

TARTU ÜLIKOOL

Bioloogia-geograafiateaduskond
Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituut
Molekulaarbioloogia õppetool

Vallo Varik

**Stressitingimustel bakteri valgusünteesi
moduleerivad valgud ja tmRNA**

Magistritöö

Juhendajad:

Prof. Tanel Tenson, Ph.D

Prof. Jaanus Remme, Ph.D

Tartu 2007

SISUKORD

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Poomisvastus.....	7
1.1.1. RelA	8
1.1.2. SpoT	10
1.1.3. ppGpp roll transkriptsiooni regulatsioonis.....	11
1.2. Ribosoomide dimeriseerumine.....	13
1.2.1. RMF	13
1.2.1.1. Mõju ribosoomidele	15
1.2.1.2. Seondumine ribosoomiga.....	17
1.2.2. YfiA	18
1.2.3. YhbH.....	21
1.3. tmRNA	23
1.3.1. tmRNA ja trans-translatsioon.....	23
1.3.2. <i>trans</i> -translatsiooni üldisem roll ja bioloogiline tähendus	24
1.3.3. tmRNA roll raku füsioloogias	26
1.3.3.1. Aminohapete biosünteesi regulatsioon	26
1.3.3.2. Suhkrute metabolismi regulatsioon.....	27
1.3.3.3. Kohanemine stressitingimustega.....	28
2. TÖÖ EESMÄRK	30
3. MATERJAL JA METOODIKA	31
3.1. Söötmed, kemikaalid.....	31
3.2. Tüved, plasmiidid.....	31
3.3. Aparatuur.....	32
3.4. Katsed.....	32
3.4.1. Kasv 37°C ja 45°C juures, külma- ja kuumašokk.....	32
3.4.2. Kuumasurm.....	32

3.4.3. Oksüdatiivne stress	33
3.4.4. Statsionaarne faas ja toibumine.....	33
3.4.5. Statsionaarsest faasist toibumine 19 aminohaptega minimaalsöötmes	34
3.4.6. Kasv 19 aminohaptega minimaalsöötmes	34
4. TULEMUSED	36
4.1. <i>relA</i> , <i>ssrA</i> , <i>relEB</i> , <i>rmf</i> , <i>yfiA</i> , <i>yhbH</i> geeniproduktid näivad olevat mitteolulised külma-, kuuma- ja oksüdatiivse stressi korral.....	36
4.2. RelA-defektne tüvi ei suuda minimaalsöötme korral toibuda statsionaarsest faasist võrdväärselt metsik-tüüpi tüvega	41
4.3. RelA-defektse tüve hilisema toibumise minimaalsöötmes kaotab söötmele aminohapete lisamine.....	46
4.4. <i>E. coli</i> metsik-tüüpi rakud toibuvad kauem, kui söötmes pole aminohapetest ainult metioniini, ainult leutsiini või ainult valiini	47
4.5. RelA-defektsus suurendab drastilisel määral toibumiseks kuluvat aega, kui söötmes pole aminohapetest ainult leutsiini või ainult valiini	48
5. ARUTELU	51
KOKKUVÕTE	61
SUMMARY	63
KASUTATUD KIRJANDUS	65

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID

Ala - alaniin

CFU – koloonia moodustav ühik (*colony forming unit*)

ppGpp – guanosiintetrafosfaat, guanosiin 3',5'-dipürofosfaat

pppGpp – guanosiin 3'-difosfaat, 5'-trifosfaat

(p)ppGpp – ppGpp ja (p)ppGpp ühine tähistus

ppGppaas – ppGpp hüdrolaas

PSI – ppGpp süntetaas I

PSII – ppGpp süntetaas II

RMF – ribosoomi moduleeriv faktor (*ribosome modulation factor*)

RNAP – RNA polümeraas

GASP – statsionaarse faasi kasvueelis (*growth advantage in stationary phase*)

rRNA nukleotiidide puhul on antud *Escherichia coli* numeratsioon

Aminohapete ühetäheliste lühendite puhul on kasutusel standardtähistused

SISSEJUHATUS

Bakterid peavad ellu jäämiseks kiiresti tunnetama ja reageerima mitmesugustele muutustele kasvukeskkonnas. Olgu selleks siis muutunud temperatuur, osmolaarsus, aeroobse keskkona asendumine anaeroobsega, toitainete ammendumine või mõni muu stressi põhjustav faktor, kohanevad rakud uute tingimustega, jätkates makromolekulide sünteesi ja jagunemist antud keskkonnas optimaalse kiirusega.

Bakterite füsioloogiline seisund kajastub nendes toimuva makromolekulide biosünteesi kiiruses ja rakkude suuruses. Soodsatel tingimustel toimub rakkudes aktiivne translatsioon. Valgusünteesi aparadi häirumine on oluline mehhanism tajumaks muutunud keskkonnatingimusi.

Ribosoomide seisukorra tunnetamisest saab alguse ka prokariootide seas peaaegu universaalne stressile reageerimise strateegia, mida nimetatakse poomisvastuseks (*stringent response*) (Stent & Brenner, 1961). Selleks sünteesitakse ribosoomiga seonduva RelA valgu poolt väikest signaalmolekuli ppGpp. Poomisvastust iseloomustab nukleiinhapete ja valkude sünteesi represseerimine ning valkude degradatsiooni ja aminohapete sünteesi taseme tõus, mille kõige tagajärjel väheneb rakkude kasvukiirus. Toimuvad ka üldised muutused transkriptsiooni mustris, mistõttu transkribeeritakse eelistatult stressitingimustega kohanemiseks vajalike geene.

Translatsiooni kiire allasurumine on oluline energia säilumise kohapealt, kuna aktiivselt kasvavas rakus on valgusüntees kõige enam energiat tarbiv protsess. Valgusünteesi koheseks peatamiseks seonduv *Escherichia coli* ribosoomiga RelE ja lõikab mRNA-d. Sellised mRNA-l peatunud ribosoomid vabastab tmRNA, mis suunab tekkinud poolikud valgud lagundamisele protsessis, mida nimetatakse *trans*-translatsiooniks.

Kui tingimused osutuvad täiesti ebasoodsaks, peatub bakterite kasv pikemaks ajaks, graamnegatiivsed bakterid sisenevad statsionaarsesse faasi, mõned graampositiivsed differentseeruvad spoorideks. Seejuures energeetiliselt kulukad ribosoomid ladestatakse ribosoomide dimeeridena RMF valgu vahendusel, et võtta neid taas kasutusse, kui keskkonnatingimused paranevad.

Käesoleva töö teoreetilises osas antakse ülevaade valgusünteesi stressitingimustes moduleerivatest geenidest ja nende produktidest. Praktilises osas kirjeldatakse RelA-, tmRNA-, relEB-, RMF-, YfiA- ja YhbH-defektsete tüvedega tehtud külma-, kuuma- ja oksüdatiivse stressi katseid; uuritakse mutantsete rakkude hakkamasaamist statsionaarses faasis ja statsionaarsest faasist toibumisel, võttes erilise tähelepanu alla RelA-defektse tüve.

Töö valmimise eest tahaksin tänada muidugi oma juhendajat Tanel Tensonit õpetamise, juhendamise ja kannatliku meele eest; samuti kogu meie TÜTI molekulaarse mikrobioloogia töögruppi asjalike nõuannete, abi ja lihtsalt hea seltskonna eest, te olete lihtsalt parimad. Suur tänu ka professor Brice Feldenile Rennesi'i Ülikoolist, kellelt on lahke kingitusena saadud metsik-tüüpi ja tmRNA-defektne tüvi ning igas olukorras rahu säilitavale Hannes Luidaleppale, kes tegi ülejäänud tüvede valmistamisel ära suurema osa tööst. Suur tänu ka minu kallile Monikale, kes mind töö kirjutamise ajal igati toetas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Poomisvastus

Elus püsimiseks peavad bakterid kiiresti tunnetama ja reageerima muutustele kasvukeskkonnas, olgu selleks siis toitainete hulga vähenemine või mõni muu stressi põhjustav faktor. Bakterite seas eksisteerib peaaegu universaalne strateegia toitainete ammendumisega kohandumiseks, mida nimetatakse poomisvastuseks (Stent & Brenner, 1961). Seda üldist stressivastust iseloomustab nukleiinhapete ja valkude sünteesi repressioon ning valkude degradatsioon ja aminohapete sünteesi taseme tõus (Chatterji & Ojha, 2001), mille kõige tagajärjel väheneb rakkude kasvukiirus.

Poomisvastuse korral on esimeseks reguleerivaks muutuseks stabiilse RNA (tRNA ja rRNA) hulga vähenemine (Lazzarini *et al.*, 1971; Ryals *et al.*, 1982; Sands & Roberts, 1952), mis viib üldise valgusünteesi taseme languseni. Translatsiooni kiire allasurumine on oluline energia säilumise koha pealt, kuna aktiivselt kasvavas rakus on valgusüntees kõige enam energiat tarbiv protsess. Lisaks stabiilsete RNA-de hulga allareguleerimisele toimuvad üleüldised muutused transkriptsiooni mustriks, mistõttu transkribeeritakse eelistatult stressitingimustega kohanemiseks vajalikke geene (Maitra *et al.*, 2005).

Erinevalt arvukatest teistest transkriptsiooni regulatsiooni mehhanismidest, mis põhinevad RNA polümeeraasiga (RNAP) ja/või kindlate DNA motiividega seonduvatel valgulistel transkriptsioonifaktoritel, sõltub poomisvastus hoopiski nukleotiidist, guanosiintetrafosfaadist (ppGpp). Seondues RNAP-ga, inhibeerib ppGpp ühede ja stimuleerib teiste geenide transkriptsiooni (Chatterji *et al.*, 1998; Jores & Wagner, 2003; Touloukhonov *et al.*, 2001).

ppGpp metabolismi eest vastutavad *E. coli*-s kaks valku: RelA ja SpoT (Xiao *et al.*, 1991). RelA on ribosoomiga seonduv ppGpp süntetaas I (PSI), mis põhjustab rakus ppGpp akumulatsiooni vastusena aminohappe näljale. SpoT on bifunktsionaalne ensüüm, millel on

nõrk ppGpp süntetaasi (PSII) aktiivsus ja ppGpp hüdrolaasi (ppGppaasi) aktiivsus (Murray & Bremer, 1996; Xiao *et al.*, 1991).

1.1.1. RelA

RelA on 84 kDa suurune valk, mis katalüüsib pürofosforüül-rühma ülekannet ATP-lt GTP või GDP riboosi 3' OH-le (Wendrich *et al.*, 2002). Moodustuvad siis vastavalt pppGpp või ppGpp, üheskoos tähistatakse neid (p)ppGpp. pppGpp konverteeritakse kiiresti ppGpp-ks. RelA (p)ppGpp süntetaasset aktiivsust stimuleerib mRNA-l peatunud ribosoomi A-kohta seonduv kognaatne ent laadimata tRNA (Wendrich *et al.*, 2002).

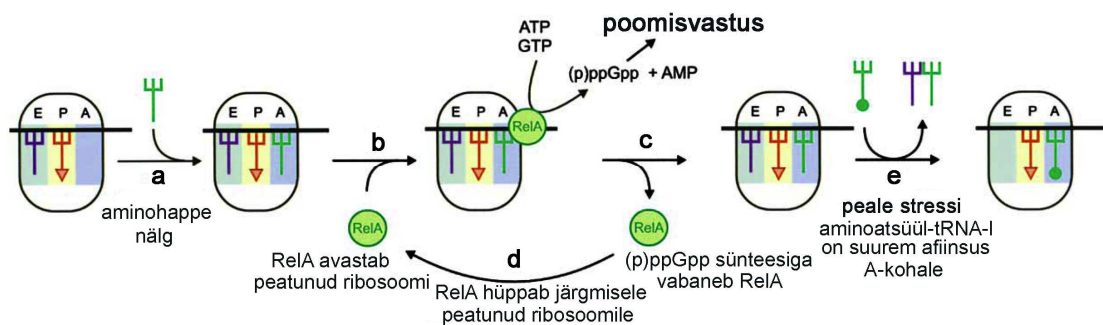
Logaritmilise kasvufaasi bakterirakkudes on ligikaudu 15% totaalsest tRNA-st aminohappe poolt laadimata ehk deatsetüleeritud. Enamus tRNA-st on seotud ribosoomide või süntetaasidega. Aminohapete nälja korral võib deatsetüleeritud tRNA osakaal tõusta kuni 80%-ni. Aminoatsetüleeritud tRNA madal ja vaba deatsetüleeritud tRNA kõrge tase suurendavad tõenäosust, et ribosoomi A-kohta siseneb madala afiinsusega kognaatne laadimata tRNA (Wendrich *et al.*, 2002).

Lisaks kognaatse laadimata tRNA seondumisele ribosoomi A-kohta on RelA-sõltuvaks ppGpp sünteesiks vajalik ribosoomi valk L11. L11 puudumisel ppGpp-d ei sünteesita (Wendrich *et al.*, 2002), vastav regulatoorne aktiivsus on valgu amino-otsal (Yang & Ishiguro, 2001).

Samas on RelA ribosoomiga seondumine L11-st sõltumatu. Ribosoomiga assotsieerumise koha pealt ei oma rolli ka laadimata tRNA viibimine A-kohas, vaid hoopis mRNA. Näib, et RelA kasutab peatunud ribosoomide avastamiseks ribosoomist väljaulatuvaid mRNA 3' otsi (Wendrich *et al.*, 2002).

Kokku võttes kõiki teadmisi RelA-vahendatud (p)ppGpp sünteesi kohta, on välja pakutud järgnev mudel (joonis 1). Aminohapete nälja tagajärjel on rakus tõusnud laadimata tRNA-de tase. Deatsetüleeritud tRNA-d seonduvad nõrgalt ribosoomi A-kohta (joonis 1a), mis on madala afiinsusega konformatsioonis (kuna E-koht on hõivatud) (Nierhaus, 1990). Peatunud ribosoomist ulatub välja mRNA 3' ots, mis ilmselt stimuleerib RelA seondumist

(joonis 1b). RelA viib läbi reaktsiooni, mille substraatideks on ATP ja GTP ning produktideks pppGpp ja AMP (joonis 1c). Selle käigus RelA vabaneb ja hüppab järgmisele peatunud ribosoomile (Joonis 1d). Arvatakse, et ppGpp sünteesi protsess kui selline ei vabasta A-kohta laadimata tRNA-st. Kognaatne ternaarne kompleks seondub laadimata tRNA-st umbes 50 korda kõrgema afiinsusega A-kohta ja tõrjub stressi leevendumisel deatsetüleeritud tRNA A-kohast (ja samal ajal ka E-kohast) välja (Joonis 1e) (Wendrich *et al.*, 2002).



Joonis 1. RelA-vahendatud (p)ppGpp süntees. (a) aminohappe nälja tõttu tõuseb laadimata tRNA tase, laadimata tRNA-d seonduvad madala afiinsusega ribosoomi A-kohta ja peatavad ribosoomi. (b) RelA avastab peatunud ribosoomi mRNA 3'-otsa järgi. (c) Kui A-kohas on laadimata tRNA, viib RelA läbi reaktsiooni, kasutades substraatidena ATP-d ja GTP(GDP)-d ning produktideks on AMP ja (p)ppGpp. Reaktsiooni toimumise tagajärjel vabaneb RelA aga mitte A-kohta seondunud laadimata tRNA. (d) RelA hüppab järgmisele peatunud ribosoomile ja korratakse (p)ppGpp sünteesi. (p)ppGpp kõrge kontsentratsioon põhjustab poomisvastuse. (e) Pärast stressitingimusi laetakse tRNA-d taas. Laetud tRNA tõrjub laadimata tRNAst kõrgema afiinsuse tõttu viimase A-kohast välja, mis vabastab peatunud ribosoomid ja aktiveerib uuesti translatsiooni. Laetud tRNA seonduvusega A-kohta vabaneb E-kohta seondunud tRNA, seega vabanevad kaks deatsetüleeritud tRNA-d (Wendrich *et al.*, 2002).

Bakteritel, kelle *relA* on muteerunud, kirjeldatakse nn *relaxed*-fenotüüpi, vastusena aminohappe näljale toodetakse oluliselt vähem ppGpp-d, mistõttu ei toimu kiiret stabiilse RNA sünteesi represserimist (Borek *et al.*, 1956; Lagosky & Chang, 1980; Lagosky & Chang, 1981). Samuti on $\Delta relA$ tüved temperatuuritundlikumad, milline fenotüüp on teadmata põhjustel seotud söötme osmomolaarsusega (Yang & Ishiguro, 2003). RelA mutantsel tüvel on teada ka tundlikkus leutsiinile, mis avaldub selles, et leutsiini olemasolu korral peab kasvu jätkamiseks keskkonnas olema ka isoleutsiini ja valiini. Samuti ei suuda $\Delta relA$ tüvi kasvada minimaalsöötmel, milles kõik aminohapped v.a isoleutsiin, leutsiin ja

valiin (Tedin & Norel, 2001; Xiao *et al.*, 1991). Vastavat kasvudefekti on püütud uurida ja seletada seoses hargneva-ahelaga aminohapete biosünteesi radade ppGpp-sõltuvusega, kuid täpne mehhanism või mehhanismid on teadmata (Tedin & Norel, 2001).

1.1.2. SpoT

E. coli spoT geen kodeerib 79 kDa suurust valku, mis Mn^{2+} -sõltuvas reaktsioonis eemaldab (p)ppGpp-lt 3'-difosfaadi, andes GDP (või GTP) ja pürofosfaadi. SpoT-l on ka nõrk ppGpp süntetaasi aktiivsus (Xiao *et al.*, 1991).

ppGpp sünteesi mehhanismidest SpoT rajas on teada veel vähem kui RelA puhul, erilist ettekujutust ei omata ka sellest, kuidas SpoT tunnetab stressi või üldisi keskkonnatingimusi. Igaljuhul ppGpp tase muutumatul kasvukiirusel on sama nii metsik-tüüpi kui *ΔrelA* tüvel ja seda hoiab SpoT (Xiao *et al.*, 1991). Seejuures eksponentsiaalse kasvu tingimustes, erinevatel kasvukiirustel, on SpoT hüdrolaasne aktiivsus üsna muutumatu (Murray & Bremer, 1996), mistõttu madalamale kasvukiirusele iseloomulik kõrgem rakusisene ppGpp kontsentratsioon saadakse, stimuleerides PSII aktiivsust konstantsel hüdrolaasi aktiivsusel. Lisaks erinevatele kasvukiirustele reguleerib SpoT ppGpp taset enamuse stresside korral, nagu süsinikuallika vahetus või ammendumine, paljude aminohapete nälg, energiapuudus, ent ilma RelA abita on ppGpp akumulatsioon aeglasem ja väiksema ulatusega (Lazzarini *et al.*, 1971; Murray & Bremer, 1996).

Kasvukeskkonna muutuse korral SpoT-sõltuvas ppGpp akumulatsiooniks rakus üldjuhul stimuleeritakse PSII aktiivsust ja vähendatakse ppGpp hüdrolyüüsi aktiivsust (Murray & Bremer, 1996). Seejuures reguleeritakse kumbagi aktiivsust erinevate stresside korral erinevas ulatuses, kuni selleni, et glükoosi ammendumise korral väheneb nii ppGpp sünteesi kui lagundamise aktiivsus aga lagundamise aktiivsus väheneb rohkem (Murray & Bremer, 1996). Samas pole *E. coli* SpoT kahte aktiivsust reguleerivat spetsiifilist signaali identifitseeritud, teatakse vaid, et see on seotud üldise tRNA aminoatsetüleerituse tasemega (Murray & Bremer, 1996). Viimane väide põhineb sellel, et puhastatud SpoT hüdrolaasi aktiivsust inhibeerib laadimata tRNA *in vitro* (Heinemeyer & Richter, 1977; Richter, 1980),

ja PSII aktiivsus on pöördvõrdeliselt seotud aminohapete arvuga kasvukeskkonnas: mida rohkem aminohappeid, seda madalam PSII aktiivsus (Murray & Bremer, 1996).

Kuigi *E. coli*-s on poomisvastus reguleeritud kahe ensüümi poolt – RelA ja SpoT, esineb enamikes uuritud graampositiivsetes organismides (näiteks *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equilisimilis*, *Bacillus spp.*, ja *Mycobacterium tuberculosis*) RelA ja SpoT-ga homoloogne mõlema funktsiooni täitev ensüüm (Mittenhuber, 2001). Need bifunktsionaalsed Rel/Spo ensüümid võivad anda vastuse sellele, kuidas on *E. coli* SpoT süntetaasne ja hüdrolaasne aktiivsus reguleeritud. Rel/Spo ensüümid näivad moduleerivat ppGpp taset kahe erineva aktiivsaiidi vahendusel, millest ühel on süntetaasi ja teisel hüdrolaasi aktiivsus. Ensüüm on kontrollitud alternatiivsete konformatsioonide vahendusel – korraga on funktsionaalne vaid üks aktiivtsenter (Avarbock *et al.*, 2000; Hogg *et al.*, 2004; Mechold *et al.*, 2002).

spoT geeni pole võimalik ilma *relA*-d deleteerimata välja lülitada. Ühe variandina võib oletada, et RelA-sõltuv ppGpp akumulatsioon takistab/peatab ppGpp hüdrolaasi defektse tüve kasvu. RelA ja SpoT topeltmutandid ei kasva söötmel, millest puuduvad aminohapped (Xiao *et al.*, 1991).

1.1.3. ppGpp roll transkriptsiooni regulatsioonis

Enamus transkriptsiooni regulaatoreid seonduvad DNA promootorlasse või selle lähedusse, et soodustada või takistada RNAP seondumist. Täiesti teistsugune lähenemisviis on ppGpp-l, mis seondub otseselt RNA polümeraasiga ja tundub toimivat ilma kindlate DNA regioonidega seonduvate abivalkudeta. Mutatsioonid, mis mõjutavad ppGpp-sõltuvat transkriptsiooni, tekivad RNA polümeraasis. Selliseid mutatsioone on kirjeldatud β , β' ja σ^{70} subühikutes (Magnusson *et al.*, 2005), ja ppGpp analoogide ja RNAP interaktsioonide keemilisel uurimisel on näidatud, et ppGpp interakteerub β ja β' subühikutega (Chatterji *et al.*, 1998) Neid tulemusi on nüüd täiendamas hiljaaegu avaldatud RNAP ja ppGpp

kompleksi kristalliseeritud struktuur (Artsimovitch *et al.*, 2004), mille puhul ppGpp seondub RNAP aktiivsaidi lähedusse, kus ta interakteerub nii β kui β' subühikutega.

ppGpp otsest negatiivset mõju promootoritele *in vitro* on kirjeldatud mitmel juhul (Barker *et al.*, 2001; Jores & Wagner, 2003; Paul *et al.*, 2004; Potrykus *et al.*, 2002). Välja on pakutud ka mitu mehhanismi, mis ei ole tingimata üksteist välistavad ning annavad võibolla kõik oma panuse ppGpp-sõltuvasse negatiivsesse regulatsiooni.

- 1) Avatud kompleksi stabiilsus – ppGpp võiks destabiliseerida avatud komplekse kõikidel promootoritel aga see omab negatiivset efekti vaid promootoritele, millel on juba eelnevalt omane ebastabiilne avatud kompleks, nagu näiteks rRNA promootorid (Barker *et al.*, 2001; Paul *et al.*, 2004)
- 2) Promootori vabanemine – ühe promootori (λP_R) puhul on näidatud, et ppGpp negatiivne efekt põhineb promootori vabanemise takistamisel (Potrykus *et al.*, 2002)
- 3) Avatud kompleksi moodustumine – ppGpp mõjutab avatud kompleksi moodustumise kiirust (Wagner, 2002)
- 4) Seisakute tekitamine transkriptsiooni elongatsiooni (Jores & Wagner, 2003; Wagner, 2002)
- 5) ppGpp ja NTP-de konkureerimine (Artsimovitch *et al.*, 2004; Jores & Wagner, 2003)
- 6) Tsütosiinidega paardumine – ppGpp paardumine promootorala mitte-matriitsahela tsütosiinidega (Artsimovitch *et al.*, 2004)

ppGpp mõjub ka otsese positiivse regulaatorina ja mitmed neist indutseeritakse ppGpp-sõltuvalt kasvu peatumise käigus (Kvint *et al.*, 2000; Kvint *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 1991). Positiivselt reguleeritavate promootorite seas on paljud, mis sõltuvad alternatiivsetest sigmafaktoritest [nt σ^S (Kvint *et al.*, 2000) ja σ^{54} (Laurie *et al.*, 2003)] aga ka neid, mis sõltuvad σ^{70} -st (Magnusson *et al.*, 2005).

Veel vähem kui otsesese negatiivse mõju mehhanismidest, on teada ppGpp-sõltuvast otsesese positiivse mõju mehhanismidest. On pakutud, et avatud kompleksi destabiliseerimine hoopis aitab alustada transkriptsiooni nendelt promootoritelt (Bartlett *et al.*, 1998)

Hiljaaegu on näidatud, et ppGpp negatiivseid mõjusid *in vitro* transkriptsioonile võimendab valk DksA (Paul *et al.*, 2004). Veelgi enam, rRNA transkriptsioon on tuntetu ppGpp akumulatsioonile $\Delta dksA$ tüves *in vivo* (Paul *et al.*, 2004) ning et DksA on vajalik osade aminohapete biosünteesi promootorite ppGpp-sõltuvaks aktivatsiooniks (Paul *et al.*, 2005).

Lisaks, ilmselt mõjutab ppGpp transkriptsiooni suuresti ka kaudselt, vähendades vaba RNAP hulka rakus (Magnusson *et al.*, 2003). Arvatakse, et ppGpp võib soodustada ka alternatiivsete σ -faktorite seondumist RNAP apoensüümiga (Jishage *et al.*, 2002; Laurie *et al.*, 2003).

1.2. Ribosoomide dimeriseerumine

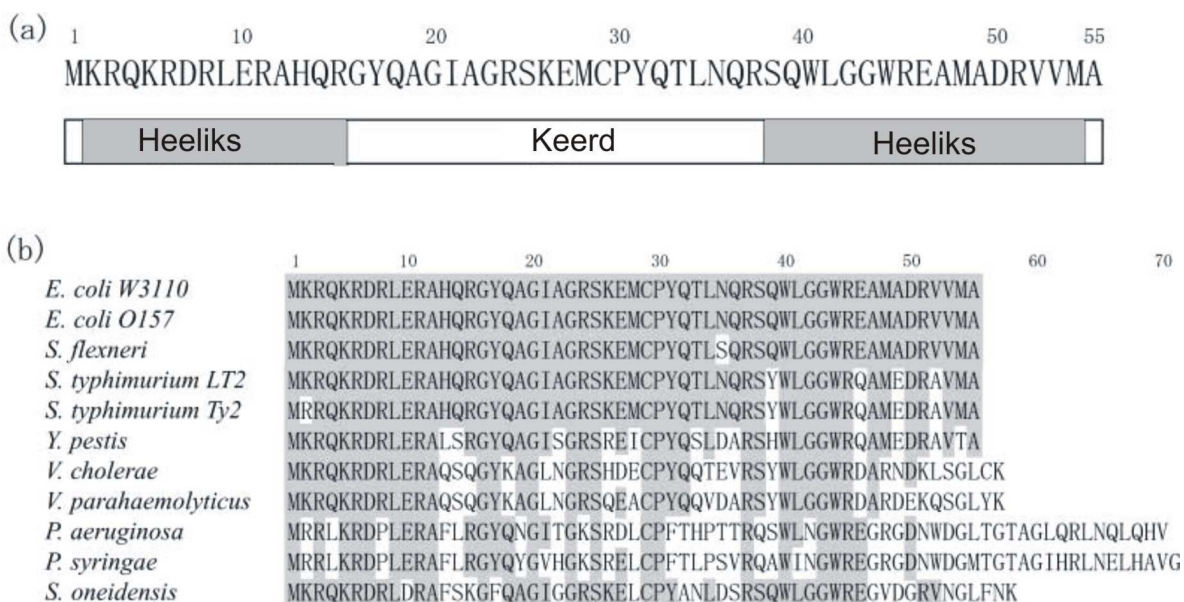
Stressitingimustes suruvad rakud oma valgusünteesi alla, kasutades erinevaid strateegiaid. Paljudes organismides toimub ribosoomide biosünteesi represseerimine (Mizuta & Warner, 1994). Eukariootides fosforüleeritakse stressitingimuste korral translatsiooni initsiatsioonifaktorit 2 (eIF-2), mis vähendab rakkudes valgusünteesi (de Haro *et al.*, 1996). Prokariootides, näiteks enterobakterites, supresseeritakse valgusünteesi stabiilsete RNA-de sünteesi vähendamise käigus (Haseltine & Block, 1973; Lazzarini *et al.*, 1971; Ryals *et al.*, 1982; Stent & Brenner, 1961) ja poomisvastusest samuti sõltuva 100S ribosoomide moodustumisega (Wada *et al.*, 1990).

Kuigi 100S ribosoomide olemasolu on juba aastakümneid teada, on nende bioloogilist tähendust hakatud uurima alles viimasel ajal (Niven, 2004). Statsionaarse faasi kultuuridest isoleeriti ribosoomiga seondunud valk, mis nimetati ribosoomi moduleerivaks faktoriks RMF (Wada *et al.*, 1990).

1.2.1. RMF

RMF on aluseline (pI = 11,3) ja väike ($M_r = 6507$) valk. Tema sekundaarstruktuur ennustatakse koosnevat kahest α -heeliksist N- ja C-otsas ja neid ühendavast keerust (*coil*). Usutakse, et tal on väljavenitatud ja lihtne struktuur, mis seletab ka vaba RMF-i ebastabiilsust tsütoplasmas (Joonis 2a).

Escherichia coli RMF-i homolooge on identifitseeritud mõnedes graamnegatiivsetes bakterites (Joonis 2b). Homoloogide vahel esinev märkimisväärselt kõrge sarnasus lubab oletada, et kõik need valgud seonduvad ribosoomiga sarnasel viisil. Lisaks ülalmainitutele on ribosoomide dimeer eksperimentaalselt leitud bakterites *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa* ja *P. syringiae*. Enamus RMF-i omavatest bakteritest on enterobakterid, samas kui *P. aeruginosa* ja *P. syringiae* on mullabakterid ja nende RMF-il on pikenenud karboksüül-ots (Joonis 2b). RMF-i toimimise ja elustiili seotus on intrigeeriv. Mõned nendest bakteritest on patogeensed, mistõttu RMF-ist võib saada uute ravimite kujundamise sihtmärk (Yoshida *et al.*, 2004).



Joonis 2. RMF-i ennustatud sekundaarstruktuur ja järjestuse homoloogia. (a) *E. coli* RMF-i ennustatud sekundaarstruktuur. (b) RMF-i ja tema homoloogide aminohappelise järjestuse joondus. Järjestused pärinevad bakteritest: *E. coli* W3110 ja O157 ja *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* LT2 ja Ty2, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae* ja *Shewanella oneidensis* (Yoshida *et al.*, 2004).

E. coli RMF-i ekspressioon tõuseb märkimisväärselt üleminekul eksponentsiaalsest kasvufaasist statsionaarsesse. *rmf* geeni transkriptsiooni indutseerib ppGpp (Izutsu *et al.*, 2001). Mutantne tüvi, milles *rmf* on inaktiveeritud, ei suuda moodustada statsionaarses faasis 100S ribosoomi (Wada *et al.*, 1990; Yamagishi *et al.*, 1993), ja isoleeritud valgul

RMF on omadus dimeriseerida 70S ribosoomi *in vitro* (Wada *et al.*, 1995). Seega on RMF vajalik ja piisav 70S ribosoomi dimeeride moodustumiseks.

RMF-i sünteesi esilekutsumine statsionaarse faasi kultuurides on sõltumatu statsionaarse faasi spetsiifilisest sigma faktorist σ^S , mida kodeerib *rpoS* (Izutsu *et al.*, 2001; Yamagishi *et al.*, 1993). Rakutüved, millel puudub funktsionaalne RMF, on statsionaarses faasis vähenenud elujõulisusega (Wada *et al.*, 1990; Wada *et al.*, 2000; Yamagishi *et al.*, 1993). Seepärast oletatakse, et dimeeride moodustamine on ribosoomide ladustamise meetod ja RMF mängib olulist rolli *Escherichia coli* statsionaarse faasi üleelamise strateegias.

RMF ei ole detekteeritav *Bacillus subtilis*'e liikidel, mis moodustavad spoore vastusena ppGpp taseme tõusule. Seepärast võib RMF olla unikaalne vahend, mille abil organismid, kes ei moodusta stressile vastupidavaid spoore, suudavad ellu jääda rasketes keskkonnatingimustes (Izutsu *et al.*, 2001).

1.2.1.1. Mõju ribosoomidele

Ribosoomide suurenenud lagunemine RMF-defektses tüves pani aluse oletusele, et RMF toimib kui „anti-degradatsiooni faktor” (Fukuchi *et al.*, 1995). Seejuures inhibeerib RMF üldist translatsiooni (Wada *et al.*, 1995), ent näib stimuleerivat osade valkude sünteesi, nagu näiteks kation-spetsiifiline poriin OmpF (Apirakaramwong *et al.*, 1998). RMF-defektses tüves on OmpF süntees inhibeeritud. Kui lisaks *rmf*-ile on rakkudes välja lülitatud ka kation-spetsiifilise poriini geen *ompC*, on rakkude suremus statsionaarses faasis veelgi suurem. Mõlema poriini puudumine *rmf ompC* topeltmutandis põhjustab rakkudes Mg^{2+} kontsentratsiooni langust, ribosoomide lagunemise kiirenemist, valgusünteesi inhibeerimist ja viib lõpuks raku suremiseni. Seega nii RMF kui Mg^{2+} , mõjudes ribosoomi stabiliseerivalt, on olulised statsionaarse faasi rakkude elujõulisuse koha pealt (Apirakaramwong *et al.*, 1998).

Ribosoomi lagunemist on välja pakutud kui peamist raku surma põhjustavat kahjustust kuumašoki korral (Teixeira *et al.*, 1997). Seepärast võib arvata, et RMF-i omadus ribosoomi stabiliseerida annab kaitset ka sellise stressi vastu. Ribosoomide stabiilsust

kuumašoki tingimustes on uuritud, jälgides nii ribosoomide konformatsiooni muutust kui rRNA lagunemist. Ribosoomide stabiilsus ei erine, kui nad on pärit: 1) metsik-tüüpi tüve eksponentsiaalse faasi rakkudest; 2) metsik-tüüpi tüve statsionaarse faasi rakkudest või; 3) *rmf*-defektse tüve eksponentsiaalse faasi rakkudest. Vaid *rmf*-defektse tüve statsionaarse faasi ribosoomid on märkimisväärselt vähem stabiilsed. Seega on just inaktiivsed ribosoomid eriti haavatavad kuumašoki poolt, kui rakkudest puudub RMF. Samas pole leidnud kinnitust, et dimerisatsioon *per se* annab kaitse kuumašoki vastu. Pigem vastupidi: 100S ribosoomid lagunevad kuumašoki korral kiiresti 70S ribosoomideks enne kui 70S ribosoomide lagunemine saab detekteeritavaks. Sama on täheldatud ka hapestressi korral. Ilmselt annavad ribosoomile stabiilsuse hoopis RMF-i seondumisega kaasnevad konformatsioonilised muutused. Kuumutamise kaasnemisel 100S lagunemisel 70S ribosoomideks jääb RMF 70S ribosoomidega seotuks, säilib 70S ribosoomi robustsem konformatsioon, mis annab parema vastupidavuse füüsikalistele-keemilistele teguritele ja parema ellujäävuse võrreldes *rmf*-defektse tüvega (Niven, 2004).

Mõningat kinnitust RMF-i stressiga kohanemise üldisemast rollist annab tähelepanek, et RMF-defektsel tüvel on suurenenud tundlikkus hüperosmootsele šokile (Garay-Arroyo *et al.*, 2000) ning *rmf*-i ekspressioon on suurenenud ka eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes, kui neid hoida toitainete puuduses (Izutsu *et al.*, 2001; Yamagishi *et al.*, 1993).

100S ribosoomid moodustuvad statsionaarses faasis ja neil puudub translatsiooniline aktiivsus (Wada *et al.*, 1995). Kui statsionaarse faasi rakud viia üle rikkale söötmele, vabaneb RMF 100S ribosoomidest ja 100S ribosoomid dissotsieeruvad taas 70S ribosoomideks. See protsess on väga kiire ja jõuab lõpule 1-2 minuti möödudes. Pärast seda alustavad rakud 6 minuti jooksul taas valgusünteesi ja hakkavad paljunema (Aiso *et al.*, 2005; Wada, 1998). Seega toimub 70S ribosoomide muutmine 100S ribosoomideks ja tagasi 70S ribosoomideks vastusena kasvufaasi muutustele. Eksponentsiaalses faasis läbivad ribosoomid pidevat valgusünteesi tsüklit, milles vahelduvad initsiatsiooni, elongatsiooni ja terminatsiooni etapid. Statsionaarses faasis konverteeritakse pärast terminatsiooni paljud ribosoomid 100S ribosoomideks. 100S moodustumist kutsutakse ka soikumise ehk hibernatsiooni etapiks (Yoshida *et al.*, 2004).

1.2.1.2. Seondumine ribosoomiga

Elektronmikroskoobis on näha, et 100S ribosoom koosneb kahest 70S ribosoomist, millede 30S subühikud on üksteisega vastamisi (Wada, 1998), ning biokeemiline analüüs näitab, et RMF on seondunud 100S ribosoomis iga 50S subühikuga (Wada *et al.*, 1990). Sellest võib järeldada, et kaks RMF-i otseselt ei seo kahte 70S ribosoomi, vaid RMF-i seondumine indutseerib konformatsioonilise muutuse 30S subühikus, mis põhjustab 70S ribosoomide dimeriseerumise.

RMF-i ribosoomi seondumise koht arvatakse olevat peptidüül-transferaases (PT) tsentris või selle läheduses (Yoshida *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2004), kus ta katab ka värskelt sünteesitava peptiidi ribosoomist väljumise tunneli avause (Yoshida *et al.*, 2004). Kristalliseeritud ribosoomide röntgenuuringud näitavad, et PT-tsentris pole ühtegi valku. Kõige lähemal asuvad polüpeptiidid on ribosoomi valkude (L2, L3, L4, L10e) mitteglobulaarsed pikendused, ent ükski nende külghela aatomitest ei ole peptiidsideme moodustumise kohale lähemal kui 18 Å (Nissen *et al.*, 2000). Seepärast seondub RMF ilmselt otse 23S rRNA-le (Yoshida *et al.*, 2004).

Mitmed antibiootikumid inhibeerivad valgusünteesi aktiivsust, ja teevad seda seondudes PT tsentri lähedusse (Schlunzen *et al.*, 2001). Tuntuimad neist on klooramfenikool ja erütromütsiin. Klooramfenikool ja erütromütsiin seonduvad valdavalt hüdrofoobsetesse lõhedesse, mis asuvad siis vastavalt PT-tsentris ja peptiidtunneli sissepääsu ees (Hansen *et al.*, 2003). Erütromütsiini ($M_r=323,13$) ja klooramfenikooli ($M_r=733,94$) molekulmassid on väiksemad kui RMF-il ($M_r=6507$). Oletatakse, et RMF assotsieerub ribosoomiga, kattes nende kahe antibiootikumi seondumiskohad (Yoshida *et al.*, 2004).

Keemiline sondeerimine näitas äärmiselt tähelepanuväärset asjaolu: RMF-i seondumine kaitseb *E. coli* 23S rRNA alust A2451 (Yoshida *et al.*, 2004), mida peetakse otseselt vastutavaks peptidüül-transferaasse aktiivsuse eest (Nissen *et al.*, 2000). Samas näitas keemiline sondeerimine, et RMF-i seondumiskoht võib kattuda ka P-kohaga või siis nii P- kui A-kohaga. Igal juhul seletab valgusünteesi jaoks oluliste kohtade sidumine ja/või

nende konformatsiooni muutmine 100S ribosoomide translatsioonilise inaktiivsuse (Yoshida *et al.*, 2004).

Üllatav ja elegantne on viis, kuidas rakk ise toodab valku, mis toimib sarnaselt antibiootikumidega ning suudab seonduda ja vabaneda vastusena keskkonnatingimustele (Yoshida *et al.*, 2004).

1.2.2. YfiA

Ribosoomi pinnavalke triitiumiga pommitades, eraldades ning lahutades kahedimensionaalsel elektroforeesil leiti geelilt plekk Y (*spot Y*) (Agafonov *et al.*, 1997). Vastavat valku kodeerib geen *yfiA* (342 bp), mis asub *E. coli* kromosoomis *rrnG* operoni 16S rRNA geeni ja *phe* operoni vahelisel alal (58.96 minutit) (Agafonov *et al.*, 1999). Puhastatud valk Y (113 ah), lühidalt pY (*protein Y*), molekulmassiga 12.7 kDa, seondub 30S subühikuga ja stabiliseerib suure ja väikese subühiku assotsieerumist 70S ribosoomiks (Agafonov *et al.*, 1999). Ta on ainus ribosoomiga seotud valk, mis jääb subühikute liitekohta ja varjestub 70S ribosoomi formeerumisel (Agafonov *et al.*, 1997).

YfiA ekspressiooni ja ribosoomidega seondumist indutseerib raku sattumine stressikeskkonda. Normaalses füsioloogilistes tingimustes kasvatatud rakkudest eraldatud ribosoomid sisaldavad väga vähe, kui üldse, valku Y. Seevastu ribosoomfraktsioon, mis saadakse statsionaarsesse faasi jõudnud või külmašoki saanud rakkudest, sisaldab valku Y ribosoomi suhtes 1:10 kuni 1:3, sõltuvalt katsetingimustest. YfiA on detekteeritav kohe esimese tunni jooksul pärast temperatuuri langetamist. Oluline on, et 37°C juures statsionaarsesse faasi jõudnud rakkude ribosoomfraktsioon sisaldab sama hulga valku Y, kui külmašoki saanud rakkudes. Kasvu jätkudes kaob pY ribosoomist (Agafonov *et al.*, 2001).

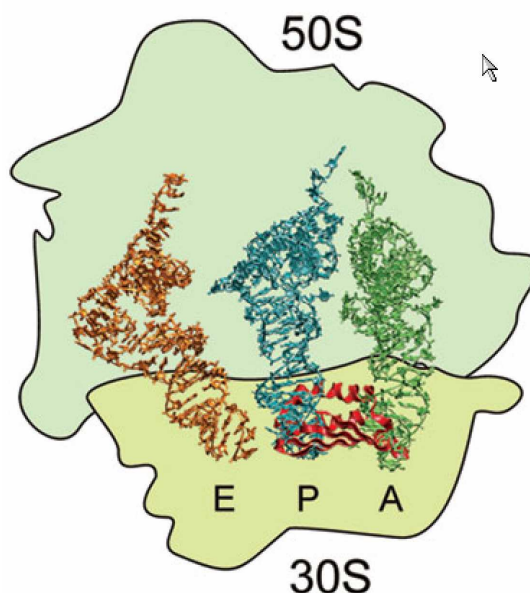
Valk Y inhibeerib tugevasti rakuvaba valgusünteesi: ~75-80% ulatuses, kui valku Y on lisatud ribosoomidega ekvimolaarses koguses (Agafonov *et al.*, 2001), takistades aminoatsüül-tRNA seondumist ribosoomi A kohta (Agafonov *et al.*, 2001; Wilson &

Nierhaus, 2004). Valku Y tähistatakse seetõttu kirjanduses sageli ka RaiA (ribosoomiga assotsieerunud inhibiitor A) ja tema avatud lugemisraami siis vastavalt *raiA*. Valk Y toimemehhanism A koha blokeerimise vahendusel on kooskõlas oletusega, et ribosoomi A kohal on oluline osa bakterite külma- ja kuumašoki vastuses (VanBogelen & Neidhardt, 1990).

Samal ajal tetratsükliin, spetsiifiline A koha inhibiitor, ei konkureeri valguga Y ribosoomi seondumise pärast, sellest lähtuvalt ei ole nende seondumiskohad A kohas kattuvad (Agafonov *et al.*, 2001).

Hiljuti on nii kristallstruktuuri uurides kui biokeemilisi meetodeid kasutades kinnitust leidnud, et YfiA seondumiskoht ribosoomis kattub P-kohaga (Joonis 3). Uute andmete valguses näib tRNA A-kohta seondumise inhibeerimine olevat kaudne efekt ning YfiA põhiliseks ülesandeks takistada valgusünteesi initsiatsiooni. Seda kinnitavad faktid: 1) YfiA blokeerib mRNA ja fMet-tRNA^{fMet} seondumist P-kohta; 2) YfiA stabiliseerib 70S ribosoomi ja blokeerib valgusünteesi lõpetanud 70S ribosoomide IF1- ja IF3-sõltuvat dissotsiatsiooni - takistab sellega neid alustamast uut translatsiooni (Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004).

Külmašoki puhul on olukorda põhjalikumalt uuritud: stressivalkude eneste süntees toimub ilmselt tänu spetsiifilistele mRNA *cis*-elementidele ja *trans*-toimelistele valkudele, mis tühistavad YfiA mõju (Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004). Selliste *cis*-elementide olemasolu kinnitab külmašoki valkude mRNA translatsiooni efektiivsuse sõltuvus 5' UTR regionist. Samuti teatakse, et IF3 ja CspA (*cold shock protein*) ergutavad külmašoki valkude mRNA eelistatud translatsiooni just nimelt madalatel temperatuuridel (Gualerzi *et al.*, 2003). Veelgi enam, külmašoki saanud rakkudest eraldatud ribosoomid säilitavad mõõduka ent reprodutseeritava eelistuse transleerida külmašoki valkude mRNA-d (Gualerzi *et al.*, 2003), mis näitab, et see on ribosoomiga seotud omadus – vägagi tõenäoliselt just ribosoomidega assotsieerunud YfiA mõju tõttu.



Joonis 3. YfiA seondumise koht kattub ribosoomis A- ja P-kohta seondunud tRNA omaga. Valgu Y (punane) asetus ribosoomis A- (roheline), P- (sinine) ja E-kohta (oranž) seondunud tRNA suhtes. 70S ribosoomi 30S ja 50S subühikud on osutatud (Wilson & Nierhaus, 2004).

Blokeerides üldist valgusünteesi, välja arvatud külmašoki valgud, suunatakse raku translatsiooniparaat sünteesima madala temperatuuriga adapteerumiseks vajalikke valke. Pärast kohanemist jätkub valgusüntees, nagu ka raku kasv, palju madalamal kiirusel (Gualerzi *et al.*, 2003). Kõigi kolme IF suurenenud süntees külmašoki tingimustes (Gualerzi *et al.*, 2003) võib pärast esmast kohanemise etappi soodustada YfiA tõrjumist osadest inaktiivsetest 70S ribosoomidest (Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004).

Lisaks translatsiooni inhibeerimisele korraldab YfiA valgusünteesi ümber stressitingimusteks, suurendades oluliselt translatsiooni täpsust. Nii külmašoki kui aminohapete nälja korral statsionaarses faasis suureneb valelugemine, mis teeb YfiA-st olulise faktori nende tingimustega kohanemisel (Agafonov & Spirin, 2004).

Homoloogsete geenide esinemine mitmetes teistes bakteriliikides (Agafonov *et al.*, 1999) annab kindlust arvata, et YfiA on oluline valk ja seda peamiselt stressitingimustes

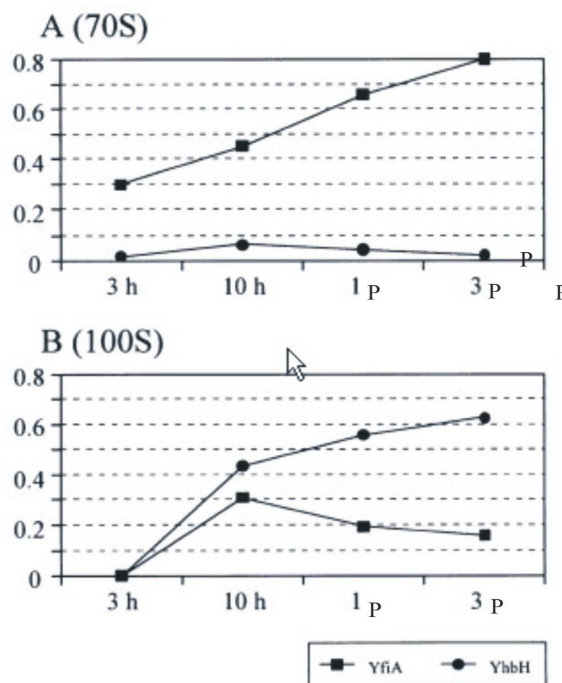
ellujäämiseks (Agafonov *et al.*, 2001). Seda enam, et näiteks tsüanobakteri *Synechococcus* PCC 7002 YfiA-le homologset valku LtrA-d ekspresseeritakse ainult pimedas (Tan *et al.*, 1994).

1.2.3. YhbH

Hiljuti on *E. coli*-st leitud statsionaarse faasi ribosoomidega seotud valk YhbH (285 bp, 95 ah), mis omab sarnast aminohappelist järjestust YfiA-le. Ainult et YfiA-l on karboksüülotsas 18 aminohappeline pikendus, millel on happelised omadused. 91-st YfiA amino-otsa aminohappest on 40% identsed YhbH vastava piirkonnaga (Maki *et al.*, 2000).

Statsionaarses faasis toimub statsionaarse faasi spetsiifilise ribosoomi moduleerimise faktori (RMF) osalusel aktiivsete 70S ribosoomide üleminek inaktiivseteks 100S dimeerideks (Wada *et al.*, 1990). Kuigi valkudel YfiA ja YhbH on sarnane aminohappeline järjestus, seonduvad nad ribosoomidele erinevalt. YfiA esineb peamiselt 70S fraktsioonis, YhbH üksnes 100S fraktsioonis. Rohkem kui pooled kolme päeva vanuse kultuuri 100S ribosoomid sisaldasid YhbH, mis tähendab, et see valk on 100S ribosoomide mažoorne komponent keskmises statsionaarses faasis. Kuna kahe valgu järjestused on väga sarnased, on mõistlik oletada, et YhbH seondumise koht ribosoomis on sama mis YfiA-l. See sobib ka tähelepanekuga, et summaarne koopiaarv ribosoomi kohta ei ületanud ühte, isegi kui rakke kasvatati kolm päeva (Joonis 5) (Maki *et al.*, 2000).

Hiljaaegu on ilmunud töö, mis lubab oletada, et YfiA ja YhbH tõepoolest konkureerivad ribosoomi seondumise pärast (Ueta *et al.*, 2005). Veelgi enam, et YfiA ja YhbH reguleerivad ribosoomide dimerisatsiooni protsessi. Andmed näitavad, et RMF moodustab vaid 90S ribosoomi, mis on näha YfiA ja YhbH topeltmutandi puhul. Oletatavasti moodustub 100S ribosoom alles YhbH seondumisel 90S ribosoomiga. Seetõttu on YhbH uueks nimeks pakutud HPF (*hibernation promoting factor*) (Ueta *et al.*, 2005). Seejuures YfiA seondub 70S ribosoomiga, arvatavasti stabiliseerib seda aga võib arvata, et takistab ka 90S ribosoomide moodustumist (Ueta *et al.*, 2005).



Joonis 5. YfiA ja YhbH koopiaarvu muutused statsionaarse faasi 70S (A) ja 100S (B) ribosoomides. 100S ribosoomide ei nähtud rakkudes 3h möödudes ja koopiaarvu väärtuseks YfiA-le ja YhbH-le anti neis rakkudes null (Maki *et al.*, 2000).

Kuna RMF inaktiveerib ribosoomid, kattes peptidüül-tranferaase tsentri (Yoshida *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2004), ja YfiA seondub 30S süühiku P- ja A-kohta (Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004), peavad RMF-i ja YfiA seondumiskohad asuma küll erinevates subühikutes ent üsna lähestikku. Huvitaval kombel aga, kuigi YfiA ja YhbH jagavad suurt järjestuste homoloogiat ja seetõttu ilmselt ka seondumiskohti ribosoomis, mõjuvad nad ribosoomide dimerisatsioonile erinevalt. Lihtsa hüpoteesina on välja pakutud, et YfiA 18 aminohappeline pikendus võiks takistada RMF-il 70S ribosoomiga seondumist (Ueta *et al.*, 2005). YhbH-l selline 18 aminohappeline saba aga puudub ja tema seondumine võiks stabiliseerida RMF-i seondumist 50S subühikuga.

1.3. tmRNA

1.3.1. tmRNA ja trans-translatsioon

Kui välja arvata mitmesugused rollid valgusünteesil (mRNA, tRNA, ribosoomi komponendid) ja üksikud märkimisväärsed erandid, siis vaadeldi RNA-d pikka aega kui üliolulist, ent väikese funktsionaalse repertuaariga molekuli. Viimaste aastate jooksul on nii prokarüootsete kui eukarüootsete organismide uurimisel tuvastatud hulk väikeseid RNA-sid, mis üsna erineval ja tihtilugu üllataval moel annavad oma panuse raku homeostaasi säilitamisse. Üks kõige ebatavalisemaid väikeseid RNA-sid on tmRNA (transfer-messenger RNA), tuntud ka kui 10Sa RNA ja SsrA. tmRNA on ainulaadne, kuna omab nii tRNA kui mRNA aktiivsuseid (Withey & Friedman, 2003).

tmRNA-l on kaks funktsionaalset domeeni: tRNA^{Ala} aktseptor õlaga sarnanev piirkond 3'-terminaalse CCA-ga, mis aminoatsüleeritaksealaniiniga (Komine *et al.*, 1994); ja transleeritav sisemine avatud lugemisraam, mis *E. coli*-s kodeerib kõrgelt konserveerunud ANDENYALAA järjestust (Withey & Friedman, 2003). tmRNA viib läbi protsessi, mida nimetatakse *trans-translatsiooniks*.

Trans-translatsiooni mudeli saab jagada neljaks etapiks: 1) valku sünteesiv ribosoom seiskub, alanüül-tmRNA siseneb ribosoomi tühja A-kohta kompleksis EF-Tu ja guanosiin trifosfaadiga (GTP) (Rudinger-Thirion *et al.*, 1999); 2) tmRNAalaniin lisatakse kasvava peptiidi ahelasse ja toimub tmRNA translokatsioon ribosoomi A-kohast P-kohta; 3) algne mRNA vabaneb ribosoomist ja valgusüntees jätkub tmRNA-sisese kümme aminohapet kodeeriva lugemisraami pealt kuni selle lugemisraami stoppkoodonini; 4) lisatud järjestus suunab valgu lagundamisele (Withey & Friedman, 2003).

tmRNA poolt märgitud valke degradeerib peamiselt tsütoplasmaatiline proteaas ClpXP, kuigi oma osa mängivad ka tsütoplasmaatiline proteaas ClpAP, membraaniseoseline proteaas FtsH, ja periplasmaatiline proteaas Tsp (Withey & Friedman, 2003). ClpXP poolt läbi viidavat lagundamist parendab ribosoomiga seondunud valk SspB (Levchenko *et al.*, 2000).

Interaktsiooniks 70S ribosoomiga peab tmRNA olema laetudalaniiniga (Tadaki *et al.*, 1996), ning esimene vajalik faktor tmRNA toimimiseks on seega alanüül-tRNA süntetaas. Analoogselt tRNA-ga on vaja EF-Tu ja GTP osalust (Rudinger-Thirion *et al.*, 1999).

Kasutades uuringutes faagi P22, identifitseeriti SmpB kui oluline *trans*-translatsiooni faktor. See 160 aminohappe pikkune aluseline valk seondub tugevasti ja spetsiifiliselt tmRNA-ga ja on vajalik tmRNA assotsieerumisel ribosoomiga (Karzai & Sauer, 2001). SmpB seondub tmRNA tRNA sarnase piirkonna D- ja lisa-õlaga (Gutmann *et al.*, 2003). Kuna SmpB on võimeline iseseisvalt assotsieeruma 70S ribosoomiga, on tekkinud uus teooria *trans*-translatsiooni initsiatsioonist: SmpB tunneb ära mRNA-l peatunud ribosoomi, kaasab tmRNA ja algatab *trans*-translatsiooni (Hallier *et al.*, 2004).

Ribosoomi valk S1 osaleb tmRNA konformatsiooni muutmisel nii, et lugemisraami sisaldav üheaahelaline piirkond koos lähedaste aladega keerdub rohkem lahti ja muutub seega ribosoomile paremini kättesaadavaks (Valle *et al.*, 2003). S1 vajalikkus pole aga kindel, vähemasti on andmeid, et see pole kriitilise tähtsusega funktsioon (McGinness & Sauer, 2004).

Rnaas R funktsiooniks pakuti algselt *trans*-translatsiooni põhjustanud mRNA lagundamist (Karzai & Sauer, 2001), ent nukleaasi defektses tüves ei nähtud mingit efekti tmRNA-sõltuval mRNA degradatsioonile (Yamamoto *et al.*, 2003). Hiljaaegu on aga Rnaas R-i funktsioon ilma stop-koodonita mRNA-de lagundamisel taas kinnitust leidnud (Richards *et al.*, 2006). Tulemuste lahknevusele hetkel selgitust ei ole.

Valkudele YfbG ja PrsA pole *trans*-translatsioonis funktsiooni leitud, kuigi nad tulevad kaasa tmRNA ja SmpB väljapuhastamisel (Karzai & Sauer, 2001).

1.3.2. *trans*-translatsiooni üldisem roll ja bioloogiline tähendus

trans-translatsiooni mudel, nagu algselt pakutud, hõlmas ainult ribosome, mis on peatunud transleeritava mRNA 3' otsas, millel puudub stoppkoodon. Sellised mRNA-d on arvatavasti tekkinud kahjustuste, ribonukleaaside lagundamise või transkriptsiooni enneaegse termineerumise tõttu. Hilisemad tööd näitavad, et *trans*-translatsioon leiab vahel

aset ka siis, kui ribosoomid transleerivad vigastamata mRNA-d - *trans*-translatsioon võib toimuda, kui ribosoomid peatuvad kas avatud lugemisraami siseselt või valgusünteesi terminatsiooni koodonil (Withey & Friedman, 2003).

Lugemisraami siseselt põhjustab ribosoomi peatumist vastava tRNA puudumine, mis on eriti tõenäoline haruldaste koodonite puhul (Roche & Sauer, 1999).

Stoppkoodonist johtuv *trans*-translatsioon leiab aset kui: 1) vahetult enne stoppkoodonit on harvaesinevad koodonid; 2) sünteesitava valgu C-otsas on proliini jääk (Hayes *et al.*, 2002), mis muudab ilmselt karboksüül-otsa struktuuri (Withey & Friedman, 2003); 3) stoppkoodon on nõrk (UAA) (Hayes *et al.*, 2002).

Lisaks ärgitab stoppkoodonil toimuvat *trans*-translatsiooni LESG järjestus sünteesitava peptiidi karboksüül-otsas (Sunohara *et al.*, 2002). LESG järjestuse puhul pole vahet, milline stoppkoodon talle järgneb, mistõttu oletatakse, et selle konkreetse järjestuse poolt esile kutsutud *trans*-translatsiooni mehhanism erineb teistest stoppkoodoniga seotud juhtumitest (Withey & Friedman, 2003).

Kõigil eelpool loetletud juhtudel on *trans*-translatsiooni algatajaks ribosoomi peatumine. Kuidas täpselt tmRNA tunneb ära mRNA-l peatunud ribosoomi, jääb suuresti lahtiseks. Mõned edusammud selles osas on siiski tehtud. Järjest enam koguneb tõendeid, et ribosoomi peatumisele järgneb ja *trans*-translatsioonile eelneb mRNA lõikamine ribosoomi A-kohas (Hayes & Sauer, 2003). Nukleaasi, mis seda lõikamist läbi viib, pole identifitseeritud. Üheks võimalikuks mRNA lõikajaks on pakutud ka ribosoomi ennast.

Esiagne *trans*-translatsiooni mudel pakkus välja, et tmRNA-vahendatud peptiidide märkimise peamiseks põhjuseks on kõrvaldada mittetäielikud valgud, suunates nad proteolüüsi. Hiljem on seda mudelit üle vaadates jõutud veidi teistsugusele arusaamisele. Arvukad katsed viitavad, et *trans*-translatsiooni põhiliseks bioloogiliseks rolliks on pigem peatunud ribosoomide eemaldamine mRNA-lt, kaasaarvatud vigastamata mRNA-lt, tõstes sellega valgusünteesi tõhusust. Võimetus eemaldada peatunud ribosoomide mRNA-lt takistaks nii selle mRNA edasist transleerimist kui vähendaks peatunud ribosoomide arvelt

aktiivsete ribosoomide hulka. Need efektid põhjustaks limiteerivate mRNA-de ebapiisavat transleerimist, mis viib lõpuks kasvudefektini (Withey & Friedman, 2003).

Hiljuti ilmunud faktid tõstatavad üles veel ühe olulise aspekti *trans*-translatsiooni positsioonist raku füsioloogias, näidates tmRNA tähtsust tRNA-de vabastajana peptidüül-rühmast (Singh & Varshney, 2004). Selle kinnituseks on fakt, et tmRNA üleekspressioon supresseerib ja *ssrA* deletsioon süvendab *E. coli pth^{ts}* fenotüüpi.

1.3.3. tmRNA roll raku füsioloogias

1.3.3.1. Aminohapete biosünteesi regulatsioon

tmRNA-l arvatakse olevat roll ka rakkude ainevahetuse regulatsioonis läbi toksiin-antitoksiin paari RelE-RelB, mis aitavad bakteril kiiresti adapteeruda toitainete puudusega (Pedersen *et al.*, 2003). RelE ja RelB asuvad *relBE* lookuses, mis on levinud nii eu- kui arhebakterites (Gerdes, 2000).

Toksiin RelE peatab valgusünteesi, lõigates mRNA-d ribosoomi A-kohas (Christensen & Gerdes, 2003; Pedersen *et al.*, 2003) koodoni teise ja kolmanda aluspaari vahel. Seejuures on täheldatud kõrget koodonspetsiifilisust. Toksiin tunneb ära ja lõikab kõige paremini stoppkoodonit UAG, veidi kehvemini UAA-d ja eriti halvasti UGA-d. Kodeerivatest koodonitest on kõige paremini ära tuntavad UCG ja CAG (Pedersen *et al.*, 2003).

Normaalsetes füsioloogilistes tingimustes moodustab RelB tugeva kompleksi RelE-ga ja neutraliseerib sellega toksiini (Galvani *et al.*, 2001). Lisaks on RelB autorepressor *relBE* lookusele. Veelgi enam, nii vaba RelB kui RelBE kompleks suruvad alla transkriptsiooni *relBE* operonilt, seejuures kompleks on isegi tõhusam repressor kui vaba RelB (Christensen *et al.*, 2001). Aminohapete nälja korral aktiveerub RelE Lon proteaaside kaudsel mõjul. Lon proteaasid lagundavad antitoksiini, rakus tõuseb vaba toksiini RelE hulk, mis viib translatsiooni taseme languseni (Christensen & Gerdes, 2004).

RelE lõikab mRNA-d ribosoomi A-kohas, mis viitab sellele, et esineb mingi seos toksiini ja tmRNA funktsiooni vahel (Pedersen *et al.*, 2003). Samuti on *ssrA*-defektne tüvi ülitundlik

RelE-le (Christensen & Gerdes, 2003). Aminohapete nälja tingimustes saab eriti oluliseks aminohapete biosünteesi ensüümide kiire tootmine, milleks on jällegi vaja aminohappeid. Ainsaks aminohapete allikaks on sellistes tingimustes vaid rakus olemasolevate valkude aeglane lagundamine. tmRNA võib seda protsessi koostöös RelE-ga kiirendada. RelE lõikab spetsiifiliselt mRNA-d, tmRNA vabastab ribosoomid ja suunab valgud kiirendatud lagundamisele, millest vabanevad aminohapped lähevad kasutusse, sünteesimaks muutunud olukorras vajalikke ensüüme. Selle mudeli poolt kõneleb ka fakt, et RelE-le tundlikud UAG stoppkoodonid on väga alaesindatud aminohapete biosünteesi ensüüme kodeerivatel mRNA-del. See tunnus võib olla selekteerunud, et suurendada nende valkude sünteesi RelE olemasolu korral rakus (Pedersen *et al.*, 2003).

1.3.3.2. Suhkrute metabolismi regulatsioon

Näide sellest, kuidas *trans*-translatsioon võib olla oluline geeniekspressioonile, tuleb *lac* operonist, mis vastutab laktoosi kasutamise eest, ning mille ekspressioon *E coli*-s on sõltuv tmRNA aktiivsusest (Abo *et al.*, 2000). Selle operoni repressorvalk LacI seondub operaatoritega nii, et katab iseenda *lacI* geeni 3' otsa, mis viib *lacI* transkriptsiooni enneaegse terminatsioonini. Selle tagajärjel tekkinud kärbitud mRNA-d, millel puudub stop koodon, on tüüpilised *trans*-translatsiooni sihtmärgid. Kui rakkudes puudub tmRNA aktiivsus, siis vigased mRNA-d transleeritakse ja moodustunud kärbitud valgud on võimelised seonduma *lac* operaatoraladega. Operaatorite kõrgem okupeeritus põhjustab märkimisväärse viivituse *lac* operoni induktsioonil. Lisaks on osadel puuduva karboksüül-otsaga LacI valkudel tekkinud tundetus induktorile (allolaktoosile).

Lisaks *lac* operonile on nähtud vihjeid tmRNA võimalikest seostest teistegi suhkrute metabolismiga. *Escherichia coli* GalE (UDP-galaktoos 4-epimeraas) on kodeeritud esimese geeni poolt neljast tihedalt koos paiknevast geenist galaktoosi operonis. RbsK (ribokinaas) on osa riboosi operonist, mille *rbsK* on temast allavoolu asuvast *rbsR*-ist kolme aluspaari kaugusel. Nii GalE kui RbsK puhul on märgatud nende kõrget märkimist tmRNA poolt, mille füüsiline põhjus näib olevat ribosoomi peatumine järgnevalt geenilt translatsiooni

alustava ribosoomi aeglase liikumise tõttu (Roche & Sauer, 2001). Võib-olla on nende geenide puhul tmRNA seotud suhkrute metabolismi regulatsiooniga.

1.3.3.3. Kohanemine stressitingimustega

Lisaks aminohapete nälja korral RelE ja tmRNA vahendusel toimuvale translatsiooni peatamisele ja aminohapete vabastamisele valkude kiirendatud lagundamise teel (vt pt 1.3.3.1), kasvavad *ssrA*-defektsed *Escherichia coli* ja *Bacillus subtilis* stressitingimustes aeglasemalt (Komine *et al.*, 1994; Muto *et al.*, 2000). Mõlemas bakteriliigis aitab tmRNA kohaneda raskete keskkonnatingimustega, nii füüsiliste (kõrgenenud temperatuur) kui keemilistega (süsinikuallika puudus, kõrgendatud etanooli või kaadmium kloriidi kontsentratsioon). *E. coli ssrA* deletsiooniga tüved ilmutavad muutunud liikuvust kõrgel temperatuuril (Komine *et al.*, 1994). Samuti ei suuda *E. coli* rakud, mis ei ekspresseeri funktsionaalset tmRNA-d, toetada teatud hübriidseid faage (*λimmP22*).

Neisseria gonorrhoeae jaoks on funktsionaalse tmRNA olemasolu eluks vajalik. *N. gonorrhoeae* erineb *E. coli*-st äärmiselt kitsa ökoloogilise niši ja suhteliselt väikese genoomi poolest. *N. gonorrhoeae*-l on neli ribosomaalse RNA operoni, *E. coli*-l seevastu seitse. Võib-olla just seetõttu on *N. gonorrhoeae* tundlikum vabade ribosoomide hulgale (Huang *et al.*, 2000).

Katsed termoindutseeritava faagiga Mu, mis vajab tmRNA-d induktsiooniks, näitavad et Mu kasutab *trans*-translatsiooni kui geeniekspressiooni regulaatorit (Ranquet *et al.*, 2001) Sarnaselt *lac* operoniga, põhjustab tmRNA aktiivsuse puudumine kärbitud Mu repressormolekulide kogunemist raku, mis viib faagi operaatorite kõrgendatud okupeerimiseni. Samuti võib lühem Mu repressor näidata üles kuumusele vastupidavat iseloomu isegi indutseerivates tingimustes. Erinevalt LacI-st moodustuvad lühikesed Mu repressori molekulid mitte transkriptsiooni vaid translatsiooni enneaegsest termineerumisest ja normaalne Mu induktsioon taastub, kui bakteris ekspresseerida muudetud tmRNA-d, mis vabastab ribosoomid, kuid ei suuna valku degradatsiooni. Ilmselt saavad ribosoomide vabastamise tõttu ülejäänud ribosoomid polüsoomi koostises jätkata ja lõpule viia funktsionaalse repressori sünteesi.

Lisaks eelnevale on viiteid, et *trans*-translatsioon võiks mängida rolli ka bakterite patogeensuses, kuna näiteks *Salmonella enterica* serovar Typhimuriumi *ssrA*-defektne tüvi näitab üles vähenenud virulentsust. Samuti ei toeta funktsionaalse tmRNA-ta *S. enterica* serovar Typhimuriumi tüvi faagi P22 kasvu (Julio *et al.*, 2000).

2. TÖÖ EESMÄRK

Praktilise töö laiemaks eesmärgiks on uurida bakteriaalset valgusünteesi stressitingimustes, lülitades välja olulisemad translatsiooni moduleerimise eest vastutavad geenid *Escherichia coli* K-12 päritolu tüves BW25113. Järgnevalt kirjeldada saadud tüvede fenotüüpe, rakendades neile erinevaid stressitingimusi, mis läbi võiks jõuda paremale ettekujutusele stressigeenide produktide funktsioonidestst ning rollidest ning võimalikest omavahelistest seostest.

Seejuures mõnede geenide nullmutantide kohta leiab kirjandusest ühte või teist liiki stressi katseid, mis enamasti on aga sooritatud üsna erineva meetodikaga. Seepärast otsustati võtta aluseks juba olemasolev informatsioon ja tehtud katsed, töötada välja ühtne meetodika ning sooritada ulatuslikum stressikatsete seeria, kasutades sarnase geneetilise taustaga tüvesid.

Välja lülitada õnnestus *relA*, *rmf*, *yfiA*, *yhbH*, *relEB* (topeltnutant, ühe-etapiliselt välja lülitatud nii toksiooni kui antitoksiini geen) geenid, kingitusena professor Brice Feldenilt Rennesi'i Ülikoolist oli olemas ka Δ *ssrA* tüvi. Kuna esialgsete stressikatsetega saadud tulemused andsid kõige huvitavama fenotüübi *relA* tüve puhul, keskenduti edaspidi selle fenotüübi uurimisele.

Käesoleva töö kitsamaks eesmärgiks oli uurida, mil määral aitab RelA olemasolu *E. coli*-l vastu pidada pikemaajalisele viibimisele statsionaarses faasis, kas ja kuidas see mõjutab bakteri toibumist ja kasvu jätkamist, kui keskkonnatingimused taas paranevad.

3. MATERJAL JA METOODIKA

3.1. Söötmed, kemikaalid

Baktereid kasvatati SOB, SOC, Lurian-Bertani (LB) ja M9 (süsinikuallikaks 0,4% glükoos või 0,2% glütserool) söötmes või LB agarooši plaatidel (Sambrook and Russel, 2001). Vajadusel lisati minimaalsöötmele M9 aminohappeid, aminohappe lõppkontsentratsioonini 100 µg/ml. Transformant selektsioonil kasutati ampitsilliini (100µg/ml) ja kanamütsiini (25µg/ml) Induktsiooniks kasutati L-arabinoosi kontsentratsioonil 1mM. PCR-i testidel kasutatid *Taq* polümeraasi (Fermentas). Kloneerimiseks ja mutageneesiks kasutati *Taq* ja *Pfu* (Fermentas) 10:1 segu.

3.2. Tüved, plasmiidid

Metsik-tüüpi tüvena kasutati *E. coli* tüve BW25113 ($lacI^q$ $rrnBT_{14}$ $DlacZ_{WJ16}$ $hsd R514$ $DaraBADAH33$ $DrhaBAD_{LD78}$). tmRNA suhtes mutantse tüvena kasutati tüve $\Delta ssrA$ (Luidalepp *et al.*, 2005), mis on valmistatud BW25113 tüvest, kasutades Kirill A. Datsenko ja Barry L. Wanner protokoll (Datsenko & Wanner, 2000). Mõlemad tüved on saadud lahke kingitusena professor Brice Feldenilt (Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique, Faculte de Pharmacie, Universite de Rennes).

Mutantne tüvi $\Delta relA$ on valmistatud metsik-tüüpi tüvest kasutades Kirill A. Datsenko ja Barry L. Wanner protokoll (Datsenko & Wanner, 2000). Mutantsed tüved $\Delta relBE$, Δrmf , $\Delta yfiA$, $\Delta yhbH$ on valmistatud metsik-tüüpi tüvest kasutades Kirill A. Datsenko ja Barry L. Wanner protokoll (Datsenko & Wanner, 2000) modifikatsiooni. Ära on jäetud restriктаas

DpnI-ga lõikamine, elektroporatsioonil kasutati 0,2 cm elektroporatsiooni küvetti ning 40 µl ettevalmistatud rakke. Kasutatud praimerid on toodud Tabelis 1.

Kõikidel tüvedelt eemaldati lugemisraam, nii et alles jäi ainult stop-koodon. $\Delta relBE$ tüvelt eemaldati üksteisele vahetult järgnevate geenide *relB* ja *relE* lugemisraamid samaaegselt, nii, et alles jäi *relE* lugemisraami stop-koodon.

3.3. Aparatuur

Bakterikultuuri tihedust mõõdeti spektrofotomeetriga (Thermo Helios β ja Tecan Sunrise). Deletsiooniga tüvede valmistamisel kasutati elektroporeerimiseks BIORAD-i elektroporaatorit Gene Pulser Xcell. 19 aminohappega minimaalsöötme katsed viidi läbi 96-positioonilisel mikrotiiterplaadil (DELTALAB S.L.).

3.4. Katsed

3.4.1. Kasv 37°C ja 45°C juures, külma- ja kuumašok k

Metsik-tüüpi ja deletsiooniga tüve üleökultuurist inokuleeriti (1000-kordse lahjendusena) 20 ml LB-d; kasvatati 37°C juures seni, kuni optiline tihedus (OD) jõudis 0,2-0,3-ni (siin ja edaspidi on optilist tihedust mõõdetud 600 nm juures). Seejärel lahjendati rakukultuure LB söötmes OD 0,01-ni. Saadud kultuure kasvatati koguses 20 ml. Kasvukatsete puhul kasvatati rakukultuure 37°C või 47°C juures. Külma- ja kuumasoki katsetes kasvatati rakukultuure 37°C juures 2,5 tundi, viidi seejärel 20-neks minutiks jääle või 15-neks minutiks 47°C vesivanni, misjärel kasvatati edasi 37°C juures. Alates OD 0,01-st mõõdeti iga 30 minuti järel rakukultuuride optilist tihedust, külma- ja kuumašoki puhul fikseeriti OD väärtus ka vahetult pärast šoki lõppemist.

3.4.2. Kuumasurm

Metsik-tüüpi ja deletsiooniga tüve üleökultuurist inokuleeriti (1000-kordse lahjendusena) 20 ml LB-d; kasvatati 37°C juures seni, kuni OD jõudis 0,2-0,3-ni (eksponentsiaalse faasi

rakkude saamiseks) või 24h (statsionaarse faasi rakkude saamiseks). Seejärel jagati raku-suspensioon 0,5 ml kaupa katsutitesse ja inkubeeriti 50°C juures. Ajahetkedel 0, 20, 40, 60, 80 ja 100 minutit jahutati/lahjendati rakukultuure toatemperatuuril söötmega ning plaaditi LB plaadile. Järgmisel päeval loeti kolooniaid ja arvatati kolooniaid moodustavate bakterite (CFU) arv ühe milliliitri bakterikultuuri kohta. Tulemused vormistati graafikuks, jagades iga ajapunkti tulemuse katse stardihetke tulemusega (mõjutamata rakkude CFU/ml-ga)

3.4.3. Oksüdatiivne stress

Metsik-tüüpi ja deletsiooniga tüve üleöökuultuurist inokuleeriti (1000-kordse lahjendusena) 20 ml LB-d; kasvatati 37°C juures seni, kuni OD jõudis 0,2-0,3-ni (eksponentsiaalse faasi rakkude saamiseks) või 24h (statsionaarse faasi rakkude saamiseks). Seejärel jagati raku-suspensioon 450 µl kaupa katsutitesse, kuhu eelnevalt oli pipeteeritud 50 µl vesinikperoksiidi 0, 5, 10, 15, 20, 30, 50 mM lõppkontsentratsiooni saamiseks. Järgnevalt inkubeeriti rakke 37°C juures 10 minutit. Katse peatati 20U katalaasi lisamisega, katalaasil lasti toimida 5 minutit. Seejärel lahjendati raku-suspensioone toatemperatuuril söötmega ning plaaditi LB plaadile. Järgmisel päeval loeti kolooniaid ja arvatati CFU-de arv ühe milliliitri bakterikultuuri kohta. Tulemused vormistati graafikuks, jagades iga H₂O₂ kontsentratsiooniga saadud tulemuse H₂O₂-ga mõjutamata rakukultuuri tulemusega.

3.4.4. Statsionaarne faas ja toibumine

Metsik-tüüpi ja deletsiooniga kultuure kasvatati 20 ml-s söötmes 37°C juures kuni optilise tiheduseni OD ~ 0,8. Seejärel lahjendati kultuurid tiheduseni OD 0,1. Saadud kultuure kasvatati koguses 20 ml 37° C juures kuni nad jõudsid statsionaarsesse faasi. Statsionaarses faasis lahjendati kultuure graafikutel viidatud ajahetkedel värskesse söötmesse OD 0,1-ni ja jälgiti nende toibumist ja kasvu. Igas ajapunktis mõõdeti bakterikultuuride tihedused ning igast kultuurist tehti kaks külvi LB plaadile. Plaaditavad lahjendused LB vedelsöötmes kasvanud kultuurist tehti arvestusega, et ühele plaadile tuleks 50 ja teisele 250 kolooniat. Seejuures eeldati, et bakterikultuur tihedusega OD 1 sisaldab 5·10⁸ CFU-d ühes milliliitris.

Järgmisel päeval loeti kolooniaid ning arvutati CFU-de arv ühe milliliitri bakterikultuuri kohta.

3.4.5. Statsionaarsest faasist toibumine 19 aminohappega minimaalsöötmes

Metsik-tüüpi ja deletsiooniga kultuure kasvatati 20 ml-s minimaalsöötmes M9 (süsinikuallikaks 0,4% glükoos) 37°C juures kuni optilise tiheduseni OD ~ 0,8. Seejärel lahjendati kultuurid tiheduseni OD 0,1. Saadud kultuure kasvatati koguses 20 ml 37° C juures kuni nad jõudsid statsionaarsesse faasi. Rakke hoiti 15 tundi statsionaarses faasis, misjärel neid pesti aminohapeteta söötmega (enamasti 0,2% glütserooli M9-s, aga igas katses kahe katseparalleeli jaoks ka 0,4% glükoosi M9-s, vt alljärgnevaid selgitusi). Pestud rakukultuurid suspendeeriti pesemiseks kasutatud söötmes OD 0,2-ni.

Statsionaarsest faasist toibumine viidi läbi 96-positioonilisel mikrotiiterplaadil. Iga mikrotiiterplaadi positsiooni katsekoguseks kavandati 80 µl (võttes arvesse kultuuri/nõu soovituslikku suhet 1:5-1:10; mikrotiiterplaadi positsiooni ruumala on 400 µl). Ühte positsiooni pipeteeriti:

10 µl	19 erineva aminohappe segu (iga aminohapet 800 µg/ml), kokku 20 segu;
30 µl	¼ võrra kangem M9 (glütserooliga);
40 µl	rakususpensiooni tihedusega 0,2 OD ühikut.

Ühel plaadil testiti toibumine 20-s erinevas söötmes nii metsik-tüüpi kui *relA* tüvel ja seda tehti kahes korduses. Kahes korduses uuriti samal plaadil lisaks veel toibumist ilma aminohapeteta 0,2% glütserooli sisaldavas M9-s ja 0,4% glükoosi sisaldavas M9-s.

Mikrotiiterplaadile kandmise järel mõõdeti positsioonide optiline tihedus (A600nm), misjärel rakke inkubeeriti 37° C loksutis. Toibumise jälgimiseks mõõdeti positsioonide optiline tihedus iga kahe tunni tagant.

3.4.6. Kasv 19 aminohappega minimaalsöötmes

Metsik-tüüpi ja deletsiooniga kultuure kasvatati 20 ml-s minimaalsöötmes M9 (süsinikuallikaks 0,4% glükoos) 37°C juures kuni optilise tiheduseni OD ~ 0,8. Seejärel lahjendati kultuurid tiheduseni OD 0,1. Saadud kultuure kasvatati koguses 20 ml 37° C

juures kuni OD~0,5. Seejärel rakke pesti ja toimiti nendega edaspidi samamoodi kui 19 aminohappega minimaalsöötme toibumiskatses (vt. ptk. 3.4.5).

Tabel 1. Deletsiooniga tüvede valmistamisel kasutatud praimerid.

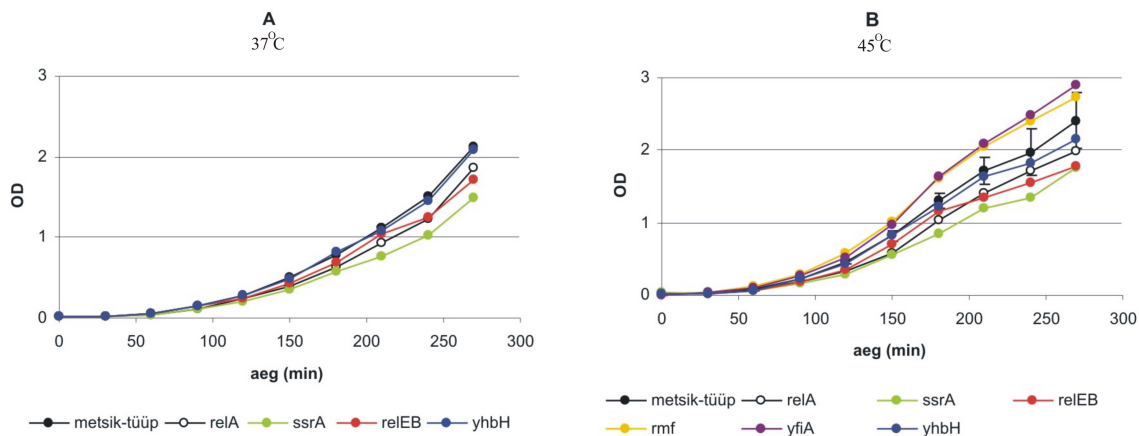
Praimerid geenide eemaldamiseks vajalike insertide amplifitseerimiseks	
geenid	praimerid
<i>relA</i>	RelAH1 CGATTTTCGGCAGGTCTGGTCCCTAAAGGAGAGGACGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC RelAH2 CAATCTACATTGTAGATACGAGCAAATTTTCGGCCTAATCCGGGGATCCGTCGACC
<i>relB</i> ja <i>relE</i>	RelBH1 TTGTAATGACATTTGTAATTACAAGAGGTGTAAGACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC RelEH2 CTTCGGTGCGAAACAGAGATGTCATGCTTTGGTTCAATTCGGGGATCCGTCGACC
<i>rmf</i>	RmfH1 CTTTTCCACCAGAAACCAGTATGAGGGAAACGAGGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC RmfH2 GCAATGCGGAGGTTTCTTTTTAAAGAGACAGAATCAATTCGGGGATCCGTCGACC
<i>yfiA</i>	YfiAH1 GAATTCACCAAGACGGGAAGACAAGAGGTAAAATTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC YfiAH2 AAGGCGCGTTGGCGATACACTCAATATAAAGGACTAATTCGGGGATCCGTCGACC
<i>yhbH</i>	YhbHH1 AACAACTCGTTTGACCCAACCGATAAGGAAGACACTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC YhbHH2 AGACCGCCATGCACATGCTAATTGCCCGGACAATTAATTCGGGGATCCGTCGACC
Praimerid geenideletsiooniga tüvede korrektsuse kontrolliks	
geenid	praimerid
<i>relA</i>	RelAk1 TCTGGTCCCTAAAGGAGAGGA RelAk2 CCCTTCCTCAAACCGCTAT
<i>relB</i> ja <i>relE</i>	RelBk1 CTTCGTGACTTGCCCTAAGC RelEk2 GGTGCGAAACAGAGATGTCA
<i>rmf</i>	Rmfk1 CCACCAGAAACCAGTATGAGG Rmfk2 CAATGCGGAGGTTTCTTTTT
<i>yfiA</i>	YfiAk1 CCAAGACGGGAAGACAAGAG YfiAk2 GCGTTGGCGATACACTCAAT
<i>yhbH</i>	YhbHk1 CCCAACCGATAAGGAAGACA YhbHk2 GCCATGCACATGCTAATTG

4. TULEMUSED

Iseloomustamaks mitmesuguseid stressitingimustel ribosoomiga seonduvaid ja translatsiooni moduleerivaid faktoreid, konstrueeriti vastavaid faktoreid kodeerivate geenide deletsiooniga tüved ja uuriti saadud tüvede fenotüüpe, rakendades neile erinevaid stressitingimusi.

4.1. *relA*, *ssrA*, *relEB*, *rmf*, *yfiA*, *yhbH* geeniproduktid näivad olevat mitteolulised külma-, kuuma- ja oksüdatiivse stressi korral

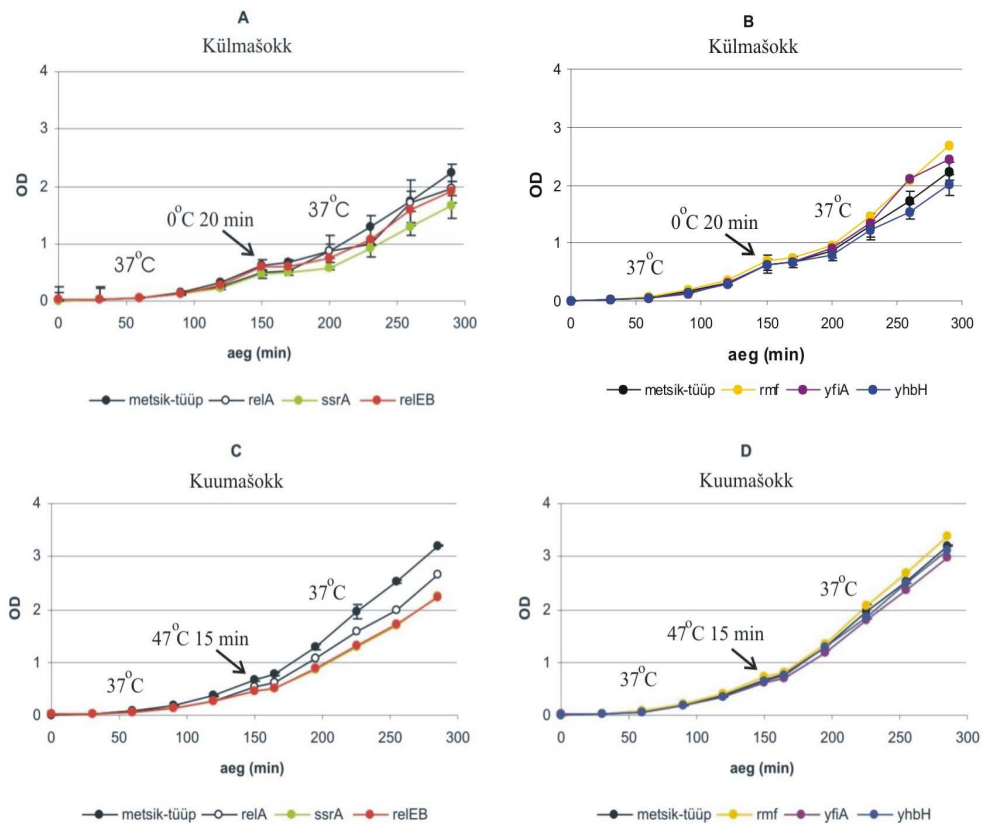
Kõigepealt sai iseloomustatud deletsiooniga tüvede kasvukiirus rikkas Luria-Bertain'i söötmes 37°C ja 45°C juures (joonis 6). Olulisi erinevusi metsik-tüüpi ja deletsiooniga tüvede vahel ei esinenud. 37°C juures oli *ssrA* tüve kasvukiirus veidi väiksem metsik-tüüpi



Joonis 6. Kasvukõverad 37°C ja 45°C juures. Katse alustamiseks inokuleeriti (0,1%) üleöö kultuurist 20 ml LB-d; kasvatati 37°C OD 0,2-0,3-ni ja lahjendati OD 0,01-ni. Edasi kasvatati rakke (A) 37°C ja (B) 45°C juures. Vertikaalteljel on bakterikultuuri optiline tihedus ja horisontaalteljel aeg minutites. Katsetulemused on esitatud: (A) paneelil on kõik tulemused ühes korduses; (B) paneelil metsik-tüüpi ja *ssrA* tüvedel vähemalt kolme katse keskmine ja *relA*, *relEB*, *yhbH* tüvedel kahe katse keskmine tulemus; *rmf*, *yfiA* katse on sooritatud ühes korduses.

tüve omast (joonis 6, paneel A), 45°C juures oli lisaks *ssrA*-le ka *relEB* kasvukiirus mõnevõrra väiksem metsik-tüüpi tüve omast, ent erinevus on viimase puhul eriti väike (joonis 6, paneel B). *yfiA* ja *rmf* tüve kasvukiirus tundus olevat metsik-tüüpi tüvest veidi suurem, ent nende kahe tüve puhul on katse sooritatud ühes korduses (joonis 6, paneel B).

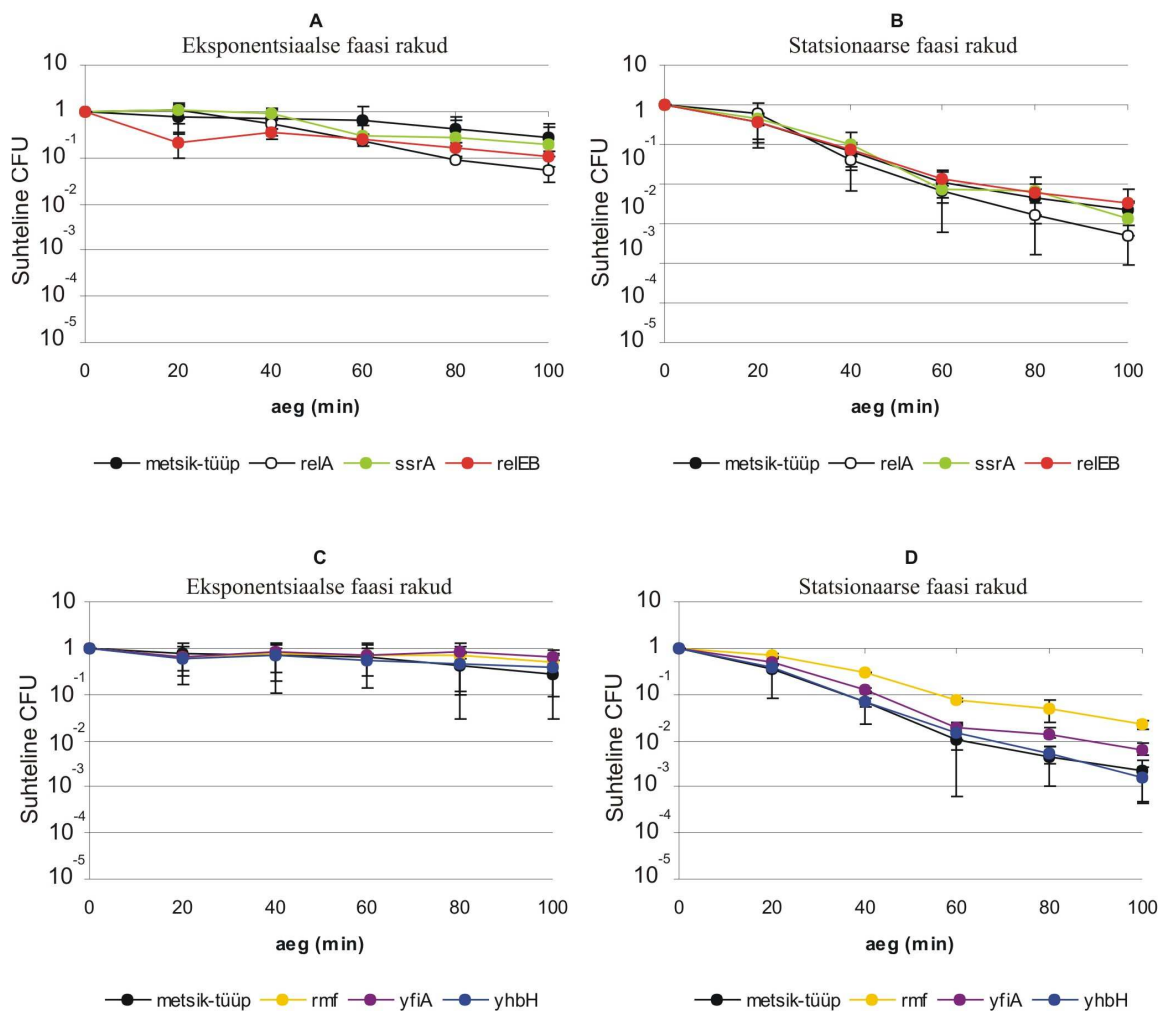
Metsik-tüüpi ja deletsiooniga rakkude vahel ei nähtud olulist erinevust ka külma- ega kuumašoki korral (joonis 7). Kuumašoki katses võib näha *relA*, *ssrA* ja *relEB* tüvede mõnevõrra väiksemat kasvukiirust juba enne šoki rakendamist (*ssrA* tulemus kattub joonisel *relEB* tulemusega) (joonis 7, paneel C).



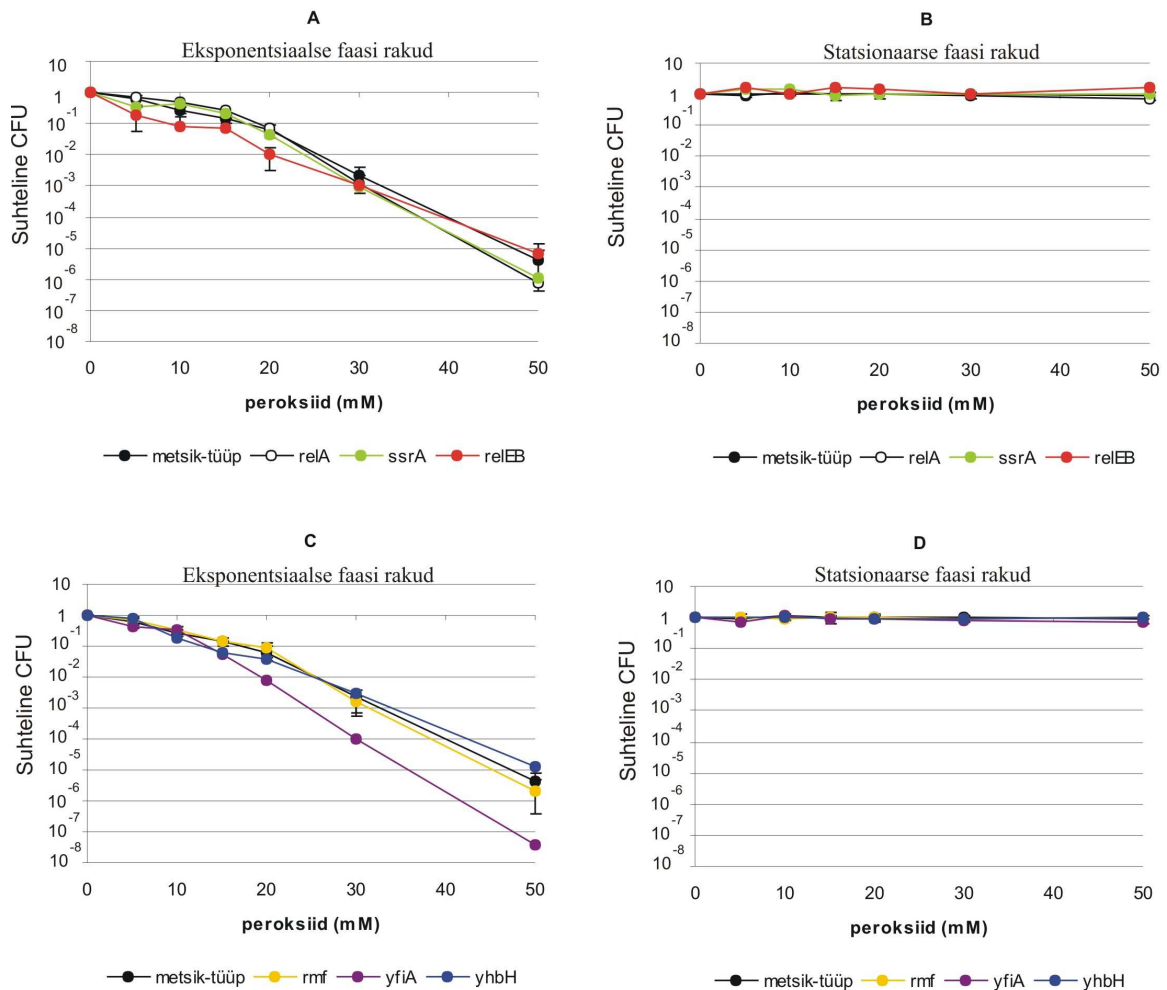
Joonis 7. Külma- ja kuumašokk. Katse alustamiseks inokuleeriti (0,1%) üleöö kultuurist 20 ml LB-d; kasvatati 37°C OD 0,2-0,3-ni ja lahjendati OD 0,01-ni. Edasi kasvatati rakke 37°C juures ning (A) ja (B) paneelil viidi rakukultuurid 150-ndal minutil 20-ks minutiks jääle, (C) ja (D) paneelil 150-ndal minutil 15-ks minutiks 47°C juurde. Vertikaalteljel on bakterikultuuri optiline tihedus ja horisontaalteljel aeg minutites. Katsetulemused on esitatud: A) paneelil on kolme katse keskmine tulemus v.a *relA*, millel on esitatud kahe katse keskmine tulemus; (B) paneelil metsik-tüüpi ja *yhbH* puhul kolme katse keskmine tulemus, *rmf* ja *yfiA* katse on sooritatud ühes korduses; (C) ja (D) paneelil on metsik-tüüpi tüvega sooritatud katse kolmes korduses, ülejäänutega ühes korduses.

Järgnevalt uuriti rakkude ellujäämist kõrgemal temperatuuril. Eraldi jälgiti nii statsionaarse kui eksponentsiaalse faasi rakukultuure (joonis 8). Seejuures ilmses, et 50°C juures kuumutamise korral langeb statsionaarsest faasist pärit metsik-tüüpi *E. coli* elusrakkude (kolooniaid moodustavate rakkude) arv 100 minuti jooksul ligi kolm suurusjärku (joonis 8, paneelid B ja D), ent eksponentsiaalsest faasist pärit rakukultuuri korral kuni ühe suurusjärgu (joonis 8, paneelid A ja C). Statsionaarse faasi rakkude puhul andis mõnevõrra suurema kuumataluvuse *rmf*-i deletsioon (joonis 8, paneel D), kuigi pärast 100 minuti möödumist ei erinenud *rmf* tüve suhteline CFU-de hulk enam oluliselt metsik-tüüpi tüve omast (andmeid pole esitatud).

Vaadeldi ka deletsioonitüvede ellujäämist oksüdatiivse stressi tingimustes (joonis 9). Eri-nevalt kuumašoki katsetest (joonis 8) langes peroksiidistressi korral eksponentsiaalse faasi elusrakkude arv ja statsionaarse faasi elusrakkude arv jäi samaks isegi kõrgeima kasutatud peroksiidi kontsentratsiooni 50 mM korral (joonis 9). Eksponentsiaalsest faasist pärit rakukultuuri CFU-de arvukus langes 50 mM vesinikperoksiidi kontsentratsiooni korral 10 minuti jooksul 5-6 suurusjärku (joonis 9, paneelid A ja C). Metsiktüüpi rakkudega võrreldes kannatas *yfiA* tüvi mõnevõrra vähem H₂O₂ põhjustatud stressi (joonis 9, paneel C), ent selle tüvega on katse sooritatud ühes korduses.



Joonis 8. Rakkude ellujäämine 50°C juures. Üleöö kultuurist inokuleeriti (0,1%) 20 ml LB-d; kasvatati 37°C OD 0,2-0,3-ni (eksponentsiaalse faasi rakud) või 24 tundi (statsionaarse faasi rakud), rakukultuur jagati 0,5 ml kaupa katsutitesse ja viidi temperatuurile 50°C. Ajapunktides jahutati/lahjendati rakukultuuri toatemperatuuril söötmega ja plaaditi. Järgmisel päeval loeti kolooniaid ja arutati CFU/ml. (A) ja (C) paneelil on tulemused eksponentsiaalse faasi rakkudega, (B) ja (D) paneelil statsionaarse faasi rakkudega. Vertikaalteljel on bakterikultuuri suhteline CFU, mis arutati milliliitri kohta jagades ajapunkti tulemuse katse stardihetke tulemusega (mõjutamata rakkude CFU/ml-ga); horisontaalteljel on rakkude kuumutamise aeg minutites. *rmf* ja *yfiA* puhul on esitatud kahe katse keskmine tulemus, ülejäänud tüvedele sooritati katse vähemalt kolmes korduses.



Joonis 9. Rakkude ellujäämine oksüdatiivse stressi korral. Üleöö kultuurist inokuleeriti (0,1%) 20 ml LB-d; kasvatati 37°C OD 0,2-0,3-ni (eksponentsiaalse faasi rakud) või 24 tundi (statsionaarse faasi rakud), rakukultuurid jagati katsutitesse laiali, inkubeeriti 37°C juures erinevate vesinikperoksiidi kontsentratsioonidega. Katse peatati katalaasi lisamisega, misjärel rakususpensiooni lahjendati ja plaaditi. Järgmisel päeval loeti kolooniaid ja arvatati CFU/ml. (A) ja (C) paneelil on tulemused eksponentsiaalse faasi rakkudega, (B) ja (D) paneelil statsionaarse faasi rakkudega. Vertikaalteljel on bakterikultuuri suhteline CFU, mis arvatati milliliitri kohta jagades ajapunkti tulemuse katse stardihetke tulemusega (mõjutamata rakkude CFU/ml-ga); horisontaalteljel H₂O₂ kontsentratsioon mM-des. Katsetulemused on esitatud: (A) paneelil on metsik-tüüpi rakkudel esitatud vähemalt kolme katse keskmine, *relEB*-l kahe katse keskmine tulemus, *relA* ja *ssrA* puhul ühe katse tulemus; (B) katsekorduste arv: metsik-tüüpi kolme katse keskmine, ülejäänud tüvedega sooritati katse ühes korduses; (C), (D) metsik-tüüpi rakkudel vähemalt kolme katse keskmine tulemus, *rmf*-il kahe katse keskmine, ülejäänutega on katse sooritatud ühes korduses.

4.2. RelA-defektne tüvi ei suuda minimaalsöötme korral toibuda statsionaarsest faasist võrdväärselt metsik-tüüpi tüvega

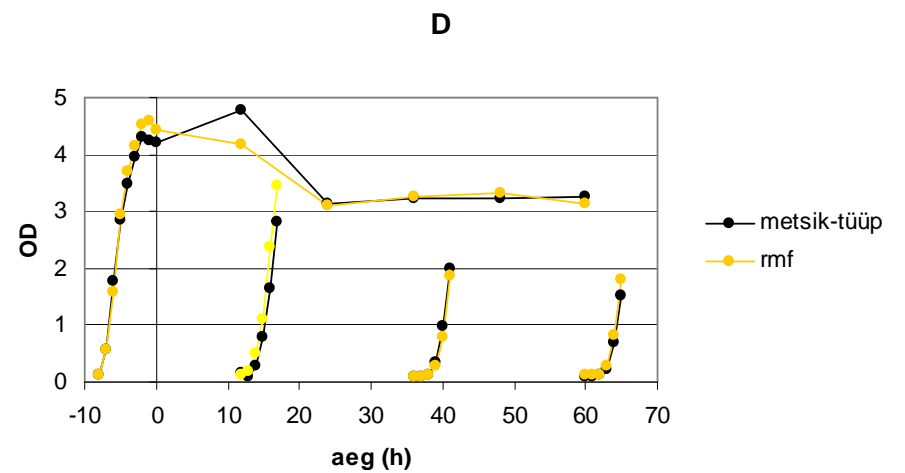
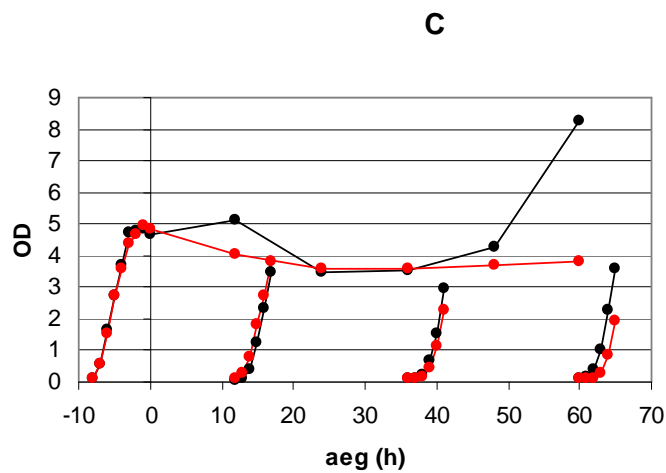
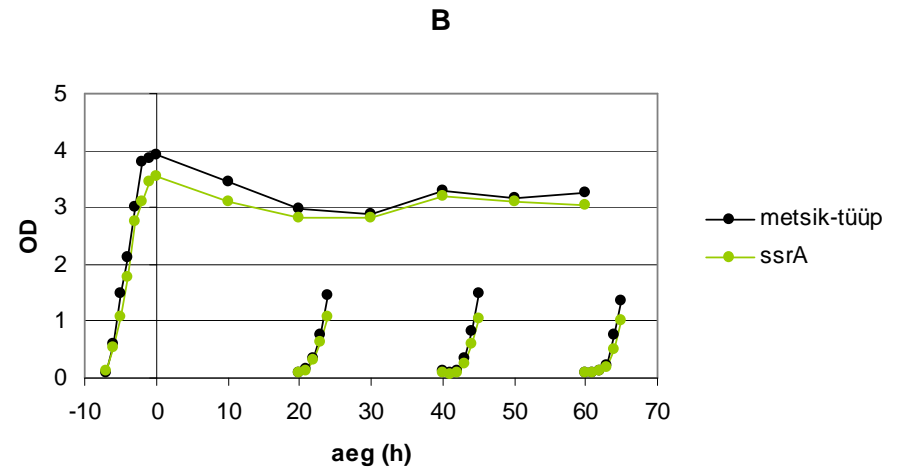
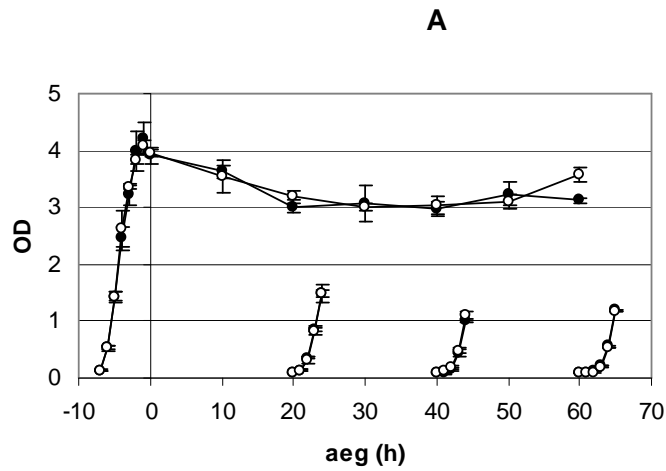
Statsionaarses faasis suurenevad *E. coli*-s vead valgusünteesil: raaminihked, vale- ja ülelugemine (Withey & Friedman, 2003) ja näiteks RMF-defektne *E. coli* mutant statsionaarset faasi üle ei ela (Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004). Seepärast hoiti *knock-out* tüvede fenotüübi iseloomustamiseks neid järgnevalt statsionaarses faasis, samuti jälgiti rakkude statsionaarsest faasist toibumist (joonised 10, 11 ja 12).

Rikka LB söötme korral erinevusi metsik-tüüpi rakkude ja *relA*, *ssrA*, *relEB* ja *rmf* tüve vahel polnud märgata ei statsionaarses faasis püsimisel ega toibumisel (joonised 10 ja 11). Rakkude optiline tihedus jõudis 4-5 OD ühikuni, langes seejärel umbes 20-ndaks statsionaarse faasi tunniks ühe OD ühiku võrra ning jäi püsima (joonis 10). Üsna selgelt on näha, et mida kauem kultuurid statsionaarses faasi viibisid, seda pikem oli bakterite toibumisele kuluv aeg. Nii joonisel esitatud katsete kui eelkatsete puhul ilmnes aeg-ajalt pärast 48-ndat statsionaarse faasi tundi GASP fenotüüp (Zambrano *et al.*, 1993) (joonis 10, paneel C).

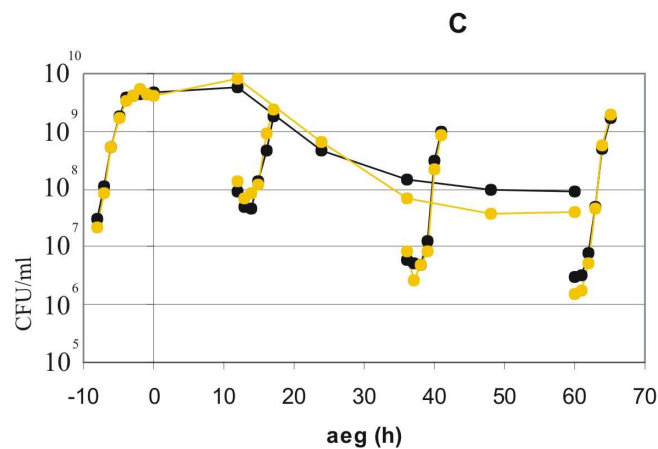
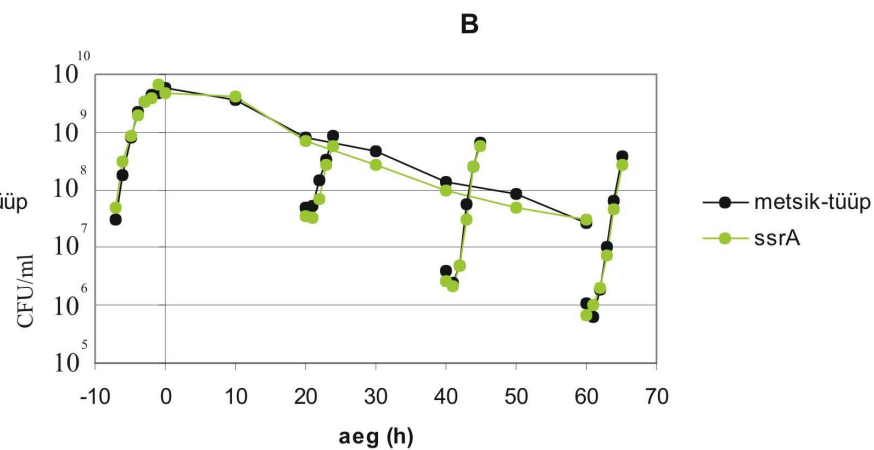
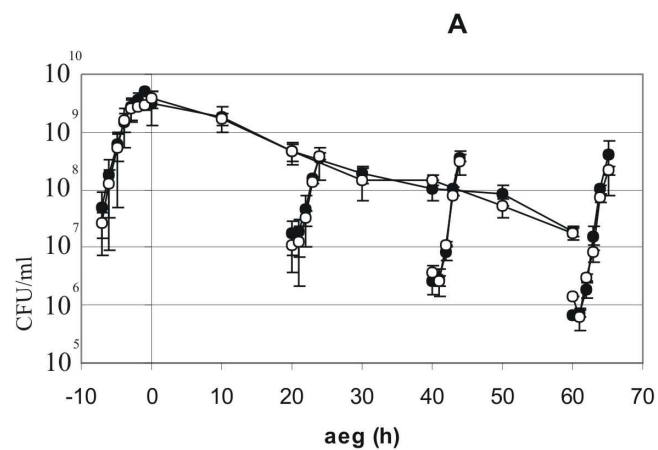
Igas ajapunktis tehti rakukultuurist ka allalahjendus, plaaditi, ning järgmisel päeval loeti kolooniaid. Erinevalt optilise tiheduse esialgsest langusest ja hilisemast stabiliseerumisest, on CFU/ml dünaamikas näha LB söötme korral kindel ja ühtlane langus kogu statsionaarse faasi jooksul (joonis 11). Samuti on igal järgmisel allalahjenduse bakterikultuuri stardipositsiooni CFU/ml väärtus madalam eelmisest, kuna lahjendused on tehtud OD järgi ent järjest suurem osa rakkudest ei suuda enam kasvama hakata, vastavalt siis ka plaadile kolooniaid moodustada (joonis 11). Seevastu M9 (0,4% glükoos) söötmes langes statsionaarse faasi CFU/ml mõnevõrra aeglasemalt kui LB söötme puhul ning seetõttu olid ka allalahjenduse stardipositsioonide väärtused sarnasemad üksteisele (joonis 12, paneelid B ja D).

Minimaalsöötmes M9 ilmnes RelA-defektsel tüvel oluline kasvudefekt (joonis 12, paneelid A ja B). Kui näiteks tmRNA-defektne tüvi suutis statsionaarsest faasist toibuda

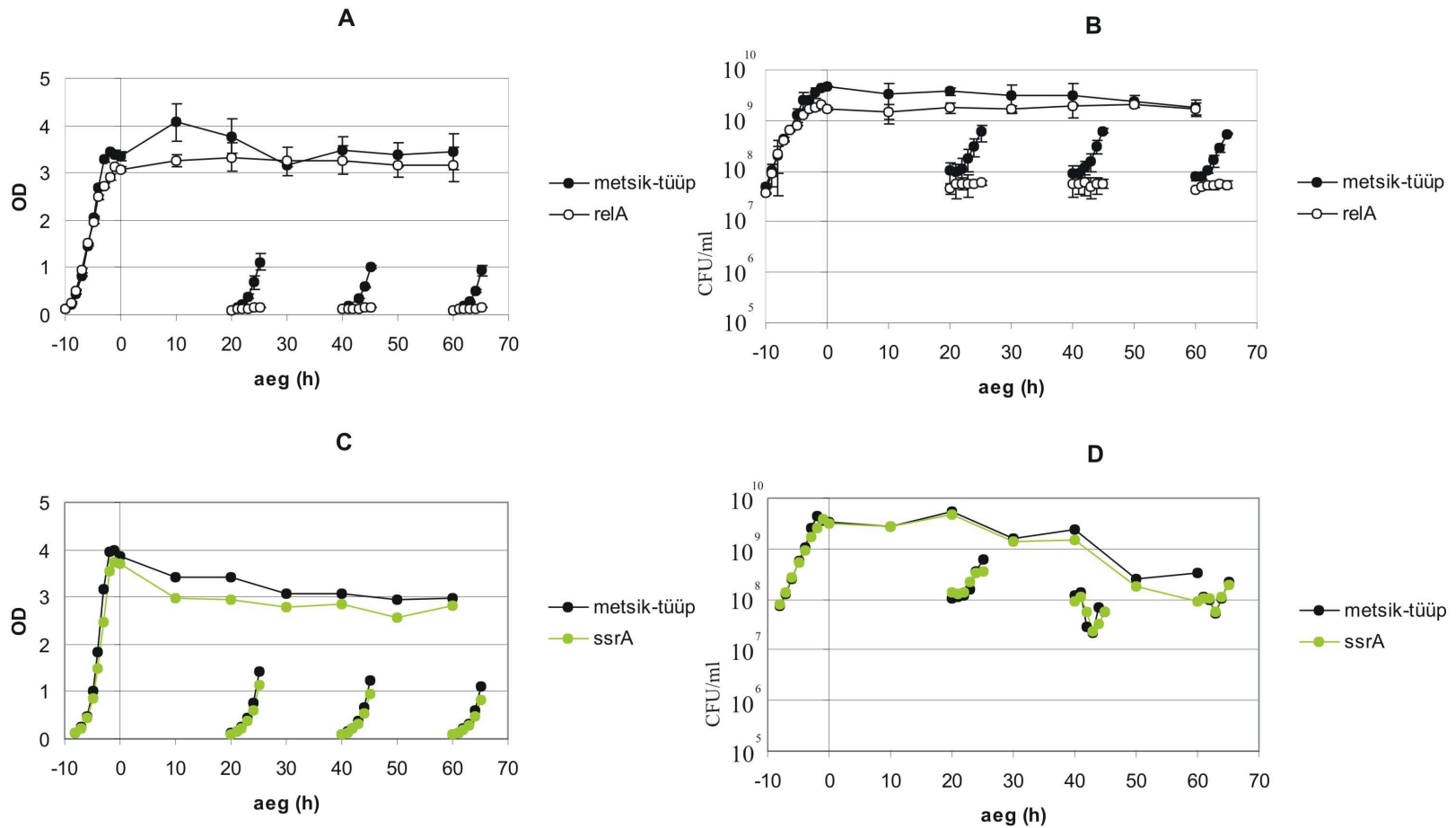
võrdväärselt metsik-tüüpi tüvega (joonis 12, paneelid C ja D), siis *relA* tüvi ei hakanud värskel söötmel kasvama kogu vaadeldud aja vältel (5 tunni jooksul).



Joonis 10. Statsionaarses faasis püsimine ja toibumine söötmes LB. Katse alustamiseks inokuleeriti plaadilt 20 ml LB söödet ja kasvatati rakke 37°C juures kuni OD~0,8, seejärel lahjendati kuni OD 0,1-ni. Edasi kasvatati rakke 37°C juures statsionaarse faasi saabumiseni, hoiti rakke statsionaarses faasis, tehti allalahjendusi värskesse söötmesse ning jälgiti kasvama hakkamist. Vertikaalteljel on bakterikultuuri optiline tihedus ja horisontaalteljel aeg tundides. (A) paneelil on esitatud kahe katse keskmine tulemus, ülejäänud katsetulemused on ühes korduses.



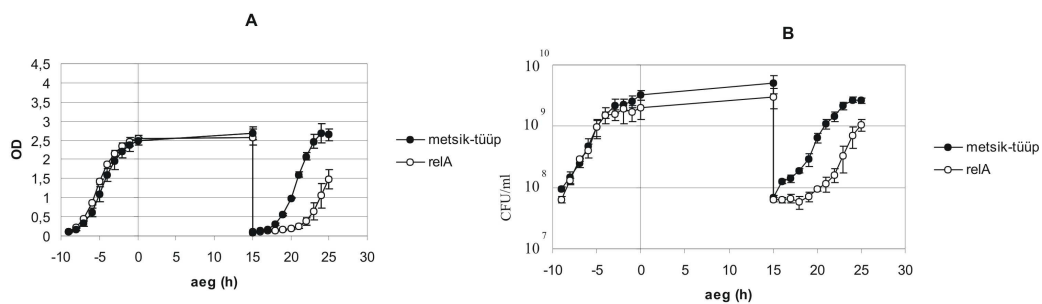
Joonis 11. Statsionaarses faasis püsimine ja toibumine söötmes LB väljendatuna CFU-des. Katse käik sama, mis joonisel 5. Ajapunktides tehti allalahjendused, plaaditi, järgmisel päeval loetid kolooniaid ja arvatati CFU/ml. Vertikaalteljel on bakterikultuuri CFU-de arv milliliitri kohta ja horisontaalteljel aeg tundides. (A) paneelil on esitatud kahe katse keskmine tulemus, ülejäänud katsetulemused on ühes korduses.



Joonis 12. Statsionaarses faasis püsimine ja toibumine minimaalsöötmes M9. Katse käik sama, mis eelneval kahel joonisel. (A) ja (C) paneelil on vertikaalteljel bakterikultuuri optiline tihedus, (B) ja (D) paneeli vertikaalteljel on bakterikultuuri CFU-de arv milliliitri kohta; horisontaalteljel on igal paneelil aeg tundides. (A) ja (B) paneelil on esitatud kahe katse keskmine tulemus, ülejäänud katsetulemused on ühes korduses. (D) paneelil olid plaadid 42 tunnist alates saastunud teistsugust värvi kolooniatega mistõttu paneelil toodud tulemused on ligikaudsed.

4.3. *relA*-defektse tüve hilisema toibumise minimaalsöötmes kaotab söötmele aminohapete lisamine

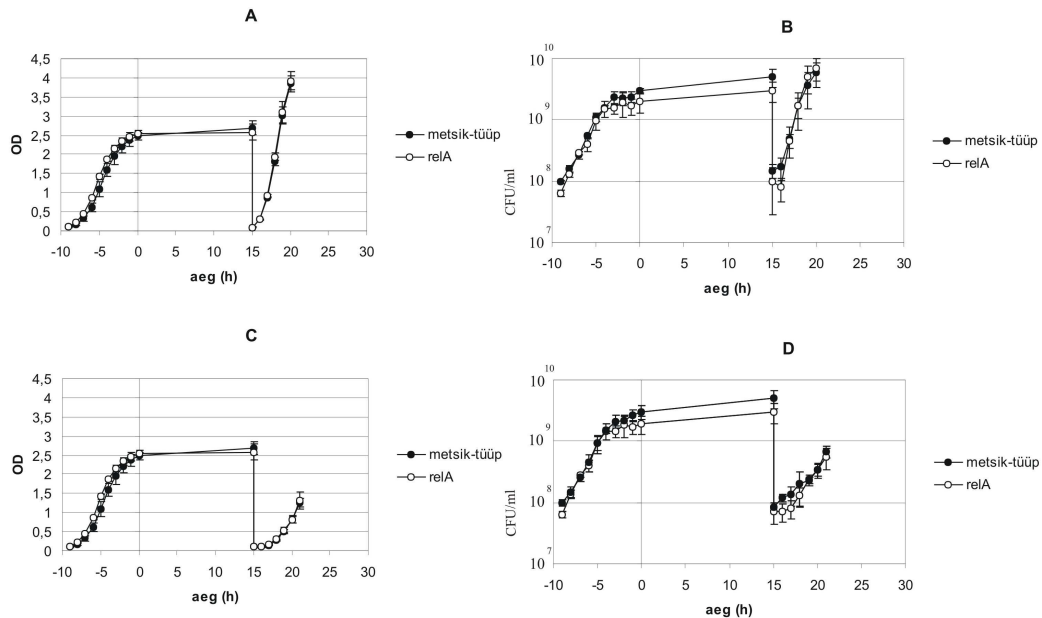
Järgnevalt asuti selgitama põhjuseid, miks *relA* tüvi suudab võrdväärselt metsik-tüüpi tüvega toibuda statsionaarsest faasist LB söötmele aga mitte minimaalsöötme korral. Kõigepealt jälgiti *relA* tüve toibumist M9-s pikema aja vältel. Katsetulemused näitasid, et deletsiooniga tüvi küll toibub, ent teeb seda oluliselt hiljem kui metsik-tüüpi *E. coli* (joonis 13).



Joonis 13. *relA* tüvi toibub statsionaarsest faasist minimaalsöötmes oluliselt hiljem kui metsik-tüüpi *E. coli*. Katse alustamiseks inokuleeriti plaadilt 20 ml söödett M9 ja kasvatati rakke 37°C juures kuni OD ~0,8, seejärel lahjendati kuni OD 0,1-ni. Edasi kasvatati rakke 37°C juures statsionaarse faasi saabumiseni, hoiti rakke 15h statsionaarses faasis, tehti allalahjendus värskesse söötmesse OD 0,1-ni ning jälgiti kasvama hakkamist. (A) paneelil on katse käigus jälgitud bakterikultuuri optiline tihedus; (B) paneelil CFU-sid milliliitri kohta. Horisontaalteljel on aeg tundides. Katsed on sooritatud vähemalt kolmes korduses.

Senini sooritatud katsed ei anna vastust, kas *relA* söötmespetsiifilist kasvudefekt põhjustab sööde, milles rakud jõuavad statsionaarsesse faasi ja püsivad selles kasvufaasis; või värske sööde, millesse rakud satuvad pärast statsionaarset faasi. Sellele küsimusele vastust otsivas katses selgus, et minimaalsöötmes statsionaarsesse faasi kasvanud rakkude üleviimisel värskesse LB söötmesse toibuvad *RelA*-defektsed rakud võrdselt metsik-tüüpi rakkudega (joonis 14, paneelid A ja B).

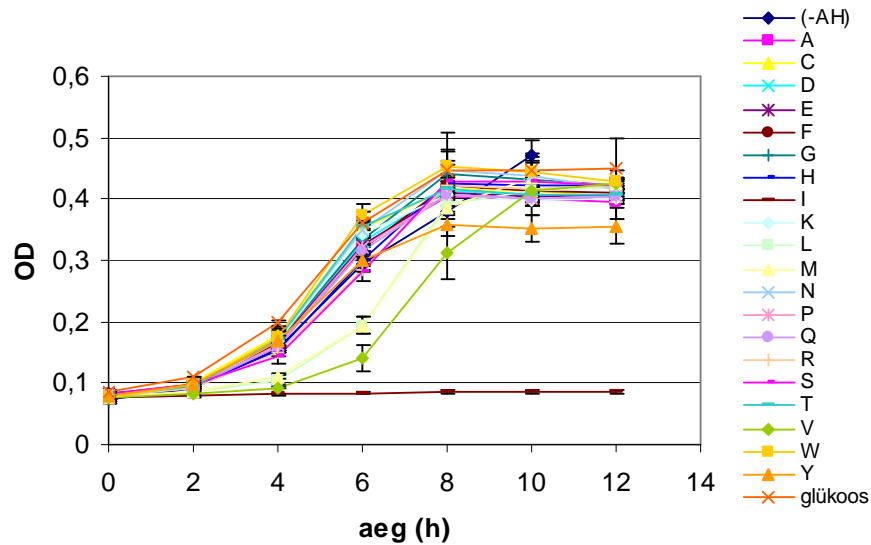
Seejärel lisati toibumiseks kasutatavale minimaalsöötmele aminohappeid ja et katsetulemused oleksid esialgse M9 söötmele paremini võrreldavad s.t kasvukiirus samasugune, asendati süsinikuallikas glükoos energiaallikalt vaesema glütserooliga. Ilmnes, et aminohapete lisamine M9-le taastas *relA* tüve statsionaarsest faasist toibumise värskes söötmes (joonis 14, paneelid C ja D).



Joonis 14. *relA* tüve statsionaarsest faasist toibumine erinevates söötmetes. Katse alustamiseks inokuleeriti plaadilt 20 ml söödet M9 ja kasvatati rakke 37°C juures kuni OD~0,8, seejärel lahjendati kuni OD 0,1-ni. Edasi kasvatati rakke 37°C juures statsionaarse faasi saabumiseni, hoiti rakke 15h statsionaarses faasis, tehti allalahjendus värskesse söötmesse OD 0,1-ni ning jälgiti kasvama hakkamist. (A) ja (B) paneelil lahjendati rakke värskesse LB-sse; (C) ja (D) paneelil aminohappeid ja süsinikuallikana 0,2% glütserooli sisaldavasse M9-sse. Vasakpoolses tulbas (A ja C) on jälgitud bakterikultuuri optilist tihedust, parempoolses (B ja D) CFU-sid milliliitri kohta. Horisontaalteljel on aeg tundides. Katsed on sooritatud vähemalt kolmes korduses.

4.4. *E. coli* metsik-tüüpi rakud toibuvad kauem, kui söötmes pole aminohapetest ainult metioniini, ainult leutsiini või ainult valiini

Selgitamaks välja, kas mõne konkreetse aminohappe puudumine mõjutab bakterirakkude toibumist statsionaarsest faasist, jälgiti toibumist 19 aminohappega minimaalsöötmes. Selleks kasvatati rakud statsionaarsesse faasi aminohapeteta minimaalsöötmes, ja lasti toibuda 22-s erinevas söötmes. Neist 20 söödet olid M9 (süsinikuallikaks 0,2% glütserool), milles puudus vaid üks aminohape 20-st; ning võrdluseks kasutati süsinikuallikana nii 0,2% glütserooli kui 0,4% glükoosi sisaldavat M9-t ilma aminohapeteta (joonis 15).



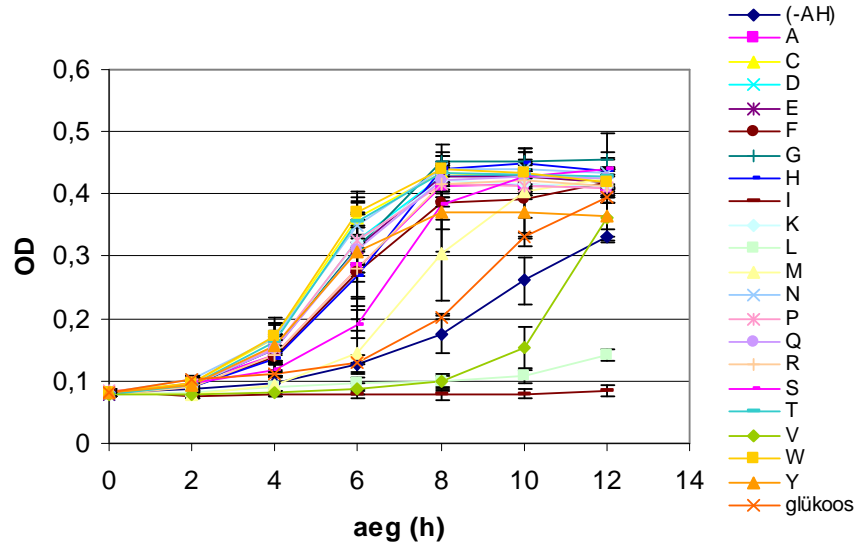
Joonis 15. *E. coli* K-12 tüve statsionaarsest faasist toibumise sõltuvus aminohapetest. Katse eeltöö sama, mis eelmistel joonistel, statsionaarse faasi rakke pesti ja lahjendati värskesse 19 aminohapet sisaldavasse M9-sse (süsinikuallikaks 0,2% glütserool) OD 0,1-ni, võrdluseks kasutati nii sama söödet ilma aminohapeteta (-AH) kui 0,4% glükoosiga M9-t (glükoos). Tähtedega on märgitud sööde vastavalt sellele, milline on sellest puuduv aminohape. Katsetulemused on esitatud statsionaarsest faasist toibumise hetkest alates. Vertikaalteljel on bakterikultuuri optiline tihedus ja horisontaalteljel aeg tundides. Katsed on sooritatud vähemalt kolmes korduses.

Enamuse aminohapete ükshaaval väljajätmine söötmest ei mõjutanud metsik-tüüpi *E. coli* rakkude toibumist, võrreldes söötmega, millest puuduvad aminohapped. Seevastu jäävad metsik-tüüpi *E. coli* rakud pärast statsionaarset faasi kasvu alustamisega peaaegu kaks tundi hilisemaks, kui minimaalsöötmes on 19 aminohapet ja puudub metioniin või leutsiin, mõnevõrra suuremgi mahajäämine leiab aset siis, kui söötmest puudub valiin (joonis 15). Isoleutsiini puudumise korral ei suuda metsik-tüüpi tüvi kasvama hakatagi.

4.5. RelA-defektsus suurendab drastilisel määral toibumiseks kuluvat aega, kui söötmes pole aminohapetest ainult leutsiini või ainult valiini

Kui *relA* geeni väljalülitamine ei muuda oluliselt statsionaarsest faasist toibumise dünaamikat enamuse aminohapete ja metioniini puudumise korral, siis leutsiini puudumine on *relA* tüvele väga dramaatilise mõjuga (toibub metsik tüüpi tüvest ~7h hiljem) (joonis 16). Valiini puudumist elab *relA* tüvi samuti palju raskemalt üle kui

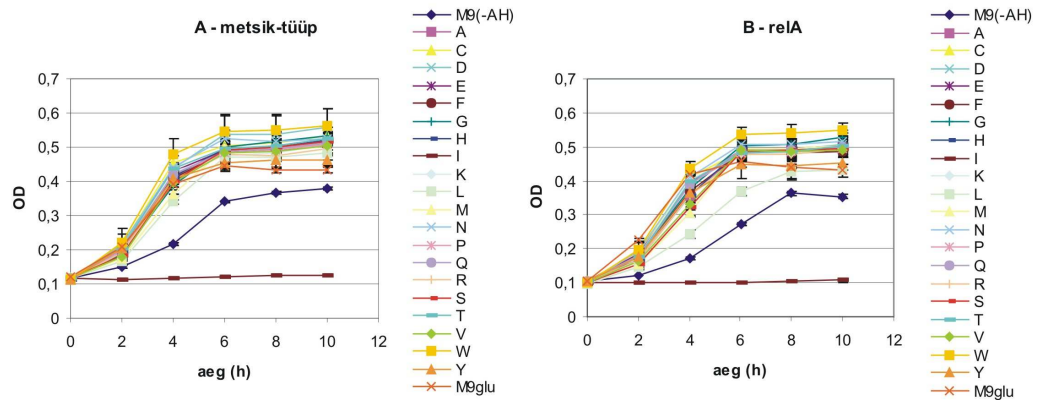
metsik-tüüpi *E. coli*, samas on kasvudefektivi süvenemine (toibub metsik tüüpi tüvest ~4h hiljem) väiksem kui leutsiini puudumise korral. Isoleutsiini puudumise korral ei suuda *relA* rakud kasvama hakata nagu algupärane, metsik-tüüpi tüvigi.



Joonis 16. *E. coli* RelA-defektse tüve statsionaarsest faasist toibumise sõltuvus aminohapetest. Katse käik ja tulemuste tähistused samad, mis eelmisel joonisel. Vertikaalteljel on bakterikultuuri optiline tihedus ja horisontaalteljel aeg tundides. Katsed on sooritatud vähemalt kolmes korduses.

Lõpuks, kehvem on *relA* tüve toibumine ka seriini puudumise korral; ja ilma aminohapeteta minimaalsöötmetes toibumiste dünaamika ei kattu ühegi konkreetset aminohapet mittesisaldava söötmega (joonis 16).

Leidmaks kinnitust, et vaadeldud aminohapete-sõltuvad fenotüübid on tõepoolest seotud statsionaarsest faasist toibumisega, võeti ilma aminohapeteta minimaalsöötmes kasvanud eksponentsiaalse faasi rakud, viidi nad samamoodi kui statsionaarse faasi rakudki 22-e erinevasse söötmesse, ning jälgiti rakkude kasvu jätkumist (joonis 17).



Joonis 17. *E. coli* metsik-tüüpi ja *relA* tüve eksponentsiaalse faasi rakkude kasvu sõltuvus aminohapetest. Katse alustamiseks inokuleeriti plaadilt 20 ml söödet M9 ja kasvatati rakke 37°C juures kuni OD~0,8, seejärel lahjendati kuni OD 0,1-ni. Edasi kasvatati rakke 37°C juures kuni OD~0,5; rakke pesti ja lahjendati värskesse 19 aminohapet sisaldavasse M9-sse (süsinikuallikaks 0,2% glütserool) OD 0,1-ni, võrdluseks kasutati sama söödet ilma aminohapeteta (-AH) ja süsinikuallikana 0,4% glükoosi sisaldavat M9-t. Tähtedega on märgitud sööde vastavalt sellele, milline on sellest puuduv aminohape. Katsetulemused on esitatud lahjendamise hetkest alates. (A) paneelil on tulemused metsik-tüüpi tüvega; (B) paneelil *relA* tüvega. Vertikaalteljel on bakterikultuuri optiline tihedus ja horisontaalteljel aeg tundides. Katsed on sooritatud vähemalt kolmes korduses.

Ekspponentsiaalse faasi *E. coli* metsik-tüüpi rakud ei suuda kasvada kui aminohapetest puudub söötmest ainult isoleutsiin, teiste aminohapete puudumise korral on kasv võrdväärne glükoosi sisaldava M9-ga. 0,2% glütserooli sisaldava M9 korral on kasv aeglasem ja rakkudele saabuva statsionaarse faasi tihedus on madalam (joonis 17, paneel A), olles sarnane statsionaarsest faasist toibumise kasvukõverate enamusele s.h glükoosi sisaldavale M9-le (joonised 15 ja 16). RelA-defektse tüve eksponentsiaalse faasi rakud kasvavad peaaegu identselt metsik-tüüpi rakkudega, ent leutsiini puudumine näib *relA* tüvele olulist mõju avaldavat, vähendades rakkude kasvukiirust (joonis 17, paneel B).

5. ARUTELU

Aktiivselt kasvavas rakus on translatsioon kõige enam energiat tarbiv protsess ja valgusünteesi aparaadi seisukord oluline mehhanism tajumaks muutunud keskkonnatingimusi. Ribosoomide seisukorra tunnetamisest saavad alguse mitmed omavahel seotud protsessid nagu poomisvastus, *trans*-translatsioon ja ribosoomide dimeriseerumine.

Muutustele kasvukeskkonnas vastab bakter kiirete ümberkorraldustega raku metabolismis. Üheks keskselamiseks regulatsiooni eesmärgiks, nii keskkonnamuutuste kui erinevate stabiilsete kasvutingimuste korral, on kontroll rakusisese efektormolekuli ppGpp kontsentratsiooni üle. ppGpp rakusisese taseme eest *E. coli*-s kannavad hoolt kaks ensüümi, RelA ja SpoT (Braeken *et al.*, 2006).

RelA aktiveerub, kui ribosoomi A-kohta seondub laadimata tRNA (Haseltine & Block, 1973). Sellisel tingimusel tekkiv kõrge ppGpp kontsentratsioon põhjustab n.n poomisvastust (Stent & Brenner, 1961), mille käigus surutakse järsult maha tRNA ja rRNA süntees (Lazzarini *et al.*, 1971; Ryals *et al.*, 1982; Sands & Roberts, 1952). Seega on RelA sünteesitud ppGpp justkui translatsiooni „hädapidur“ kui keskkonnatingimused on valgusünteesiks ebasobivad.

Stabiilsete RNA-de sünteesi allasurumine kohandab valgusünteesi aparaadi võimsuse ebasobivamate tingimustega. Ent transkriptsiooni inhibeerimine ei vähenda koheselt translatsiooni, mis tarbib suurema osa aktiivselt kasvava raku energiast. Takistamiseks rakkude energiast tühjaks jooksmist, seondub *E. coli* peatunud ribosoomiga RelE, toksiin-antitoksiin paarist RelBE, ja lõikab mRNA-d, mis omakorda saab substraadiks *trans*-translatsioonile (Christensen & Gerdes, 2003; Christensen & Gerdes, 2004; Gerdes, 2000). *Trans*-translatsiooni eest vastutav tmRNA, tRNA ja mRNA hübriid, seondub mRNA 3' otsas peatunud ribosoomi tühja A-kohta, vabastab ribosoomi ja suunab poolikud valgud lagundamisele, lisades neile spetsiifilise järjestuse (Withey &

Friedman, 2003). Seega takistab tmRNA aktiivsus vigaste valkude raku kujumist. Degradatsioonil vabanevad aminohapped leevendavad mõnevõrra aminohapete nälga ning leiavad olulist kasutust stressitingimustes vajalike valkude sünteesil. Olgu öeldud, et ppGpp aktiveerib samuti valkude lagundamist (Chatterji & Ojha, 2001; Kuroda *et al.*, 2001).

Mittevajalikud n.ö ülearused ent energeetiliselt kulukad ribosoomid, vähemalt toitainete ammendumise puhul, ladestatakse translatsiooniliselt inaktiivsete dimeeridena RMF valgu vahendusel (Wada *et al.*, 1990). Soodsate keskkonningimuste taastumisel/saabumisel lagunevad dimeersed 100S ribosoomid kiiresti funktsionaalseteks 70S ribosoomideks (Wada, 1998). Ribosoomide ladestamise ja taaskasutusse võtmise protsessi reguleerivad YfiA ja YhbH (Ueta *et al.*, 2005).

Käesolevas töös võeti vaatluse alla mainitud protsesside käigus valgusünteesi moduleerivad faktorid, konkreetselt uuriti *relA*, *ssrA*, *relEB*, *rmf*, *yfiA* ja *yhbH* deletsiooniga tüvesid erinevates stressitingimustes.

Ühegi uuritud geeni väljalülitamine ei avaldanud suuremat mõju rakkude kasvule pärast lühiajalist külma- ega kuumaehmatust (joonis 7). Kui kuumašoki katses $\Delta relA$, $\Delta ssrA$ ja $\Delta relEB$ puhul tundubki esmapilgul olevat veidi suurem erinevus metsik-tüüpi tüvest, siis tuleb tähelepanu pöörata, et nende tüvede kasvukiirus on mõnevõrra väiksem juba enne šoki rakendamist (joonis 7, paneel C). Tõepoolest, deletsioonitüvede kasvukõverad jäävad nii 37°C kui 45°C juures alati ja veidi allapoole metsik-tüüpi rakkude omast (joonis 6, paneelid A ja B).

ssrA-defektsel *E. coli*-l on varem kirjeldatud metsik-tüüpi rakkudest veidi aeglasem kasv 37 °C ja 42°C juures, ning oluline kasvudefekt 45°C juures (Komine *et al.*, 1994). Selline mõnevõrra aeglasem kasv tõepoolest ilmnes 37°C, aga ka 45°C juures (joonis 6, paneelid A ja B). Võimalik, et 45°C on *ssrA* tüve kasvu võimaldava temperatuurivahemiku piiripealne väärtus. Seepärast väärriks tmRNA-defektne tüvi ilmselt edasist uurimist paari kraadi võrra kõrgemal temperatuuril. Olgu siinkohal mainitud, et *ssrA* tüvega seoses huvi pakkuva temperatuuri piirkonnas, 46-49°C juures, *Escherichia coli* konstitutiivselt ekspresseeritud geenide (δ^{70} -sõltuv) transkriptsioon katkeb täielikult ja asendub δ^{32} - ja δ^{24} -sõltuva transkriptsiooniga (Blaszczak *et al.*, 1995).

Samuti vääriks edaspidist tähelepanu deletsiooniga tüvede kasvamine minimaalsöötmes optimumist kõrgemal temperatuuril, kus näiteks RelA-defektse tüve rakkudel ilmneb kasvudefekt juba 42°C kraadi juures (kuid puudub LB söötme puhul) (Yang & Ishiguro, 2003).

Kuna *rmf* tüve statsionaarse faasi rakkudel on iseloomustatud vähenenud kuumataluvus 50°C juures (Niven, 2004), tehti järgnevalt samasugune katse paralleelselt kõigi mutantsete tüvedega (joonis 8). Seejuures saadi Niveni avaldatud tööle ristvastupidine tulemus juba ainuüksi metsik-tüüpi tüve puhul: CFU-de arvukus langes käesolevas töös 2-3 suurusjärku rohkem statsionaarse faasi (3-4 suurusjärku; joonis 8, paneelid B ja D) kui eksponentsiaalse faasi rakkude kuumutamise korral (~1 suurusjärku; joonis 8, paneelid A ja C). Veelgi enam, mis puutub statsionaarse faas rakkudesse, siis RMF-defektne tüvi ilmutas isegi mõnevõrra suuremat vastupanu elusrakkude arvukuse vähenemisele kui metsik-tüüpi tüvi (joonis 8, paneel D), kuigi pärast 100 minuti möödumist ei erinenud *rmf* tüve suhteline CFU-de arvukus enam oluliselt metsik-tüüpi tüve omast (andmeid pole esitatud). Samuti ei sobi käesoleva töö tulemused seisukohaga, et eksponentsiaalse faasi rakkudega võrreldes on kasvu peatanud statsionaarse faasi rakud väga vastupidavad tervele hulgale stressidele, nähtus mida tuntakse staasis-indutseeritud ringkaitse (*stasis-induced cross protection*) (Jenkins *et al.*, 1988). Töö Hengge laboris demonstreeris, et selline ringkaitse sõltub suuresti ühest ainsast regulaatorist, sigma faktor δ^S -st (Lange & Hengge-Aronis, 1991).

Asudes lahendama näilisi vastuolusid käesoleva töö ja kirjanduse vahel, võib oletada, et 50°C on katsetes kasutatud BW25113 rakutüve jaoks temperatuur, millel vähemalt osa rakupopulatsioonist suudab veel kasvu jätkata. Selline kasv „varjaks” tegeliku mõju rakkude suremusele. Kahtlemata oli aga eksponentsiaalse faasi rakkude kasvukeskkonnas ressursse, mis puudusid statsionaarse faasi rakkudel, kuna rakke kuumutati Niveni jt eeskujul otse söötmes. Tehtud oletuste toetuseks räägivad esialgsed tulemused, mis saavutati järgneva katsega: nii eksponentsiaalse kui statsionaarse faasi rakke pesti, suspendeeriti ja kuumutati steriilses soolalahuses (0,015 M NaCl) 55°C juures. Eksponentsiaalse faasi rakkude CFU oli sel juhul 10 minuti möödudes 20 korda väiksem, statsionaarse faasi rakkude CFU vaid 2 korda väiksem, võrreldes katse stardihetkega (andmeid pole esitatud). Seejuures käitusid metsik-tüüpi ja RMF-defektne

tüvi ühtemoodi. Lõpuks, mitmete teiste kuumasurma uurivate tööde korral kasutaksegi kõrgemat temperatuuri kui 50°C ja rakke kuumutatakse fosfaatpuhvrts või steriilses soolalahuses (Cuny *et al.*, 2005; Jenkins *et al.*, 1988; Yang & Ishiguro, 2003).

Oksüdatiivse stressi korral reprodutseerus staasise indutseeritud ringkaitse (Jenkins *et al.*, 1988): statsionaarse faasi rakkude arvukus ei langenud 10 minuti jooksul isegi 50 mM H₂O₂ tingimustes (joonis 9, paneelid B ja D), samas kui neis tingimustes vähenes eksponentsiaalsest faasist pärit rakkude arvukus 5-6 suurusjärgu võrra (joonis 9, paneelid A ja C). Võimalus, et *yfiA* tüvi kannatab oksüdatiivset stressi halvemini metsik-tüüpi tüvest (joonis 9, paneel C) on intrigeeriv, ent vajab veel kinnitamist/ümberlökkamist.

Nagu juba öeldud, on poomisvastus, *trans*-translatsioon ja ribosoomide dimerisatsioon omavahel tihedalt põimunud protsessid. Kuigi ppGpp mõjutab oluliselt raku füsioloogiat ka kasvu tingimustes, on paljud geeniekspressioonile mõjutavad ppGpp-sõltuvad efektid iseloomustatud statsionaarses faasis (Nystrom, 2004). Statsionaarse faasi spetsiifilise δ^S ekspressiooniks (Gentry *et al.*, 1993; Lange & Hengge-Aronis, 1991) ja δ^S -sõltuvaks transkriptsiooniks (Kvint *et al.*, 2000) on vajalik ppGpp. Samuti on ppGpp vajalik *rmf* geeni ekspressiooniks (Izutsu *et al.*, 2001) ning rakutüved, millel puudub funktsionaalne RMF, on statsionaarses faasis vähenenud elujõulisusega (Wada *et al.*, 1990; Wada *et al.*, 2000; Yamagishi *et al.*, 1993). Seepärast, kasutades nii RelA-, tmRNA-, RelEB- kui RMF-defektseid tüvesid jälgiti nende vastupidamist pikaajal viibimisel statsionaarses faasis. Samuti vaadeldi tüvede toibumist keskkonnatingimuste paranemisel.

Kirjandusest leiab, et rikkal söötmel kasvanud metsik-tüüpi *E. coli* rakud saavutavad maksimaalse rakutiheduse ligikaudu 5×10^9 CFU/ml. Rakukultuuri elujõulisus kahaneb mõne järgmise päeva jooksul umbes kahe suurusjärgu võrra ja jääb siis pidama mitmeks päevaks (Fukuda *et al.*, 2001). Samasugust maksimaalset tihedust ja järgnevat langust nähti ka käesolevas töös (joonis 11).

RMF-defektse tüve elujõulisus langeb metsik-tüüpi *Escherichia coli* rakkude omast mitu suurusjärku madalamale, see juhtub enamasti ~4-5-ndal päeval (Wada *et al.*, 2000; Yamagishi *et al.*, 1993). Kuna käesolevas töös jälgiti mutantseid tüvesid vaid kolme

ööpäeva jooksul siis rikkas LB söötmes statsionaarsesse faasi jõudmise ja selles püsimise puhul polnud näha olulist erinevust ühegi mutantse ja metsik-tüüpi tüve vahel (joonised 10 ja 11). Samuti suutsid deletsiooniga tüved allalahjendamise järel toibuda võrdselt kontrollkultuuriga. Seevastu minimaalsöötme M9 korral ilmnes *relA* tüvel huvitav fenotüüp: *relA* rakud ei suutnud toibuda statsionaarsest faasist kogu jälgitud aja vältel (5 tunni jooksul) (joonis 12, paneelid A ja B). $\Delta relA$ siiski toibub, ent teeb seda palju hiljem kui metsik-tüüpi tüvi (joonis 13).

Siiani kirjeldatud ja edaspidiste katsetulemuste interpreteerimisel tuleks silmas pidada kahte olulist asja. Esiteks on statsionaarne faas oma olemuselt käibetermin ja ei kirjelda tegelikult bakterite spetsiifilist ja fikseeritud füsioloogilist seisundit või vastust. Statsionaarse faasi kultuuri rakud erinevad oma keemiliselt koostiselt erinevatel ajahetkedel, ning rakud, mis sisenesid statsionaarsesse faasi näiteks fosfaadi otsalõppemise tõttu, erinevad suuresti oma koostise ja geeniekspressiooni mustri poolest rakkudest, kellel ammendus süsinikuallikas (Nystrom, 2004). Näiteks rikkal söötmel (nagu LB) statsionaarsesse faasi kasvanud *E. coli* rakkudes on kromosoomi koopiaarv 1, 2, 4, või 8, seejuures on 2 või 4 kromosoomi koopiaarvuga rakke kõige rohkem (Akerlund *et al.*, 1995). Glükoosi sisaldaval minimaalsöötmel kasvanud rakkudel (nagu M9) on aga enamasti kromosoomi koopiaarv 1 või 2 (Akerlund *et al.*, 1995). Teiseks toimub RelA-sõltuv ppGpp süntees siiani teadaolevalt ennekõike statsionaarsesse faasi sisenemisel (Lazzarini *et al.*, 1971), muudel juhtudel hoiab ja reguleerib ppGpp basaalsel, kasvukiirusest sõltuvat taset *E. coli* rakkudes SpoT (Lazzarini *et al.*, 1971; Xiao *et al.*, 1991). Seepärast on üllatav, et minimaalsöötmes nähtud kasvudefekt ei sõltu niivõrd söötmest, milles rakud jõuavad statsionaarsesse faasi, vaid söötmest, milles rakud toibuma hakkavad (joonis 14, paneelid A ja B).

Kuna allahjendamisel rikkasse LB söötmesse alustavad võrdse edukusega kasvu nii RelA-defektne kui metsik-tüüpi kultuur (joonis 14, paneelid A ja B), võib esmapilgul arvata, et *relA* rakkude statsionaarse faasi füsioloogiline seisund lubab neil millegipärast paremini kohaneda kiiret kuid mitte aeglast kasvu võimaldava olukorraga. Rikkas söötmes on valmis kujul olemas aminohapped, tRNA-d saavad lühikese ajaga aminoatsetüleeritud, laetud tRNA-de tase tõuseb, see stimuleerib SpoT guanosiintetrafosfaadi hüdrolaasset aktiivsust (Murray & Bremer, 1996), ppGpp tase

langeb ja rakk lülitubki kiirele kasvule võrdväärselt metsik-tüüpi rakuga. Ilmneb aga, et kasvudefekti ei määra kasvukiirus vaid aminohapete olemasolu või puudumine (joonis 14, paneelid C ja D).

Selgitamaks välja, kas mõne konkreetse aminohappe puudumine mõjutab bakterirakkude statsionaarsest faasist väljumist, jälgiti toibumist 19 erineva aminohappega minimaalsöötmetes. Seejuures ilmnes aga ka metsik-tüübina kasutatud BW25113 tüvel huvipakkuv fenotüüp.

Kõigepealt, *E. coli* K-12 tüved on defektsed põhilise isoleutsiini biosünteesiraja ensüümi suhtes (atsetohüdroksühappe süntetaas II, kodeeritud *ilvGM* poolt) ning seda defekti kompenseerivad ensüümid represseritakse valiini tagasisidestusliku inhibitsiooni tõttu (Tedin & Norel, 2001). Kui kasvukeskkonnas on valiini, ei suuda K-12 tüved isoleutsiini sünteesida ja klassikalistes *relA* katsetes indutseeritakse rakkudes isoleutsiini nälg, lisades minimaalsöötmesse valiini (Lagosky & Chang, 1980; Lagosky & Chang, 1981). BW25113 on K-12 tüve derivaat, seepärast ei toibugi ta söötmel, mis ei sisalda aminohapetest ainult isoleutsiini (joonis 15).

Enamuse aminohapete ükshaaval väljajätmine ei mõjutanud BW25113 toibumist, võrreldes söötmega, millest puuduvad aminohapped (joonis 15). Seevastu toibuvad aga BW25113 tüve rakud pea kaks tundi hiljem, kui minimaalsöötmetest puuduvad ainult metioniin või ainult leutsiin, mõnevõrra suuremgi mahajäämine leiab aset siis, kui söötmetest puudub ainult valiin (joonis 15).

Escherichia coli kasvamise probleemi ainult metioniini puudumise korral on hiljaaegu kirjeldatud. Zhang jt lisavad keset eksponentsiaalset faasi glütserooli sisaldavas minimaalsöötmes kasvavatele rakkudele aminohappeid ja näevad, et ainult metioniini puudumisel on metsik-tüüpi *E. coli* kasvukiirus isegi väiksem kui ilma aminohapeteta söötmes, ja ligi kaks korda väiksem (0,7 ja 1,5 pooldumist tunni kohta) kui 20 aminohappe olemasolu korral (Zhang *et al.*, 2006). Seevastu juhul, kui söötmes on 18 aminohapet ja puuduvad nii Met kui Cys, suureneb kasvukiirus, sarnaselt 20 aminohappe lisamisega. Seepärast võib oletada, et ainult metioniini puudumisel väheneb kasvukiirus väävli metabolismi tasakaalu häirumisest.

Nagu juba mainitud, võib käesolevas töös samuti näha, et ainult metioniini puudumisel on rakkude *toibumine statsionaarsest faasist* hilisem metsik-tüüpi tüve puhul (joonis 15), veelgi enam, et *relA* väljalülitamine sellele fenotüübile mõju ei avalda (joonis 16). Samas ei nähta käesolevas töös, Zhang jt tööga sarnasemas katses metsik-tüüpi ega *relA* tüve *eksponentsiaalse faasi kasvu* puhul probleemi üleminekul minimaalsöötimest aminohappeid sisaldavale minimaalsöötmele (joonis 17, paneelid A ja B). Kuna aga antud töö puhul pidid rakud vahetama süsinikuallikat, pole selle töö ja Zhang jt tehtud katsed päris üheselt võrreldavad. Kindlasti annaks aga olulist lisainformatsiooni toibumiskatse söötmes, milles 18 aminohapet ilma metioniini ja tsüsteiinita.

RelA-defektsel tüvel on aminohapete metabolismiga seoses varem kirjeldatud võimetus kasvada glükoosi sisaldavas minimaalsöötmes, milles on kõik aminohapped, kuid: 1) puuduvad kõik hargneva ahelaga aminohapped (isoleutsiin, valiin ja leutsiin; ILV) (Tedin & Norel, 2001; Xiao *et al.*, 1991); 2) puudub ainult valiin (Tedin & Norel, 2001). 20-st aminohappest ainult valiini puudumise korral pääseb mõjule *E. coli relA*-defektse tüve tundlikus leutsiinile, mis tähendab seda, et leutsiini olemasolu korral kasvukeskkonnas peab, seni mitte teadaolevatel põhjustel, kasvukeskkond sisaldama nii isoleutsiini kui valiini (Tedin & Norel, 2001).

Käesolevas töös *relA* tüvega saadud tulemused kattuvad vaid osaliselt Tedini ja Noreli töö tulemustega (Tedin & Norel, 2001). Ühest küljest ilmneb valiini puudumise korral BW25113 $\Delta relA$ tüvel üsna suur kasvudefekt (joonis 16), ja nagu selgub ainult käesolevas tööst, võiks selline defekt palju väiksemal määral omane olla ka metsik-tüüpi *E. coli*-le (joonis 15). Teisest küljest on käesoleva töö puhul ainult leutsiini puudumine *relA* rakkudele mitte ainult samaväärse vaid isegi sügavama mõjuga (joonis 16).

Igal juhul kinnitab käesolev töö, et *relA* funktsioneerimine on mingil moel seotud hargneva ahelaga aminohapete biosünteesiradade ensüümide ekspressiooniga ja/või regulatsiooniga. Seejuures võivad probleemid geeniekspressiooni reguleerimisel olla märksa suuremad, kui söötimest puuduvad vaid vähesed aminohapped, võrreldes söötmega, milles pole üldse aminohappeid. Alljärgnevalt vaatleme sellise fenotüübi võimalikke põhjuseid.

Tedini ja Noreli tehtud katsed annavad põhjust arvata, et ppGpp on peamiselt vajalik RNAP transkriptsiooni elongatsioonikiiruse aeglustamiseks (Vogel & Jensen, 1994), mis võiks soodustada ILV biosünteesiraja ensüümide attenuatsiooni-sõltuvat ekspressiooni (Tedin & Norel, 2001). Kuid sellega ppGpp roll ei piirdu: ppGpp omab positiivset mõju veel vähemalt ühe biosünteesis osaleva ensüümi promootori transkriptsioonile (Uzan & Danchin, 1976); ning mõjutab samuti regulatsioonis osalevate lisafaktorite, nagu Lrp või IHF, ekspressiooni. Seejuures viimased kaks ppGpp-sõltuvat mehhanismi ei tundu olevat nii kriitilise tähtsusega kui RNAP elongatsioonikiiruse vähendamine (Tedin & Norel, 2001).

Olukorras, kus *Escherichia coli* rakkudes puudub RelA, sõltub ppGpp metabolism ainult SpoT-st. Kirjandusest leiab, et ühe aminohappe eemaldamisel keskkonnast SpoT süntetaasne aktiivsus kaob täielikult ja stimuleeritakse SpoT hüdrolaasit aktiivsust nii, et $\Delta relA$ tüves langeb ppGpp tsütoplasmaatiline tase nulli (Murray & Bremer, 1996). Mitme aminohappe samaaegne eemaldamine aga, kontrastiks üksiku aminohappe näljale, stimuleerib PSII aktiivsust ja jäljendab seeläbi poomisvastust. Selline stimulatsioon on seda tugevam, mida rohkem aminohappeid eemaldada (Murray & Bremer, 1996). Võttes arvesse veel, et ühe aminohappe nälja korral üldine tRNA-de laetuse tase hoopis tõuseb (Yegian *et al.*, 1966), ning puhastatud SpoT hüdrolaasi aktiivsust inhibeerib laadimata tRNA (Heinemeyer & Richter, 1977; Richter, 1980), arvatakse, et SpoT aktiivsust reguleerib üldine tRNA-de laetuse tase. Teisisõnu, üldine madal tRNA-de laetus stimuleerib SpoT ppGpp süntetaasi ja/või inhibeerib hüdrolaasit aktiivsust, ning hoiab seeläbi valgusünteesi võimsuse vastavuses kasvutingimustega.

Lisaks mitme aminohappe näljale on kirjeldatud SpoT-sõltuva ppGpp sünteesi stimulatsiooni veel rasvhapete nälja (Seyfzadeh *et al.*, 1993) ja süsinikuallika ammendumise (Gallant *et al.*, 1972; Murray & Bremer, 1996) korral. Seejuures rasvhapete nälja korral on vähenenud valgusünteesi tingimustes tRNA-d maksimaalselt laetud (Seyfzadeh *et al.*, 1993). Viimane fakt aga ei sobi eelmises lõigus väljajõutud arutelu tulemusega.

Rasvhapete nälja korral on vähenenud valgusünteesi põhjuseks arvatavasti neis tingimustes täheldatud madal GTP tase. Seletamaks *spoT*-sõltuvat ppGpp sünteesi neis ja samuti süsinikunälja tingimustes (Gallant *et al.*, 1972), pakkusid Seyfzadeh jt. (1993)

välja, et „rasvhapete süntees mängib olulist rolli kui süsinikuallika (ja energia) varude indikaator.”

Hilisemates uuringutes leiti, et süsinikuallika nälja korral akumuleerub ppGpp peamiselt SpoT hüdrolaasi aktiivsuse inhibeerimise tõttu (Murray & Bremer, 1996). Veelgi enam, süsinikuallika ammendumise korral PSII-sõltuvat ppGpp sünteesi isegi inhibeeritakse, ent hüdrolaasi aktiivsust inhibeeritakse enam, mis põhjustabki ppGpp akumulatsiooni hoolimata tema vähenenud sünteesist (Murray & Bremer, 1996). See jätab PSII stimulatsiooni rasvhapete nälja ja neis tingimuses maksimaalselt laetud tRNA-de puhul üsna seletuseta. Seepärast on viimasel ajal pakutud välja, et seotult küll laetud tRNA-de tasemega, on oluliseks parameetriks, mida SpoT süntetaasne aktiivsus seirab, ribosoomide talitlus. Ribosoomi talitluse oluliseks parameetriks on elongatsiooni kiirus, ning SpoT-sõltuv ppGpp süntees võiks olla stimuleeritud tingimustes, kus translatsiooni kiirus on vähenenud (Zhang *et al.*, 2006), nagu näiteks mitme aminohappe nälg, süsinikuallika vahetus või kerge energiapuudus (Murray & Bremer, 1996). Seejuures, kuna PSII aktiivsuseks on millegipärast vajalik pidev translatsioon, katkeb PSII aktiivsus täielikult üksiku aminohappe nälja, raskekujulise energiapuuduse või valgusünteesi blokeerimisel antibiootikumidega (Murray & Bremer, 1996). PSII aktiivsus oleks seega paraboolne funktsioon maksimumiga translatsiooni elongatsioonikiiruse maksimumi ja translatsiooni peatumise vahepeal. SpoT hüdrolaasne aktiivsus on PSII-st veel eraldi ja ilmselt tõesti inhibeeritud laadimata tRNA-de poolt.

Nüüd, võttes aluseks, et PSII aktiivsus on üsna nullilähedane ja hüdrolaasi aktiivsus pea maksimaalne tingimustes, kus rakud nälgivad vaid üksikute aminohapete järele, hakkavad *relA* rakud statsionaarse faasi järel loomulikult kasvama väga palju hiljem, kui söötimest puuduvad leutsiin ja valiin (joonis 16), sest nende aminohapete biosünteesi operonide ekspressioon sõltub ppGpp-st (Tedin & Norel, 2001; Xiao *et al.*, 1991). Võib oletada, et käesoleva töö katsetes kannatavad rakud isegi funktsionaalse RelA olemasolu korral mõnda aega leutsiini ja valiini biosünteesi puuduse all just madalama ppGpp kontsentratsiooni tõttu (joonis 15). SpoT funktsioon ppGpp tasakaalu hoidmisel on niivõrd ebatavalise ja looduslikest tingimustest erineva olukorra puhul lihtsalt „segadusesse viidud”. Teisisõnu, isegi metsik tüüpi rakkude kontekstis võib leutsiini ja

valiini biosünteesi ensüümide ekspressioon olla tundlik veidi madalama ppGpp kontsentratsiooni suhtes.

Eelnevaga sobib ka see, et selliseid suuri kasvudefekte ei ilmnenu eksponentsiaalse faasi rakkude üleviimisel 19 aminohappega minimaalsöötmesse ei metsik-tüüpi ega *relA* rakkude korral (joonis 17). Kuna rakud pidid selle katse käigus vahetama süsinikuallikat, milline muutus on *E. coli*-le „tuttav” ning põhjustab SpoT-sõltuva ppGpp akumulatsiooni ja adekvaatse hüdrolaasi regulatsiooni, oli rakkude reaktsioon uutele tingimustele oluliselt vähem mõjutatud *relA* olemasolust või puudumisest.

Eeltoodut arvestades võib töö tulemusi kokku võttes kõige olulisema järeldusena kinnitada, et hargneva ahelaga aminohapete biosüntees sõltub tõepoolest ppGpp-st ning oletada, et ka funktsionaalse RelA olemasolu korral võib teatud kunstlikes tingimustes ppGpp tase olla ebapiisav I, L, V sünteesiks vajalike operonide ekspressiooniks või produktide regulatsiooniks.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti stressitingimustel *Escherichia coli* ribosoomiga seonduvaid ja translatsiooni moduleerivaid valke ning tmRNA-d. Selleks konstrueeriti vastavaid valke kodeerivate geenide deletsiooniga tüved ning uuriti nende kasvu, hakkamasaamist külma-, kuuma- ja oksüdatiivse stressi tingimustes. Samuti jälgiti deletsiooniga rakke pikemaajasel püsimisel statsionaarses faasis ja statsionaarsest faasist toibumisel. Konkreetselt said uuritud RelA-, RelEB-, RMF-, YfiA-, YhbH- ja tmRNA-defektsed tüved.

Töö tulemustest selgub, et vastavad geeniproduktid võiksid olla üsna mitteolulised või asendatavad nii külma-, kuuma- kui oksüdatiivse stressi tingimustes. Samuti ei ilmnenud RelA-, tmRNA, RelEB ega RMF-defektsel tüvel mingisugust metsik-tüüpi rakkudest erinevat fenotüüpi pikemaajasel viibimisel statsionaarses faasis ega toibumisel rikka LB söötme korral. Seevastu minimaalsöötmes M9, kui tmRNA-defektne tüvi toibus ka minimaalsöötmel M9 võrdväärselt metsik-tüüpi tüvega, siis *relA* tüve toibumine oli tugevasti häiritud. Ilmnes, et *relA* statsionaarse faasi rakkude viimisel värskesse minimaalsöötmesse, toibuvad nad mitu tundi hiljem kui metsik-tüüpi rakud. Selgus, et sellise kasvudefekti kaotab minimaalsöötmele aminohapete lisamine.

Kasutades rakkude statsionaarsest faasist toibumist erinevatel minimaalsöötmetel, millest puudus 20-st aminohapest ainult üks, avaldus ka metsik-tüüpi *E. coli* tüvel huvitav fenotüüp. Metsik-tüüpi rakud toibusid paar tundi hiljem, kui söötmes olid 19 aminohapet ja puudusid ainult metioniin, ainult leutsiin või ainult valiin. RelA-defektsus suurendab drastiliselt määral statsionaarsest faasist toibumiseks kuluvat aega, kui söötmes pole aminohapetest ainult leutsiini (+7h) või ainult valiini (+4h). Ainult metioniini puudumise korral jäi toibumise viivitus *relA* rakkudes sarnaseks metsik-tüüpi tüvele, arvatavasti on metioniiniga seotud fenotüüp põhjustatud katsetingimuste kunstlikkusest läbi väevli metabolismi häirumise. Seejuures eksponentsiaalse faasi

rakkude üleviimisel 19 erineva aminohappega söötmetesse ilmnes ainult K-12 tüvedele iseloomulik võimetus kasvada leutsiini sisaldavas söötmes ilma isoleutsiinita nii metsik-tüüpi kui *relA* rakkudel.

Eeltoodut arvestades võib töö tulemusi kokku võttes kõige olulisema järeldusena öelda, et hargneva ahelaga aminohapete biosüntees sõltub ppGpp-st ning oletada, et ka funktsionaalse RelA olemasolu korral võib, vähemalt teatud kunstlikes tingimustes, ppGpp tase olla ebapiisav I, L, V sünteesiks vajalike operonide ekspressiooniks või produktide regulatsiooniks.

SUMMARY

Bacterial translation modulating proteins and tmRNA in stress conditions

Vallo Varik

Bacteria quickly adjust their metabolic activities to changing environments. This adjustment includes a control of the cytoplasmic level of the effector nucleotide guanosine tetraphosphate (ppGpp). *Escherichia coli* has two enzymes catalyzing synthesis of ppGpp, ppGpp synthetase I (PSI; *relA* gene product) and II (PSII; *spoT* gene product). PSI is ribosome-associated protein, which is activated when uncharged tRNA binds to the A-site of the ribosome and produces high levels of ppGpp that causes a drastic reduction in the synthesis of rRNA and tRNA; a phenomenon known as „stringent response”. PSII is mostly active during exponential growth and certain conditions of environmental stress.

Stringent response adjusts translational apparatus to stress conditions. However, in order to stop translation even more rapidly, RelE binds to the ribosome and cuts mRNA. Ribosomes stopped on these truncated mRNAs are released by *trans*-translation, a process executed by tmRNA. tmRNA also converts aberrant proteins to facilitated degradation. When conditions do not favour bacterial growth, gram negative bacteria enter into stationary phase. In prokaryotes such as enterobacteria, the protein synthesis is further suppressed by the formation of 100S ribosomes, that is a translationally inactive dimer of 70S ribosomes. Ribosome dimerization is regulated by YfiA and YhbH.

Current thesis investigates the phenotype of RelA-, RelEB-, RMF-, YfiA-, YhbH- and tmRNA-defective *Escherichia coli*. It appears that products of the investigated genes seem to be mostly dispensable during exponential growth, as well as cold shock, heat shock and oxidative stress conditions. In addition, neither RelA-, tmRNA, RelEB nor RMF-defective strain do show problems of prolonged starvation in stationary phase or growth resumption on rich LB medium. However, in a case of growth resumption on minimal medium, $\Delta relA$ shows severe lag phase and does start to reproduce much later than the wild-type *E. coli*. Growth defect of *E. coli* was suppressed by the addition of

amino acids into the minimal medium. It was previously sustained that *E. coli* K-12 strains do not grow on minimal media lacking isoleucine while supplemented with leucine. Nevertheless, when one amino acid out of twenty was omitted, wild-type *E. coli* exhibited about two hour delay in growth resumption in a fresh growth media lacking methionine, leucine or valine. There is a reason to believe that *E. coli* growth reduction without methionine is caused by imbalance in the metabolism of sulphur. However, although *relA* deletion did not affect recovering on media lacking only methionine, it severely aggravated growth resumption on amino acid supplemented minimal media lacking leucine (+7h) or valine (+4h).

In conclusion, ppGpp seems to affect the synthesis of amino acid promoters and/or regulation of corresponding enzymes and it can be supposed that even in a functional RelA background, ppGpp level might be insufficient for branched-chain amino acid biosynthesis, at least in certain artificial conditions.

KASUTATUD KIRJANDUS

Abo, T., Inada, T., Ogawa, K. & Aiba, H. (2000). SsrA-mediated tagging and proteolysis of LacI and its role in the regulation of lac operon. *Embo J* **19**, 3762-3769.

Agafonov, D. E., Kolb, V. A. & Spirin, A. S. (1997). Proteins on ribosome surface: measurements of protein exposure by hot tritium bombardment technique. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12892-12897.

Agafonov, D. E., Kolb, V. A., Nazimov, I. V. & Spirin, A. S. (1999). A protein residing at the subunit interface of the bacterial ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12345-12349.

Agafonov, D. E., Kolb, V. A. & Spirin, A. S. (2001). Ribosome-associated protein that inhibits translation at the aminoacyl-tRNA binding stage. *EMBO Rep* **2**, 399-402.

Agafonov, D. E., Kolb, V. A. & Spirin, A. S. (2001). A novel stress-response protein that binds at the ribosomal subunit interface and arrests translation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **66**, 509-514.

Agafonov, D. E. & Spirin, A. S. (2004). The ribosome-associated inhibitor A reduces translation errors. *Biochem Biophys Res Commun* **320**, 354-358.

Aiso, T., Yoshida, H., Wada, A. & Ohki, R. (2005). Modulation of mRNA stability participates in stationary-phase-specific expression of ribosome modulation factor. *J Bacteriol* **187**, 1951-1958.

Akerlund, T., Nordstrom, K. & Bernander, R. (1995). Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**, 6791-6797.

Apirakaramwong, A., Fukuchi, J., Kashiwagi, K., Kakinuma, Y., Ito, E., Ishihama, A. & Igarashi, K. (1998). Enhancement of cell death due to decrease in Mg²⁺ uptake by OmpC (cation-selective porin) deficiency in ribosome modulation factor-deficient mutant. *Biochem Biophys Res Commun* **251**, 482-487.

Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, S., Vassilyeva, M. N., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S. & Vassilyev, D. G. (2004). Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell* **117**, 299-310.

Avarbock, D., Avarbock, A. & Rubin, H. (2000). Differential regulation of opposing RelMtb activities by the aminoacylation state of a tRNA.ribosome.mRNA.RelMtb complex. *Biochemistry* **39**, 11640-11648.

Barker, M. M., Gaal, T., Josaitis, C. A. & Gourse, R. L. (2001). 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.

Bartlett, M. S., Gaal, T., Ross, W. & Gourse, R. L. (1998). RNA polymerase mutants that destabilize RNA polymerase-promoter complexes alter NTP-sensing by rrn P1 promoters. *J Mol Biol* **279**, 331-345.

Blaszczak, A., Zylicz, M., Georgopoulos, C. & Liberek, K. (1995). Both ambient temperature and the DnaK chaperone machine modulate the heat shock response in Escherichia coli by regulating the switch between sigma 70 and sigma 32 factors assembled with RNA polymerase. *Embo J* **14**, 5085-5093.

Borek, E., Rockenbach, J. & Ryan, A. (1956). Studies on a mutant of Escherichia coli with unbalanced ribonucleic acid synthesis. *J Bacteriol* **71**, 318-323.

Braeken, K., Moris, M., Daniels, R., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2006). New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology. *Trends Microbiol* **14**, 45-54.

Chatterji, D., Fujita, N. & Ishihama, A. (1998). The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the beta-subunit of Escherichia coli RNA polymerase. *Genes Cells* **3**, 279-287.

Chatterji, D. & Ojha, A. K. (2001). Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr Opin Microbiol* **4**, 160-165.

Christensen, S. K., Mikkelsen, M., Pedersen, K. & Gerdes, K. (2001). RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14328-14333.

Christensen, S. K. & Gerdes, K. (2003). RelE toxins from bacteria and Archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA. *Mol Microbiol* **48**, 1389-1400.

Christensen, S. K. & Gerdes, K. (2004). Delayed-relaxed response explained by hyperactivation of RelE. *Mol Microbiol* **53**, 587-597.

Cuny, C., Dukan, L., Fraysse, L., Ballesteros, M. & Dukan, S. (2005). Investigation of the first events leading to loss of culturability during Escherichia coli starvation: future nonculturable bacteria form a subpopulation. *J Bacteriol* **187**, 2244-2248.

Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640-6645.

- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640-6645.
- de Haro, C., Mendez, R. & Santoyo, J. (1996).** The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis. *Faseb J* **10**, 1378-1387.
- Fukuchi, J., Kashiwagi, K., Yamagishi, M., Ishihama, A. & Igarashi, K. (1995).** Decrease in cell viability due to the accumulation of spermidine in spermidine acetyltransferase-deficient mutant of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**, 18831-18835.
- Fukuda, T., Nakahigashi, K. & Inokuchi, H. (2001).** Viability of *Escherichia coli* cells under long-term cultivation in a rich nutrient medium. *Genes Genet Syst* **76**, 271-278.
- Gallant, J., Margason, G. & Finch, B. (1972).** On the turnover of ppGpp in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **247**, 6055-6058.
- Galvani, C., Terry, J. & Ishiguro, E. E. (2001).** Purification of the RelB and RelE proteins of *Escherichia coli*: RelE binds to RelB and to ribosomes. *J Bacteriol* **183**, 2700-2703.
- Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J. M., Garcarrubio, A. & Covarrubias, A. A. (2000).** Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J Biol Chem* **275**, 5668-5674.
- Gentry, D. R., Hernandez, V. J., Nguyen, L. H., Jensen, D. B. & Cashel, M. (1993).** Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. *J Bacteriol* **175**, 7982-7989.
- Gerdes, K. (2000).** Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *J Bacteriol* **182**, 561-572.
- Gualerzi, C. O., Giuliadori, A. M. & Pon, C. L. (2003).** Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. *J Mol Biol* **331**, 527-539.
- Gutmann, S., Haebel, P. W., Metzinger, L., Sutter, M., Felden, B. & Ban, N. (2003).** Crystal structure of the transfer-RNA domain of transfer-messenger RNA in complex with SmpB. *Nature* **424**, 699-703.
- Hallier, M., Ivanova, N., Rametti, A., Pavlov, M., Ehrenberg, M. & Felden, B. (2004).** Pre-binding of small protein B to a stalled ribosome triggers trans-translation. *J Biol Chem* **279**, 25978-25985.
- Hansen, J. L., Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2003).** Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol* **330**, 1061-1075.

Haseltine, W. A. & Block, R. (1973). Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 1564-1568.

Hayes, C. S., Bose, B. & Sauer, R. T. (2002). Stop codons preceded by rare arginine codons are efficient determinants of SsrA tagging in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3440-3445.

Hayes, C. S., Bose, B. & Sauer, R. T. (2002). Proline residues at the C terminus of nascent chains induce SsrA tagging during translation termination. *J Biol Chem* **277**, 33825-33832.

Hayes, C. S. & Sauer, R. T. (2003). Cleavage of the A site mRNA codon during ribosome pausing provides a mechanism for translational quality control. *Mol Cell* **12**, 903-911.

Heinemeyer, E. A. & Richter, D. (1977). In vitro degradation of guanosine tetraphosphate (ppGpp) by an enzyme associated with the ribosomal fraction from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **84**, 357-361.

Hogg, T., Mechold, U., Malke, H., Cashel, M. & Hilgenfeld, R. (2004). Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response [corrected]. *Cell* **117**, 57-68.

Huang, C., Wolfgang, M. C., Withey, J., Koomey, M. & Friedman, D. I. (2000). Charged tmRNA but not tmRNA-mediated proteolysis is essential for *Neisseria gonorrhoeae* viability. *Embo J* **19**, 1098-1107.

Izutsu, K., Wada, A. & Wada, C. (2001). Expression of ribosome modulation factor (RMF) in *Escherichia coli* requires ppGpp. *Genes Cells* **6**, 665-676.

Jenkins, D. E., Schultz, J. E. & Martin, A. (1988). Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**, 3910-3914.

Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V. & Nystrom, T. (2002). Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev* **16**, 1260-1270.

Jores, L. & Wagner, R. (2003). Essential steps in the ppGpp-dependent regulation of bacterial ribosomal RNA promoters can be explained by substrate competition. *J Biol Chem* **278**, 16834-16843.

Julio, S. M., Heithoff, D. M. & Mahan, M. J. (2000). ssrA (tmRNA) plays a role in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenesis. *J Bacteriol* **182**, 1558-1563.

Karzai, A. W. & Sauer, R. T. (2001). Protein factors associated with the SsrA.SmpB tagging and ribosome rescue complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3040-3044.

- Kolter, R., Siegele, D. A. & Tormo, A. (1993).** The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol* **47**, 855-874.
- Komine, Y., Kitabatake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K. & Inokuchi, H. (1994).** A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9223-9227.
- Kuroda, A., Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H. & Kornberg, A. (2001).** Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science* **293**, 705-708.
- Kvint, K., Farewell, A. & Nystrom, T. (2000).** RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of sigma(s). *J Biol Chem* **275**, 14795-14798.
- Kvint, K., Hosbond, C., Farewell, A., Nybroe, O. & Nystrom, T. (2000).** Emergency derepression: stringency allows RNA polymerase to override negative control by an active repressor. *Mol Microbiol* **35**, 435-443.
- Lagosky, P. A. & Chang, F. N. (1980).** Influence of amino acid starvation on guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate basal-level synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **144**, 499-508.
- Lagosky, P. A. & Chang, F. N. (1981).** Correlation between RNA synthesis and basal level guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate in relaxed mutants of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **256**, 11651-11656.
- Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1991).** Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**, 49-59.
- Lazzarini, R. A., Cashel, M. & Gallant, J. (1971).** On the regulation of guanosine tetraphosphate levels in stringent and relaxed strains of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **246**, 4381-4385.
- Laurie, A. D., Bernardo, L. M., Sze, C. C., Skarfstad, E., Szalewska-Palasz, A., Nystrom, T. & Shingler, V. (2003).** The role of the alarmone (p)ppGpp in sigma N competition for core RNA polymerase. *J Biol Chem* **278**, 1494-1503.
- Levchenko, I., Seidel, M., Sauer, R. T. & Baker, T. A. (2000).** A specificity-enhancing factor for the ClpXP degradation machine. *Science* **289**, 2354-2356.
- Luidalepp, H., Hallier, M., Felden, B. & Tenson, T. (2005).** tmRNA decreases the bactericidal activity of aminoglycosides and the susceptibility to inhibitors of cell wall synthesis. *RNA Biol* **2**, 70-74.
- Magnusson, L. U., Nystrom, T. & Farewell, A. (2003).** Underproduction of sigma 70 mimics a stringent response. A proteome approach. *J Biol Chem* **278**, 968-973.

- Magnusson, L. U., Farewell, A. & Nystrom, T. (2005).** ppGpp: a global regulator in Escherichia coli. *Trends Microbiol* **13**, 236-242.
- Maitra, A., Shulgina, I. & Hernandez, V. J. (2005).** Conversion of active promoter-RNA polymerase complexes into inactive promoter bound complexes in E. coli by the transcription effector, ppGpp. *Mol Cell* **17**, 817-829.
- Maki, Y., Yoshida, H. & Wada, A. (2000).** Two proteins, YfiA and YhbH, associated with resting ribosomes in stationary phase Escherichia coli. *Genes Cells* **5**, 965-974.
- McGinness, K. E. & Sauer, R. T. (2004).** Ribosomal protein S1 binds mRNA and tmRNA similarly but plays distinct roles in translation of these molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13454-13459.
- Mechold, U., Murphy, H., Brown, L. & Cashel, M. (2002).** Intramolecular regulation of the opposing (p)ppGpp catalytic activities of Rel(Seq), the Rel/Spo enzyme from Streptococcus equisimilis. *J Bacteriol* **184**, 2878-2888.
- Mizuta, K. & Warner, J. R. (1994).** Continued functioning of the secretory pathway is essential for ribosome synthesis. *Mol Cell Biol* **14**, 2493-2502.
- Mittenhuber, G. (2001).** Comparative genomics and evolution of genes encoding bacterial (p)ppGpp synthetases/hydrolases (the Rel, RelA and SpoT proteins). *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**, 585-600.
- Murray, K. D. & Bremer, H. (1996).** Control of spoT-dependent ppGpp synthesis and degradation in Escherichia coli. *J Mol Biol* **259**, 41-57.
- Muto, A., Fujihara, A., Ito, K. I., Matsuno, J., Ushida, C. & Himeno, H. (2000).** Requirement of transfer-messenger RNA for the growth of Bacillus subtilis under stresses. *Genes Cells* **5**, 627-635.
- Nierhaus, K. H. (1990).** The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle: features and future. *Biochemistry* **29**, 4997-5008.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2000).** The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**, 920-930.
- Niven, G. W. (2004).** Ribosome modulation factor protects Escherichia coli during heat stress, but this may not be dependent on ribosome dimerisation. *Arch Microbiol* **182**, 60-66.
- Nystrom, T. (2004).** Stationary-Phase Physiology. *Annu Rev Microbiol*.
- Paul, B. J., Barker, M. M., Ross, W., Schneider, D. A., Webb, C., Foster, J. W. & Gourse, R. L. (2004).** 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.

Paul, B. J., Berkmen, M. B. & Gourse, R. L. (2005). DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7823-7828.

Pedersen, K., Zavialov, A. V., Pavlov, M. Y., Elf, J., Gerdes, K. & Ehrenberg, M. (2003). The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell* **112**, 131-140.

Potrykus, K., Wegrzyn, G. & Hernandez, V. J. (2002). Multiple mechanisms of transcription inhibition by ppGpp at the lambda_{dap}(R) promoter. *J Biol Chem* **277**, 43785-43791.

Ranquet, C., Geiselmann, J. & Toussaint, A. (2001). The tRNA function of SsrA contributes to controlling repression of bacteriophage Mu prophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10220-10225.

Richards, J., Mehta, P. & Karzai, A. W. (2006). RNase R degrades non-stop mRNAs selectively in an SmpB-tmRNA-dependent manner. *Mol Microbiol* **62**, 1700-1712.

Richter, D. (1980). Uncharged tRNA inhibits guanosine 3',5'-bis (diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase [ppGppase], the spoT gene product, from Escherichia coli. *Mol Gen Genet* **178**, 325-327.

Roche, E. D. & Sauer, R. T. (1999). SsrA-mediated peptide tagging caused by rare codons and tRNA scarcity. *Embo J* **18**, 4579-4589.

Roche, E. D. & Sauer, R. T. (2001). Identification of endogenous SsrA-tagged proteins reveals tagging at positions corresponding to stop codons. *J Biol Chem* **276**, 28509-28515.

Rudinger-Thirion, J., Giege, R. & Felden, B. (1999). Aminoacylated tmRNA from Escherichia coli interacts with prokaryotic elongation factor Tu. *Rna* **5**, 989-992.

Ryals, J., Little, R. & Bremer, H. (1982). Control of rRNA and tRNA syntheses in Escherichia coli by guanosine tetraphosphate. *J Bacteriol* **151**, 1261-1268.

Sands, M. K. & Roberts, R. B. (1952). The effects of a tryptophan-histidine deficiency in a mutant of Escherichia coli. *J Bacteriol* **63**, 505-511.

Schlunzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A. & Franceschi, F. (2001). Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* **413**, 814-821.

- Seyfzadeh, M., Keener, J. & Nomura, M. (1993).** spoT-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11004-11008.
- Singh, N. S. & Varshney, U. (2004).** A physiological connection between tmRNA and peptidyl-tRNA hydrolase functions in Escherichia coli. *Nucleic Acids Res* **32**, 6028-6037.
- Stent, G. S. & Brenner, S. (1961).** A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **47**, 2005-2014.
- Sunohara, T., Abo, T., Inada, T. & Aiba, H. (2002).** The C-terminal amino acid sequence of nascent peptide is a major determinant of SsrA tagging at all three stop codons. *Rna* **8**, 1416-1427.
- Zambrano, M. M., Siegle, D. A., Almiron, M., Tormo, A. & Kolter, R. (1993).** Microbial competition: Escherichia coli mutants that take over stationary phase cultures. *Science* **259**, 1757-1760.
- Zhang, X., Liang, S. T. & Bremer, H. (2006).** Feedback control of ribosome synthesis in Escherichia coli is dependent on eight critical amino acids. *Biochimie* **88**, 1145-1155.
- Tadaki, T., Fukushima, M., Ushida, C., Himeno, H. & Muto, A. (1996).** Interaction of 10Sa RNA with ribosomes in Escherichia coli. *FEBS Lett* **399**, 223-226.
- Tan, X., Varughese, M. & Widger, W. R. (1994).** A light-repressed transcript found in Synechococcus PCC 7002 is similar to a chloroplast-specific small subunit ribosomal protein and to a transcription modulator protein associated with sigma 54. *J Biol Chem* **269**, 20905-20912.
- Tedin, K. & Norel, F. (2001).** Comparison of DeltarelA strains of Escherichia coli and Salmonella enterica serovar Typhimurium suggests a role for ppGpp in attenuation regulation of branched-chain amino acid biosynthesis. *J Bacteriol* **183**, 6184-6196.
- Teixeira, P., Castro, H., Mohacsi-Farkas, C. & Kirby, R. (1997).** Identification of sites of injury in Lactobacillus bulgaricus during heat stress. *J Appl Microbiol* **83**, 219-226.
- Toulokhonov, II, Shulgina, I. & Hernandez, V. J. (2001).** Binding of the transcription effector ppGpp to Escherichia coli RNA polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N terminus of the beta'-subunit. *J Biol Chem* **276**, 1220-1225.
- Ueta, M., Yoshida, H., Wada, C., Baba, T., Mori, H. & Wada, A. (2005).** Ribosome binding proteins YhbH and YfiA have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of Escherichia coli. *Genes Cells* **10**, 1103-1112.
- Uzan, M. & Danchin, A. (1976).** A rapid test for the rel A mutation in E. coli. *Biochem Biophys Res Commun* **69**, 751-758.

- Wada, A., Yamazaki, Y., Fujita, N. & Ishihama, A. (1990).** Structure and probable genetic location of a "ribosome modulation factor" associated with 100S ribosomes in stationary-phase *Escherichia coli* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2657-2661.
- Wada, A., Igarashi, K., Yoshimura, S., Aimoto, S. & Ishihama, A. (1995).** Ribosome modulation factor: stationary growth phase-specific inhibitor of ribosome functions from *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **214**, 410-417.
- Wada, A. (1998).** Growth phase coupled modulation of *Escherichia coli* ribosomes. *Genes Cells* **3**, 203-208.
- Wada, A., Mikkola, R., Kurland, C. G. & Ishihama, A. (2000).** Growth phase-coupled changes of the ribosome profile in natural isolates and laboratory strains of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**, 2893-2899.
- Wagner, R. (2002).** Regulation of ribosomal RNA synthesis in *E. coli*: effects of the global regulator guanosine tetraphosphate (ppGpp). *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 331-340.
- Valle, M., Gillet, R., Kaur, S., Henne, A., Ramakrishnan, V. & Frank, J. (2003).** Visualizing tmRNA entry into a stalled ribosome. *Science* **300**, 127-130.
- VanBogelen, R. A. & Neidhardt, F. C. (1990).** Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5589-5593.
- Wendrich, T. M., Blaha, G., Wilson, D. N., Marahiel, M. A. & Nierhaus, K. H. (2002).** Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Mol Cell* **10**, 779-788.
- Vila-Sanjurjo, A., Schuwirth, B. S., Hau, C. W. & Cate, J. H. (2004).** Structural basis for the control of translation initiation during stress. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1054-1059.
- Wilson, D. N. & Nierhaus, K. H. (2004).** The how and Y of cold shock. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1026-1028.
- Withey, J. H. & Friedman, D. I. (2003).** A salvage pathway for protein structures: tmRNA and trans-translation. *Annu Rev Microbiol* **57**, 101-123.
- Vogel, U. & Jensen, K. F. (1994).** Effects of guanosine 3',5'-bisdiphosphate (ppGpp) on rate of transcription elongation in isoleucine-starved *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**, 16236-16241.
- Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G. & Cashel, M. (1991).** Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of relA null mutants can be eliminated by spoT null mutations. *J Biol Chem* **266**, 5980-5990.

Yamagishi, M., Matsushima, H., Wada, A., Sakagami, M., Fujita, N. & Ishihama, A. (1993). Regulation of the *Escherichia coli* *rnf* gene encoding the ribosome modulation factor: growth phase- and growth rate-dependent control. *Embo J* **12**, 625-630.

Yamamoto, Y., Sunohara, T., Jojima, K., Inada, T. & Aiba, H. (2003). SsrA-mediated trans-translation plays a role in mRNA quality control by facilitating degradation of truncated mRNAs. *Rna* **9**, 408-418.

Yang, X. & Ishiguro, E. E. (2001). Involvement of the N terminus of ribosomal protein L11 in regulation of the RelA protein of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 6532-6537.

Yang, X. & Ishiguro, E. E. (2003). Temperature-sensitive growth and decreased thermotolerance associated with *relA* mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**, 5765-5771.

Yegian, C. D., Stent, G. S. & Martin, E. M. (1966). Intracellular condition of *Escherichia coli* transfer RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**, 839-846.

Yoshida, H., Maki, Y., Kato, H., Fujisawa, H., Izutsu, K., Wada, C. & Wada, A. (2002). The ribosome modulation factor (RMF) binding site on the 100S ribosome of *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)* **132**, 983-989.

Yoshida, H., Yamamoto, H., Uchiumi, T. & Wada, A. (2004). RMF inactivates ribosomes by covering the peptidyl transferase centre and entrance of peptide exit tunnel. *Genes Cells* **9**, 271-278.