

## ROLA KOMPONENTÓW ODPOWIEDZI ŚCISŁEJ W REGULACJI WIRULENCJI

Klaudyna Krause\*, Klaudia Milewska, Agnieszka Szalewska-Pałasz

Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii, Uniwersytet Gdański

Wpłynęło w styczniu, zaakceptowano w maju 2019r.

**Streszczenie:** Celem istnienia każdego organizmu żywego jest przetrwanie i przekazanie materiału genetycznego komórkom potomnym. Patogen po infekcji gospodarza musi pokonać jego barierę obronną. Wykorzystuje do tego cechy związane z wirulencją, takie jak możliwości inwazji komórek i tkanek, przywieranie do powierzchni, wytwarzanie toksyn. Liczne patogeny łączą swoje szlaki wirulencji z ogólnymi mechanizmami umożliwiającymi adaptację do zmieniających się warunków środowiska. Wiele z nich wykorzystuje w tym celu globalny mechanizm reakcji bakterii na stany stresu – odpowiedź ścisłą. W artykule omówiono, w jaki sposób komponenty odpowiedzi ścisłej wpływają na wirulencję bakterii patogennych.

1. Wprowadzenie. 2. Metabolizm (p)ppGpp. 2.1. Cele regulatorowe (p)ppGpp. 3. Wirulencja a adaptacja do niekorzystnych warunków środowiska. 4. Udział odpowiedzi ścisłej w wirulencji bakterii Gram-ujemnych. 4.1. *Escherichia coli* EHEC. 4.2. *Escherichia coli* UPEC. 4.3. *Shigella flexneri*. 4.4. *Vibrio cholerae*. 4.5. *Salmonella enterica*. 4.6. *Pseudomonas aeruginosa*. 4.7. *Francisella tularensis*. 4.8. *Bordetella pertussis*. 5. Udział odpowiedzi ścisłej w wirulencji u bakterii Gram-dodatnich. 5.1. *Enterococcus faecalis*. 5.2. *Bacillus anthracis*. 5.3. *Staphylococcus aureus*. 5.4. *Streptococcus pyogenes*. 5.5. *Listeria monocytogenes*. 6. Wpływ odpowiedzi ścisłej na wirulencję *Mycobacterium tuberculosis*. 7. Podsumowanie

### THE ROLE OF THE STRINGENT COMPONENTS IN THE REGULATION OF VIRULENCE

**Abstract:** The aim of the existence of every organism is to survive and replicate its genetic material. The pathogen, after infection of the host, has to overcome the host's defensive barrier. For this, bacterial pathogens use virulence-related factors, such as cell and tissue invasion, adhesion to the surface and toxin production. Numerous pathogenic microorganisms combine their virulence pathways with general mechanisms that allow their adaptation to changing environmental conditions. For this purpose, many bacteria use the global mechanisms of reaction to a stress condition, the stringent response. Here we discuss how the components of stringent response influence the virulence of pathogenic bacteria.

1. Introduction. 2. Metabolism of (p)ppGpp. 2.1. Regulatory targets of (p)ppGpp. 3. Virulence and adaptation to adverse environmental conditions. 4. The role of stringent response in the virulence of Gram-negative bacteria. 4.1. *Escherichia coli* EHEC. 4.2. *Escherichia coli* UPEC. 4.3. *Shigella flexneri*. 4.4. *Vibrio cholerae*. 4.5. *Salmonella enterica*. 4.6. *Pseudomonas aeruginosa*. 4.7. *Francisella tularensis*. 4.8. *Bordetella pertussis*. 5. The role of stringent response in the virulence of Gram-positive bacteria. 5.1. *Enterococcus faecalis*. 5.2. *Bacillus anthracis*. 5.3. *Staphylococcus aureus*. 5.4. *Streptococcus pyogenes*. 5.5. *Listeria monocytogenes*. 6. The effect of the stringent response on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** bakterie patogenne, czynniki wirulencji, odpowiedź ścisła, (p)ppGpp

**Key words:** pathogenic bacteria, virulence factors, stringent response, (p)ppGpp

### 1. Wprowadzenie

Wszystkie mikroorganizmy dążą do przetrwania i replikacji materiału genetycznego. W celu monitorowania i adaptacji do szybko zmieniających się warunków środowiska naturalnego, bakterie wytworzyły szereg globalnych systemów regulacyjnych. Brak składników odżywczych, tlenu, niedobór aminokwasów, głód węglowy, prowadzą do zmian w metabolizmie komórki bakteryjnej [18]. Jednym z mechanizmów, który umożliwia przeżycie bakteriom w niekorzystnych warunkach środowiskowych jest odpowiedź ścisła. Indukcja tej odpowiedzi związana jest z syntezą czterofosforanu guanozyny (ppGpp) i pięciofosforanu

guanozyny (pppGpp) w komórce bakteryjnej [69]. Wzrost poziomu tych alarmonów, określanych wspólnie jako (p)ppGpp, w komórce prowadzi do zmian w jej metabolizmie, pozwalających przetrwać warunki stresu i niedoboru.

Patogeny, aby zainfekować organizm gospodarza, muszą pokonać bariery obronne organizmu, tj. skórę, błony śluzowe, niskie pH żołądka czy układ odpornościowy. W tym celu wytwarzają czynniki związane z etapami wirulencji, takimi jak adhezja powierzchniowa, inwazja komórek czy tkanek, wytwarzanie toksyn. Wiele różnych gatunków bakterii patogennych łączy swoje szlaki wirulencji z ogólną adaptacją, taką jak odpowiedź SOS, czy odpowiedź ścisła.

\* Autor korespondencyjny: Klaudyna Krause, Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii, Uniwersytet Gdański, ul. Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk; e-mail: klaudyna.krause@phdstud.ug.edu.pl

## 2. Metabolizm (p)ppGpp

Poziom (p)ppGpp regulowany jest głównie przez dwie klasy enzymów. Należą do nich jednofunkcyjne syntetazy i hydrolazy albo dwufunkcyjne enzymy posiadające funkcję syntetazy i hydrolazy (p)ppGpp. Odpowiedź ściśłą opisano dokładnie dla modelowych bakterii, Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. U *Escherichia coli* poziom cztero- i pięcioletfosforanu guanozyny kontrolowany jest przez aktywność produktów genów *relA* i *spoT*. ppGpp i pppGpp mogą być syntetyzowane przez białka RelA i SpoT, a powstają odpowiednio z GDP lub GTP oraz ATP. Z kolei dwufunkcyjne SpoT ma również zdolność hydrolizy ppGpp do GDP i pirofosforanu (PPi) oraz pppGpp do GTP i PPi. Większość *Gammaproteobacteria* i część *Betaproteobacteria*, takich jak *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* posiadają enzymy RelA i SpoT. Bakterie Gram-dodatnie (*Bacillus anthracis*, *B. subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus coelicolor*, *Enterococcus faecalis*) posiadają zarówno dwufunkcyjne białka RSH (RelA/SpoT homologue), jak i małe syntetazy RelP i RelQ. Obecność małych syntetaz stwierdzono także u niektórych bakterii posiadających enzymy Rel i SpoT jak np. syntetaza RelV u Gram-ujemnej *Vibrio cholerae* [19]. Istnienie wielu enzymów związanych z syntezą i hydrolizą alarmonów odpowiedzi ściślej potwierdza, że bakterie wykształciły wszechstronne mechanizmy kontrolujące poziom (p)ppGpp.

U bakterii posiadających dwa odrębne białka, indukcja odpowiedzi ściślej przez RelA zachodzi podczas głodu aminokwasowego, gdy dochodzi do zahamowania translacji na skutek braku naładowanego tRNA odpowiednim aminokwasem. Jest to sygnałem dla białka RelA związanego z rybosomem do syntezy (p)ppGpp [69]. Natomiast synteza alarmonów przez białko SpoT stymulowana jest podczas głodu węglowego, niedoboru źródła fosforu, żelaza, jak również w wyniku niedoboru kwasów tłuszczowych. Dotychczas poznany został częściowo tylko mechanizm regulacji syntezy (p)ppGpp w odpowiedzi na limitację kwasów tłuszczowych. W indukcji tej odpowiedzi uczestniczy mediator ACP (Acyl Carrier Protein) [69], który zaangażowany jest w wiązanie kwasów tłuszczowych. Choć mechanizm działania nie jest do końca poznany, to na interakcję białka ACP z nieenzymatyczną domeną TGS białka SpoT, wpływa stosunek nieacylowanego do acylowanego ACP, umożliwiając bakteriom wykrycie biosyntezy kwasów tłuszczowych w komórce. Relację tę zauważono w komórkach *E. coli*, *B. subtilis* i *P. aeruginosa* [9]. Białko SpoT pełni jednocześnie bardzo ważną rolę hydrolazy (p)ppGpp, obniżając szybko poziom alarmonu w sytuacji ustąpienia warunków stresowych.

Cząsteczka (p)ppGpp pełni istotną rolę nie tylko w regulacji metabolizmu bakterii podczas zmian warunków zewnętrznych. Stężenie (p)ppGpp wzrasta

także podczas przejścia bakterii w fazę stacjonarną wzrostu, co jest niezbędne przy aktywacji ekspresji genów transkrybowanych przez polimerazę RNA związaną z podjednostką sigma S [38]. Co ciekawe, (p)ppGpp jest obecne w komórce w niskich stężeniach nawet podczas optymalnych warunków, będąc bardzo istotnym regulatorem tempa wzrostu bakterii [70].

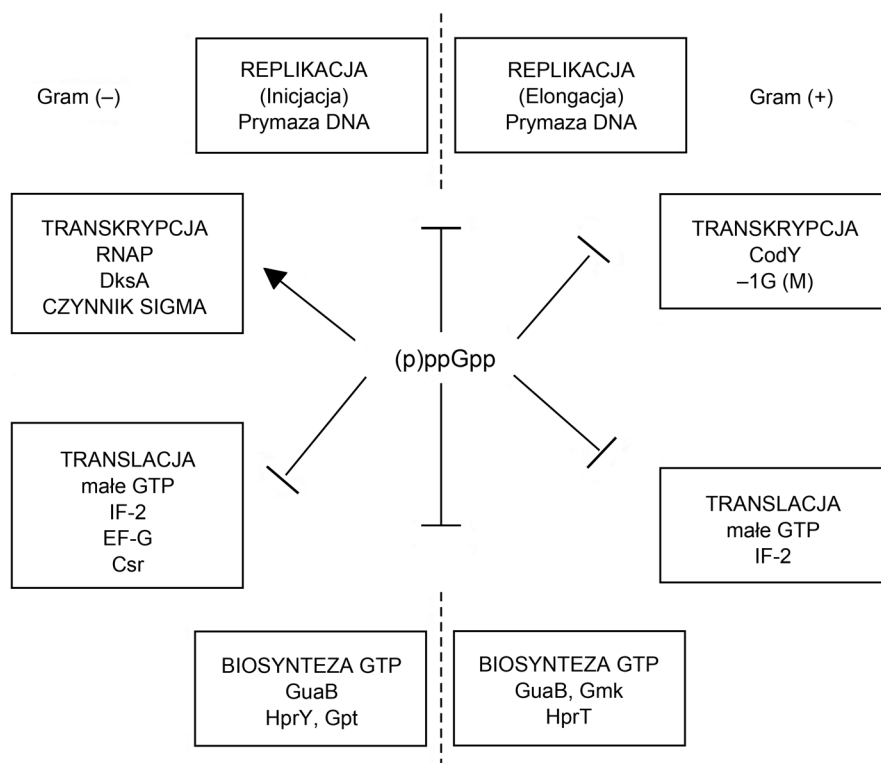
### 2.1. Cele regulatorowe (p)ppGpp

Alarmon odpowiedzi ściślej reguluje poziom ekspresji genów bakteryjnych poprzez kontrolę transkrypcji za pomocą pośrednich i bezpośrednich mechanizmów, umożliwiając komórce przetrwanie czasu stresu. Badania strukturalne wykazały, że czterofosforan guanozyny oddziałuje bezpośrednio z polimerazą RNA [51, 93] wpływając na jej centrum katalityczne i w konsekwencji na stabilność kompleksów tworzonych przez polimerazę RNA i rejon promotorowy genu podczas inicjacji transkrypcji. (p)ppGpp może wywierać pozytywny, jak i negatywny wpływ na ekspresję genów [18], w rezultacie prowadząc do zahamowania procesów związanych z wysokim nakładem energii, np. wzrostem i podziałem komórki, syntezą stabilnych RNA (rRNA) czy kwasów tłuszczowych [21, 69]. Działanie (p)ppGpp, poza bezpośrednim wiązaniem z polimerazą RNA, może być także pośrednie, przez wpływ na inne regulatory lub czynniki sigma (ich poziom i zdolność dołączania się do rdzenia polimerazy RNA).

Działanie (p)ppGpp na potencjał transkrypcyjny komórki może być modulowane przez białko DksA, będące czynnikiem transkrypcyjnym wiążącym się z polimerazą RNA. W przypadku *E. coli*, białko DksA, uważane jest głównie za czynnik wspomagający działanie (p)ppGpp zarówno w jego aktywującym, jak i hamującym działaniu [64, 65]. Nie wykazano obecności białka DksA u wielu gatunków bakterii.

U *Bacillus subtilis*, modelowego gatunku bakterii typu *Firmicutes*, działanie (p)ppGpp nie przebiega za pośrednictwem polimerazy RNA. Wpływ (p)ppGpp na metabolizm *B. subtilis* zachodzi głównie poprzez regulację poziomu GTP w komórce, na skutek obniżania poziomu tego nukleotydu przez zużycie podczas syntezy (p)ppGpp oraz wskutek zahamowania aktywności enzymów uczestniczących w syntezie GTP, Gmk i HprT [44]. Obniżenie poziomu GTP, nukleotydu startowego dla rRNA, powoduje zmniejszenie tempa inicjacji ich transkrypcji [43]. Dodatkowo, niski poziom GTP wpływa na aktywność regulatora transkrypcji CodY, jednego z ważnych czynników transkrypcyjnych *B. subtilis* [44]. Taki mechanizm działania (p)ppGpp został wykazany także dla innych gatunków i jest prawdopodobnie wspólny dla bakterii Gram-dodatnich.

Poza wpływem na transkrypcję, celem działania (p)ppGpp jest również replikacja DNA, gdzie alarmony te



Ryc. 1. Główne cele regulacyjne (p)ppGpp u *Firmicutes* i *Gammaproteobacteria*. Nukleotydy odpowiedzi ścisłej zmieniają metabolizm komórki poprzez bezpośrednie bądź pośrednie wiązanie się z różnymi enzymami. (Rycina zmieniona na podstawie Gaca i wsp. 2015)

mogą wpływać na poziom białka inicjatorowego DnaA [15]. Ponadto, również proces elongacji replikacji może być regulowany przez (p)ppGpp, poprzez działanie na prymazę DNA, białko DnaG, co wykazano zarówno dla *E. coli*, jak i *B. subtilis* [47, 88].

### 3. Wirulencja a adaptacja do niekorzystnych warunków środowiska

Zdolność drobnoustroju do wywołania choroby zwana jest wirulencją. O tym, czy drobnoustrój jest zjadliwy decyduje umiejętność zakażenia, inwazyjność, czy też toksyczność bakterii [30]. Każdy gatunek bakterii posiada zestaw czynników wirulencji determinujących wystąpienie objawów chorobowych. Należą do nich między innymi rżęski, endo- i egzotoksyny, czy wszelkiego rodzaju enzymy, jak również zdolność tworzenia biofilmu, czy wytwarzania przetrwalników. Do patogenów zaliczamy m.in. bakterie przewodu pokarmowego człowieka: *E. coli* EHEC (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*), *E. faecalis*, *Shigella flexnerii* czy *V. cholerae* oraz bakterie układu moczowego – *E. coli* UPEC (Uropathogenic *Escherichia coli*). *Staphylococcus aureus* występująca w jamie nosowo-gardłowej oraz na skórze ludzi, czy *Bordetella pertussis* – patogen układu oddechowego. Warunki bytowe gospodarza i jego mechanizmy obronne (układ odpornościowy) tworzą stresujące śro-

dowisko dla infekujących go bakterii patogennych. Dlatego adaptacja mikroorganizmów do stresu wywołanego zmianami środowiskowymi jest ważna w przetrwaniu patogenu. Szereg badań odpowiedzi ścisłej wykazał powiązanie tego mechanizmu nie tylko z reakcją bakterii na głód aminokwasowy, jak początkowo sądzono, ale również z innymi rodzajami stresów. Badania wskazały, że mechanizm ten wpływa na wiele procesów komórkowych, w tym także na wirulencję bakterii.

### 4. Udział odpowiedzi ścisłej w wirulencji bakterii Gram-ujemnych

#### 4.1. *Escherichia coli* EHEC

Większość szczepów *E. coli* występuje w jelicie człowieka jako komensale, wśród nich znajdują się jednak także szczepy patogenne. Wyjątkowo zjadliwy enterokrwotoczny szczep EHEC (Enterohaemorrhagic *E. coli*) produkuje toksyny Shiga (Stx), powodujące szerokie spektrum objawów chorobowych, m.in. zespół hemolityczno-mocznicowy (HUS, Haemolytic-Uremic Syndrome). Zespół ten charakteryzuje się ostrą niewydolnością nerek, anemią hemolityczną i małopłytkowością. Niektóre czynniki wirulencji kodowane są na wyspie patogenności LEE (Locus of Enterocyte Effacement). Do czynników tych należą geny związane z adhezją bakterii,

niszczeniem ludzkich erytrocytów, czy geny kodujące system sekrecji typu III (T3SS) [72]. Ekspresja genów LEE aktywowana jest przez białko Ler, jak również przez regulatory Pch, które jednocześnie aktywują transkrypcję *ler*. Dodatkowo ekspresja regulowana jest przez czynniki środowiskowe, poprzez działanie czynników transkrypcyjnych [40]. Adaptacja do zmieniających się warunków środowiskowych jest niezbędna do przeżycia bakterii i infekcji, co możliwe jest dzięki indukcji odpowiedzi ściślej. W komórkach *E. coli* do syntezy (p)ppGpp dochodzi z wykorzystaniem dwóch dróg syntezy (p)ppGpp: RelA-zależnej i SpoT-zależnej. Akumulacja czterofosforanu guanozyny w komórkach EHEC aktywuje ekspresję genów operonów LEE i zwiększa zdolność adhezji bakterii [58]. Białko Ler, kodowane przez pierwszy gen operonu LEE1, koordynuje aktywację ekspresji pozostałych czterech operonów LEE, jak również aktywację efektorów związanych z systemem sekrecji T3SS [52]. Zależność aktywacji ekspresji operonu LEE od (p)ppGpp została opisana przez Nakanishi i wsp. [58]. Po indukcji ekspresji *relA* transkrypcja genów LEE została aktywowana w ciągu 20 minut, obserwowano to także bez wprowadzenia hodowli w stan głodu. Ekspresja regulatorów transkrypcji LEE: *ler* i *pchABC*, była aktywowana przez ppGpp. Dodatkowo promotory *ler* i *pch* były bezpośrednio aktywowane przez ppGpp w układzie transkrypcyjnym *in vitro*. Odkrycia te sugerują, że regulacja ekspresji genów wirulencji u bakterii EHEC jest zintegrowana z mechanizmem odpowiedzi ściślej [58]. Jednakże, analiza mechanizmu ekspresji genów *stx* prowadzi do wniosków, że nie zawsze (p)ppGpp jest czynnikiem regulującym pozytywnie syntezę czynników wirulencji. W przeciwieństwie do innych czynników wirulencji, toksyny Shiga kodowane są w genomie bakteriofagów lambdoidalnych występujących w szczepach EHEC w postaci profagów [46]. Ekspresja genów *stx* następuje po indukcji profaga i rozpoczęciu przez niego rozwoju litycznego. Dochodzi do masowej produkcji toksyny, która uwalniana jest w wyniku lizy komórki bakteryjnej, prowadząc do charakterystycznych objawów chorobowych. W związku z tym, w zwalczaniu zakażeń wywołanych przez EHEC użycie antybiotyków może przynieść efekty odwrotne do zamierzonych. Wiele antybiotyków, prowadząc do uszkodzeń DNA, powoduje indukcję systemu SOS, a co za tym idzie, indukcję profagów z genomu gospodarza *E. coli*, prowadząc do uwalniania toksyny w jelitach mimo zahamowania wzrostu bakterii. Zastosowanie izotiocyjanianów (ITC, substancji produkowanych przez rośliny z rodzaju *Brassicaceae*): fenetylu (PEITC), benzylu (BITC), allilu (AITC) oraz sulforafanu, jako substancji antibakteryjnych, prowadziło nie tylko do efektywnego działania bakteriobójczego, ale także zahamowania ekspresji genów toksyny Shiga [60]. Badania wykazały, że podstawą mechanizmu działania antybakteryjnego ITC była

indukcja odpowiedzi ściślej na drodze głodzenia aminokwasowego i zahamowanie transkrypcji z promotorów fagowych, i konsekwentnie, produkcji toksyn [60].

#### 4.2. *Escherichia coli* UPEC

Zakażenia układu moczowego stanowią jeden z najważniejszych problemów klinicznych. W Polsce klasyfikowane są one na drugim miejscu (po infekcjach układu oddechowego). Najczęstszym czynnikiem etiologicznym tych zakażeń są uropatogenne szczepy *E. coli* (UPEC). Czynniki ich wirulencji zazwyczaj zlokalizowane są na chromosomie bakteryjnym [56]. Do najważniejszych należą adhezyny i inwazyjne umożliwiające bakteriom kolonizację komórek gospodarza oraz toksyny, np. alfa-hemolizyny lub cytotoksyczne czynniki nekrozy 1 (CNF1) [20]. Adhezyny warunkują przyleganie bakterii do komórek nabłonka dróg moczowych, zapobiegając wypłukiwaniu drobnoustrojów. Dodatkowo, w wyniku adhezji, dochodzi do aktywacji szlaków sygnalizacyjnych, ułatwiając oddziaływanie toksyn na komórki gospodarza [53]. Dla patogenów, takich jak UPEC, kluczową adhezyną jest fimbria typu 1 [39]. Geny kodujące fimbrie typu 1 kodowane są w operonie *fimAICDFGH*. Liczne badania wykazały, że odpowiedź komórki na stres środowiskowy, wysoka osmolarność, pH, czy zmiany temperatury wpływają na ekspresję genów kodujących fimbrie typu 1 [76]. Zaobserwowano także, że w szczepach ppGpp<sup>0</sup> formowanie biofilmu było zredukowane, co związane jest z regulacją ekspresji genów *fim* przez ppGpp [1].

#### 4.3. *Shigella flexnerii*

Wewnętrzny patogen *S. flexnerii* jest Gram-ujemną, nieurzęsioną pałeczką, która odpowiada za szigelozę (czerwonkę bakteryjną), objawiającą się biegunką, gorączką i bólem brzucha [74]. Zidentyfikowano wiele czynników wirulencji *S. flexnerii* kodowanych zarówno na chromosomie, jak i plazmidzie tego gatunku bakterii [61]. Rozprzestrzenianie się bakterii w komórkach jelita cienkiego jest kluczowym elementem wirulencji *S. flexnerii*. Bakteria do tego celu wykorzystuje białko błony zewnętrznej IcsA. W kontroli ekspresji wielu genów wirulencji w komórkach *S. flexnerii* zaangażowane jest białko DksA. Jest ono niezbędne do wydajnej transkrypcji białka Hfq w komórkach *S. flexnerii* [78]. Pierwotnie Hfq odkryto w komórkach *E. coli*, jako czynnik gospodarza, który wykorzystywany jest przez replikazę bakteriofaga RNA Qb do inicjacji syntezy dodatnich nici [27]. Białko to jest plejotropowym, potranskrypcyjnym regulatorem, który działa jak białko opiekuńcze RNA, kontrolując stabilność mRNA, wpływając na różnorodne funkcje komórki, m.in. szybkość wzrostu, czas tworzenia biofilmu, wiązanie azotu



czy przetrwanie w warunkach stresowych [91]. Do rozprzestrzenienia się *S. flexnerii* wymaga aktywności DksA, które bezpośrednio aktywuje transkrypcję Hfq. Badania przeprowadzone przez Sharma i Payne wykazały, że ekspresja genu białka Hfq była obniżona u mutantu  $\Delta dksA$  w porównaniu do szczepu typu dzikiego. Naukowcy w teście transkrypcji *in vitro* określili, że dodanie DksA zwiększyło ekspresję *hfq* a efekt ten był dodatkowo zwiększany w obecności ppGpp [78].

#### 4.4. *Vibrio cholerae*

Enterotoksyczna bakteria *Vibrio cholerae*, będąca czynnikiem etiologicznym cholery, wytworzyła szereg przystosowań umożliwiających jej przeżycie zarówno w zbiornikach wodnych jak i układzie pokarmowym. Do czynników wirulencji przecinkowca cholery należą toksyna RTX (Repeats In Toxin), toksyna cholery (CT), hemaglutynina (Hap), hemolizyna (HlyA) czy pilus związany z toksyną (TCP) (potrzebny do adhezji i kolonizacji jelita cienkiego) [50]. Podobnie, jak w przypadku innych bakterii Gram-ujemnych, poziom (p)ppGpp regulowany jest przez produkty genów *relA* i *spoT*. Dodatkowo w komórkach *V. cholerae* w przypadku głodu wywołanego niedoborem kwasów tłuszczowych i glukozy, indukcja odpowiedzi ścisłej zachodzi przy udziale produktu genu *relV* [62]. Zauważono, że regulacja ekspresji genów wirulencji związana może być ze zmianami w środowisku, w którym rosną bakterie. Wykazano, że zagęszczenie bakterii wpływa na ekspresję genów wirulencji, kontrolowanych przez system QS (Quorum Sensing), a odpowiedź ścisła kontroluje powiązanie czynników wirulencji z fazą wzrostu, w której znajdują się komórki. Badania Boardmana i wsp. wykazały, że toksyna RTX nie jest wydzielana na zewnątrz w czasie stacjonarnej fazy wzrostu, co było spowodowane negatywnym wpływem ppGpp na promotory genów związanych z produkcją toksyny; wynikający z obecności w rejonie promotorowym sekwencji dyskryminatora bogatej w pary GC [12]. Wskazywano, że syntetazą ppGpp zaangażowaną w wirulencję jest RelA [36]. Szczepy z mutacją w genie *relA* niezdolne do akumulacji ppGpp podczas głodu aminokwasowego [79] wykazywały obniżony poziom ekspresji genów toksyny cholery oraz pilusa związanego z toksyną (TCP), zmieniony poziom poryn *OmpU* i *OmpT*, ograniczoną zdolność ruchu, a także zredukowaną zdolność kolonizacji w jelicie myszy [36]. Geny kodujące czynniki wirulencji *V. cholerae* są wspólnie regulowane tworząc regulon ToxR [11]. Jego indukcja rozpoczyna się od aktywacji ekspresji *tcpPH* przez związanie do jego promotora *AphA* i *AphB*. Następnie *TcpP* w połączeniu z *ToxR*, aktywują ekspresję genów toksyny *ctxAB*. Bezpośrednio na aktywację ekspresji genów kodujących CT i TCP wpływa *ToxT* [11]. W badaniach transkryp-

cji genów CT i TCP w mutantach  $\Delta relA$  zaobserwowano spadek poziomu ekspresji tych genów wynikający z obniżenia efektywności transkrypcji genu *toxR* [36]. Oprócz tego wykazano, że syntetaza (p)ppGpp niezbędna jest do transkrypcji genów kodujących egzopolisacharydy biofilmu *vpsR* i *vpsT* w komórkach *V. cholerae* [37]. Istotną rolę w wirulencji *V. cholerae* odgrywa także białko DksA. Jego synergistyczna rola w regulacji ekspresji genów znajdujących się pod kontrolą odpowiedzi ścisłej (opisana w szczegółach dla *E. coli*) przejawia się u *V. cholerae* w postaci pozytywnej regulacji procesów związanych z wirulencją, takich jak ruchliwość, produkcja hemaglutyniny czy ekspresji genów toksyny cholery [63]. Co ciekawe, ostatnio wykazano, iż produkcja toksyny cholery jest regulowana przez DksA także post-transkrypcyjnie [9].

#### 4.5. *Salmonella enterica*

Bakteria *Salmonella enterica* należy do Gram-ujemnych, względnie beztlenowych patogenów zdolnych do ruchu za pomocą flagelli. Główną niszą kolonizowaną przez *S. enterica* jest układ pokarmowy człowieka i zwierząt hodowlanych, skąd gatunek ten wraz z odchodami dostaje się do wody, gdzie może infekować inne organizmy [3]. Po kolonizacji jelita, *S. enterica* dzięki zdolności aktywnego atakowania komórek fagocytycznych i nefagocytycznych poprzez układ sekrecyjny 1 typu III (T3SS1), którego geny kodowane są na wyspie patogenności 1 (SPI1 – *Salmonella* Pathogenicity Island 1), dostaje się do erytrocytów, komórek M i komórek dendrytycznych w nabłonku jelita. Następnie zostaje pochłonięta przez makrofagi i szybko przetransportowana przez krew do węzłów chłonnych i śledziony [73]. Wykorzystanie układu wydzielniczego T3SS1 jest ściśle regulowane przez ekspresję wielu czynników. Zaangażowane są w to białka efektorowe (*SipA*, *SipC*, *SopB/SigD*, *SopD*, *SopE2* i *SptP*) [86]. Cykl życiowy *S. enterica* w komórkach gospodarza wymaga dostosowania się do różnych warunków środowiskowych, tak aby nastąpiła ekspresja genów zaangażowanych w proces wirulencji. Czynnikiem koordynującym te procesy jest czterofosforan guanozyny, za którego metabolizm odpowiada u *S. enterica* zarówno *RelA*, jak i *SpoT* [66]. Badania zespołu Pizzaro-Cerda i Tedin wykazały, iż mutant  $\Delta relA \Delta spoT$  był awirulentny *in vitro* a jego wirulencja badana w modelu mysim była bardzo obniżona. Ponadto, zauważono, że mutant  $\Delta relA \Delta spoT$  utracił zdolność do kolonizacji wątroby i śledziony [66]. W celu skoordynowania infekcji komórek nabłonka jelita, *S. enterica* odpowiada na bodźce zewnętrzne poprzez aktywację ekspresji genów znajdujących się w obrębie SPI1. Indukcja genów *spi1* zachodzi poprzez odpowiedź na poziom ppGpp syntetyzowanego przez produkt genu *spoT*. Z kolei głód węglowy i ograniczenie

ilości tlenu powoduje zależną od ppGpp aktywację ekspresji genu *hilA* [66]. Białko HilA jest jednym z głównych czynników regulujących ekspresję genów wyspy patogenności SPI1, reguluje także ekspresję drugiego ważnego regulatora transkrypcji, białka InvF [66]. Do wirulencji *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium przyczynia się również białko DksA. Mutanty  $\Delta dksA$  wykazują mniejszą zdolność kolonizacji zwierząt, a w mysim modelu badawczym obserwowano 5-krotne obniżenie poziomu infekcji [89]. DksA pełni ważną rolę w formowaniu biofilmu, ruchliwości bakterii i ekspresji genów SPI1, stanowiąc istotny czynnik regulujący procesy wirulencji u *S. enterica* [7].

#### 4.6. *Pseudomonas aeruginosa*

Oprócz zdolności do przetrwania w różnych niszach ekologicznych, włączając glebę i wodę, pałeczka ropy błękitnej jest patogenem oportunistycznym, zarówno dla roślin, jak i najgroźniejszym drobnoustrojem powodującym zakażenia szpitalne, szczególnie groźne dla pacjentów chorych na mukowiscydozę. Bakteria *Pseudomonas aeruginosa* posiada wiele czynników odpowiedzialnych za patogenezę. Głównymi czynnikami chorobotwórczymi są: otoczka alginianowa, działająca jako czynnik adhezyjny, pilina związana ze wstępną kolonizacją, proteazy i toksyny, m.in. enterotoksyna czy egzotoksyna A. Pałeczka ropy błękitnej wytwarza picyjaninę, powodującą zahamowanie wzrostu innych gatunków bakterii [22]. Komórki bakteryjne komunikują się ze sobą z wykorzystaniem mechanizmu QS [31]. Systemy wyczuwania tego mechanizmu wykorzystują w komórkach bakterii Gram-ujemnych zwykle N-acetylo-homoserynolakton, który bezpośrednio wiąże się i aktywuje białko LasR regulujące transkrypcję [42]. Dzięki systemowi QS, *P. aeruginosa* koordynuje wydzielanie czynników wirulencji. Podobnie, jak *E. coli*, *P. aeruginosa* posiada dwufunkcyjne białko SpoT oraz białko RelA zaangażowane w akumulację ppGpp podczas głodu aminokwasowego. Mutanty  $\Delta relA$  *P. aeruginosa* wykazały mniejszą wirulencję w modelu badawczym *Drosophila melanogaster* [26], co może mieć związek z quorum sensing. Bakteria ta posiada również inny system QS, związany z p-chinolonem, który współpracuje z N-acetylo-homoserynolaktonem i kontroluje produkcję czynników wirulencji w stacjonarnej fazie wzrostu [42]. Zaobserwowano, że ilość picyjaniny, aktywność elastazy, czy ekspresja białek T3SS były obniżone w szczepie pozbawionym RelA i SpoT [92]. Poza naturalną opornością na wiele antybiotyków, *P. aeruginosa* posiada zdolność tworzenia biofilmu, dzięki któremu jest jeszcze bardziej odporny na antybiotykoterapię. Badania Stewarta i wsp. wykazały, że mutanty  $\Delta relA \Delta spoT$  pomimo tworzenia biofilmu tej samej gęstości, co komórki typu dzikiego, wykazywały

większą podatność na antybiotyk – cyprofloksacyne [83]. Wyżej wymienione wyniki wskazują, że ppGpp wymagany jest do regulacji wirulencji u *P. aeruginosa*.

#### 4.7. *Francisella tularensis*

Bakteria *Francisella tularensis* jest zjadliwym patogenem, bardzo łatwo rozprzestrzeniającym się drogą powietrzną, ze względu na niską dawkę infekcyjną [23]. Gatunek ten powoduje tularemię, będącą ostrą chorobą zakaźną ludzi i zwierząt. Tularemia u człowieka przyjmuje różne formy: wrzodziejącą, węzłową i płucną [4]. Geny wirulencji bakterii są zlokalizowane w obrębie ruchomych elementów genetycznych. Bakteria wytwarza otoczkę chroniącą ją przed układem immunologicznym, z kolei lipopolisacharyd, zwany endotoksyną bakteryjną, jest jednym z najbardziej istotnych komponentów wpływającym na przebieg infekcji. Ważnym czynnikiem wirulencji wielu bakterii Gram-ujemnych są pile typu IV. Biorą one udział w adhezji, mobilności i tworzeniu biofilmu. Po dostaniu się do organizmu ssaków *F. tularensis* wnika do makrofagów, gdzie dochodzi do indukcji ekspresji genu *mglA*, który niezbędny jest do wewnątrzkomórkowego wzrostu. Produkcja białka MglA indukowana jest w przeciągu 90 min. MglA wiąże się z innym białkiem – SspA. Kompleks ten współpracuje z RNAP kontrolując transkrypcję genów zlokalizowanych na wyspie patogenności FPI [29]. Obecność MglA jest niezbędna do wzrostu bakterii w makrofagach, jak również wpływa na chorobotwórczość. Wykazano, że kompleks MglA-SspA działa wspólnie z hipotetycznym białkiem PigR. Białko to wiąże DNA z alarmonem odpowiedzi ścisłej w celu regulacji ekspresji docelowych genów, takich jak *iglA* (kodujący białko systemu sekrecji typu IV-IglA) czy *pdpA* (Pathogenicity Determinant Protein) [14]. Patogen *F. tularensis* posiada zarówno białko RelA, jak i SpoT. U *F. tularensis* ssp. *holarctica*, mutanty  $\Delta relA \Delta spoT$  pozbawione zdolności do syntezy ppGpp wykazują obniżoną ekspresję genów wyspy patogenności, zmniejszoną zdolność do wzrostu w makrofagach, czy wirulencję w mysim modelu badawczym. Poziom ppGpp zależny od białka SpoT jest wystarczający do zjadliwości bakterii, ponieważ mutanty  $\Delta relA$  wykazują jedynie niewielkie defekty wirulencji. Dodatkowo ppGpp nie wpływa na interakcję pomiędzy MglA-SspA a RNAP, ale kontroluje ekspresję genów *mglA* i *sspA* zależną od PigR [14]. Poza tym, ppGpp wpływa także na białka regulatorowe kontrolujące wirulencję *F. tularensis* podczas infekcji.

#### 4.8. *Bordetella pertussis*

Pałeczka krztuśca jest Gram-ujemnym patogenem człowieka wywołującym chorobę układu oddechowego. Do czynników zjadliwości należą adhezyny: hemaglu-

tylina filamentowa, pertaktyna, białka fimbrii, LPS oraz toksyny, takie jak toksyna krztuścowa i tchawicza. Czynniki zjadliwości umożliwiają bakteriom adhezję do nabłonka błony śluzowej dróg oddechowych, bezpośrednią inwazję komórek nabłonka, niszczenie rzęsek układu oddechowego czy modulowanie odpowiedzi immunologicznej [24]. Ekspresja genów wirulencji regulowana jest przez system BvgAS. Białko BvgAS aktywuje produkcję czynników wirulencji: filamentację, hemaglutyninę, toksynę krztuśca i cyklazę adenylową [25]. Podobnie jak w komórkach *E. coli* podczas głodu aminokwasowego, alarmon odpowiedzi ścisłej syntetyzowany jest przez białka RelA i SpoT. Pałeczka krztuśca wytwarza fimbrie Fim3 [6], które kodowane są przez geny *fimBCD*. Badania Stanley i wsp. wykazały, że ekspresja genów kodujących białka Fim3 była obniżona w podwójnych mutantach  $\Delta relA \Delta spoT$  [81]. Kolejnym ważnym procesem związanym z patogennością tych bakterii jest tworzenie biofilmu. Jest to wieloetapowy proces tworzenia mikrokolonii i rozwoju wielowarstwowej struktury [81]. Rozwój biofilmu związany jest z adaptacją i przetrwaniem pałeczki krztuśca podczas infekcji [77]. Wykazano, że (p)ppGpp zaangażowany jest w regulację tworzenia biofilmu na podłożu. Mutant szczepu ppGpp<sup>0</sup> nie jest zdolny do przeżycia w warunkach głodu aminokwasowego, a także wykazuje zwiększoną podatność na stres oksydacyjny. W związku z tym, tworzenie biofilmu przez mutanty pozbawione odpowiedzi ścisłej jest ograniczone w porównaniu do szczepu typu dzikiego [84]. Struktury filamentów biofilmu szczepu typu dzikiego wykazują różnice w długości i morfologii, podczas gdy nie obserwowano takiego zróżnicowania u mutantów ppGpp<sup>0</sup> [84].

## 5. Udział odpowiedzi ścisłej w wirulencji bakterii Gram-dodatnich

### 5.1. *Enterococcus faecalis*

Paciorkowiec kałowy należący do bakterii Gram-dodatnich, występuje w przewodzie pokarmowym człowieka i innych ssaków. Może powodować zagrażające życiu zakażenia. Paciorkowiec kałowy *E. faecalis* posiada kilka czynników wirulencji, z których jedne sprzyjają kolonizacji, inne toksycznie działają na komórkę gospodarza. Do najważniejszych czynników zjadliwości należy substancja agregująca – AS (Aggregation Substance), która odpowiada za przyleganie enterokoków do komórek eukariotycznych. Cytolizyna (Cyl) jest jedną z toksyn produkowanych przez enterokoki. Powoduje ona rozpad erytrocytów, leukocytów i makrofagów [71]. Wykazano, że w komórkach *E. faecalis* głód aminokwasowy również prowadzi do akumulacji czterofosforanu guanozyny. W komórkach *E. faecalis* oprócz dwufunkcyjnego białka Rel produ-

kowana jest także mała syntetaza RelQ [32]. Mutanty  $\Delta rel$  są bardziej podatne na stres, taki jak szok temperaturowy, niskie pH, wysoką osmolarność, czy stres oksydacyjny [2]. Badania wskazują, że odpowiedź ścisła może być związana z wirulencją *E. faecalis*. Wykazano, że podwójne mutanty ppGpp<sup>0</sup> ( $\Delta relA \Delta relQ$ ) charakteryzowały się obniżonym poziomem wirulencji w modelu infekcyjnym *Caenorhabditis elegans* [2]. W doświadczeniu kontrolnym z użyciem pojedynczych mutantów  $\Delta rel$  i  $\Delta relQ$  nie zaobserwowano zmniejszenia wirulencji bakterii. Dodatkowo zauważono, że inaktywacja enzymu RelQ w mutancie  $\Delta rel$  przywraca zdolność białka RelA do hydrolizy ppGpp. Ponadto, mutanty  $\Delta rel$  wykazywały większą odporność na niskie pH, czy traktowanie komórek etanolem [94].

### 5.2. *Bacillus anthracis*

Laseczka wąglika jest bakterią Gram-dodatnią, rosnącą w warunkach tlenowych. Posiada zdolność wytwarzania przetrwalników. Do zakażenia zwierząt dochodzi w wyniku spożycia zanieczyszczonej przetrwalnikami paszy bądź wody. Główne czynniki wirulencji zlokalizowane są na dwóch plazmidach pXO1 i pXO2 [35]. Cykl życiowy *Bacillus anthracis* rozpoczyna się po spożyciu przetrwalników przez ssaki. Kolejno dochodzi do kiełkowania zarodników wewnątrz organizmu żywiciela i syntezy czynników wirulencji. Najważniejszym czynnikiem wirulencji jest toksyna będąca mieszaniną trzech białek – antygeny ochronnego PA (Protective Antigene), czynnika obrzęku EF (Edema Factor) i czynnika letalnego LF (Lethal Factor) [54]. PA umożliwia wniknięcie toksyny wąglika do wnętrza komórek. Czynniki EF to białko zależne od wapnia, które zwiększając poziom cAMP w komórce zaburza jej homeostazę. Z kolei LF to zależna od cynku proteaza, przecinająca kinazy z rodzaju MAPKK, prowadząc do zaburzeń szlaków przekazywania sygnału w komórce i do apoptozy. Ekspresja genów wirulencji regulowana jest przez główny czynnik regulacyjny AtxA. Doświadczalnie wykazano, że największa ekspresja genów toksyny laseczki wąglika występuje podczas wejścia bakterii w stacjonarną fazę wzrostu, co sugeruje, że ograniczenie składników odżywczych jest środowiskowym sygnałem, który indukuje produkcję toksyn [75]. Mutant *relA B. anthracis* nie wykazuje zmniejszonej ekspresji genów wirulencji, ale liczba endospor mutantów *relA* jest około 10 000 razy niższa niż w przypadku szczepu typu dzikiego [75]. Zależność pomiędzy syntezą (p)ppGpp a sporulacją wskazuje, że odpowiedź ścisła przyczynia się do przetrwania *B. anthracis* w środowisku naturalnym [75]. W komórkach *B. anthracis* wykazano także obecność drugiego genu – homologa *rsh*, którego produkt, Rsh<sub>Bant</sub>, uczestniczy w powstawaniu (p)ppGpp i może być związany z wirulencją bakterii [41].



### 5.3. *Staphylococcus aureus*

Gronkowiec złocisty jest jednym z głównych patogenów człowieka. Powoduje ropne zapalenia skóry, zatrucia pokarmowe, zapalenie płuc czy zespół wstrząsu toksycznego [28]. Gronkowiec *Staphylococcus aureus* wytwarza wiele czynników zjadliwości, takich jak białka powierzchniowe, toksyny uszkadzające tkanki, czy prowadzące do wstrząsu septycznego i białka hamujące chemotaksję [28]. Produkcja czynników jest ściśle regulowana podczas wzrostu bakterii. Jednym z mechanizmów tej regulacji jest system quorum sensing. Patogen ten posiada trzy syntetazy (p)ppGpp: bifunkcjonalne RSH oraz białka RelP i RelQ [59]. Dowiedziono, że mutanty  $\Delta relP$  i  $\Delta relQ$  wykazują obniżoną zdolność do przetrwania w obecności wysokich dawek antybiotyków niszczących ściany komórkowe w porównaniu do szczepu typu dzikiego [33]. Ponadto, wyniki wskazały, że mutanty niezdolne do syntezy (p)ppGpp mają obniżoną wirulencję [33].

### 5.4. *Streptococcus pyogenes*

Paciorkowiec *Streptococcus pyogenes* jest Gram-dodatnim ziarniakiem, zaliczanym do paciorkowców  $\beta$ -hemolizujących grupy A. Bakteria jest patogenem człowieka, posiadającym zdolność całkowitej hemolizy typu  $\beta$  [85], powoduje zapalenia gardła, anginę, jak również zapalenia skóry (liszajec) oraz płonice [13]. Do czynników wirulencji *S. pyogenes* należy egzotoksyna B (*speB*), streptolizyna S i streptokinaza (*covRS*) [34]. Podobnie, jak inne Gram-dodatnie bakterie, *S. pyogenes* posiada białka RelQ i RelP oraz bifunkcjonalne RSH [45]. Badania wykazały, że głódzenie aminokwasowe prowadziło do nadmiernej indukcji operonu *fas* (regulującego wirulencję) oraz wzrostu ekspresji genu autoinduktora 2 [82]. Podczas analizy wyników RT-PCR okazało się, że ekspresja genów *relA*, *graB* (wiąże białko G), *xpt* (fosforybozylotransferaza ksantynowa), *braB* (białko transportujące aminokwasy), *pbuX* (permeaza putynowa), *speH* (egotoksyna pirogenna H), *pyrR* (białko regulujące syntetazę pirymidyny), *pncA* (nikotynoamidaza) była negatywnie kontrolowana przez odpowiedź ścisłą [49].

### 5.5. *Listeria monocytogenes*

Gram-dodatnia *Listeria monocytogenes* jest zjadliwym patogenem przenoszonym drogą pokarmową. Atakuje przede wszystkim ludzi starszych, dzieci i obiety w ciąży prowadząc do listeriozy. Zakażenie rozpoczynane jest przez adhezję bakterii do powierzchni komórek, następnie na drodze fagocytozy dochodzi do wnikięcia bakterii do komórek gospodarza. Kluczowymi czynnikami wirulencji są listeriolizyna umożli-

wiająca lizę fagosomu oraz dwie fosfolipazy [55]. Głód aminokwasowy u *L. monocytogenes* wywołuje syntezę (p)ppGpp, za którą odpowiedzialny jest dwufunkcyjny produkt genu *relA* [87]. Zdolność *L. monocytogenes* do adhezji do powierzchni abiotycznej i tworzenia biofilmu, jak również infekcji organizmu myszy jest ograniczona w mutantach  $\Delta relA$  [87]. U bakterii Gram-dodatnich, globalny regulator CodY negatywnie reguluje ekspresję genów niezbędnych do adaptacji w warunkach ograniczonego dostępu składników odżywczych. Regulon CodY *L. monocytogenes* obejmuje geny zaangażowane w metabolizm aminokwasów, asymilację azotu, wirulencję, jak również wejście bakterii w stacjonarną fazę wzrostu [10]. Prawdopodobnie obniżony poziom patogenności mutantów  $\Delta relA$  może być spowodowany niezdolnością bakterii do wirulencji powiązaną z regulacją poziomu białka CodY. Zależność ta wyjaśniana jest represją transkrypcji genów regulonu CodY w mutantach  $\Delta relA$  [10]. Zatem, ppGpp wpływa na patogenność *L. monocytogenes* na wiele różnych sposobów.

## 6. Wpływ odpowiedzi ścisłej na wirulencję *Mycobacterium tuberculosis*

Gruźlica jest jedną z najstarszych opisanych chorób i ciągle jedną z największych przyczyn zgonów wśród zarażonych osób. Każdego roku z powodu gruźlicy umiera na świecie do 2 milionów ludzi. Czynnikiem etiologicznym gruźlicy jest *Mycobacterium tuberculosis*. Jest to Gram-dodatnia bakteria z charakterystyczną budową ściany komórkowej, która zawiera ok. 60% substancji lipidowych warunkujących kwasooporność. Prątek gruźlicy po wnikięciu do komórek gospodarza wchodzi w stan uśpienia do momentu pojawienia się sprzyjających warunków do dalszego rozwoju. Najczęstszą drogą zakażenia jest droga kropelkowa. Po dostaniu się do płuc, prątki są pochłaniane przez makrofagi pęcherzyków płucnych, ale dzięki kwasooporności są zdolne w nich przeżyć. Dodatkowo, *M. tuberculosis* blokuje fuzję fagosomów z lizosomami, przechodząc tym samym w stan utajony [48], który zainicjowany jest przez białko odpowiedzi ścisłej, zwane RelMtb. Enzym ten odpowiada za wzrost oporności bakterii na mechanizmy przeciwbakteryjne gospodarza, zmienia centralny metabolizm węgla i moduluje odpowiedź immunologiczną [17]. Białko RelMtb wykazuje aktywność hydrolazy i syntetazy ppGpp [5]. Wymagany na początku fazy latencji enzym RelMtb reaguje na warunki środowiskowe. W normalnych warunkach wzrostu poziom ppGpp wzrasta w stacjonarnej fazie podczas niedoboru węgla, co prowadzi do zahamowania łańcucha oddechowego, a dodatkowo zapewnia większą odporność na zmiany środowiskowe, czy kontroluje odpowiedź immunologiczną gospodarza



[17]. Dotychczasowe badania sugerują, że po okresie wewnątrzkomórkowej replikacji, synteza ppGpp przez RelMtb wywołana jest hipoksją, ale również może być rezultatem zmian w metabolizmie węgla. Białko CarD *M. tuberculosis* oddziałujące z RNAP, jest niezbędne do regulacji ekspresji genów rRNA, prawdopodobnie odpowiadając funkcjonalnie białku DksA [80]. Białko CarD bierze udział w odpowiedzi na stres oksydacyjny i niedobór składników odżywczych. Podobnie jak RelMtb, CarD jest niezbędne do efektywnej kolonizacji organizmu myszy. Oprócz tego, białko RelMtb wpływa również na ekspresję genów modyfikujących ścianę komórkową i silnych antygenów prątkowych [17]. *M. tuberculosis* akumuluje łańcuchy polifosforanowe poly(P), które zatrzymują rozwój patogenu i ułatwiają jego przetrwanie, gdy napotka warunki ograniczające wzrost, takie jak wyczerpanie fosforanów, głodzenie aminokwasowe, stres oksydacyjny, kwasowy, czy podczas przechodzenia w fazę stacjonarną [16]. U *M. tuberculosis* poly(P) syntetyzowane jest głównie przez polifosforanową kinazę PPK1, ale również PPK2. Dodatkowo patogen syntetyzuje dwie polifosfatazy PPX1 i PPX2, hydrolizujące poly(P) [16]. Badania *in vitro* wykazały, że (p)ppGpp bezpośrednio hamuje aktywność hydrolityczną PPX1 i PPX2, co prowadzi do akumulacji poly(P). Dowiedziono, że właściwa regulacja poziomów poly(P) jest ważna dla zjadliwości *M. tuberculosis*, a zdolność (p)ppGpp do regulowania poziomów poly(P) przez bezpośrednie hamowanie polifosfataz może być jednym z wielu mechanizmów, za pośrednictwem których odpowiedź ścisła wpływa na patogenność tych bakterii [16].

## 7. Podsumowanie

Odpowiedź ścisła jest mechanizmem umożliwiającym bakteriom przetrwanie w niesprzyjających warunkach środowiskowych. Mechanizm ten koordynowany jest przez specyficzne nukleotydy, cztero- i pięciofosforan guanozyny, które wpływają na szereg procesów w komórce w celu wzrostu zdolności do przeżycia bakterii w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Częsteczką (p)ppGpp indukuje zmiany transkrypcyjne prowadzące do represji transkrypcji genów zaangażowanych w szybki wzrost komórki, m.in. związanych z biosyntezą aminokwasów, czy pozyskiwaniem składników odżywczych. Dodatkowo alarmon odpowiedzi ścisłej hamuje aktywność prymazy DNA, czynników translacyjnych, czy enzymów biorące udział w biosyntezie GTP.

Liczne badania przyczyniły się do rozwoju wiedzy na temat wirulencji bakterii patogennych i ich zdolności do infekcji człowieka, wykazały różnice w rozwoju patogenów w zależności od warunków wzrostu,

a eksperymenty te rozszerzyły rozumienie procesów chorobotwórczych. Wyraźne dysproporcje fenotypowe w różnych warunkach wzrostu wskazują na skorelowanie ekspresji i działania czynników wirulencji ze zmianami zachodzącymi w środowisku. Poza udziałem odpowiedzi ścisłej w wielu procesach komórkowych umożliwiających adaptację bakterii do zmieniających warunków środowiskowych, alarmony stanu stresu pełnią ważną rolę w wirulencji patogenów. Wykazano, że wiele patogenów pozbawionych zdolności do ekspresji białek związanych z odpowiedzią ścisłą traci wirulencję. Przykładem mogą być bakterie *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium, której mutanty ppGpp<sup>0</sup> nie były zdolne do kolonizacji jelit w modelu badawczym myszy, czy zmniejszenie wydzielania picyjaniny, elastazy i obniżoną wirulencję u mutantów ppGpp<sup>0</sup> *P. aeruginosa*. Z kolei w przypadku bakterii *F. tularensis* obserwowano zmniejszenie patogenności w mutantach  $\Delta relA$   $\Delta spoT$ , ale wirulencja nie była zmieniona w mutantach  $\Delta relA$ . Co ciekawe, badania prowadzone w szczepach EHEC niezdolnych do odpowiedzi ścisłej wykazały zwiększoną indukcję bakteriofagów przenoszących geny toksyny Shiga. Niewątpliwie niektóre z podanych wyżej przykładów udowadniają, jak istotne jest dostosowanie bakterii do zmieniających się warunków środowiska, w którym żyją. Zmiany fizjologiczne zachodzące w warunkach stresowych nadają zwiększoną oporność i zjadliwość patogenom.

Niezwykle istotne wydaje się być poznanie wpływu mechanizmu odpowiedzi ścisłej na wirulencję patogenów, szczególnie dla poszukiwania nowych leków wykorzystujących ten mechanizm jako cel ich działania. Przykładem takiego związku jest relacyna, jako substancja hamująca produkcję ppGpp. Relacyna prowadzi do zahamowania aktywności RelA *in vitro* oraz zmniejszenie produkcji ppGpp *in vivo*. Co więcej, relacyna wpływa na wejście w stacjonarną fazę wzrostu bakterii Gram-dodatnich, co prowadzi do dramatycznego zmniejszenia żywotności komórek [90]. Dodatkowo naukowcy zauważyli, że tworzenie spor przez *B. subtilis* było zaburzone przez relacynę. Dzięki tym badaniom, ustalono, że relacyna, jako nowy analog ppGpp zakłóca długoterminowe strategie przetrwania bakterii [90]. Wyniki badań wskazujące na zmniejszenie wirulencji u mutantów ppGpp<sup>0</sup> *S. enterica* serowar Typhimurium zwróciły uwagę naukowców na możliwość wykorzystania tych szczepów jako żywych szczepionek. Badania wykazały, że mutanty ppGpp<sup>0</sup> były awirulentne w modelu badawczym myszy BALB/c, a wywoływały odpowiedź immunologiczną organizmu. Pojedyncza immunizacja mutantem ppGpp<sup>0</sup> *S. enterica* serowar Typhimurium skutecznie chroniła myszy przed *Salmonella* typu dzikiego [57]. Ponadto, interesujące dane uzyskane zostały w doświadczeniach z zastosowaniem syntetycznych peptydów. Te wpływające na biofilm

bakteryjny peptydy działały synergistycznie wraz z typowymi antybiotykami, zmniejszając ich efektywne stężenia. Wykazano, iż za ten efekt odpowiedzialne jest zaburzenie odpowiedzi ścisłej, zmniejszające tym samym wirulencję patogennych bakterii z grupy ESKAPE [67, 68]. Zdobyta wiedza o funkcjonowaniu mikroorganizmów w różnych warunkach środowiska, wymagań metabolicznych patogenu, ujawnia nowe możliwości kontroli patogenów i być może umożliwi wykorzystanie tej wiedzy do walki z rosnącą antybiotykoopornością wirulentnych mikroorganizmów.

#### Podziękowania

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki, z grantu nr UMO-2013/11/B/NZ2/02582 (ASP).

#### Piśmiennictwo

- Aberg A., Schingler V., Balsalobre C.: (p)ppGpp regulates type fimbriation of *Escherichia coli* by modulating the expression of the site-specific recombinase FimB. *Mol Microbiol.* **60**, 1520–1533 (2006)
- Abranches J., Martinez A.R., Kajfasz J.K., Charvez V., Garsin D.A., Lemos A.: The molecular alarmone (p)ppGpp mediates stress responses, vancomycin tolerance and virulence in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **191**, 2248–2256 (2009)
- Abulreesh H.H.: *Salmonellae* in the environment (w) *Salmonella* – distribution, adaptation, control measures and molecular technologies, red. B. Annous and J.B. Gurtler, IntechOpen, 2012, s. 19–50
- Anda P., Martínez Nawarro J.F.: Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. *Emerg. Infect. Dis.* **3**, 575–582 (2001)
- Avarbock D., Salem J., Li L.S., Wang Z.M., Rubin H.: Cloning and characterization of a bifunctional RelA/SpoT homologue from *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene*, **233**, 261–269 (1999)
- Ashworth L.A., Irons L.I., Dowsett, A.B.: Antigenic relationship between serotype-specific agglutinin and fimbriae of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **37**, 1278–1281 (1982)
- Azriel S., Goren A., Rahav G., Gal-Mor O.: The stringent response regulator DksA is required for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium growth in minimal medium, motility, biofilm formation, and intestinal colonization. *Infect. Immun.* **84**, 375–384 (2015)
- Basu P., Bhadra R.K.: Post-transcriptional regulation of cholera toxin production in *Vibrio cholerae* by the stringent response regulator DksA. *Microbiology*, **165**, 102–112 (2019)
- Battesti A., Bouveret E.: Bacteria possessing two RelA/SpoT-like proteins have evolved a specific stringent response involving to acyl carrier protein-SpoT interaction. *J. Bacteriol.* **191**, 616–624 (2009)
- Bennett H.J., Pearce D.M., Glenn S., Taylor C.M., Kuhn M., Sonenshein A.L., Andrew P.W., Roberts I.S.: Characterization of *relA* and *codY* mutants of *Listeria monocytogenes*: identification of the CodY regulon and its role in virulence. *Mol. Microbiol.* **63**, 1453–1467 (2007)
- Bina J., Zhu J., Dziejman M., Faruque S., Calderwood S., Mekalanos J.: ToxR regulon of *Vibrio cholerae* and its expression in vibrios shed by cholera patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2801–2806 (2003)
- Boardman B.K., Meehan B.M., Fullner Satchell K.J.: Growth phase regulation of *Vibrio cholerae* RTX toxin export. *J. Bacteriol.* **189**, 1827–1835 (2007)
- Carapetis J.R., Steer A.C., Mulholland E.K., Weber M.: The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet. Infect. Dis.* **5**, 685–694 (2005)
- Charity J.C., Blalock L.T., Costante-Hamm M.M., Kasper D.L., Dove S.L.: Small molecule control of virulence gene expression in *Francisella tularensis*. *PLoS Pathogen*, **5**, e1000641 (2009)
- Chiaromello A.E., Zyskind J.W.: Coupling of DNA replication to growth rate in *Escherichia coli*: a possible role for guanosine tetraphosphate. *J. Bacteriol.* **172**, 2013–2019 (1990)
- Chuang Y.M., Bandyopadhyay N., Rifat D., Rubin H., Bader J.S., Karakousis P.C.: Deficiency of the novel exopolyphosphatase Rv1026/PPX2 leads to metabolic downshift and altered cell wall permeability in *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio*, **6**, e02428 (2015)
- Dahl J.L., Kraus C.N., Boshoff H.I., Doan B., Foley K., Avarbock D., Kaplan G., Mizrahi V., Rubin H., Barry III C.E.: The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 10026–10031 (2003)
- Dalebroux Z.D., Swanson M.S.: ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 203–212 (2012)
- Das B., Pal R.R., Bag S., Bhadra R.K.: Stringent response in *Vibrio cholerae*: genetic analysis of *spoT* gene function and identification of a novel (p)ppGpp synthetase gene. *Mol. Microbiol.* **72**, 380–398 (2009)
- Davis J.M., Rasmussen S.B., O'Brien A.D.: Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function. *Infect. Immun.* **73**, 5301–5310 (2005)
- Dąbrowska G., Prusińska J., Goc A.: Odpowiedź ścisła – mechanizm adaptacyjnej odpowiedzi bakterii na warunki stresowe. *Post. Biochem.* **52**, 87–93 (2006)
- Delden Ch., Iglewski B.: Cell-to-cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Synopses*, **4**, 551–560 (1998)
- Dennis D.T., Tonat K.: Tularemia as a biological weapon: medical and public management. *JAMA*, **285**, 2763–2773 (2001)
- de Gouw D., Diavatopoulos D.A., Bootsma H.J., Hermans P.W., Mooi F.R.: Pertussis: a matter of immune modulation. *FEMS Microbiol.* **35**, 441–474 (2011)
- Deora R., Bootsma H.J., Miller J.F., Cotter P.A.: Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg intermediate phase gene. *Mol. Microbiol.* **40**, 669–683 (2001)
- Erickson D.L., Lines J.L., Pesci E.C., Venturi V., Storey D.G.: *Pseudomonas aeruginosa relA* contributes to virulence in *Drosophila melanogaster*. *Infect. Immun.* **72**, 5638–5645 (2004)
- Franze de Fernandez M.T., Eoyang, L., August, J.T.: Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. *Nature*, **219**, 588–590 (1968)
- Foster T.J.: The *Staphylococcus aureus* “superbug”. *J. Clin. Invest.* **114**, 1693–1696 (2004)
- Formińska K., Zasada A.A.: *Francisella tularensis* – podstępny patogen, *Post. Mikrobiol.* **56**, 187–195 (2017)
- Futoma-Kołoch B.: Toksyny bakteryjne jako czynniki wirulencji Część I. Lipopolisacharyd (LPS) jako endotoksyna, *Laboratorium Środowiskowe*, **7–8**, 28–31 (2010)
- Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P.: Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**, 269–275 (1994)
- Gaca A.O., Kudrin P., Colomer-Winter C., Beljantseva J., Liu K., Anderson B., Wang J.D., Rejman D., Potrykus K., Cashel M.,

- Hauryliuk V., Lemos J.A.: From (p)ppGpp to (pp)pGpp: characterization of regulatory effects of pGpp synthesized by the small alarmone synthetase of *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **197**, 2908–2919 (2015)
33. Geiger T., Kastle B., Gratani F.L., Goerke Ch., Wolz Ch.: Two small (p)ppGpp synthases in *Staphylococcus aureus* mediate tolerance against cell envelope stress conditions. *J. Bacteriol.* **196**, 894–902 (2013)
  34. Graham M.R., Smoot L.M., Migliaccio C.A., Virtaneva K., Sturdevant D.E., Porcella S.F., Federle M.J., Adams G.J., Scott J.R., Musser J.M.: Virulence control in group A *Streptococcus* by a two-component gene regulatory system: global expression profiling and *in vivo* infection modeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13855–13860 (2002)
  35. Hanna P.: Anthrax pathogenesis and host response. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **225**, 13–35 (1998)
  36. Haralalka S., Nandi S., Bhadra R.K.: Mutation in the *relA* gene of *Vibrio cholerae* affects *in vitro* and *in vivo* expression of virulence factors. *J. Bacteriol.* **185**, 4672–4682 (2003)
  37. He H., Cooper J.N., Mishra A., Raskin D.M.: Stringent response regulation of biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **194**, 2962–2972 (2012)
  38. Hirsch M., Elliott T.: Role of ppGpp in *rpoS* stationary-phase regulation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**, 5077–5087 (2002)
  39. Hung C.S., Bouckaert J., Hung D., Pinkner J., Widberg C., DeFusco A., Auguste C.G., Strouse R., Langermann S., Waxman G., Hultgren S.J.: Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Mol. Microbiol.* **44**, 903–915 (2002)
  40. Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.: Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 123–140 (2004)
  41. Kim S.K., Park M.K., Kim S.H., Oh K.G., Jung K.H., Hong C.H., Yoon J.W., Chai Y.G.: Identification of stringent response-related and potential serological proteins released from *Bacillus anthracis* overexpressing the RelA/SpoT homolog, *Rsh<sub>Bant</sub>*. *Curr. Microbiol.* **69**, 436–444 (2014)
  42. Kohler T., Buckling A., van Delden C.: Cooperation and virulence of clinical *Pseudomonas aeruginosa* populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 6339–6344 (2009)
  43. Krasny L., Tiserova H., Jonak J., Rejman D., Sanderova H.: The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response. *Mol. Microbiol.* **69**, 42–54 (2008)
  44. 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)
  45. Lemos J.A., Lin V.K., Nascimiento M.M., Abranches J., Burne R.A.: Three gene products govern (p)ppGpp production by *Streptococcus mutans*. *Mol. Microbiol.* **74**, 1568–1581 (2007)
  46. Lim J.Y., Yoon J.W., Hovde C.J.: A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 1–10 (2010)
  47. Maciąg M., Kochanowska M., Łyżeń R., Węgrzyn G., Szalewska-Pałasz A.: ppGpp inhibits the activity of *Escherichia coli* DnaG primase. *Plasmid*, **63**, 61–67 (2010)
  48. Manabe Y.C., Bishai W.R.: Latent *Mycobacterium tuberculosis* – persistence, patience and winning by waiting. *Nat. Med.* **6**, 1327–1329 (2000)
  49. Malke H., Steiner K., McShan W.M., Ferretti J.J.: Linking the nutritional status of *Streptococcus pyogenes* to alternation of transcriptional gene expression: The action of CodY and RelA. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**, 259–275 (2006)
  50. Matson J.S., Withey J.H., DiRita V.J.: Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect. Immun.* **75**, 5542–5549 (2007)
  51. 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)
  52. Mellies J.L., Barron A.M., Carmona A.M.: Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infect. Immun.* **75**, 4199–4210 (2007)
  53. Mirecka A.: Adhezja uropatogennych szczepów *Escherichia coli* do komórek nabłonka moczowego. Patomechanizm zakażeń układu moczowego. *Przeg. Urol.* **68**, 7–13 (2011)
  54. Mock M., Fouet A.: Anthrax. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 647–671 (2001)
  55. Muskalska KB., Szymczak B.: Postępy badań nad bakteriami rodzaju *Listeria*. *Post. Mikrobiol.* **54**, 123–132 (2014)
  56. Mulvey M.A.: Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* **4**, 257–271 (2002)
  57. Na H.S., Kim H.J., Lee H.C., Hong Y., Rhee J.H., Choy H.E.: Immune response induced by *Salmonella typhimurium* defective in ppGpp synthesis. *Vaccine*, **24**, 2027–2034 (2006)
  58. Nakanishi N., Abe H., Ogura Y., Hayashi T., Tashiro K., Kuhara S., Sugimoto N., Tobe T.: ppGpp with DksA controls gene expression in the locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island of enterohemorrhagic *Escherichia coli* through activation of two virulence regulatory genes. *Mol. Microbiol.* **61**, 194–205 (2006)
  59. Nanamiya H., Kasai K., Nozawa A., Yun C.S., Narisawa T., Murakami K., Natori Y., Kawamura F., Tozawa Y.: Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **67**, 291–304 (2008)
  60. Nowicki D., Rodzik O., Herman-Antosiewicz A., Szalewska-Pałasz A.: Isothiocyanates as effective agents against enterohemorrhagic *Escherichia coli*: in sight to the mode of action. *Sci. Rep.* **6**, 22263 (2016)
  61. Oaks E.V., Wingfield M.E., Formal S.B.: Plaques formation by virulent *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **48**, 124–129 (1985)
  62. Pal R.R., Das B., Dasgupta S., Bhadra R.K.: Genetic components of stringent response in *Vibrio cholera*. *Indian J. Med. Res.* **133**, 212–217 (2011)
  63. Pal R.R., Bag S., Dasgupta S., Das B., Bhadra R.K.: Functional characterization of the stringent response regulatory gene *dksA* of *Vibrio cholerae* and its role in modulation of virulence phenotypes. *J. Bacteriol.* **194**, 5638–5648 (2012)
  64. Paul B.J., Barker M.M., Ross W., Schneider D.A., Webb C., Foster J.W., Gourse R.L.: DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell*, **118**, 311–322 (2004)
  65. Perederina A., Svetlov V., Vassilyeva M.N., Tahirov T.H., Yokoyama S., Artsimovitch I., Vassilyev D.G.: Regulation through the secondary channel-structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell*, **118**, 297–309 (2004)
  66. Pizarro-Cerda J., Tedin K.: The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. *Mol. Microbiol.* **52**, 1827–1844 (2004)
  67. Pletzer D., Mansour S.C., Hancock R.E.W.: Synergy between conventional antibiotics and anti-biofilm peptides in a murine, sub-cutaneous abscess model caused by recalcitrant ESKAPE pathogens. *PLoS Pathog.* **14**, e1007084 (2018)
  68. Pletzer D., Wolfmeier H., Bains M., Hancock R.E.W.: Synthetic peptides to target stringent response-controlled virulence in a *Pseudomonas aeruginosa* murine cutaneous infection model. *Front. Microbiol.* **8**, 1867 (2017)
  69. Potrykus K., Cashel M.: (p)ppGpp still magical? *Annu. Rev. Microbiol.* **62**, 35–51 (2010)
  70. Potrykus K., Murphy H., Philippe N., Cashel M.: ppGpp is the major source of growth rate control in *E. coli*. *Environ. Microbiol.* **13**, 563–575 (2011)



71. Prażmo E., Godlewska R., Kwaśny M., Mielczarek A.: Udział czynników wirulencji *Enterococcus faecalis* w rozwoju chorób mięzgi i tkanek okołowierzchołkowych. *Post. Mikrobiol.* **55**, 247–254 (2016)
72. Robins-Browne RM, Hartland EL.: *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 67–75 (2002)
73. Salcedo S.P., Noursadeghi M., Cohen J., Holden D.W.: Intracellular replication of *Salmonella typhimurium* strains in specific subsets of splenic macrophages in vivo. *Cell Microbiol.* **3**, 587–597 (2001)
74. Sansonetti P.J.: The bacterial weaponry: lessons from *Shigella*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1072**, 307–312 (2006)
75. Schaik van W., Prigent J., Fouer A.: The stringent response of *Bacillus anthracis* contributes to sporulation but not to virulence. *Microbiology*, **153**, 4234–4239 (2007)
76. Schwan W.R., Lee J.L., Lenard F.A., Matthews B.T., Beck M.T.: Osmolarity and pH growth conditions regulate *fim* gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **70**, 1391–1402 (2002)
77. Serra D.O., Lućkin G., Weiland F., Schulz S., Gorg A., Yantorno O.M., Ehling-Schulz M.: Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *Proteomics*, **8**, 4995–5010 (2008)
78. Sharma K.A., Payne M.S.: Induction of expression of *hfq* by DksA is essential for *Shigella flexneri* virulence. *Mol. Microbiol.* **62**, 469–479 (2006)
79. Silva A.J., Benitez J.A.: A *Vibrio cholerae* relaxed (*relA*) mutant expresses major virulence factors, exhibits biofilm formation and motility, and colonizes the suckling mouse intestine. *J. Bacteriol.* **188**, 794–800 (2006)
80. Stallings C.L., Stephanou N.C., Chu L., Hochschild A., Nickels B.E., Glickman M.S.: CarD is an essential regulator of rRNA transcription required for *Mycobacterium tuberculosis* persistence. *Cell*, **138**, 146–159 (2009)
81. Stanley N.R., Lazazzera B. A.: Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **52**, 917–924 (2004)
82. Steiner K., Malke H.: *relA*-Independent amino acid starvation response network of *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.* **183**, 7354–7364 (2001)
83. Stewart P.S., Franklin M.J., Williamson K.S., Folsom J.P., Boegli L., James G.A.: Contribution of stress responses to antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Anti-microb. Agents Ch.* **59**, 3838–3847 (2015)
84. Sugisaki K., Hanawa T., Yonezawa H., Osaki T., Fukutomi T., Kawakami H., Yamamoto T., Kamiya S.: Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in *Bordetella pertussis*. *Microbiology*, **159**, 1379–1389 (2003)
85. Szczypa K., Wilemska J., Hryniewicz W., Sitkiewicz I.: Epidemiologia zakażeń *Streptococcus pyogenes*, struktura klonalna populacji i antybiotykooporność. *Post. Mikrobiol.* **52**, 223–232 (2013)
86. Takaya A., Suzuki A., Kikuchi Y., Eguchi M., Isogai E., Tomoyasu T., Yamamoto T.: Derepression of *Salmonella* pathogenicity island 1 genes within macrophages leads to rapid apoptosis via caspase-1- and caspase-3-dependent pathways. *Cell Microbiol.* **7**, 79–90 (2005)
87. Taylor C.M., Beresford M., Epton H.A., Sigeo D.C., Sharma 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)
88. Wang J.D., Sanders G.M., Grossman A.D.: Nutritional control of elongation of DNA replication by (p)ppGpp. *Cell*, **128**, 865–875 (2007)
89. Webb C., Moreno M., Wilmes-Riesenberg M., Curtiss III R., Foster J. W.: Effects of DksA and ClpP protease on sigma S production and virulence in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **34**, 112–123 (1999)
90. Wexselblatt E., Oppenheimer-Shaanan Y., Kaspary I., London N., Schueler-Furman O., Yavin E., Glaser G., Katzhendler J., Ben-Yehuda S.: Relacin, a novel antibacterial agent targeting the stringent response. *PLoS Pathog.* **8**, e10002925 (2012)
91. Valentin-Hansen P., Eriksen M., Udesen C.: The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol. Microbiol.* **51**, 1525–1533 (2004)
92. Xu X., Hu X. i wsp.: Role of ppGpp in *Pseudomonas aeruginosa* acute pulmonary infection and virulence regulation. *Microbiol. Res.* **192**, 84–95 (2016)
93. 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)
94. Yan X., Zhao C., Budin-Verneuil A., Hartke A., Rince A., Gilmore M.S., Auffray Y., Pichereau V.: The (p)ppGpp synthetase RelA contributes to stress adaptation and virulence in *Enterococcus faecalis* V583. *Microbiology*, **155**, 3226–3237 (2009)