prawdopodobnie jest to związek istotny dla funkcjonowania tych bakterii, gdyż jego synteza zachodzi w odpowiedzi na niedobór azotu, tak jak innych polimerów cukrów ważnych dla struktury biofilmu. Co więcej, jego najwyższe stężenie obserwuje się w fazie stacjonarnej wzrostu, podobnie jak innych egzopolisacharydów. Analiza transkryptomu *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 w warunkach niedoboru azotu – w fazie stacjonarnej wzrostu, wykazała, że ekspresja genów operonu produkcji kurdlanu, *crdASC*, wzrasta 100-krotnie w porównaniu do fazy wzrostu logarytmicznego tych bakterii. Podczas produkcji kurdlanu wzrasta również ekspresja genu kodującego homologa RelA i SpoT (*rsh*). Mutant *rsh* (knock-out insercyjny) w podobnych warunkach wykazuje 57-krotnie niższą ekspresję genu *crdS* kodującego podjednostkę katalityczną syntazy  $\beta$ -1,3-glukanu biorącej udział w produkcji kurdlanu w porównaniu do szczepu dzikiego oraz całkowity brak akumulacji kurdlanu [92]. Z kolei mutant pozbawiony podjednostki polimerazy RNA RpoN, regulatora transkrypcji w warunkach niedoboru azotu np. u *E. coli* [65], produkuje o 30% więcej kurdlanu niż bakterie typu dzikiego. Może to wskazywać, że produkcja kurdlanu jest niezależna od RpoN, a wręcz, że brak funkcjonalnego polipeptydu RpoN umożliwia szybsze i/lub stabilniejsze przyłączanie do rdzenia polimerazy innych niż RpoN czynników  $\sigma$ , do produkcji i funkcjonowania których bardzo często niezbędne są alarmony odpowiedzi ścisłej [23], umożliwiając intensywniejszą produkcję kurdlanu [92]. Niższa ekspresja genu *crdS* u mutantu *rsh* oraz brak produkcji kurdlanu potwierdzają, że odpowiedź ścisła odgrywa istotną rolę w produkcji tego polimeru, który najprawdopodobniej bierze udział w formowaniu biofilmu.

Odpowiedź ścisła wywiera wpływ nie tylko na ekspresję genu istotnego dla syntezy kurdlanu ale i hamuje aktywność inhibitora pośredniego syntezy tego polimeru, polifosfatazy Ppx rozkładającej polifosforan w komórkach. W związku z tym, że biosynteza kurdlanu jest procesem wymagającym dużych nakładów energii, ich źródłem może być polifosforan. Akumulacja polifosforanu u *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 wzrasta w warunkach stresowych oraz w stacjonarnej fazie wzrostu, co koreluje z wysokim poziomem (p)ppGpp i kurdlanu. Alarmony odpowiedzi ścisłej hamując aktywność polifosfatazy utrzymują wysoki poziom polifosforanu, umożliwiając tym samym syntezę kurdlanu, co wyjaśnia jego wysoki poziom w fazie stacjonarnej wzrostu bakterii. Opisane wyniki badań potwierdzają zaangażowanie alarmonów odpowiedzi ścisłej w syntezę egzopolisacharydów oraz regulację metabolizmu mikroorganizmów w warunkach niedoboru związków odżywczych [92]. Wydaje się zatem, że stosowanie środków bakteriobójczych może być skuteczne wówczas, kiedy komórki są w fazie wzrostu logarytmicznego, charakteryzującej się niską intensywnością produkcji (p)ppGpp, a co za tym idzie niskim poziomem istotnych dla utworzenia stabilnej struktury biofilmu egzopolisacharydów.

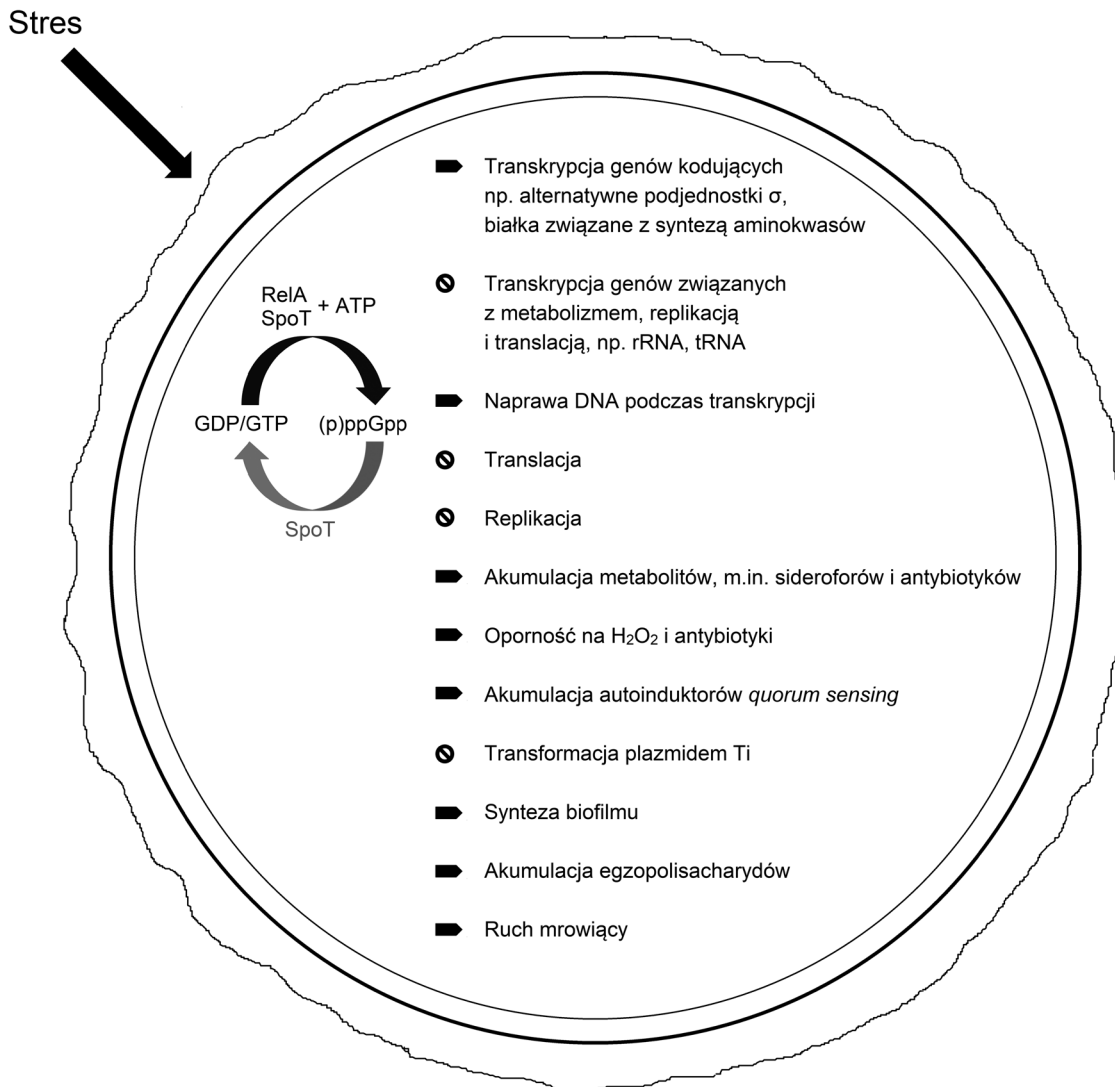
Przykładami badań nad funkcją odpowiedzi ścisłej w tworzeniu biofilmu są eksperymenty przeprowadzone na Gram-dodatniej bakterii patogenicznej *Listeria monocytogenes* powodującej u ludzi występowanie listeriozy, objawiającej się dolegliwościami układu pokarmowego (wymioty, biegunka i wysoka gorączka). Bakteria *L. monocytogenes* jest zdolna do adhezji i tworzenia biofilmu na różnych powierzchniach, na żywności czy roślinach. Wykazano, że przyłączenie się komórek *L. monocytogenes* do powierzchni hydrofobowej – polistyrenu, koreluje z podwyższonym poziomem ekspresji genu *relA*. Mutant *L. monocytogenes* z insercją w tym genie charakteryzuje się mniejszą zdolnością do adhezji do wspomnianej powierzchni oraz ograniczonym wzrostem po przytwierdzeniu do powierzchni. Co więcej, mutant jest awirulentny w stosunku do myszy, pomimo, że aktywność hemolityczna i skład wydzielanych białek bakterii nie są zmienione. Wynik eksperymentu świadczy o istotnej roli cztero- i pięciofosforanu guanozyny w rozwoju biofilmu *L. monocytogenes* oraz patogeniczności bakterii [106]. Można podejrzewać, że u innych bakterii Gram-dodatnich, np.: z rodzaju *Clavibacter*, które powodują choroby roślin [72], odpowiedź ścisła również odgrywa istotną rolę w przystosowaniu do niekorzystnych warunków panujących na atakowanych organizmach. Jednym z takich przystosowań jest właśnie tworzenie biofilmu. Zatem ukierunkowanie produkcji środków bakteriobójczych na elementy bakteryjnej odpowiedzi ścisłej wydaje się mieć ogromne znaczenie dla produkcji rolnej.

#### 4.3. Rola odpowiedzi ścisłej w regulacji ruchu mrowiącego bakterii

Ruch mrowiący to zsynchronizowany ruch bakterii posiadających rzęski i znajdujących się w populacji o dużej gęstości, który umożliwia powstałej „tratwie bakteryjnej” przemieszczanie się w środowisku. Stanowi alternatywę dla tworzenia biofilmu, w którym bakterie wykazują obniżoną ruchliwość [55]. Ruch ten u większości bakterii wymaga obecności biosurfaktanta obniżającego napięcie powierzchniowe i umożliwiającego gwałtowną ekspansję kolonii. U populacji bakterii wykonujących ruch mrowiący zauważono podwyższoną oporność na liczne antybiotyki, która wynika nie tylko z faktu bycia w środowisku charakteryzującym się wysokim zagęszczeniem bakterii, ale i z zdolności „ucieczki” z miejsca o wysokim stężeniu substancji antybakteryjnych [14]. Obecność cztero- oraz pięciofosforanu guanozyny wydaje się być niezbędna do tego, aby bakterie mogły wykonywać ruch mrowiący. Mutanty *P. syringae* pozbawione enzymów odpowiedzi ścisłej nie wykazują ruchu mrowiącego, co prawdopodobnie wynika z braku *RelA*- i *SpoT*-zależnej ekspresji genu kodującego białko *SalA*, które pozytywnie reguluje *SyfA* oraz *SyfR*, białka biorące udział w produkcji syringfaktyny, biosurfaktanta istotnego do wykonywania ruchu mrowiącego. Nadekspresja genu *salA* u mutantów *relA*, *spoT* i *relA/spoT* powoduje częściowe przywrócenie zdolności do tego ruchu. Natomiast u bakterii szczepu dzikiego z nadekspresją *salA* obserwuje się wręcz obniżoną zdolność do ruchu mrowiącego, który charakteryzuje się odmienną morfologią. Według badaczy wynika to najprawdopodobniej z tego, że odpowiedź ścisła reguluje ruch mrowiący nie tylko poprzez regulację białka *SalA* [19]. Mutant *P. syringae* pv. *tomato* DC 3000 *relA/spoT/fprel* również nie ma zdolności do wykonywania ruchu mrowiącego, natomiast mutanty *relA* oraz *relA/spoT* wykazują zredukowaną zdolność do tego ruchu. Komplementacja mutacji genami *relA* lub *fprel* u mutantu *relA/spoT/fprel* częściowo przywraca ruch mrowiący, natomiast, co zaskakujące, komplementacja mutacji *relA/spoT* przez ekspresję genu *relA* lub *spoT* *in trans* skutkuje wystąpieniem bardziej zredukowanego ruchu mrowiącego [20].

#### 5. Podsumowanie

Odpowiedź ścisła jest reakcją bakterii na stres, a jej efektorami są cztero- i pięciofosforan guanozyny syntetyzowane przez enzymy *RelA*, *SpoT* i *RSH*. Enzym *RelA* jest aktywowany w odpowiedzi na niedobór aminokwasów, który objawia się obecnością w komórce deacylowanego tRNA. Enzym *SpoT* jest białkiem bifunkcyjnym – syntazą i hydrolazą alarmonów odpowiedzi



Ryc. 2. Odpowiedź ścisła i jej zaangażowanie w odpowiedź bakterii na stres

Opis zawarty w podsumowaniu. Pentagon – wpływ pozytywny (p)ppGpp na dany proces, znak zakazu – wpływ negatywny (p)ppGpp na dany proces.

ścislej (Ryc. 2). Alarmony regulują transkrypcję i towarzyszącą jej naprawę DNA, translację oraz replikację DNA. Nukleotydy te pełnią niezwykle istotną rolę w regulacji procesów fizjologicznych i przystosowaniu bakterii do niekorzystnych warunków środowiska. Może o tym świadczyć wpływ nie tylko na ekspresję bardzo wielu genów ale i na produkcję metabolitów wtórnych. Alarmy odpowiedzi ścisłej biorą udział w regulacji wzrostu komórek, produkcji antybiotyków i sideroforów, indukcji oporności bakterii na  $H_2O_2$  i antybiotyki, syntezie autoinduktorów *quorum sensing*, czyli formie komunikacji i wyczuwania zagęszczenia populacji przez bakterie, a także biosyntezie związków, które wydają się być istotnymi dla tworzenia biofilmu, czyli społeczności bakterii zanurzonej w macierzy zewnątrzkomórkowej, wykazującej podwyższoną oporność na warunki stresowe, czy w regulacji ruchu mrowiącego bakterii (Ryc. 2).

#### Podziękowania

Pragniemy serdecznie podziękować Recenzentom za okazany wkład merytoryczny oraz wszelkie inne sugestie, które pozwoliły na udoskonalenie niniejszej pracy.

Prace badawcze autorów, których wyniki zainspirowały do napisania niniejszej pracy, są finansowane z funduszy Narodowego Centrum Nauki w Polsce (grant Miniatura 1, 2017/01/X/NZ1/01981; Justyna Boniecka) oraz Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Polsce [fundusz statutowy Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (Justyna Boniecka, Grażyna B. Dąbrowska) oraz grant badawczy 1189-B (Justyna Boniecka)].

#### Piśmiennictwo

1. Ancona V., Lee J.H., Chatnaparat T., Oh J., Hong J.-I., Zhao Y.: The bacterial alarmone (p)ppGpp activates the type III secretion system in *Erwinia amylovora*. *J. Bacteriol.* **197**, 1433–1443 (2015)

2. Aranda F.J., Espuny M.J., Marques A., Teruel J.A., Manresa Á., Ortiz A.: Thermodynamics of the interaction of a dirhamno-lipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* with phospholipid membranes. *Langmuir*, **23**, 2700–2705 (2007)
3. Atkinson G.C., Tenson T., Haurlyuk V.: The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PLoS One*, **6**, e23479 (2011)
4. Autret S., Levine A., Vannier F., Fujita Y., Séror S.J.: The replication checkpoint control in *Bacillus subtilis*: identification of a novel RTP-binding sequence essential for the replication fork arrest after induction of the stringent response. *Mol. Microbiol.* **31**, 1665–1679 (1999)
5. Barker M.M., Gaal T., Josaitis C.A., Gourse R.L.: Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation *in vivo* and *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **305**, 673–688 (2001)
6. Bartlett M.S., Gourse R.L.: Growth rate-dependent control of the *rrnB* P1 core promoter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**, 5560–5564 (1994)
7. Battesti A., Bouveret E.: Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol. Microbiol.* **62**, 1048–1063 (2006)
8. Baysse C., Cullinane M., Déneraud V., Burrowes E., Dow J.M., Morrissey J.P., Tam L., Trevors J.T., O’Gara F.: Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. *Microbiology*, **151**, 2529–2542 (2005)
9. Bell K.S., Toth I.K. i wsp.: Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 11105–11110 (2004)
10. Bergman J.M., Hammarlöf D.L., Hughes D.: Reducing ppGpp level rescues an extreme growth defect caused by mutant EF-Tu. *PLoS One*, **9**, e90486 (2014)
11. Bowden S.D., Eyres A., Chung J.C.S., Monson R.E., Thompson A., Salmond G.P.C., Spring D.R., Welch M.: Virulence in *Pectobacterium atrosepticum* is regulated by a coincidence circuit involving quorum sensing and the stress alarmone, (p)ppGpp. *Mol. Microbiol.* **90**, 457–471 (2013)
12. Brint J.M., Ohman D.E.: Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J. Bacteriol.* **177**, 7155–7163 (1995)
13. Browning D.F., Busby S.J.W.: Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 638–650 (2016)
14. Butler M.T., Wang Q., Harshey R.M.: Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 3776–3781 (2010)
15. Cámara M., Williams P., Hardman A.: Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 667–676 (2002)
16. Cashel M., Gallant J.: Two compounds implicated in function of RC gene of *Escherichia coli*. *Nature*, **221**, 838–841 (1969)
17. Chakraborty R., Bibb M.: The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J. Bacteriol.* **179**, 5854–5861 (1997)
18. Chakravarty D., Banerjee M., Waghmare N., Ballal A.: Cyanobacterial Mn-catalase ‘KatB’: molecular link between salinity and oxidative stress resistance. *Commun. Integr. Biol.* **9**, e1216738 (2016)
19. Chatnaparat T., Li Z., Korban S.S., Zhao Y.: The bacterial alarmone (p)ppGpp is required for virulence and controls cell size and survival of *Pseudomonas syringae* on plants. *Environ. Microbiol.* **17**, 4253–4270 (2015)
20. Chatnaparat T., Li Z., Korban S.S., Zhao Y.: The stringent response mediated by (p)ppGpp is required for virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and its survival on tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* **28**, 776–789 (2015)
21. Choudhury P., Flower A.M.: Efficient assembly of ribosomes is inhibited by deletion of *bipA* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **197**, 1819–1827 (2015)
22. Dalebroux Z.D., Svensson S.L., Gaynor E.C., Swanson M.S.: ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 171–199 (2010)
23. Dąbrowska G., Prusińska J., Goc A.: Odpowiedź ścisła – mechanizm adaptacyjnej odpowiedzi bakterii na warunki stresowe. *Post. Bioch.* **52**, 87–93 (2006)
24. DeLivron M.A., Robinson V.L.: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium BipA exhibits two distinct ribosome binding modes. *J. Bacteriol.* **190**, 5944–5952 (2008)
25. DeNapoli J., Techranchi A.K., Wang J.D.: Dose-dependent reduction of replication elongation rate by (p)ppGpp in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **88**, 93–104 (2013)
26. Diggle S.P., Winzer K., Chhabra S.R., Worrall K.E., Cámara M., Williams P.: The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol. Microbiol.* **50**, 29–43 (2003)
27. English B.P., Haurlyuk V., Sanamrad A., Tankov S., Dekker N.H., Elf J.: Single-molecule investigations of the stringent response machinery in living bacterial cells. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 365–373 (2011)
28. Feng B., Gao N. i wsp.: Structural and functional insights into the mode of action of a universally conserved Obg GTPase. *PLoS Biol.* **12**, e1001866 (2014)
29. Flårdh K., Axberg T., Albertson N.H., Kjelleberg S.: Stringent control during carbon starvation of marine *Vibrio* sp. strain S14: molecular cloning, nucleotide sequence, and deletion of the *relA* gene. *J. Bacteriol.* **176**, 5949–5957 (1994)
30. Flåtten I., Skarstad K.: The Fis protein has a stimulating role in initiation of replication in *Escherichia coli in vivo*. *PLoS One*, **8**, e83562 (2013)
31. Flaviv A.B., Schell M.A., Denny T.P.: An RpoS ( $\sigma^s$ ) homologue regulates acylhomoserine lactone-dependent autoinduction in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* **28**, 475–486 (1998)
32. Flemming H.-C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S.: Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 563–575 (2016)
33. Fuqua W.C., Winans S.C.: A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J. Bacteriol.* **176**, 2796–2806 (1994)
34. Gaal T., Bartlett M.S., Ross W., Turnbrough C.L.Jr., Gourse R.L.: Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria. *Science*, **278**, 2092–2097 (1997)
35. Gaca A.O., Colomer-Winter C., Lemos J.A.: Many means to a common end: the intricacies of (p)ppGpp metabolism and its control of bacterial homeostasis. *J. Bacteriol.* **197**, 1146–1156 (2015)
36. Gallant J., Palmer L., Pao C.C.: Anomalous synthesis of ppGpp in growing cells. *Cell*, **11**, 181–185 (1977)
37. Gentry D.R., Hernandez V.J., Nguyen L.H., Jensen D.B., Cashel M.: Synthesis of the stationary-phase sigma factor  $\sigma^s$  is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.* **175**, 7982–7989 (1993)
38. Goldberg J.B.: *Pseudomonas*: global bacteria. *Trends Microbiol.* **8**, 55–57 (2000)

39. Haba E., Pinazo A., Jauregui O., Espuny M.J., Infante M.R., Manresa A.: Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044. *Biotechnol. Bioeng.* **81**, 316–322 (2003)
40. Hamel E., Cashel M.: Role of guanine nucleotides in protein synthesis. Elongation factor G and guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3250–3254 (1973)
41. Haseltine W.A., Block R.: Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 1564–1568 (1973)
42. Hassett D.J., Iglewski B.H. i wsp.: Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol. Microbiol.* **34**, 1082–1093 (1999)
43. Haugen S.P., Berkmen M.B., Ross W., Gaal T., Ward C., Gourse R.L.: rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of  $\sigma$  region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase. *Cell*, **125**, 1069–1082 (2006)
44. Haurlyuk V., Atkinson G.C., Murakami K.S., Tenson T., Gerdes K.: Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 298–309 (2015)
45. Hausner M., Wuertz S.: High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3710–3713 (1999)
46. Hesketh A., Sun J., Bibb M.: Induction of ppGpp synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown under conditions of nutritional sufficiency elicits *actII-ORF4* transcription and actinorhodin biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **39**, 136–144 (2001)
47. Hogg T., Mechold U., Malke H., Cashel M., Hilgenfeld R.: Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response. *Cell*, **117**, 57–68 (2004)
48. Huang L., McCluskey M.P., Ni H., LaRossa R.A.: Global gene expression profiles of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 in response to irradiation with UV-B and white light. *J. Bacteriol.* **184**, 6845–6858 (2002)
49. Itikawa H., Fujita H., Wada M.: High temperature induction of a stringent response in the *dnaK* (Ts) and *dnaJ* (Ts) mutants of *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **99**, 1719–1724 (1986)
50. Jayaseelan S., Ramaswamy D., Dharmaraj S.: Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J. Microb. Biot.* **30**, 1159–1168 (2014)
51. Jensen P.Ø., Høiby N. i wsp.: Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing – controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **153**, 1329–1338 (2007)
52. Ji G., Beavis R.C., Novick R.P.: Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 12055–12059 (1995)
53. Kalia D., Meray G., Nakayama S., Zheng Y., Zhou J., Luo Y., Guo M., Roembke B.T., Sintim H.O.: Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 305–341 (2013)
54. Kamarthapu V., Epshtein V., Benjamin B., Poroshkin S., Mironov A., Cashel M., Nudler E.: ppGpp couples transcription to DNA repair in *E. coli*. *Science*, **352**, 993–996 (2016)
55. Kearns D.B.: A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 634–644 (2010)
56. Keren I., Shah D., Spoering A., Kaldalu N., Lewis K.: Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 8172–8180 (2004)
57. Khakimova M., Ahlgren H.G., Harrison J.J., English A.M., Nguyen D.: The stringent response controls catalases in *Pseudomonas aeruginosa* and is required for hydrogen peroxide and antibiotic tolerance. *J. Bacteriol.* **195**, 2011–2020 (2013)
58. Kołwzan B.: Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstania i funkcjonowania. *Ochr. Śr.* **33**, 3–14 (2011)
59. Krasny L., Gourse R.L.: An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription. *EMBO J.* **23**, 4473–4483 (2004)
60. Kriel A., Bittner A.N., Kim S.H., Liu K., Tehranchi A.K., Zou W.Y., Rendon S., Chen R., Tu B.P., Wang J.D.: Direct regulation of GTP homeostasis by (p)ppGpp: a critical component of viability and stress resistance. *Mol. Cell*, **48**, 231–241 (2012)
61. Kumar V., Chen Y., Ero R., Ahmed T., Tan J., Li Z., See Weng Wong A., Bhushan S., Gao Y.-G.: Structure of BipA in GTP form bound to the ratcheted ribosome. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 10944–10949 (2015)
62. Kuźniak E., Urbanek H.: The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. *Acta Physiol. Plant.* **22**, 195–203 (2000)
63. Laabei M., Jamieson W.D., Lewis S.E., Diggle S.P., Jenkins A.T.A.: A new assay for rhamnolipid detection – important virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 7199–7209 (2014)
64. Lang J., Faure D.: Functions and regulation of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Front. Plant Sci.* DOI:10.3389/fpls.2014.00014 (2014)
65. Leigh J.A., Dodsworth J.A.: Nitrogen regulation in bacteria and archaea. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 349–377 (2007)
66. Levine A., Vannier F., Dehbi M., Henckes G., Séror S.J.: The stringent response blocks DNA replication outside the ori region in *Bacillus subtilis* and at the origin in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **219**, 605–613 (1991)
67. Loveland A.B., Bah E., Madireddy R., Zhang Y., Brilot A.F., Grigorieff N., Korostelev A.A.: Ribosome•RelA structures reveal the mechanism of stringent response activation. *Elife*, **5**, e17029 (2016)
68. Maciąg-Dorszyńska M., Szalewska-Pałasz A., Węgrzyn G.: Different effects of ppGpp on *Escherichia coli* DNA replication *in vivo* and *in vitro*. *FEBS Open Bio.* **3**, 161–164 (2013)
69. Martins D., McKay G., Sampathkumar G., Khakimova M., English A.M., Nguyen D.: Superoxide dismutase activity confers (p)ppGpp mediated antibiotic tolerance to stationary-phase *Pseudomonas aeruginosa*. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 9797–9802 (2018)
70. McKnight S.L., Iglewski B.H., Pesci E.C.: The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**, 2702–2708 (2000)
71. Mechold U., Potrykus K., Murphy H., Murakami K.S., Cashel M.: Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **41**, 6175–6189 (2013)
72. Metzler M.C., Laine M.J., De Boer S.H.: The status of molecular biological research on the plant pathogenic genus *Clavibacter*. *FEMS Microbiol. Lett.* **150**, 1–8 (1997)
73. Molodtsov V., Sineva E., Zhang L., Huang X., Cashel M., Ades S.E., Murakami K.S.: Allosteric effector ppGpp potentiates the inhibition of transcript initiation by DksA. *Mol. Cell*, **69**, 1–12 (2018)
74. Murakami K.S.: X-ray crystal structure of *Escherichia coli* RNA polymerase  $\sigma^{70}$ . *J. Biol. Chem.* **288**, 9126–9134 (2013)
75. Ng W.-L., Bassler B.L.: Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 197–222 (2009)
76. Nguyen D., Singh P.K. i wsp.: Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*, **334**, 982–986 (2011)

77. Okada Y., Makino S., Tobe T., Okada N., Yamazaki S.: Cloning of *rel* from *Listeria monocytogenes* as an osmotolerance involvement gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1541–1547 (2002)
78. Passador L., Cook J.M., Gambello M.J., Rust L., Iglewski B.H.: Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science*, **260**, 1127–1130 (1993)
79. Paul B.J., Berkmen M.B., Gourse R.L.: DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 7823–7828 (2005)
80. Pearson J.P., Gray K.M., Passador L., Tucker K.D., Eberhard A., Iglewski B.H., Greenberg E.P.: Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 197–201 (1994)
81. Pearson J.P., Passador L., Iglewski B.H., Greenberg E.P.: A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1490–1494 (1995)
82. Pearson J.P., Pesci E.C., Iglewski B.H.: Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* **179**, 5756–5767 (1997)
83. Petrova O., Gorshkov V., Daminova A., Ageeva M., Moleleki L.N., Gogolev Y.: Stress response in *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 under starvation conditions: adaptive reactions at a low population density. *Res. Microbiol.* **165**, 119–127 (2014)
84. Pingoud A., Block W.: The elongation factor Tu•guanosine tetraphosphate complex. *Eur. J. Biochem.* **116**, 631–634 (1981)
85. Potrykus K., Cashel M.: (p)ppGpp: still magical? *Annu. Rev. Microbiol.* **62**, 35–51 (2008)
86. Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., Sintim H.O.: Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem.* **7**, 493–512 (2015)
87. Raskin D.M., Judson N., Mekalanos J.J.: Regulation of the stringent response is the essential function of the conserved bacterial G protein CgtA in *Vibrio cholerae*. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 4636–4641 (2007)
88. Rasmussen T.B., Givskov M.: Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**, 149–161 (2006)
89. Rocha E.R., Smith C.J.: Regulation of *Bacteroides fragilis katB* mRNA by oxidative stress and carbon limitation. *J. Bacteriol.* **179**, 7033–7039 (1997)
90. Ross W., Sanchez-Vazquez P., Chen A.Y., Lee J.-H., Burgos H.L., Gourse R.L.: 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 (2016)
91. Ross W., Vrentas C.E., Sanchez-Vazquez P., Gaal T., Gourse R.L.: The magic spot: a ppGpp binding site on *E. coli* RNA polymerase responsible for regulation of transcription initiation. *Mol. Cell*, **50**, 420–429 (2013)
92. Ruffing A.M., Chen R.R.: Transcriptome profiling of a curdland-producing *Agrobacterium* reveals conserved regulatory mechanisms of exopolysaccharide biosynthesis. *Microb. Cell Fact.* DOI:10.1186/1475-2859-11-17 (2012)
93. Rumbaugh K.P., Griswold J.A., Hamood A.N.: The role of quorum sensing in the *in vivo* virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect.* **2**, 1721–1731 (2000)
94. Rymer R.U., Solorio F.A., Techranchi A., Chu C., Corn J.E., Keck J.L., Wang J.D., Berger J.M.: Nucleotide-bound structures of the DnaG catalytic core reveal how metal•NTP substrates are bound during primer synthesis and blocked by stringent response alarmones. *Structure*, **20**, 1478–1489 (2012)
95. Sánchez M., Aranda F.J., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa Á., Ortiz A.: Permeabilization of biological and artificial membranes by a bacterial dirhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Colloid Interf. Sci.* **341**, 240–247 (2010)
96. Schuster M., Hawkins A.C., Harwood C.S., Greenberg E.P.: The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol. Microbiol.* **51**, 973–985 (2004)
97. Seyfzadeh M., Keener J., Nomura M.: *spoT*-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11004–11008 (1993)
98. Shyp V., Tankov S., Ermakov A., Kudrin P., English B.P., Ehrenberg M., Tenson T., Elf J., Haurlyuk V.: Positive allosteric feedback regulation of the stringent response enzyme RelA by its product. *EMBO Rep.* **13**, 835–839 (2012)
99. Silo-Suh L., Suh S.-J., Sokol P.A., Ohman D.E.: A simple alfalfa seedling infection model for *Pseudomonas aeruginosa* strains associated with cystic fibrosis shows AlgT ( $\sigma$ -22) and RhlR contribute to pathogenesis. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15699–15704 (2002)
100. Solomon J.M., Lazazzera B.A., Grossman A.D.: Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* **10**, 2014–2024 (1996)
101. Sonenshein A.L.: CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 203–207 (2005)
102. Srivatsan A., Wang J.D.: Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 100–105 (2008)
103. Steinchen W., Bange G.: The magic dance of the alarmones (p)ppGpp. *Mol. Microbiol.* **101**, 531–544 (2016)
104. Strugeon E., Tilloy V., Ploy M.-C., Da Re S.: The stringent response promotes antibiotic resistance dissemination by regulating integron integrase expression in biofilms. *MBio.* **7**, e00868-16 (2016)
105. Suh S.-J., Silo-Suh L., Woods D.E., Hassett D.J., West S.E.H., Ohman D.E.: Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181**, 3890–3897 (1999)
106. Taylor C.M., Beresford M., Epton H.A.S., Sigeo D.C., Shama G., Andrew P.W., Roberts I.S.: *Listeria monocytogenes relA* and *hpt* mutants are impaired in surface-attached growth and virulence. *J. Bacteriol.* **184**, 621–628 (2002)
107. Trigui H., Dudyk P., Oh J., Hong J.-I., Faucher S.P.: A regulatory feedback loop between RpoS and SpoT supports the survival of *Legionella pneumophila* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 918–928 (2015)
108. Van Delden C., Comte R., Bally M.: Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**, 5376–5384 (2001)
109. Vinella D., Albrecht C., Cashel M., D’Ari R.: Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **56**, 958–970 (2005)
110. Walker T.S., Bais H.P., Déziel E., Schweizer H.P., Rahme L.G., Fall R., Vivanco J.M.: *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiol.* **134**, 320–331 (2004)
111. Wang J.D., Sanders G.M., Grossman A.D.: Nutritional control of elongation of DNA replication by (p)ppGpp. *Cell*, **128**, 865–875 (2007)
112. Wendrich T.M., Blaha G., Wilson D.N., Marahiel M.A., Nierhaus K.H.: Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Mol. Cell*, **10**, 779–788 (2002)

113. Winzer K., Williams P.: Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**, 131–143 (2001)
114. Xiao H., Kalman M., Ikehara K., Zemel S., Glaser G., Cashel M.: Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J. Biol. Chem.* **266**, 5980–5990 (1991)
115. Zhang H.-B., Wang C., Zhang L.-H.: The quorumone degradation system of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by starvation signal and stress alarmone (p)ppGpp. *Mol. Microbiol.* **52**, 1389–1401 (2004)
116. Zulianello L., Canard C., Köhler T., Caille D., Lacroix J.-S., Meda P.: Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **74**, 3134–3147 (2006)
117. Zuo Y., Wang Y., Steitz T.A.: The mechanism of *E. coli* RNA polymerase regulation by ppGpp is suggested by the structure of their complex. *Mol. Cell*, **50**, 430–436 (2013)