

TARTU ÜLIKOOL
Bioloogia-geograafiateaduskond
Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituut
Molekulaarbioloogia õppetool

Hannes Luidalepp

**Translatsiooni moduleerivate geenide roll bakteri
antibiootikumitundlikkuses**

Magistritöö

Juhendajad:
Tanel Tenson, Ph.D
Prof. Jaanus Remme, Ph.D

Tartu, 2006

SISUKORD

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. TRANS-TRANSLATSIOON.....	7
1.1.1. tmRNA	7
1.1.2. Üldine mehhanism.....	10
1.1.3. Lisafaktorid.....	12
1.1.5. Valgu degradatsioon	14
1.1.6. Roll raku füsioloogias.....	16
1.1.6.4. Antibiootikumid	17
1.2. POOMISVASTUS	19
1.2.1. RelA ja SpoT	19
1.2.2. ppGpp metabolism.....	22
1.2.3. ppGpp mõju transkriptsioonile	23
1.2.4. ppGpp kui globaalne regulaator	25
1.3. RELBE	26
1.3.1. Toksiin-antitoksiin süsteemid.....	26
1.3.2. RelBE	27
1.3.3. <i>relBE</i> lookuse regulatsioon poomisvastuse kontekstis.....	28
1.4. RIBOSOOMIDE DIMERISEERUMINE	31
1.4.1. RMF.....	31
1.4.1.1. Mõju ribosoomidele.....	32
1.4.1.2. Dimeriseerumise bioloogiline funktsioon	33
1.4.2. YfiA.....	35
1.4.2.1. YfiA struktuur	39
1.4.3. YhbH	41
1.5. ANTIBIOOTIKUMIDE TOIMED.....	43
1.5.1. Aminoglükosiidid	43

1.5.2. Ampitsilliin.....	43
1.5.3. Fluorokinoloonid	44
1.5.4. Fosfomütsiin	44
1.5.5. Klooramfenikool.....	45
1.5.6. Linkosamiidid.....	45
1.5.7. Makroliidid	46
1.5.8. Puromütsiin.....	46
1.5.9. Rifampitsiin	47
1.5.10 Spektinomütsiin	47
1.5.11 Streptomütsiin.....	48
1.5.12. Tetratsükliin.....	48
1.5.13. Trimetoprim.....	48
2. TÖÖ EESMÄRK	50
3. MATERJAL JA METOODIKA	51
4. TULEMUSED	55
5. ARUTELU.....	67
KOKKUVÕTE.....	79
SUMMARY	80
KASUTATUD KIRJANDUS	81
LISA 1.....	96

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID

Ala – alaniin

AlaRS – alanüül-tRNA süntetaas

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

ppGpp – guanosiintetrafosfaat

pppGpp – guanosiinpentafoosfaat

MLS_B – Makroliid-linkosamiid-streptogramiin B

Phe – fenüülalaniin

tmRNA_Δ – RNA molekul, mis koosneb ainult tmRNA tRNA sarnasest piirkonnast.

TSP – tRNA sarnane piirkond

tmRNA ja rRNA nukleotiidide puhul on antud *Escherichia coli* numeratsioon

SISSEJUHATUS

Juba natuke aega peale esimeste antibiootikumide kasutuselevõttu isoleeriti ka esimesed resistentsed bakteritüved. Kiire resistentsuse levik jätkus ka peale uute antibiootikumide kasutusele võtmist. Enamasti oli põhjuseks horisontaalse geeniulekande alahindamine. Varajased antibiootikumi preparaadid sisaldasid arvestataval hulgal ka geneetilist materjali, mis muuhulgas kodeerib ka mehhanisme, millega antibiootikume tootvad organismid tagavad endale resistentsuse. Antibiootikumi kasutamisel võeti aga see geneetiline materjal kergesti haigustekitajate poolt üle (Walsh, 2003).

Viimasel ajal on resistentsus eriti suureks probleemiks saanud, sest hulgaliselt on esile kerkinud multiresistentseid bakteritüvesid, mis alluvad ainult väheste antibiootikumide agressiivsele ravile.

Nii kaua kui resistentsus on probleemiks olnud, on otsitud ja sünteesitud ka uusi antibiootikume, millelt loodetakse abi. Kuid ikka ja jälle on tekkinud resistentsed tüved. Uute antibiootikumide väljatöötamisel ja juba olemasolevate modifitseerimisel loodetakse, et resistentsed tüved oleksid neile tundlikud ja omaksid soovitatavalt ka bakteriotsiidset toimet. Bakteriotsiidne on antibiootikum siis, kui ta põhjustab bakterite suremist. Juhul kui bakteri kasv on ainult pärsitud ning bakterid ei sure, on tegemist bakteriostaatilise antibiootikumiga.

Uute ja tõhusamate antibiootikumide väljatöötamiseks on oluline tunda toimemehhanisme, mis suurel hulgal antibiootikumidel ei ole veel piisavalt selgelt teada. Kuna ribosoom on paljude erinevate antibiootikumide sihtmärgiks, tehakse suuri pingutusi täpsustamiseks ribosomaalsete antibiootikumide ja valgusünteesiapparaadi vahelisi seoseid. Viimasel ajal on pööratud tähelepanu ka sellele, et antibiootikumide toime ei ole ainult otsese sihtmärgi spetsiifiline, kuna antibiootikumid põhjustavad laialdasi geeniekspressiooni muutusi (Evers *et al.*, 2001; Hutter *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 2003). Lisaks on peetud ribosoomi üldiseks stressi sensoriks (VanBogelen & Neidhardt, 1990). Kõik see tekitab huvi selgitamiseks ka otseselt ribosoomile mitte mõjuvate antibiootikumide ja valgusünteesiapparaadi vahelisi seoseid.

Lisaks tuntakse praegu suurt huvi uute ühendite vastu, mis võimendaksid olemasolevate antibiootikumide toimet (Markham *et al.*, 1999). Selleks on samuti vaja teada valgusünteesiapparaadi ja erinevate rakuliste mehhanismide omavahelisi seoseid.

Käesoleva töö teoreetilises osas antakse põhjalikum ülevaade valgusünteesiapparaati stressitingimustes moduleerivatest geenidest ja nende produktidest ning käsitletakse töös kasutatud antibiootikumide toimemehhanisme. Praktilises osas kirjeldatakse katseid, kus on vaadeldud, kuidas valgusünteesi moduleerivaid ja kaitsvaid mehhanisme kodeerivate geenide eemaldamine genoomist mõjutab tundlikkust erinevatele antibiootikumidele. $\Delta ssrA$ tüvega saadud tulemused on avaldatud artiklis, mis on lisatud töö lõppu Lisana 1.

Töö valmimise eest tahaksin ma tänada oma juhendajat Tanel Tensonit õpetamise ja juhendamise eest, samuti ka kogu TÜTI molekulaarse mikrobioloogia töögrupi ning TUMRI molekulaarbioloogia õppetooli liikmeid. Suur tänu ka professor Brice Feldenile Rennes'i Ülikoolist, kellelt on lahke kingitusena saadud töös kasutatud metsik-tüüpi ja $\Delta ssrA$ tüvi. Eriti tahaks tänada veel tarmukat ning healoomulist kolleegi Vallo Varikut, kellega äärmiselt huvitavas ning lõppkokkuvõttes viljakas koostöös sai valmistatud ülejäänud mutantsed tüved.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. TRANS-TRANSLATIOON

Bakterirakus on palju mRNA-sid, millel puudub terminatsioonikoodon, seda arvatavasti kas puuduliku transkriptsiooni protsessiivsuse või nukleaaside aktiivsuse pärast. Keskmine mRNA-de pooleluiga *E. coli*'s on 2-3 minutit ning endo- ja 3' → 5' eksonukleaasid tekitavad tõenäoliselt pidevalt mRNA fragmente (Karzai *et al.*, 2000). Juhul kui toimub selliste molekulide translatsioon, jääb ribosoom nende 3'-otsa pidama. Sellises olukorras ei ole translatsiooni jätkamine ega terminatsioon ning ka normaalne peptiidahela vabastamine enam võimalik, mis tingib ribosoomi mRNA-le pidama jäämise.

Ellpool kirjeldatud olukord põhjustab bakterile järgmisi probleeme: ribosoom ei saa jätkata translatsiooni teistelt mRNA-delt, aminohapped ning tRNA seisavad rakule kasutult. Tagajärjeks on kõikide mainitud raku komponentide kasutatava hulga vähenemine. Samuti võib olla rakule kahjulik katkenud valgusünteesi käigus tekkinud poolik valk, mis aeglaselt ribosoomist vabaneb. Selle vältimiseks on bakteritel arenenud keerukas mehhanism, mis viib ringlusesse mRNA-l peatunud ribosome. Lisaks saavad tekkinud mittetäielikud valgud signaaljärjestuse, mis suunab need valgud lagundamisele. Seda süsteemi kutsutakse *trans*-translatsiooniks ja kaks põhilist komponenti selles on tmRNA ning temaga seonduv valk SmpB (Karzai *et al.*, 2000). Mõlema puudumine põhjustab stressitingimustes mutantsete tüvede suuremat kasvuinhibitsiooni võrrelduna metsik-tüüpi tüvega (Karzai *et al.*, 1999).

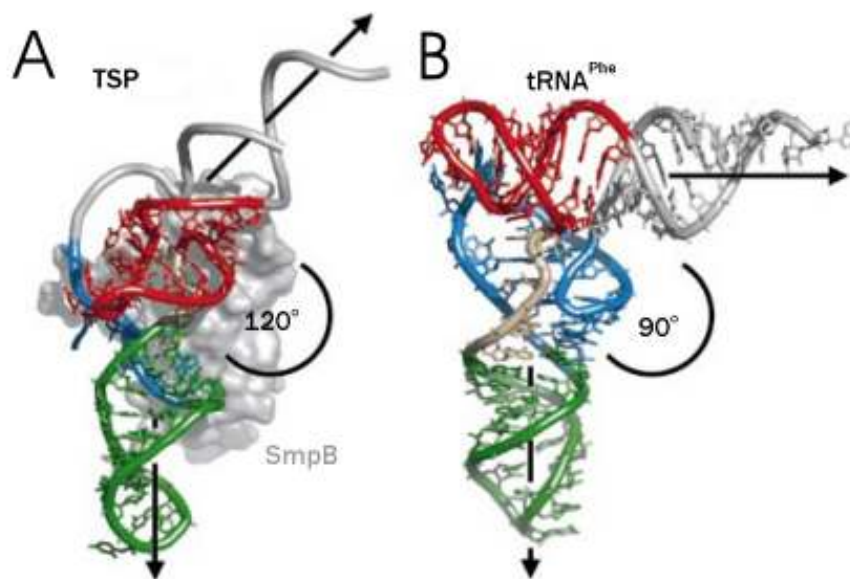
1.1.1. tmRNA

Põhiline *trans*-translatsiooni komponent on väike ja stabiilne RNA, mida kutsutakse tmRNA-ks, kuid on tuntud ka nimede 10Sa ja SsrA (*small stable RNA A*) all (Karzai *et al.*, 2000). Esimese nime on ta saanud sellest, et omab nii *transport* kui ka *messenger* RNA funktsioone.

tmRNA 5'- ja 3'-otsad on konserveerunud ja see on aidanud leida PCR-meetodi abil tmRNA gene kõikidest uuritud eubakteritest ning ka mõningatest kloroplastidest ja degenereerunud kujul vähemalt ühest mitokondrist (protist *Reclinomonas americana*) (Keiler *et*

konserveerunud. Eriti conserveerunud on viimase viie C-terminaalse aminohappe aromaatsuse ja hüdrofoobsuse muster. Lisaks on alati viimane aminohapealaniin (Williams *et al.*, 1999).

TSP sekundaarstruktuuri mudelil on ristikeinalehe kuju (Joonis 1), erinedes tRNA-st selle poolest, et puudub antikoodon-aas ning D-aasal ei ole paardunud nukleotiide ja D-aas on seetõttu lühem. TSP ja tRNA tertsaarstruktuur on mõlemal L tähe kujuline, kuid tmRNA-l on liitunud heeliksi vaheline nurk 90° asemel 110° - 120° (Joonis 2) (Gutmann *et al.*, 2003; Stagg *et al.*, 2001).



Joonis 2. Heeliksivahelise nurga erinevus TSP-SmpB (A) kompleksil ja tRNA^{Phe}-I (B). Domeenid on tähistatud erinevate värvidega: antikoodon-õlg-aas (roheline), T-õlg-aas (punane), D-õlg-aas (sinine), aktseptor õlg (hall) (Gutmann *et al.*, 2003).

tmRNA aktseptoorse õla küljes on CCA-ots, mida aminoatsüleeribalaniiniga AlaRS. tmRNA äratundmiseks kasutab see ensüüm samu struktuurseid elemente, mida tRNA^{Ala} puhulgi. (Komine *et al.*, 1994). Üldiselt on AlaRS aminoatsüül-tRNA süntetaaside hulgas identsusdeterminantide osas üks vähem nõudlikumaid ja ehk see on põhjus, miks kõikide uuritud bakterite tmRNA-d on just selle ensüümi poolt aminoatsüleeritud (Gutmann *et al.*, 2003).

Algselt arvati, et α -proteobakteritel puudub tmRNA, aga hiljem leiti, et ta siiski esineb, kuid on permuteeritud ja sisaldab vahesegmenti. Tavaline 3'-osa (sisaldades T-õlga) asub ülesvoolu 5'-osast (sisaldab D-õlga). Protsessimise käigus vahesegment eemaldatakse ja tekib

kaks eraldi molekuli, mis koos on funktsionaalsed. Sarnane tmRNA on leitud ka mõningatel tsüanobakteritel (Keiler *et al.*, 2000) ning ka β -proteobakterite hulka kuuluvalt *Dechloromonas aromatica*'lt ja tema lähisugulastelt (Sharkady & Williams, 2004). Ilmselt on kaheosaline tmRNA tekkinud igakord iseseisvalt ning see annab tunnistust, et hoolimata struktuuri stabiilsuse vähenemisest parandab selline kaheosalisus kuidagi tmRNA funktsionaalsust.

1.1.2. Üldine mehhanism

tmRNA seondub ribosoomiga siis, kui ribosoom on mRNA-l peatunud ja A-koht on vaba. Esimesena näidati seda juhul kui mRNA on poolik ja valgusüntees on jõudnud 3'-otsa ilma, et oleks toimunud terminatsiooni (Keiler *et al.*, 1996).

Ilmselt tRNA-d jäljendades seondub alaniiniga laetud tmRNA oma TSP-ga ribosoomi A-kohta. Tavalise peptidüültransferaasse reaktsiooni käigus lisatakse tmRNA küljes olev alaniin peptiidahelasse. Järgmisena vahetub ribosoomil paiknev mRNA tmRNA lühikese lugemisraami vastu ning sellelt jätkub translatsioon kuni stop-koodonini. Lisatud järjestus suunab tekkinud produkti degradatsiooni.

Samuti võib ribosoom jõuda mRNA 3'-otsa, kui toimub stop-koodoni ülelugemine supressor-tRNA-de (Ueda *et al.*, 2002) või translatsiooni täpsust vähendavate antibiootikumide mõjul (Abo *et al.*, 2002).

tmRNA-seoselist märgistamist on täheldatud ka täispikkade valkude korral ning see oli sõltuv nõrgast UGA stop-koodonist (Collier *et al.*, 2002). Ka haruldaste arginiini koodonite korral, mis eelnevad stop-koodonile (Hayes *et al.*, 2002b) või paiknevad keset lugemisraami (Roche & Sauer, 1999), on täheldatud peptiidide märgistamist *trans*-translatsioonisüsteemi poolt.

Eelnevad näited viitavad *trans*-translatsiooni- ja terminatsioonisüsteemi ning tRNA-de omavahelisele konkurentsile seondumisel ribosoomi A-kohta. Sellele vastanduvad andmed, mis näitavad, et tmRNA-seoseline signaaljärjestuse lisamine stop-koodoni juurest sõltub ka peptiidahela C-terminaalsest aminohappelisest järjestusest, mitte mRNA nukleotiidsest järjestusest. Seejuures terminatsiooni efektiivsuse ja SsrA-märke lisamise efektiivsuse vaheline seos oli nõrk (Hayes *et al.*, 2002a; Sunohara *et al.*, 2002).

Nüüdseks on selgunud, et eelnevalt lagunemata mRNA-lt kaasneb *trans*-translatsiooniga mRNA lõikamine ribosoomi A-kohast või selle lähedusest. mRNA lõikamist on täheldatud stop-

koodonile eelnevate aminohapete korral, mis tagavad efektiivse SsrA-märkimise (Hayes & Sauer, 2003; Sunohara *et al.*, 2004b). mRNA lõikamist põhjustavad ka järjestused (Sunohara *et al.*, 2004a; Sunohara *et al.*, 2004b) ja haruldased arginiini koodonid (Li *et al.*, 2006), mis peatavad elongatsiooni ning kutsuvad esile *trans*-translatsiooni. Võimalik, et mRNA lõikamine ongi indutseeritud ribosoomi peatumise poolt mRNA-l, kuna teada on mõningad juhud, kus geeniekspressioon on reguleeritud ribosoomi peatumise ja sellest tingitud mRNA lõikamisega (Dridner *et al.*, 2002; Loomis *et al.*, 2001).

In vitro on näidatud, et *trans*-translatsiooni efektiivsus sõltub P-kohale järgnevast mRNA pikkusest. Kui mRNA pikkus ületab 6 nukleotiidi, hakkab SsrA-märkimise kiirus kiiresti langema ja enam-vähem lakkab 15 nukleotiidi juures (Ivanova *et al.*, 2004). See toetab järeldust, et *trans*-translatsiooni toimumiseks mRNA sisemistelt koodonitelt on vajalik mRNA lõikamine.

Trans-translatsiooniga seotud mRNA lõikamise mehhanism ei ole teada. Ilmselt ei ole *E. coli* puhul lõikamisega seotud tuntud endonukleasid ega ka toksiin-antitoksiin paarid (Hayes & Sauer, 2003; Sunohara *et al.*, 2004a; Sunohara *et al.*, 2004b). Võimalik, et lõikamise põhjuseks on mõni senitundmatu nukleaaas. Teiseks eksisteerib võimalus, et ribosoom ise on seotud mRNA lõikamisega. Seejuures peab esinema regulatsioon teatud faktorite poolt, muidu oleks valgusüntees tugevasti häiritud. tmRNA võib-olla üheks regulaatoriks, sest tmRNA olemasolu rakus võimendab lõikamise aktiivsust (Sunohara *et al.*, 2004a). Samas ei saa tmRNA olla ainus reguleeriv faktor, sest SsrA-defektsetes tüvedes oli mRNA lõikamine samuti näha (Hayes & Sauer, 2003; Sunohara *et al.*, 2004b).

Võimalik, et mRNA lõikamine, mis on seotud ribosoomi peatumisega, on koos tmRNA-ga osa üldisest valgusünteesi kvaliteedikontrolli mehhanismist. Valgusünteesil on suureks probleemiks ribosoomi peatumine, mis võib tuua kaasa defektsete valkude kogunemise rakku. Antud süsteem aitaks raku sellest olukorrast üle, lõigates mRNA-d ja tmRNA aitaks lõigatud mRNA-d lagundada ning suunaks tekkinud valgud degradatsiooni (Sunohara *et al.*, 2004a).

Trans-translatsiooni mehhanismist ei ole selged veel paljud üksikasjad. Näiteks pole teada, kuidas täpselt toimub tmRNA äratundmine ribosoomi A-koha poolt (puudub ju antikoodon-aas) ja mRNA väljavahetamine ribosoomis ning tmRNA-l paiknevalt lugemisraamilt õige esimese koodoni valik translatsiooni alustamisel.

1.1.3. Lisafaktorid

SmpB (*Small protein B*) on väga oluline komponent *trans*-translatsioonis. Ta on ligikaudu 160 aminohappest koosnev spetsiifiliselt ja kõrge afiinsusega tmRNA-le seonduv valk (tRNA-ga seondub 400 korda nõrgemini). Nagu tmRNA-d on SmpB-dgi leitud konserveerunult kõikidest eubakteritest ja seal hulgas väikseima genoomiga eubakterist *Mycoplasma genitalium* (Keiler *et al.*, 2000).

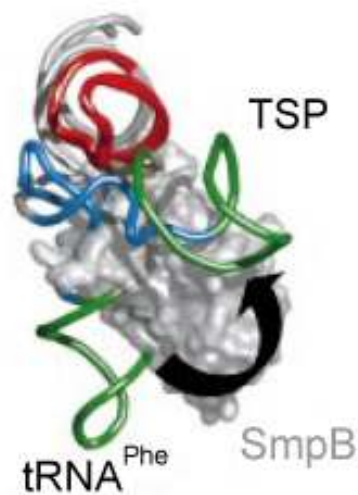
SmpB seondub tmRNA TSP D- ja lisa-aasaga, nii et AlaRS seandumis koht jääb teisele poole tmRNA-d (Barends *et al.*, 2001; Gutmann *et al.*, 2003). Sellest tulenevalt ei takista SmpB tmRNA alanüleerimist vaid hoopis võimendab seda, samas SmpB mitmekordsel molaarsel ülehulgal võimendusefekt siiski kaob (Barends *et al.*, 2001; Karzai *et al.*, 1999).

SmpB seondub ka 70S ribosoomidega ja ei vaja selleks tmRNA osalust. Oletatakse, et SmpB tunneb ära mRNA-l peatunud ribosoomi ning seondununa sellisele ribosoomile põhjustab ka tmRNA seandumise ja algatab *trans*-translatsiooni (Hallier *et al.*, 2004a). Ilmselt ei piirdu SmpB roll ainult *trans*-translatsiooni initsiatsiooniga, kuna SmpB on seotud ribosoomiga ka teistel *trans*-translatsiooni etappidel (Hallier *et al.*, 2006; Metzinger *et al.*, 2005; Shpanchenko *et al.*, 2005).

On ka oletatud, et SmpB võib seonduda ribosoomiga kompleksis koos tmRNA-ga, kusjuures SmpB·tmRNA kompleksi seandumiseks mRNA-l peatunud ribosoomiga on vajalik veel EF-Tu (Barends *et al.*, 2001). Samas elongatsioonifaktor Tu ja SmpB seandumiskohad tmRNA-l ei kattu (Gutmann *et al.*, 2003). Lisaks EF-Tu sarnasele rollile tRNA-de ja tmRNA seandumisel ribosoomiga, omab EF-Tu võimet kaitsta nii tRNA-sid kui ka tmRNA-d deaminoatsüleerumast (Rudinger-Thirion *et al.*, 1999).

Kui tRNA·EF-Tu·GTP kolmik-kompleks seondub ribosoomi A-kohta, siis antikoodon-koodon interaktsiooni sobivusel toimub GTP hüdroolüüs ning EF-Tu ja GDP koos fosfaatjäägiga lahkuvad ning 3'-ACC asetub õigesti peptidüültransferaasesse tsentrisse. *Trans*-translatsiooni korral ei ole teada, kuidas on reguleeritud GTP hüdroolüüs ja EF-Tu vabanemine, sest tmRNA-l puudub antikoodon-aas., kuid oletatakse SmpB rolli selles. Võimalik, et positiivselt laetud C-terminaalne SmpB osa jäljendab antikoodon-heeliksit või muudab oma interaktsioonidega ribosoomi konformatsiooni sarnaselt nagu õige antikoodon-koodon paardumine (Dong *et al.*, 2002; Gutmann *et al.*, 2003; Ivanova *et al.*, 2005; Shimizu & Ueda, 2006; Sundermeier *et al.*, 2005). SmpB·TSP ja tRNA^{Phe} kolmemõõtmelisi struktuure üksteise

peale pannes kattub SmpB osaliselt tRNA antikoodon-õlaga (Joonis 3). Sobitades SmpB·TSP struktuuri ribosoomi, asetub valgulise komponendi C-terminus väikse alaühiku dekodeerimistsentri lähedusse (Gutmann *et al.*, 2003). Samas ei ole kristallstruktuurid, mis siia maani on lahendatud, näidanud, et C-terminaalsel valgu osal oleks kindel struktuur (Dong *et al.*, 2002). Veel on leitud, et mitmel juhul vähendab SmpB C-terminuse deletsioon tmRNA·SmpB kompleksi afiinsust ribosoomile ning takistab *trans*-translatsiooni alustamast (Dong *et al.*, 2002; Hallier *et al.*, 2006).



Joonis 3. SmpB·TSP ja tRNA^{Phe} kolmemõõtmelised struktuurid on asetatud üksteise peale, nii et nende T-õlad asuksid kohakuti. Domeenid värvitud nagu Joonisel 2 (Gutmann *et al.*, 2003).

Eelnevale hüpoteesile pakub täiendust täieliku tmRNA·SmpB kompleksi krüo-elektronmikroskoopia uuring (Valle *et al.*, 2003). Pakutakse välja, et dekodeerimiskohas võib paikneda ka tmRNA heeliksiite 2a ja 2b vaheline aas. Arvatakse, et selle piirkonna seondumine 30S alaühikuga kutsub esile konformatsiooni muutusi, mis on olulised GTP hüdrolüüsiks ja seda koodon-antikoodon interaktsioonist sõltumatult. Leiti veel, et tmRNA võib läbi SmpB mõjutada GTPaas-seonduvat piirkonda viisil, mis stimuleerib GTP hüdrolüüsi.

On leitud, et tmRNA ja SmpB puhastamisel tulevad kaasa ka valgud S1 (Wower *et al.*, 2000), RNAs R, PrsA, YfbG (Karzai & Sauer, 2001), mis lubab oletada, et neil on mingisugune funktsioon *trans*-translatsiooni mehhanismis.

S1 on suurim valk, mis ribosoomi väikese alaühikuga seondub, kuid teeb seda nõrgalt ja pöördvalt (Bordeau & Felden, 2002). S1 interakteerub ka mitmete tmRNA piirkondadega ning on oletatud, et ta on vajalik tmRNA seondumiseks ribosoomiga (Wower *et al.*, 2000) ja lugemisraami sisaldava ala lahtikeerumiseks (Bordeau & Felden, 2002; Valle *et al.*, 2003). Samas aitavad mitmed andmed, et S1 ei ole *trans*-translatsiooniks vajalik (McGinness & Sauer, 2004; Valle *et al.*, 2003).

Algselt pakuti RNAas R funktsiooniks tmRNA poolt asendatud mRNA-de lagundamist oma 3'→5' eksonukleaasse aktiivsusega (Karzai & Sauer, 2001), kuid ka siin esineb seda oletust ümberlukkavaid tõendeid (Yamamoto *et al.*, 2003).

Valkude PrsA ja YfbG osaluse kohta *trans*-translatsioonis ei ole mingeid andmeid.

E. coli puhul on näidatud, et *in vitro* seondub tmRNA-ga tRNA^{Ala} ja isoaktseptoorsetest suurima afiinsusega just selline, mis ainukesena vastab tmRNA lugemisraami esimesele koodonile (Gillet & Felden, 2001a). Sellise kompleksi moodustumise funktsiooniks on pakutud, et ta aitab määrata lugemisraami esimest koodonit ning kiirendada *trans*-translatsiooni initsiatsiooni. Alaniini ja tRNA^{Ala} olulisust lubab aimata see, et üle 80% organismidel on alaniin esimeseks aminohappeks, mida tmRNA kodeerib (tmRNA website: <http://www.indiana.edu/~tmrna/>).

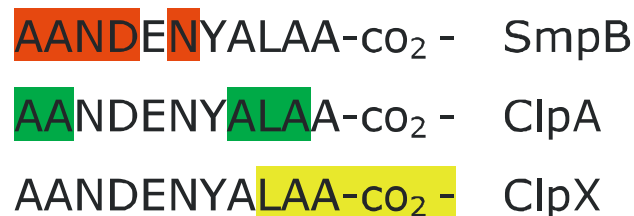
1.1.5. Valgu degradatsioon

SsrA-märgitud valkude lagundamine on tähtis osa *trans*-translatsioonist (Karzai *et al.*, 2000) ja on leitud, et seda viivad *E. coli*'s läbi ATP-sõltuvad proteaasid ClpXP, ClpAP, mis paiknevad tsütoplasmas (Gottesman *et al.*, 1998), ja membraanseoseline HflB (FtsH) (Herman *et al.*, 1998). Lisaks tunneb tmRNA-s kodeeritud signaaljärjestust periplasmast leitud ATP-sõltumatu proteaas Tsp (Prc) (Keiler *et al.*, 1996). Kõik nad vajavad toimimiseks mingit piirkonda 11 aminohappe pikkusest järjestusest, mis lisatakse tmRNA poolt.

Degradatsioonimehhanism on kõige paremini teada ClpXP ja ClpAP proteaasidel. Mõlemad on kahekomponendilised: ClpA ja ClpX on sarnase järjestusega ATPaasid, mis vastutavad substraadi äratundmise ja lahtipakkumise eest, ClpP on proteolüütiline alaühik, mis seejärel lagundab denatureerunud valgu (Gottesman *et al.*, 1998). On leitud valk SspB (*stringent starvation protein B*), mis võimendab SsrA-märgitud produkti seondumist ClpX-le ja

degradatsiooni ClpXP proteaaskompleksi poolt (Levchenko *et al.*, 2000). Dimeriseerudes seondub SspB kumbki monomeer oma N-terminaalse osaga signaaljärjestuse algusesse. Teise otsaga seondub ta ClpX-ga ning sellega paigutab SsrA-märgistuse lõpu, mis on oluline seandumiseks, ClpX-le piisavalt lähedale. Niiviisi kiirendab SmpB signaalpeptiidi seandumist proteaasile. Edasi tõmmatakse valk mehhaanilise jõuga läbi ClpX, mis põhjustab lahti pakkumise ning edasi läheb tee Clp proteolüütilisse alaühikusse (Bolon *et al.*, 2004; Hersch *et al.*, 2004; Levchenko *et al.*, 2003).

Kui ClpX puhul oli oluline ainult SsrA-märgistuse lõpp, siis ClpA-l on olulised ka alguse aminohapped. Nii kattub tema seandumiskoht SspB omaga (Joonis 4) ja SspB hoopis takistab *trans*-translatsiooni produktide ClpAP poolt läbi viidavat degradatsiooni (Flynn *et al.*, 2001). Kas sellel on ka mingi bioloogiline tähtsus? Kuna ClpAP lagundab erinevalt ClpXP-st ka ilma signaaljärjestuseta valke (Flynn *et al.*, 2001) siis on võimalik, et SspB suunab rakule vajalikul hetkel SsrA-märgitud valgud ClpXP degradatsioonirajale. Nii jääb ClpAP rohkem vabaks SsrA-märgiseta valkude lagundamiseks, mis võivad olla tekkinud erinevate stressitingimuste mõjul.



Joonis 4. Toodud on *E. coli* tmRNA-s kodeeritud signaaljärjestus ja värviliselt on märgitud erinevatele valkudele äratundmiseks vajalikud aminohappejäägid. On näha, et SspB ja ClpA seandumisalad kattuvad (Flynn *et al.*, 2001).

ClpAP ja ClpXP vastutavad enamuse osa SsrA-märgitud valkude lagundamise eest (Farrell *et al.*, 2005; Gottesman *et al.*, 1998), kusjuures eksponentsiaalse faasi rakkudes piisab ClpXP, et lagundada enamus SsrA-märgitud valgud, kuid statsionaarses faasis hakkab ka ClpAP suuremat rolli mängima. Sellega on kooskõlas järgnevad andmed: statsionaarses faasis suureneb tunduvalt ClpAP hulk, samas kui ClpXP hulk jääb enam-vähem samaks; väheneb ClpP (SsrA-märke spetsiifiline ClpAP inhibiitor) ja ClpAP suhe (Farrell *et al.*, 2005).

1.1.6. Roll raku füsioloogias

Trans-translatsioon mängib ka olulist rolli poolikute mRNA-de lagundamisel. Kui poolik mRNA on jäänud ribosoomi pidama, ei ole ta 3'→5'eksonukleasidele enam märklauaks ning mRNA-d kogunevad rakku. Nende 5'-ots on veel täiesti toimiv ja uued ribosoomid saavad alustada translatsiooni, kuid ka nemad ei suuda valgusünteesi lõpuni viia. Juhul kui tmRNA vabastab ribosoomi mRNA-lt, vabaneb viimase 3'-ots ning 3'→5'eksonukleasid saavad lagundada mRNA-d järgmise ribosoomini ja sedaviisi tsüklit korrates lagundatakse poolikud mRNA-d, mis viib omakorda alla ka osaliste valkude sünteesi (Yamamoto *et al.*, 2003).

Arvatakse, et tmRNA on seotud ka bakteri ainevahetuse regulatsiooniga ja seda läbi toksiin-antitoksiin paari RelB-RelE, mis arvatavasti aitab bakteril kiiresti adapteeruda toitainete vähesusega. Bakteritüvedel, millel puudub tmRNA, esineb aeglasem aminohappe näljast taastumise fenotüüp (Pedersen *et al.*, 2003). Mudel kuidas tmRNA on seotud aminohappe näljaga kohanemisega on pakutud peatükkis RelBE.

tmRNA osalust on näidatud väga paljude bakterite erinevates protsessides. Bakteril *Caulobacter crescentuse* osaleb tmRNA rakutsükli regulatsioonis (Hong *et al.*, 2005; Keiler & Shapiro, 2003a; Keiler & Shapiro, 2003b). Termo-indutseeritava bakteriofaag Mu mutandi puhul on näidatud, et SsrA osaleb *E. coli* 's profaagi repressiooni kontrollimises (Ranquet *et al.*, 2001).

tmRNA ekspressioon on oluline *Salmonella enterica* Serovar Typhiuriumi täielikuks patogeneesiks ja tmRNA muudab ekspressiooni geenidelt, mis induitseeritakse infektsiooni ajal. SsrA on veel vajalik faag P22 kasvuks ja profaagi induktsiooniks samas bakteritüves (Julio *et al.*, 2000). Ka *Yersinia pseudotuberculosis*'e patogeensuseks on vaja toimivat *trans*-translatsioonisüsteemi (Okan *et al.*, 2006).

tmRNA osaleb *E. coli* *secM-secA-mutT* operoni regulatsioonis (Collier *et al.*, 2004). *Lac* operon, mis vastutab laktoosi kasutamise eest energiaallikana, on samuti tmRNA poolt reguleeritud. Bakteritel, kellel puudub tmRNA, esineb viivitus laktoosi kasutamisele võtul (Abo *et al.*, 2000).

Neisseria gonorrhoeae puhul on näidatud, et tmRNA on bakterile eluliselt vajalik, kuid märgitud valkude degradatsioon mitte. (Huang *et al.*, 2000). Samas *Bacillus subtilis* vajab SsrA-d stressitingimustes kasvamiseks. Kõrgetel temperatuuridel (>45°C), kaadmiumkloriidi ja etanooli suurtel kontsentratsioonidel kasvab tmRNA suhtes mutantne tüvi tunduvalt halvemini. Mitmete

stressi põhjustavate tegurite puhul näidati veel, et transkriptsioon *ssrA* geenilt tõusis mitmeid kordi (Muto *et al.*, 2000).

E. coli puhul on tmRNA puudumisel näidatud aeglasemat taastumist süsinikuallika puudusest (Gillet & Felden, 2001b) ja väiksemat liikuvust (Komine *et al.*, 1994). Samuti ei suutnud kasvada *limmP22* hübriidfaag (Withey & Friedman, 1999). Kõrgetel temperatuuridel Δ *ssrA* tüvel on kehvem kasv kui metsik-tüüpi tüvel (Komine *et al.*, 1994), kuigi arvatakse, et Δ *ssrA* tüvel on indutseeritud kuumašoki vastus, sest on leitud üks ekspresseerunud kuumašoki valk (Munavar *et al.*, 2005) Kõikide nende kasvudefektide korvamiseks on olulinealaniiniga laetud tmRNA, mis suudab ribosoomi mRNA-lt vabastada. SsrA-märgitud valkude ära tundmine degradatsioonisüsteemi poolt ei ole vajalik.

SmpB geeni katkestamine *E. coli*'s viis samade fenotüüpideni, mis esinesid SsrA-defektsetel tüvedel. Ilmnesid kasvu pidurdumine kõrgematel temperatuuridel ning *limmP22* hübriidfaagi ja bakteriofaagi *Mu* kasvu raskused (Karzai *et al.*, 1999).

1.1.6.4. Antibiootikumid

E. coli (Abo *et al.*, 2002), *Synechocystis* sp. tüvi PCC6803 (de la Cruz & Vioque, 2001) ja *Salmonella typhimurium* (Vioque & de la Cruz, 2003) SsrA-mutandid on näidanud võrreldes metsik-tüüpi tüvega ülitundlikkust mitmete valgusünteesi inhibiitorite suhtes. Täpne mehhanism, kuidas see tmRNA-st sõltub ei ole aga teada. Samas translatsiooniga mitte seotud antibiootikumide (ampitsilliin, rifampitsiin ja novobiotsiin) juuresolekul ei ole SsrA-defektsete tüvede ülitundlikkust nähtud.

Peptipүүлtransferaasi inhibiitoritest on tsüanobakter *Synechocystis* Δ *ssrA* ja metsik-tüüpi tüve kasvuerinevus näha klooramfenikoolil ja linkomütsiinil kasvatamisel (de la Cruz & Vioque, 2001). *E. coli* puhul on näidatud sama efekti klooramfenikoolil (Abo *et al.*, 2002). Need antibiootikumid ei lase A-kohas olevale aminoatsüül-tRNA-le peptiidahelat üle kanda, mistõttu tRNA ei püsi ribosoomis ja vabaneb (Spahn & Prescott, 1996). See annabki tmRNA seondumiseks ribosoomiga vajaliku vaba A-koha, ning aitaks seletada kuidas *trans*-translatsioon vähendab ülitundlikkust.

Makroliidid (erütromütsiin, tülosiin, spiramütsiin), mida prooviti tsüanobakter *Synechocystis* peal, andsid kasvuerinevuse (de la Cruz & Vioque, 2001). *E. coli* puhul on

kirjanduses andmeid vaid erütromütsiini kohta ja ka siis ilmnes tmRNA mutantide kehvem kasv madalatel kontsentratsioonidel (Abo *et al.*, 2002). Need antibiootikumid blokeerivad polüpeptiidi väljumistunneli ja põhjustavad peptidüül-tRNA ribosoomist vabanemise (Spahn & Prescott, 1996). Võimalik, et vabanenud A-kohta seondub tmRNA ning jätkates translatsiooni vabastab ribosoomi mRNA-lt.

Translokatsiooni takistavatest ainetest esineb tsüanobakteri *Synechocystis* Δ ssrA tüve ülitundlikkus spektinomütsiini suhtes (de la Cruz & Vioque, 2001). Tiostreptoosil ja fusiidhappel kasvatades kasvuerinevusi ei ole. *E. coli*'t kasvatati spektinomütsiinil ja fusiidhappel ja ülitundlikkuse efekti ei esinenud (Abo *et al.*, 2002). Spektinomütsiin takistab EF-G·GTP seondumist, mis on translokatsiooni eelduseks ning A-koht jääb hõivatuks peptidüül-tRNA poolt (Bilgin *et al.*, 1990). Kuna translokatsioon võib aeglaselt toimuda ka ilma EF-G-ta, siis on võimalik, et tmRNA lihtsalt lükkab peptidüül-tRNA P-kohta. Teised antibiootikumid osalevad juba hilisemate etappide takistamisel, kus EF-G·GTP kompleks on juba ribosoomiga seondunud ja translokatsioon „kinni kiilunud“ (Spahn & Prescott, 1996).

Tetratsükliini puhul ei ole kasvuerinevusi nähtud *E. coli* ega ka tsüanobakteri *Synechocystis* puhul (Abo *et al.*, 2002; de la Cruz & Vioque, 2001). Kui tetratsükliini põhiline toime seisneb GTP liigeses hüdrolyüüsis, siis ei annagi ribosoomide vabastamata jätmine tmRNA poolt efekti (Brodersen *et al.*, 2000).

Aminoglükosiidid on antibiootikumid, mis põhjustavad translatsioonil valelugemist. Sellega nad suurendavad ka stop-koodonite ülelugemist. See viib ribosoomi peatumiseni mRNA 3'-otsas, seda juhul, kui enne ei tule ette mõni nonsens-koodon ja ei toimu translatsiooni terminatsioon. Ja kõik aminoglükosiidid (kanamütsiin, gentamütsiin, hügromütsiin B, streptomütsiin, paromomütsiin), mida on proovitud, on näidanud *E. coli* puhul ülitundlikkust madalatel kontsentratsioonidel (Abo *et al.*, 2002). *S. typhurium* puhul on näidatud samasugust efekti kanamütsiini juuresolekul (Vioque & de la Cruz, 2003). Kanamütsiini ja streptomütsiini puhul on veel näidatud, et *E. coli* SsrA-DD mutandil (SsrA-s oleva lugemisraami kaks viimastalaniini on vahetatud aspartaadi vastu, mis tingib, et SsrA-märgitud valkud ei ole degradatsiooni süsteemile ära tuntavad) esineb erinevatel antibiootikumide kontsentratsioonidel samuti suurem kasvu inhibitsioon, kuid mitte sellisel määral kui SsrA-null mutandil (Abo *et al.*, 2002).

Aminoglükosiidide puhul on nähtud veel, et nad inhibeerivad *E. coli* tmRNA alanüleerimist ning kõige tugevam mõju on neomütsiin B-l ja paromomütsiinil (Corvaisier *et al.*,

2003). Inhibeerimine toimub läbi nende seondumise tmRNA-le, mille tulemusena muutub tmRNA struktuur ja konformatsiooniline vabadus.

1.2. POOMISVASTUS

Elus püsimiseks ja teiste organismidega konkureerimiseks peavad bakterid kiiresti kohanema muutustega keskkonnas, alates temperatuuri kõikumistest lõpetades toitainete lõppemisega. Aminohappe nälja korral aktiveerub protsess nimega poomisvastus (*stringent response*). Klassikaline poomisvastuse mudel seisneb stabiilse RNA tootmise (rRNA ja tRNA) ja valgusünteesi allasurumises, mis viib bakteri energia kokkuhoiu režiimile, sest aktiivselt kasvavas rakus on valgusüntees üks energiamahukamaid protsesse. Samaaegselt aktiveeritakse valkude proteolüüs ning aminohapete biosünteesiks vajalikud geenid. Kõige selle tulemuseks on bakteri kasvukiiruse vähenemine ning bakteri metabolismi ümberseadistamine stressitingimustele vastavaks. Juhul kui tingimused halvenevad veelgi võib bakter siseneda ka statsionaarsesse faasi või osade gram-positiivsete bakterite puhul toimub sporulatsioon. Kogu sellega kaasneva transkriptsioonimustri muutuse taga on väike molekul ppGpp (Chatterji & Ojha, 2001; Maitra *et al.*, 2005).

1.2.1. RelA ja SpoT

E. coli's on kaks nukleotiidi (p)ppGpp sünteesirada. Need on RelA ning SpoT sõltuvad rajad. Kuigi aminohappeliseltjärjestuselt on RelA ja SpoT üksteisele suhteliselt sarnased, ei oma RelA ppGpp hüdrolyüüsi võimet ning SpoT-l on seevastu suhteliselt väike (p)ppGpp sünteesi võime (Hogg *et al.*, 2004).

RelA on 84 kDa suurune ribosoomiga seonduv valk, mis katalüüsib ATP-lt pürofosforüül grupi ülekannet GDP või GTP 3'-OH rühmale. Moodustuvad siis AMP ja ppGpp või pppGpp, mida ühiselt nimetatakse (p)ppGpp-ks. pppGpp konverteeritakse kiiresti ppGpp-ks (Hogg *et al.*, 2004). Selguse mõttes olgu lisatud, et käes olevas töös kasutatakse (p)ppGpp-d ainult sünteesi kontekstis, teistel juhtudel kasutatakse mõistet ppGpp.

SpoT on aga 79 kDa suurune tsütosoolse paiknemisega valk, mis lisaks RelA-ga analoogsele (p)ppGpp sünteesireaktsioonile viib läbi ka Mg^{2+} sõltuvat ppGpp hüdrolüüsi reaktsiooni, kus eemaldatakse 3'difosfaatjääk, nii et tekib GDP (või GTP) ning pürofosfaat (Hogg *et al.*, 2004).

Kuigi *E. coli*'l on poomisvastus reguleeritud läbi kahe valgu, siis enamusel uuritud gram-positiivseid baktereid omab ainult ühte bifunktsionaalset RelA-SpoT homoloogi, millel on nii (p)ppGpp sünteesi kui ka hüdrolüütiline aktiivsus (Mittenhuber, 2001). On näidatud, et nii süntetaasset kui ka hüdrolüütilist aktiivsust omavad aktiivsandid paiknevad lahus ning eeldatavasti omavad üksteise suhtes antagonistlikku mõju, st substraadi seondumine ühte piirkonda põhjustab läbi konformatsiooniliste muutuste teise piirkonna inaktiveerumise. Selliste ensüümide uurimine annab aimu ka kuidas võiks olla reguleeritud ka SpoT süntetaasse ja hüdrolüütilise aktiivsuse regulatsioon *E. coli*'s (Hogg *et al.*, 2004; Mechold *et al.*, 2002).

Ka taimede leidub RelA-SpoT homolooge, millel on näidatud (p)ppGpp sünteesiaktiivsust. Taimsed RelA-SpoT homoloogid on kodeeritud tuumas, kuid nad paiknevad ise plastiides. Kuigi taimedest pärit homoloogide kohta on vähe andmeid, võib oletada, et taimede kloroplastides on bakterile sarnane ppGpp osalusel töötav regulatsioonisüsteem (Braeken *et al.*, 2006; Givens *et al.*, 2004; van der Biezen *et al.*, 2000).

RelA ja SpoT ning gram-positiivsete bakterite bifunktsionaalsel homoloogil asub N-terminaalses osas katalüütiline piirkond (Joonis 5) (Braeken *et al.*, 2006). SpoT-l ja bifunktsionaalsel homoloogidel on selles piirkonnas osaliselt kattuvad hüdrolüütilist ning süntetaasset aktiivsust omavad domeenid. RelA-l on ainult süntetaasne domeen, kuna puuduvad histidiini ja aspartaadi jäägid, mis on oletatavasti vajalikud hüdrolüütiliseks aktiivsuseks (Hogg *et al.*, 2004; Mittenhuber, 2001). Teisest küljest on taimedest pärit homoloogidel vastavad histidiini ja aspartaadi jäägid primaarstruktuuris olemas, kuid siiani on neil valkudel nähtud ainult süntetaasset aktiivsust (Givens *et al.*, 2004; van der Biezen *et al.*, 2000).

RelA ja RelA-SpoT homoloogide C-terminaalne piirkond osaleb ilmselt valgu aktiivsuse regulatsioonis, mis võiks toimuda ribosoomi vahendusel (Avarbock *et al.*, 2005; Gropp *et al.*, 2001). On pakutud välja, et *E. coli* RelA molekulid on võimelised läbi C-terminaalse piirkonna moodustama inaktiivseid homo-oligomeere. Aktiveerumiseks on vajalik ribosoomiga seondumine. *E. coli* SpoT C-terminaalse piirkonna regulatoorne roll on vähem selge: tundub, et

ribosoomiga see valk seotud ei ole. SpoT regulatsioonist on üldse vähe teada (Braeken *et al.*, 2006).



Joonis 5. RelA, SpoT ja bifunktsionaalsete homologide organisatsioon. RelA, SpoT ja bifunktsionaalsed homologid bakteris sisaldavad C-terminaalset regulatoorset (hallikassinine) ja N-terminaalset katalüütilist piirkonda, mis oma korda sisaldab kattuvaid hüdrolüütilist (vertikaalsed jooned) ja süntetaasne domeeni (horisontaalsed jooned). SpoT puhul pole C-terminaalse otsa roll regulatoorse piirkonnana selge. Aminohapped, mis piiritlevad kattuvaid hüdrolüütilist ja süntetaasne domeeni, on märgitud numbriga skeemi kohale. Hüdrolüütilise domeeniga kattub konserveerunud HD domeen (kollane), mis on iseloomulik metall-sõltuvatele fosfohüdrolaasidele, mille hulka loetakse ka RelA, SpoT ja bifunktsionaalsed homologid. RelA-l puuduvad HD domeenist katalüütilised histidiini (H) ja aspartaadi (D) jäägid (märgitud ringidega), mis seletab hüdrolüütilise aktiivsuse puudumist. Kõige paremini iseloomustatud taimse homologu skeem on lisatud. Taimisel homologil on näidatud ainult süntetaasne aktiivsust, kuigi valgu järjestus sisaldab konserveerunud HD domeeni koos histidiini ja aspartaadi jääkidega. Süntetaasne domeeni nukleotiidi siduvad konserveerunud aminohappejäägid on märgitud ruutudega ning tähistatud numbritega skeemi all (rasvases kirjas on märgitud aminohappejäägid, mis leidnud kinnitust mutatsioonanalüüsiga). N-terminaalne ots Nt-RSH2-l (roheline) on potentsiaalne plastiiditranspordisignaal. RelA and SpoT pärinevad *E. coli*'st. Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*, Seq: *Streptomyces equisimilis*, Sco: *S. coelicolor*, Nt: *Nicotiana tabacum* (Braeken *et al.*, 2006).

RelA mutantidel esineb nn *relaxed*-fenotüüp, mille korral aminohappe näljas rRNA ja tRNA süntees jääb samaks või hoopis tõuseb, mis on tingitud ppGpp basaalse taseme langusest. ppGpp basaalne tase on RelA mutandil ja metsiktüüpi tüvel ekponentsiaalses faasis üsna sarnane

(Lagosky & Chang, 1980; Lagosky & Chang, 1981; Tedin & Norel, 2001). *E. coli* RelA mutant on temperatuuritundlik (Yang & Ishiguro, 2003). Samas *E. coli* SpoT mutandid on suhteliselt halvasti kasvatatavad, põhjus on ilmselt kõrges ppGpp kontsentratsioonis, sest puudub ensüüm, mis lagundaks ppGpp-d (Yang & Ishiguro, 2003). *E. coli* SpoT ja RelA topelt mutant on seevastu suhteliselt normaalse kasvuga ning neis puudub ppGpp tase täiesti. Nad on ainult mitmete aminohapete suhtes auksotroofsed ning kuuma- ja külmatundlikud (Yang & Ishiguro, 2003)

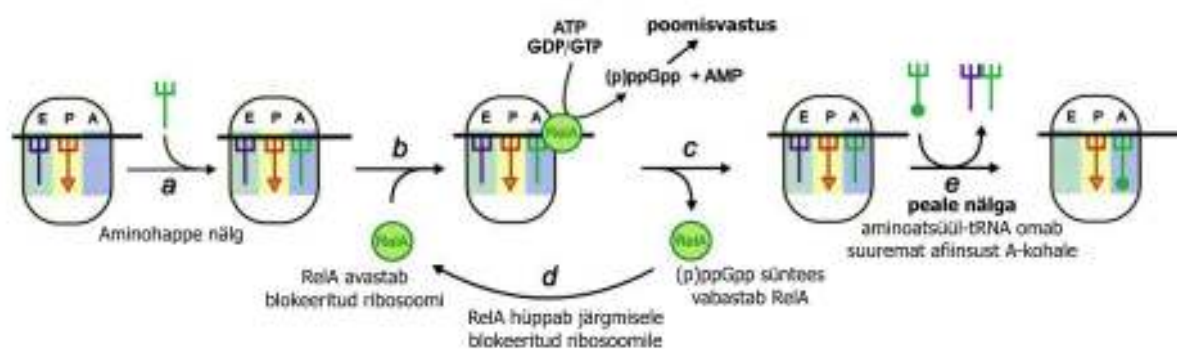
1.2.2. ppGpp metabolism

ppGpp on oluline molekul mitmete stressivastuste juures (ppGpp tase tõuseb). Aminohappe näljale reageerimisel on RelA sõltuval ppGpp sünteesirajal oluline roll (Block & Haseltine, 1975; Lazzarini *et al.*, 1971; Yang & Ishiguro, 2003). SpoT sõltuvat rada peetakse oluliseks muude stressivastuste korral, sealhulgas süsinikuallika lõppemisel või lülitumisel teisele süsinikuallikale (Lazzarini *et al.*, 1971; Magnusson *et al.*, 2005; Murray & Bremer, 1996). Samuti peetakse SpoT-d vastutavaks eksponentsiaalses kasvufaasis korral ppGpp basaalse taseme hoidmises ning läbi selle ribosoomide sünteesi ja kasvukiiruse reguleerimisel (Murray & Bremer, 1996; Sarubbi *et al.*, 1988).

Ekspponentsiaalse faasi rakkudes on umbes 15% tRNA-dest aminoatsüleerimata (laadimata), kuid aminohappe nälja korral võib see hulk tõusta 80%-ni (Yegian *et al.*, 1966). Kuna sellisel juhul on terav puudus aminoatsüül-tRNA-dest, tekib võimalus ka laadimata tRNA-del ribosoomi A-kohta seonduda ning peatada valgusüntees. Aminoatsüleerimata tRNA-de affiinsus ribosoomile on küll umbes 50 korda väiksem ning tavaolukorras tõrjutakse laadimata tRNA-d ribosoomist kiiresti välja, ent ülekaalu suudavad laadimata tRNA-d piisavalt edukalt valgusünteesi peatada (Wendrich *et al.*, 2002).

Aminohappe nälja korral on ribosoomi A-kohta seondunud deatsüleeritud tRNA, mis on vajalik RelA-le, et alustada ppGpp sünteesi. Protsess on kujutatud Joonisel 6, kus on näha, et peale laadimata tRNA-ga ribosoomi äratundmist ning sellele seondumist sünteesitakse üks (p)ppGpp molekul ning RelA vabaneb ribosoomist, et tunda ära järgmine ribosoom ja jätkata (p)ppGpp sünteesi (Wendrich *et al.*, 2002). Kuna RelA ja 70S ribosoomide suhet on hinnatud 1:200 (Pedersen & Kjeldgaard, 1977), siis selline ribosoomilt ribosoomile hüppamine on vajalik, et tagada ppGpp hulga vastavus peatunud ribosoomidega hulgale (Wendrich *et al.*, 2002).

RelA funktsioneerimiseks on ribosoomis peale laadimata tRNA vajalik ka ribosoomi valk L11 ning mRNA 3'-ots. L11 ei ole vajalik ribosoomile kinnitumiseks, kuid on oluline käivitamaks ppGpp sünteesi. Otseseid L11 ja RelA kontakte ribosoomil ei ole suudetud näidata, mis viitab, et L11 annab läbi ribosoomi konformatsiooniliste muutuste edasi signaali deatsüleeritud tRNA-de kohta (Wendrich *et al.*, 2002; Yang & Ishiguro, 2003). Kuna ribosoomist väljaulatuv mRNA 3'-ots on oluline RelA-le ribosoomiga seondumiseks, võib RelA kasutada mRNA-d tundmaks ära seiskunud ribosome (Wendrich *et al.*, 2002).



Joonis 6. RelA sõltuva (p)ppGpp sünteesi skeem. (a) Aminohappe nälg põhjustab suure hulga deatsüleeritud tRNA-de tekke, mis seonduvad madala affiinsusega ribosoomi A-kohta ning blokeerivad translatsiooni. (b) RelA avastab blokeeritud ribosoomid mRNA 3'-otsa järgi. (c) RelA viib läbi (p)ppGpp ja AMP sünteesi GDP/GTP-st ja ATP-st, vajalik on deatsüül-tRNA paiknemine ribosoomi A-kohtas. (d) RelA „hüppab“ järgmisele blokeeritud ribosoomile ja (p)ppGpp süntees kordub. Kõrge ppGpp tase aktiveerib poomisvastuse. (e) Aminohappenälja järgselt aminoatsüül-tRNA varud taastuvad (Wendrich *et al.*, 2002).

1.2.3. ppGpp mõju transkriptsioonile

Poomisvastuse puhul toimuvad suured muutused transkriptsioonimustris. Erinevalt tavalistest transkriptsiooni reguleerivatest mehhanismidest (valgulised transkriptsioonifaktorid, mis seonduvad RNA polümeraasiga (RNAP) või erinevate nukleotiidsete järjestustega geenide reguleerimises alades) on siin oluline kõigest väike nukleotiidne molekul ppGpp, mis seondues RNAP-ga muudab transkriptsiooni paljudelt promootoritelt. Sama moodi toimib ilmselt ka ppGpp eellasmolekul pppGpp (Magnusson *et al.*, 2005).

Biokeemilised ning kristallstruktuuri uuringud näitavad, et ppGpp seondub RNAP aktiivtsentri lähedusse, kuid sellega ei põhjusta erilisi konformatsioonilisi muutusi RNAP-s (Artsimovitch *et al.*, 2004; Magnusson *et al.*, 2005). ppGpp saab seonduda kahel viisil: 3' ja 5'

orientatsiooniga (st kas 3' või 5' fosfaat on suunatud aktiivtsentri poole) (Artsimovitch *et al.*, 2004).

Kõige paremini on teada ppGpp transkriptsiooni represseerivad omadused, kuid mehhanismid, läbi mille repressioon täpselt toimub, ei ole lõpuni selged. On pakutud mitmeid otseseid mehhanisme, millest enamus on osaliselt ka katseliselt kinnitust leidnud:

1) on oletatud ppGpp ja polümeraasi nukleotiidsete substraatide omavahelist konkurentsi aktiivtsentrisse (Artsimovitch *et al.*, 2004; Jores & Wagner, 2003).

2) ppGpp võib paarduda mittekodeerivas ahelas paiknevate tsütosiinidega (Artsimovitch *et al.*, 2004).

3) ppGpp mõjutab otseselt avatud kompleksi stabiilsust, muutes niigi ebastabiilsed avatud kompleksid veelgi ebastabiilsemaks ning takistades seeläbi transkriptsiooni initsiatsiooni (Artsimovitch *et al.*, 2004; Magnusson *et al.*, 2005). Samas on avaldatud arvamust, et selline suurendatud ebastabiilsusega kompleks võib hoopis initsiatsiooni soodustada (Bartlett *et al.*, 1998).

4) erineva orientatsiooniga ppGpp seondumised kutsuvad esile erinevaid muutusi aktiivtsentri konformatsioonis. 5' orientatsioon soodustab kahe katalüütilise Mg^{2+} seondumist, mis toob kaasa transkriptsiooni aktiveerumise. 3' orientatsioon jälle takistab Mg^{2+} seondumist ja toob kaasa transkriptsiooni represseerumise (Artsimovitch *et al.*, 2004).

Ilmselt osalevad ppGpp-vahedatud regulatsioonis ka mõningad lisa valgud, mis aitaks seletada miks *in vitro* katsetes on ppGpp mõju suhteliselt tagasihoidlik, kuid *in vivo* on mõju palju suurem. Üheks selliseks valguks osutus hiljuti DksA (Magnusson *et al.*, 2005).

ppGpp kaudne mõju transkriptsioonile võib käia ka läbi suurenenud vaba RNAP hulga, mis tuleneb suurenenud RNAP-de ärakukkumisest ebastabiilse avatud kompleksiga promootoritelt. Nii avaneb ka nõrgematel promootoritel rohkem võimalusi RNAP-dega seonduda. Kaudne mõju võib käia ka läbi erinevate σ -faktorite konkurentsi RNAP apoensüümile, kus ppGpp muudab σ -faktorite seondumise affiinsusi. Läbi selle väheneb σ^{70} seondunud RNAP hulk ning suureneb teiste σ -faktorite seondunud RNAP hulk (Artsimovitch *et al.*, 2004).

Klassikalise poomisvastuse mudeli järgi langeb aminohappe nälja korral rRNA-de ja tRNA-de süntees ja aktiveerub transkriptsioon aminohappeid sünteesivaid ensüüme kodeerivatelt geenidelt. Kindlasti ei tohiks seda puhta kullana võtta, kuna *E. coli* täisgenoomse DNA kiibiga

läbi viidud katsed näitavad, et ka seitsme aminohappe biosünteesiraja eest vastutavad geenide transkriptsioon surutakse poomisvastuse käigus maha (Smulski *et al.*, 2001).

1.2.4. ppGpp kui globaalne regulaator

Kuigi poomisvastus on enim uuritud ppGpp seotud protsess bakteris, osaleb ppGpp veel paljudes teistes protsessides. Juba varem sai mainitud SpoT sõltuva (p)ppGpp sünteesi rolli seoses reageerimisega muutustele toitainete kättesaadavuses, sealhulgas C-allika lõppemisel või lülitumisel teisele C-allikale (Lazzarini *et al.*, 1971; Murray & Bremer, 1996; Wendrich *et al.*, 2002; Yang & Ishiguro, 2003). Lisaks on ppGpp ilmselt osaline nii sporulatsioonis, virulentsus, hulgatunnetuses (*quorum sensing*), biofilmi moodustamisel kui ka sekundaarsete metaboliitide sünteesis (Braeken *et al.*, 2006; Chatterji & Ojha, 2001; Magnusson *et al.*, 2005). Eelnevast mitte eraldiseisvana seostatakse ppGpp otseselt kasvukiiruse regulatsiooniga (Chatterji & Ojha, 2001; Sarubbi *et al.*, 1988). Lisaks näitavad *E. coli* täisgenoomse DNA kiibi katsed, et transkriptsiooniprofiili muutus kasvu takistavates tingimustes on sarnane poomisvastuse põhjustatud muutustele transkriptsioonimustris (Chang *et al.*, 2002; Smulski *et al.*, 2001). ppGpp on positiivseks regulaatoriks ka σ^S -le, mis reguleerib paljude erinevate keskkonnatingimustega kohanemiseks vajalike geende ekspressiooni (Loewen *et al.*, 1998). Kokkuvõtvalt peab ütlema, et ppGpp-d tuleks rohkem vaadata kui globaalset transkriptsiooni regulaatorit, mis osaleb bakteriraku molekulaarses elukorralduses nii kasvuks sobivatel kui ka ebasobivates tingimustes.

Eraldi peaks mainima ppGpp rolli *E. coli*'i antibiootikumitundlikkuse juures. Mitmetel β -laktaam antibiootikumidele resistentsetel tüvedel on leitud kõrgeem ppGpp tase rakus. Leiti ka, et ppGpp defektsed tüved on võrreldes metsiktüüpi tüvega paljudele rakukesta sünteesi takistavate antibiootikumidele ning gentamütsiinile tundlikumad. Oletatakse, et ppGpp efekt antibiootikumitundlikkusele tuleneb vähemalt osaliselt ppGpp mõjust σ^S ekspressioonile (σ^S defektsel tüvel oli sarnane tundlikkusemuster), mille tagajärjel muutub geeniekspressioon, nii et tõuseb vastupanuvõime antibiootikumidele (Greenway & England, 1999).

1.3. RELBE

1.3.1. Toksiin-antitoksiin süsteemid

Algselt avastati toksiin-antitoksiin süsteemid mehhanismidena, mis stabiliseerisid plasmide (Jensen & Gerdes, 1995; Ogura & Hiraga, 1983). Plasmidide stabiliseerimine toimub läbi mehhanismi, kus plasmidivaba bakteri kasv peatatakse või bakter hoopis tapetakse toksiini poolt. Süsteem ise on reguleeritud ebastabiilse *antisens*-RNA või valgulise antitoksiini poolt (Gerdes *et al.*, 2005). Plasmidi kaotamisel lõpeb ebastabiilse *antisens*-RNA või valgulise antitoksiini süntees, mis viib *antisens*-RNA puhul toksiini sünteesini (*antisens*-RNA on komplementaarne toksiini mRNA-ga) või valgulise antitoksiini puhul toksiini vabanemisele (antitoksiiniga seondunult on toksiin inaktiivne). Toksiin kasvu pärssiv mõju võib seineda valgusünteesi peatamises, rakumembraani kahjustamises või DNA gürasii inhibeerimises (Gerdes *et al.*, 2005)..

Nüüdseks on toksiin-antitoksiin süsteeme leitud rohkesti ka bakterite genoomidest, kusjuures vabalt elavatel bakteritel on neid leitud maksimaalselt 45 aga rakusisestel bakteritel kipuvad need üldse puuduma (Pandey & Gerdes, 2005). Kuna genoomsed toksiin-antitoksiin süsteemid ei saa plasmide stabiliseerida, on nende funktsiooniks pakutud programmeeritud rakusurma läbi viimist (Aizenman *et al.*, 1996; Gotfredsen & Gerdes, 1998). Siiski näitavad uuemad andmed, et genoomsetel toksiin-antitoksiin süsteemidel on pigem baktersiostaatiline mõju (Pedersen *et al.*, 2002) ning nad osalevad stressitingimustes replikatsiooni ja translatsiooni moduleerimisel (Christensen *et al.*, 2001; Christensen *et al.*, 2003).

E. coli's on teadaolevalt 6 toksiin-antitoksiin süsteemis, millest 5 (RelBE, MazEF, DinJ-YafQ, ChpBIK, YefM-YoeB) on varem kirjeldatud (Pandey & Gerdes, 2005). Kuues süsteem YgiUT on alles hiljuti meie laboris avastatud (K. Kurg avaldamata andmed). Lisaks on olemas *hipBA* lookus, mis meenutab toksiin-antitoksiin süsteeme, kuid selle kohta on hetkel veel puudulikud andmed (Gerdes *et al.*, 2005)

1.3.2. RelBE

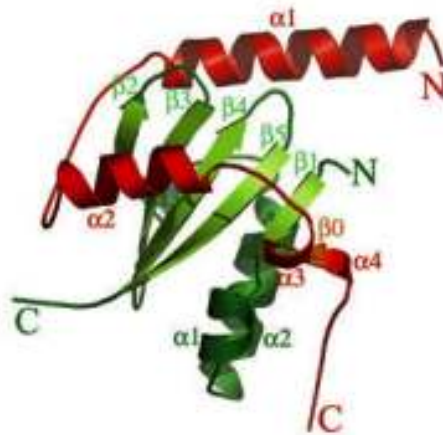
RelBE on *E. coli* toksiin-antitoksiin süsteemidest on üks kõige paremini iseloomustatud. RelBE süsteemi komponendid on antitoksiin RelB ja toksiin RelE, mida kodeerivad geenid asuvad *relBE* lookuses (Joonis 8). Nagu enamuse toksiin-antitoksiin süsteemide korral paikneb ka *relBE* lookuses toksiini geen antitoksiini geeni järel. Samuti on *relBE* lookus negatiivselt reguleeritud antitoksiini poolt (Gerdes *et al.*, 2005).

RelB on 9,1 kDa suurune 79 aminohappejäägi pikkune valk, mis seondub RelE-ga (11,2 kDa suurune 95 aminohappejäagist koosnev valk), nii et moodustub kompleks RelBE. Sellise kompleksi koosseisus on RelE katalüütiliselt inaktiivne (Gotfredsen & Gerdes, 1998). Vaba RelE on suuteline lõikama ribosoomiga seondunud mRNA-d A-koha spetsiifiliselt. Seejuures on täheldatud kõrget koodonspetsiifilisust. Toksiin tunneb ära ja lõikab kõige paremini stop-koodon UAG-d, kehvemini UAA-d, eriti halvasti aga UGA-d. Kodeerivatest koodonitest on hästi äratuntavad UCG ja CAG (Pedersen *et al.*, 2003).

RelBE süsteeme on leitud väga paljudest bakteritest, nii eubakterites kui ka arhedest (Pandey & Gerdes, 2005) ning mitmetel neist on samuti näidatud võime lõigata mRNA-d (Christensen & Gerdes, 2003). *E. coli*'st on leitud lisaks kaks RelBE homoloogi: DinJ-YafQ (RelBE-2), YefM-YoeB (RelBE-3). YefM-YoeB puhul on näidatud, et see suudab ka mRNA-d lõigata (Christensen *et al.*, 2004).

Arhe *Pyrococcus horikoshii* OT3 RelBE kompleksi kristallstruktuur on lahendatud ning sellest on näha, et RelBE kompleks moodustub RelB keerdumisel ümber RelE (Joonis 7). Suure tõenäosusega moodustavad RelBE kompleksid veel omavahel dimeere (Takagi *et al.*, 2005). RelB ise on suhteliselt lihtsa struktuuriga ning tal puudub hüdrofoobne tšenter. See seletab RelBE üsna madalat stabiilsust *in vivo*: kuna vabalt lahuses olles on ta üsna struktuuritus olekus ning proteaaside poolt kergelt lagundatav. Kindla struktuuri omandab ta ilmselt alles RelE-ga seondudes.

RelE kuju on suhteliselt ellipsoidne ning suuruselt meenutab EF-G IV domeeni, mis oletuste järgi jäljendab translokatsiooni ajal tRNA antikoodon-aasa. Suuruste sobivus tekitab oletuse, et RelE võib samuti seonduda dekodeerimistsentri lähedusse, et lõigata ribosoomiga seotud mRNA-d A-koha spetsiifiliselt. Selline hüpotees seletaks üsna lihtsalt ka RelB inaktiveeriva mõju: RelBE kompleks oleks lihtsalt liiga suur, et ribosoomi mahtuda, eriti kui RelBE kompleks on dimeriseerunud (Takagi *et al.*, 2005).



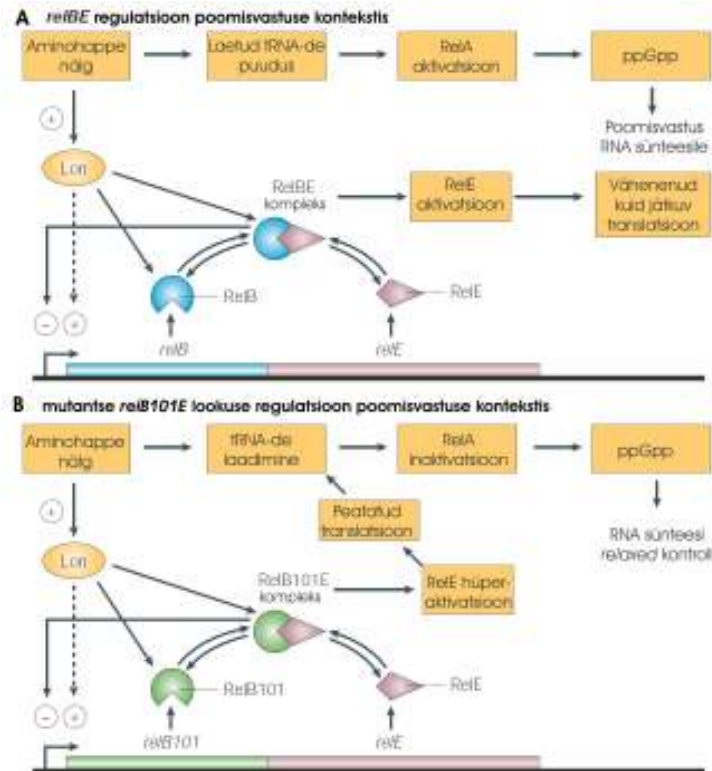
Joonis 7. Arhe *P. horikoshii* OT3 RelBE kristallstruktuur. Rohelisega on märgitud RelE ja punasega RelE ümber mähkunud RelB (Takagi *et al.*, 2005).

1.3.3. *relBE* lookuse regulatsioon poomisvastuse kontekstis

Esimesed RelE üleekspressiooni katsed näitasid, et see toob kaasa bakterirakkude kiire surma (Gotfredsen & Gerdes, 1998) nagu ka MazF üleekspressioon (Aizenman *et al.*, 1996). Oletati, et nad mõlemad osalevad programmeeritud rakusurmas. Väheste toitainetega oludesse sattudes võiks osade rakkude surm pakkuda teistele rakkudele raskete tingimuste üleelamiseks vajalikke toitaineid. Samas puuduvad andmed, et näiteks statsionaarses faasis oleksid toksiiin-antitoksiin süsteemid indutseeritud (Gerdes *et al.*, 2005). Lisaks näitavad uuemad andmed, et toksiiini üleekspressioonil on pigem bakteriostaatiline kui bakteriotsiidne toime ja antitoksiini ekspresseerimisega on võimalik bakterite kasv taastada (Pedersen *et al.*, 2002).

RelBE toksiiin-antitoksiin süsteem osaleb aminohappe näljaga kohanemises (Joonis 8A). Kui rikkaliku toitainete kättesaadavusega keskkonnas on RelBE kompleks stabiilne, siis aminohappe nälja korral hakkab RelBE kompleks lagunema. Aminohappe nälja korral üldine translatsiooni tase langeb ning koos sellega väheneb ka ebastabiilse RelB hulk, kuna nüüd laguneb RelB-d rohkem kui jõutakse juurde sünteesida. Lisaks on RelB hulga vähenemisega seotud proteaas Lon, mis aminohappe nälja korral suureneva polüfosfaadi kontsentratsiooni mõjul aktiveerub (Christensen & Gerdes, 2004). Kuna RelE ise on stabiilsem siis teda nii palju ei lagundata ja varsti ületab vaba RelE hulk RelB oma ning tsütoplasmasse tekib vaba ja

katalüütiliselt aktiivset RelE-d. Lisaks hoogustub RelB hulga vähenemisel transkriptsioon *relBE* lookuselt, mis veelgi suurendab RelE hulka (Christensen *et al.*, 2001).



Joonis 8. *relBE* lookuse regulatsioon. (A) *relBE* lookuse regulatsioon poomisvastuse kontekstis. Aminohappe nälg tingib laetud tRNA-de puuduse, mis viib RelA aktiveerimiseni. RelA omakorda viib üles ppGpp kontsentratsiooni, mis tingib poomisvastuse ja RNA sünteesi vähenemise. Aminohappe näljast on põhjustatud ka Lon proteaasi aktiveerumine, mis lagundab antitoksiin RelB. Vähenenud RelB hulk viib vabade toksiin RelE molekulide taseme tõusuni tsütoplasmasse, mis põhjustab translatsiooni taseme vähenemise. (B) Mutantse *relB101E* lookuse regulatsioon poomisvastuse kontekstis. Mutantse RelB-st on tingitud „hilinenud *relaxed*“-fenotüüp. Mutantse RelB laguneb aminohappe nälja järgselt Lon proteaasi mõjul rohkem ja tsütoplasmasse vabaneb suurem hulk toksiin RelE-d, millest on tingitud RelE hüperaktiveerimine. RelE peatab translatsiooni pea täielikult, mis tingib tRNA-de laadimise. Aminoatsüül-tRNA kontsentratsiooni taastumisel RelA inaktiveerub ning ppGpp tase läheb alla, mis põhjustab RNA sünteesi jätkumise (Gerdes *et al.*, 2005).

Seejärel, kui tsütoplasmas on suurenenud kogus vaba RelE-d, hakkab ta ribosoomiga seotud mRNA-sid A-koha spetsiifiliselt lõikama. Sellega aeglustab RelE translatsiooni veelgi, mis on bakterile väheste toitainetega oludes kindlasti kasulik. On oletatud isegi, et translatsiooni aeglustamine RelE poolt võib vähendada statsionaarses faasis või nälja tingimustes läbi viidud translatsiooni käigus tekkinud vigu (Gerdes *et al.*, 2005).

Aminohappe nälja korral saab oluliseks aminohapete sünteesimine bakteri enda poolt, aga selleks on vajalik sünteesida aminohapete biosünteesiradade ensüüme. Samas on ka nende ensüümide sünteesiks aminohappeid, mille ainukeseks allikaks on olemasolevate valkude degradatsioon, valdavalt läbi Lon proteaasi aktiivsuse (Kuroda *et al.*, 2001). Lisaks osaleb ka tmRNA kasutatavate aminohapete hulga suurendamisel, vabastades ribosoomi RelE poolt lõigatud mRNA-dest ning saates pooleliolevad valgud kiirele lagundamisele (Pedersen *et al.*, 2003).

Aminohapete sünteesi eest vastutavate ensüümide mRNA-del on stop-koodonina tunduvalt alaesindatud RelE-le tundlik UAG. See tagab, et selliseid mRNA-sid lõigatakse RelE poolt tunduvalt vähem ning aminohapete valmistamiseks vajalike ensüümide translatsioon toimub eelistatuna (Pedersen *et al.*, 2003).

Geen *relB* avastati esialgu, kui otsiti mutante, millel esineb aeglane toitainete näljast taastumine. *relB* mutatsiooniga tüvel avastati ka „hilinenud *relaxed*”-fenotüüp (Bech *et al.*, 1985; Diderichsen *et al.*, 1977). Kui *relaxed*-fenotüüpi korral rRNA ja tRNA süntees jätkub ka aminohappe nälja korral (Lagosky & Chang, 1980; Lagosky & Chang, 1981; Tedin & Norel, 2001), siis „hilinenud *relaxed*”-fenotüüpi korral jätkus rRNA ja tRNA süntees umbes 10 minutit peale aminohappe nälja tekitamist. Samuti esines sellise fenotüübiga tüvel väga aeglane kasvu taastumine pärast aminohappe nälja lõppemist.

„Hilinenud *relaxed*”-fenotüüpi seletatakse sellega (Joonis 8B), et *relB* mutatsiooni korral muutub *relBE* mRNA hulk suuremaks (Bech *et al.*, 1985) või muutub RelB ebastabiilsemaks (Christensen & Gerdes, 2004). Ja aminohappe nälja korral lagundatakse RelB ära nii, et toksiin RelE hulk on suurem kui metsik-tüüpi tüve korral. Suurem kogus toksiini RelE-d inhibeerib translatsiooni ka suuremal määral. Kuna translatsioon on nüüd pea täielikult seiskunud hakkab vabade aminohapete hulk kiiresti kasvama, mis viib ka tRNA-de aminoatsüleerimise taseme uuesti üles ja põhjustab esialgu aktiveerunud RelA inaktiveerumise. RelA inaktiveerumisega kaasneb kiire ppGpp kontsentratsiooni langus, mis taastabki stabiilsete RNA-de sünteesi (Christensen & Gerdes, 2004).

1.4. RIBOSOOMIDE DIMERISEERUMINE

Nälja või mõne muu stressi tingimustes on peale poomisvastuse veel süsteeme, millega bakter saab täiendavalt kohandada oma metabolismi, et edukamalt toime tulla. Üheks selliseks süsteemiks on ribosoomide dimeriseerumine, millega vähendatakse valgusünteesisüsteemi aktiivsust ning tagatakse ka ribosoomide suurem stabiilsus. Translatsiooniliselt mitteaktiivsed 100S ribosoomid tekivad 70S ribosoomide dimeriseerumise teel statsionaarses faasis ja nagu on näha elektronmikroskoobiga pildistamisel, liituvad 70S ribosoomid, nii et 30S alaühikud satuvad üksteisega vastastikku (Wada, 1998).

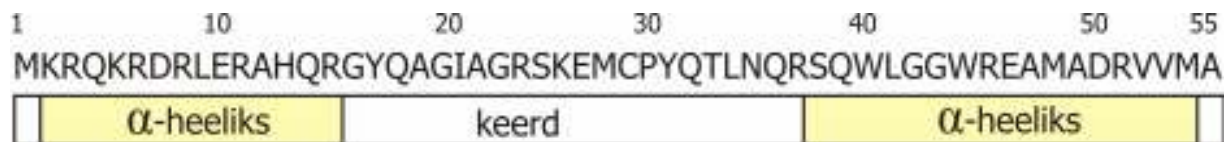
Erinevatel andmetel ulatub dimeriseerunud ribosoomide hulk *E. coli*'l statsionaarses faasis 35 kuni 50 protsendini (Niven, 2004; Wada, 1998). Statsionaarses faasis viibimise jooksul 100S ribosoomide osakaal tõuseb hetkeni, kuni bakterite elujõulisus hakkab vähenema. Seejärel hakkavad 100S ribosoomid kiiresti lagunema, millele järgneb peale mõningast viivitust ka 70S ribosoomide lagunemine. Selleks ajaks on bakterite kolooniate moodustamise võime langenud minimaalseks (Niven, 2004; Ueta *et al.*, 2005; Wada, 1998).

100S ribosoomide dimeriseerumise protsessis osalevad praegu teadaolevate andmete põhjal kolm valku RMF, YfiA ning YhbH (Niven, 2004; Wada, 1998). Mõlema dimeriseeruva 70S ribosoomiga seondub üks RMF-i ning dimeeri kohtal üks YhbH molekul. YfiA omab YhbH-ga ribosoomil sama seondumiskohta ning osaleb ilmselt dimerisatsiooni regulatsioonis (Ueta *et al.*, 2005).

1.4.1. RMF

Ligi paarkümmend aastat tagasi loodi uus radikaalivaba ning üliredutseeriv kahedimensionaalse geeli meetod, millega leiti üks ainult ribosomaalses fraktsioonis leiduv valk, mida vastavalt definitsioonile ei loetud ribosomaalseks valguks (Wada *et al.*, 1990). Nimelt ei seondunud see valk ribosoomidega piisavalt tugevalt ning eraldus ribosoomidest kõrge soola kontsentratsiooni juures. Valku täpsemalt uurides leiti, et ta koosneb 55 aminohappejäägist ning omab molekulmassi 6,5 kDa (Wada *et al.*, 1990). Primaarjärjestuse järgi ennustades peaks valk koosnema kahest α -heeliksist ning neid ühendavast keerust ja omama väljaveninud ning suhteliselt lihtsat struktuuri (Joonis 9) (Yoshida *et al.*, 2004). Samuti pandi tähele, et RMF esineb

ainult 100S ribosoomides (dimeriseerunud 70S ribosoomid) ning vastavalt sellele hakati seda kutsuma ribosoomi modulatsiooni faktoriks e. RMF-ks, kuna leiti, et just see valk on oluline 70S ribosoomide dimeriseerumisel (Wada *et al.*, 1990).



Joonis 9. RMF-i struktuur. RMF-i struktuur on ennustatud aminohappelise järjestuse järgi (Yoshida *et al.*, 2004).

Peale *E. coli* on leitud RMF-i homologe ka paljudest teistest enterobakteritest ning ka mõningatest teistest bakteritest. Samuti tuvastati neis bakterites ka 70S ribosoomide dimeriseerumine, mis viitab, et see protsess on bakterite seas laialt levinud (Wada, 1998).

1.4.1.1. Mõju ribosoomidele

RMF-i seotust 100S ribosoomide moodustumisega kinnitavad järgmised faktid. Statsionaarsesse faasi sisenemisel hakkab koos dimeriseerunud ribosoomide hulgaga kasvama ka RMF-i hulk (Yamagishi *et al.*, 1993) ning jõuab haripunkti hetkel, kui maksimaalne hulk ribosome on 100S olekus (Wada, 1998). Mutantsel Δrmf tüvel seevastu ei moodustu 100S ribosome isegi mitte pikajalisel statsionaarses faasis viibimise korral ning selline tüvi ei ole sama suure kolooniate moodustamise võimega kui metsik-tüüpi tüvi (Yamagishi *et al.*, 1993). Tugeva soola lahusega pestud statsionaarsest faasist pärit 100S ribosoomide lagunemisel tekkinud 70S ribosoomide inkubeerimisel RMF-iga (sealhulgas ka keemiliselt sünteesitud RMF-iga) moodustuvad uuesti 100S ribosoomid (Wada, 1998).

100S ribosoomid sisaldavad RMF-i ja 70S ribosome ligikaudu võrdses molaarses koguses, mis viitab, et üks RMF-i molekul seondub 70S ribosoomiga ning annab sellega 70S ribosoomile võime paarduda. Kui täpsustati RMF-i seondumist, leiti et ta seondub 50S alaühikuga (Wada *et al.*, 1990). Hilisemad biokeemilised uuringud näitasid RMF-i oletatava seondumiskoha täpsemalt kätte ja selleks osutus peptidüültransferaasentsentri lähiümbrus (Yoshida *et al.*, 2004).

RMF inhibeerib translatsiooni ka *in vitro*, kus valgusünteesivõime väheneb samas suurusjärgus 100S ribosoomide moodustumisega (Wada, 1998). Leiti, et RMF takistab

aminoatsüül-tRNA-de seondumist ribosoomile. See sobib ka RMF-i seondumisandmetega (Yoshida *et al.*, 2004), mis näitavad, et RMF katab oma väljaveninud struktuuriga osalist P- ja A-koha ning selgitab lihtsalt, miks 100S ribosoomid on translatsiooniliselt inaktiivsed.

RMF-iga käituvad sarnaselt ka mitmed antibiootikumid (nt erütromütsiin ja klooramfenikool) (Schlunzen *et al.*, 2001), mis samuti seonduvad peptidüültransferaassentsentrisse või selle lähedusse. On äärmiselt huvitav, et rakk ise toodab valku, mis käitub sarnaselt antibiootikumidega (Yoshida *et al.*, 2004).

1.4.1.2. Dimeriseerumise bioloogiline funktsioon

Arvatakse, et RMF-i üheks funktsiooniks on läbi 100S ribosoomide moodustamise statsionaarses faasis valgusünteesi alla surumine ning soodsate olude taastumisel/saabumisel valgusünteesisüsteemi aktiivsuse taastamine (Wada, 1998). Niiviisi jääb ära energiamahukas ribosoomide lagundamine ja uuesti sünteesimine. On olemas andmeid, et peale 24 tunnist statsionaarses faasis viibimist lagunevad 100S ribosoomid 2 minuti jooksul pärast bakterite värskesse söötmesse sattumist ning 6 minuti pärast jätkavad rakud eksponentsiaalset kasvumist (Wada, 1998). Samuti on teada, et pestes 100S ribosoomi tugeva soola lahusega, eralduvad 70S ribosoomid, mis omavad pea sama suurt valgusünteesi võimet, kui eksponentsiaalsest faasist pärinevad 70S ribosoomid (Wada, 1998).

Nagu mainitud hakkab RMF-i hulk kasvama alles statsionaarsesse faasi üleminekul, samamoodi käitub ka *rmf*-i mRNA, seejuures transkriptsioon *rmf* geenilt jätkub nii kaua kuni rakud elus püsivad (Wada, 1998). Samas oli teada, et *rmf* geen on σ^S sõltumatu (Yamagishi *et al.*, 1993). Hiljem leiti *rmf*-i promootor aktiveerub ka aeglaselt kasvavates *E. coli* tüvedes, kusjuures kasvukiirus ja *rmf*-i promootori aktivatsioon olid omavahel pöördvõrdelises suhtes. Siduvaks elemendiks kasvukiiruse ja *rmf*-i transkriptsiooni vahel leiti olevat ppGpp hulk, mis aeglasel kasvukiirusel on kõrge ja viib omakorda üles ka *rmf*-i mRNA hulga (Izutsu *et al.*, 2001).

Kuigi aeglaselt kasvavates tüvedes indutseeritakse *rmf*-i promootor logaritmilises faasis, jääb RMF hulk siiski väga madalaks või alla detekteerimispiiri (Izutsu *et al.*, 2001) ja samuti ei moodustu 100S ribosoomi. Varem oletati, et vaba RMF on tänu lihtsale struktuurile suhteliselt ebastabiilne ning stabiliseerub alles 100S ribosoomi moodustades, kuid selleks on vajalik veel üks tundmatu ainult statsionaarses faasis esinev faktor, mis ribosoomi konformatsiooni RMF-ile

vastuvõtlikuks muudab. Nüüdseks on see hüpotees tõestust leidnud, sest leiti statsionaarse faasi spetsiifiline valk YhbH, mis on oluline 100S ribosoomide moodustumiseks (Ueta *et al.*, 2005). See seletab ka, miks RMF suudab *in vitro* dimeriseerida ainult 70S ribosoomi, mis on saadud 100S ribosoomide pesemisel tugeva soola lahusega (seega statsionaarsest faasist pärit), aga mitte eksponentsiaalsest faasist pärinevaid ribosoomi (Wada, 1998).

Mis puutub ppGpp-sse, siis kunstlikult aminohappe nälga esile kutsudes suureneb koos ppGpp tasemega (poomisvastus) nii transkriptsioon *rmf*-lt kui RMF-i tase (Izutsu *et al.*, 2001). Kahjuks jääb selgusetuks, kas ka 100S ribosoomi tekib. Oletades, et lahustunud RMF on suhteliselt ebastabiilne võib siiski eeldada 100S ribosoomide teket nälja korral.

Kuna ppGpp akumulatsioon ja ribosoomide dimeriseerumine on üsna tõenäoliselt seotud, oleks huvitav teada, kas teistele ppGpp osalusega stressivastuste korral, tõuseb RMF-i hulk, mis lubaks oletada ka 70S dimeeride moodustumist.

Teine oluline RMF-i funktsioon on ilmselt ribosoomide stabiliseerimine, sest RMF-i puudumisel lagunevad ribosoomid palju kiiremini (Fukuchi *et al.*, 1995). Ilmselt ei ole ribosoomide stabiliseerimise juures oluline dimeriseerimine vaid hoopis RMF-i seondumisega kaasnevad muutused ribosoomis. On nähtud, et kuumašoki korral lagunevad 100S ribosoomid suhteliselt kiiresti 70S ribosoomideks ja püsivad seejärel stabiilsena (eksponentsiaalse faasi ribosoomide stabiilsused on metsik-tüüpi ja Δrmf tüve korral samad). Samal ajal aga Δrmf tüvel lagunevad 70S ribosoomid suhteliselt kiiresti alaühikuteks, mis kipuvad kiiresti edasi lagunema (Niven, 2004). Ka happešoki korral või happelises keskkonnas kasvatamisel näib RMF ribosoomi stabiliseerivat. Sel juhul pole küll 100S ribosoomi näha, kuid ilmneb, et metsik-tüüpi tüve ribosoomid on Δrmf tüve ribosoomidest stabiilsemad (el-Sharoud & Niven, 2005). Nagu RMF suudaks siiski ka 70S ribosoomidega seonduda ning ribosoomide dimeriseerumine oleks statsionaarse faasi spetsiifiline nähtus (põhjustatud seehulgas valgust YhbH). See aitaks seletada, miks eksponentsiaalse faasis toimub aegselt kasvavates tüvedes *rmf*-i promotori induktsioon, kuid ribosoomide dimeriseerumist ei täheldata (kuigi enamasti ei täheldata ka valku RMF).

Lisaks statsionaarse faasi paremale talumisele on *E. coli* RMF vajalik ka osmootse šoki korral, millisel juhul on täheldatud mõningast *rmf*-i transkriptsiooni tõusu (Garay-Arroyo *et al.*, 2000). RMF aitab bakterirakul kergemini taluda ka juba mainitud kuuma- ning vähemal määral ka happešokki. Kuumašoki korral peetakse ribosoomi lagunemist põhiliseks surmavaks

kahjustuseks (Niven, 2004), mis võiks seletada RMF-i selgemat rolli selle šoki korral võrreldes happešokiga.

1.4.2. YfiA

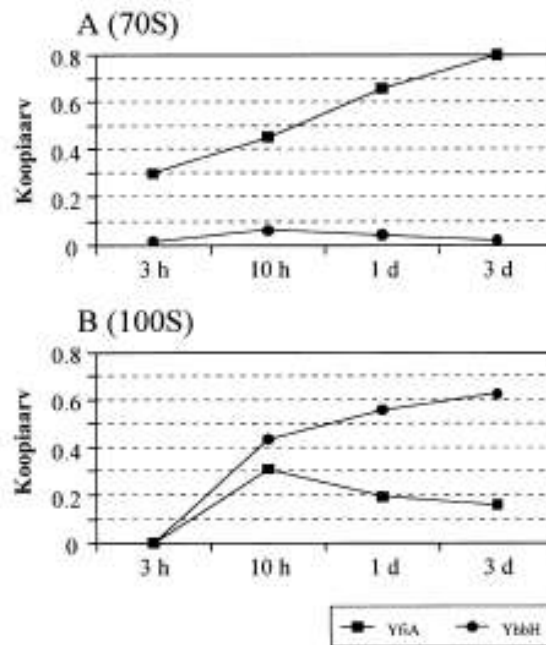
Juba kakskümmend aastat tagasi leiti kahedimensionaalselt valgugeelilt plekk Y (*spot Y*) (Yusupov & Spirin, 1986). Kasutades kuuma tritiumiga pommitamise (*hot tritium bombardment*) meetodikat, otsiti ribosomaalseid valke, mis seonduvad kahe alaühiku vahele. Kuna plekk Y ei klassifitseerunud ühekski seni tuntud ribosomaalseks valguks ja ilmus ainult osadel geelidel, ei pälvinud see tähelepanu.

Alles kümme aastat hiljem pälvis see valk rohkem tähelepanu (Agafonov *et al.*, 1997) ning mõne aasta pärast identifitseeriti plekk Y kui tundmatu funktsiooniga lugemisraami *yfiA* produkt (Agafonov *et al.*, 1999). Sellest ajast alates on seda ribosoomiga seonduvat valku kutsutud nii YfiA, valk Y (*protein Y*) kui ka lühidalt pY. YfiA 12,8 kDa suurune 113 aminohappejätki pikk valk. YfiA kodeeriv geen *yfiA* paikneb 16S rRNA geeni ja *phe* operoni vahel (Agafonov *et al.*, 1999). *YfiA* geenile homoloogseid gene leidub paljudes erinevates bakterites (Agafonov *et al.*, 1999; Ueta *et al.*, 2005), lisaks veel värskeaedspinatis (*Spinacia oleracea*) (Bubunenکو & Subramanian, 1994; Johnson *et al.*, 1990)

YfiA seondub 70S ribosoomiga ja täpsemalt 30S alaühikuga, kusjuures seandumine on Mg^{2+} kontsentratsioonist sõltuv (madala Mg^{2+} kontsentratsiooni juures seondub YfiA ribosoomiga halvasti). Samas madala Mg^{2+} kontsentratsiooni korral stabiliseerib YfiA seandumine 70S ribosoomi, takistades neid lagunemast alaühikuteks (Agafonov *et al.*, 1999).

YfiA seandumine ribosoomiga on indutseeritud enamasti stressitingimustes, milleks on külmašokk ja statsionaarne faas (Agafonov *et al.*, 2001). Eksponeerimise faasi rakkudest eraldatud ribosoomidelt on leitud YfiA-d suhteliselt vähe või see puudub üldse (Agafonov *et al.*, 2001; Maki *et al.*, 2000). Valgu Y hulk ribosoomi kohta varieerub erinevate andmete põhjal suhteliselt palju ja on ilmselt tingitud erinevatest tüvedest ja katsetingimustest. Ühtedel andmetel sisaldab ribosoomi fraktsioon, mis saadakse statsionaarsesse faasi jõudnud või külmašoki rakkudest, YfiA-d ja ribosoomi suhtes 1:10 kuni 1:3 (Agafonov *et al.*, 2001). Samas teised andmed näitavad, et juba eksponeerimisfaasist statsionaarsesse faasi üleminekul on YfiA ja

ribosoomide suhe 1:3 ja jõuab statsionaarse faasi kolmandaks päevaks 4:5 (Joonis 10). Vähemal määral seondub YfiA ka 100S ribosoomidega (Maki *et al.*, 2000).



Joonis 10. YfiA ja YhbH koopiaarvu muutumine erinevates kasvufaasides. YfiA ja YhbH koopiaarv on antud ribosoomi partikli kohta. Horisontaalteljel antud ajapunktid näitavad aega peale bakterikultuuri allalahjendamist. 3 tunnil on bakterikultuur eksponentsiaalsest faasist statsionaarsesse faasi üle minemas. Järgnevatel ajahetkedel on bakterikultuur juba statsionaarses faasis. Ruuduga (■) on tähistatud YfiA, ringiga (●) on tähistatud YhbH (Maki *et al.*, 2000).

Uuemad andmed see-eest näitavad, et YfiA takistab 100S ribosoomide formeerumist (Ueta *et al.*, 2005). 100S ribosoomid moodustuvad kahe RMF ja ühe YhbH molekuli seondumisel kahe 70S ribosoomiga. Kuna YfiA ja YhbH omavad suurt sarnasust ning nende pinnal on konserveerunud aminohapejääke, mis on olulised ribosoomiga seondumisel, siis on nende eeldatavad seondumiskohad samad. Erinevalt YhbH-st sisaldab YfiA C-terminaalset pikendust, mis omakorda võiks takistada RMF-i seondumist ribosoomile (RMF-i seondumiskoht paiknema YfiA-ga samas piirkonnas). Steriliselt nii RMF-i kui YhbH-i seondumist blokeerides võib YfiA takistada 100S ribosoomide moodustumist (Ueta *et al.*, 2005), osaledes seeläbi YfiA sedasi ribosoomide dimerisatsiooni regulatsioonis.

Kuigi 100S ribosome peetakse ribosoomide säilitusvormiks, millega kaitstakse ribosome stressitingimustes lagunemise eest, näidatakse samas töös: hoolimata YfiA omadusest takistada 100S ribosoomide moodustumist, kaitseb YfiA ribosome degradatsiooni eest ka *in*

vivo (Ueta *et al.*, 2005). $\Delta yhbH$ tüves, kus ei moodusti ei 100S ega ka 90S (100S dimeeri ellasmolekul) ribosome, on 70S ribosoomide hulk pikaajalisel statsionaarses faasis viibimise korral kõrgem kui metsik-tüüpi tüves. Arvatavasti sellest tingituna on ka $\Delta yhbH$ tüvel pikaajalisel statsionaarses faasis viibimise korral metsik-tüüpi tüvest suurem kolooniate moodustamise võime. Ribosoomide dimeriseerumist ei toimu ilmselt seetõttu, et 70S ribosoomid on YfiA-ga küllastunud ning RMF-il ei jää võimalust ribosoomidega seonduda ning dimeriseerumist indutseerida. Oluline on seejuures mainida, et ka $\Delta yfiA$ tüvioli statsionaarses faasis suurema kolooniate moodustamise võimega, kuid YfiA ja YhbH topelmutant metsik-tüübile sarnase kolooniate moodustamise võimega (Ueta *et al.*, 2005).

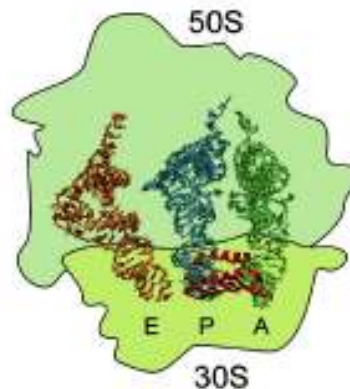
Kristallstruktuuranalüüs paigutab ribosoomile seondunud YfiA 30S alaühiku 50S alaühiku poolsele küljele (Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004). Sellist seondumist toetavad ka juba mainitud YfiA seondumiskatsed (Agafonov *et al.*, 1999) ning kuuma tritiumiga pommitamise katsed, mis näitasid, et YfiA on ainulaadne 70S ribosoomi alaühikute vahele seonduv valk (Agafonov *et al.*, 1997; Yusupov & Spirin, 1986). Hetkel oletatakse, et ka YhbH seondub samasse kohta (Ueta *et al.*, 2005).

50S alaühikust jääb YfiA seondumiskohale kõige lähemale heeliks 69 23S rRNA-st (Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004). Heeliks 69 mängib olulist rolli kahe ribosoomi alaühiku seandumisel ja translatsiooni elongatsiooni käigus konformatsiooniliste signaalide edastamisel alaühikute vahel (Maivali & Remme, 2004; Yusupov *et al.*, 2001). Samas on teda, et YfiA seandumine stabiliseerib 70S ribosoomi (Agafonov *et al.*, 1999). Võiks oletada, et ribosoomi stabiliseerimine toimub läbi heeliks 69 ja YfiA interaktsiooni, kuid kahjuks on nende vaheline kaugus ligikaudu 10 Å, mis on otsese interaktsiooni jaoks liiga palju. Kuna kristallstruktuur ei olnud just väga täpne (lahendatud täpsusega 11,4 Å) tehti ka keemilist sondeerimist heeliksis 69. YfiA seandumine ribosoomile ei näidanud ühegi nukleotiidi reaktiivsuse muutust heeliks 69-s, millest võib oletada, et YfiA efekt takistamaks 70S ribosoomide lagunemist alaühikuteks tuleneb 30S alaühiku konformatsiooni stabiliseerimisest, mis on 50S alaühikule eriti seandumisaldis (Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004).

30S alaühikule seondumist kristallstruktuurilt täpsemalt vaadates selgub, et YfiA seondub kanalisse, kuhu seonduvad ka mRNA ja tRNA-d. Kõrvutades YfiA ja tRNA-de ning mRNA-ga seondunud ribosoomi struktuure on näha, et YfiA kattub P-koha ning osaliselt ka A-koha tRNA antikoodon-aasadega (Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004) (Joonis 11). Neid andmeid toetavad varasemad

tulemused, mis näitavad, et YfiA inhibeerib translatsiooni aminoatsüül-tRNA seondumise staadiumis. Need tulemused andsid aluse pakkumaks YfiA-le uueks nimeks RaiA (*Ribosome associated inhibitor A*) (Agafonov *et al.*, 2001). Seejuures näidati, et tetratsükliini (A-koha spetsiifiline inhibiitor) ja YfiA seondumiskohad ei kattu (Agafonov *et al.*, 2001).

Samas uuemad andmed YfiA translatsiooni inhibeerivate omaduste kohta näitavad, et YfiA põhilisemaks omaduseks on takistada just translatsiooni initsiatsiooni. Nimelt on hyäiritud f-Met-tRNA^{Met} seondumine P-kohta (eriti madalamal temperatuuril) ja 70S ribosoomide IF1- ja IF3-sõltuv dissotsatsioon (segades sellega ribosoomidel alustamast translatsiooni uut ringi) ning konkureerides vähemalt IF-1-ga ribosoomile seondumisel (Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004).



Joonis 11. YfiA seondumiskoht ribosoomis. YfiA (punane) seondumiskoht kattub A- ja P-koha tRNA-de (märgitud vastavalt rohelse ja sinisega) seondumiskohtadega. E-koha tRNA (oranž) seondumiskohaga YfiA seondumiskoht ei kattu. Ribosoom on kujutatud skemaatiliselt (Wilson & Nierhaus, 2004).

Need andmed sobivad YfiA oletatava rolliga translatsiooni aparadi reguleerimisel külmašoki korral. Arvatakse, et külmašoki korral on valgusünteesi aeglustumine/peatumine tingitud just initsiatsiooni takistumisest (Gualerzi *et al.*, 2003). Külmašoki üleelamiseks on siiski vajalik teatavate valkude süntees ning nende sünteesi initsiatsioon toimub ilmselt tänu mRNA *cis*-elementidele ja *trans*-toimelistele valkudele, mis tühistavad YfiA mõju. *Trans*-toimelisteks valkudeks oleksid näiteks CspA ja IF-3, mis stimuleerivad eelistatult külmašoki valkude mRNA-de translatsiooni ja seda eriti just madalatel temperatuuridel (15°C) (Gualerzi *et al.*, 2003). On teada ka, et külmašoki ajal eraldatud ribosoomid omavad eelistust transleerida külmašoki valkude mRNA-sid, just kui nad sisaldaksid mingisugust külmašoki ajal omandatud faktorit, mis neid

selleks suunab (Gualerzi *et al.*, 2003). Selliseks faktoriks võikski olla YfiA (Wilson & Nierhaus, 2004).

Teatud aja jooksul kohaneb rakk külmaga ning jätkub ka valgusüntees, kuid aeglasemas tempos. Selleks ajaks on suurenenud IF-de hulk (Gualerzi *et al.*, 2003), mis ilmselt aitab kaasa YfiA välja konkureerimisele ribosoomidelt ja ribosoomide aktiivsuse osalisele taastamisele ning sellega ka valgusünteesi osalisele taastumisele (Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004).

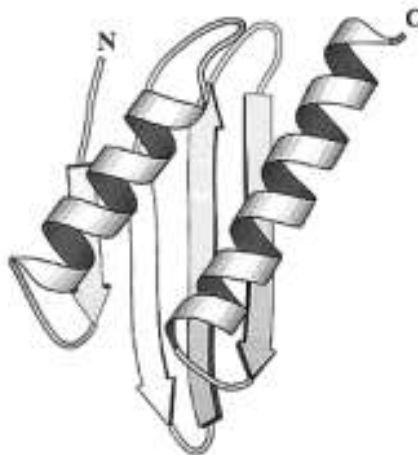
Lisaks on näidatud, et YfiA vähendab valgusünteesil ka valelugemist. Kuna stressi tingimustes, nagu aminohappe nälg statsionaarses faasis või ka külmašokk, väheneb aminohapete lisamise täpsus kasvavasse peptiidahelasse, võib YfiA oluliseks funktsiooniks olla ka valgusünteesi täpsuse suurendamine stressitingimustes (Agafonov & Spirin, 2004).

Kokkuvõtvalt võikski YfiA rakule kasuliku toimet stressitingimustes kirjeldada nii: samal ajal ribosoomide kaitsmisega degradatsiooni ning alaühikuteks lagunemise eest peatab YfiA (osaliselt) translatsiooni ning suunab ka mRNA spetsiifikat (nii vähemalt külmašoki korral (Wilson & Nierhaus, 2004) aga miks ka mitte statsionaarses faasis, kuigi andmed selle kohta puuduvad). Lisaks takistab YfiA valgusünteesitäpsuse vähenemist statsionaarses faasis või külmašoki korral (Agafonov & Spirin, 2004) ning osaleb ribosoomide dimerisatsiooni regulatioonis (Ueta *et al.*, 2005).

1.4.2.1. YfiA struktuur

E. coli valgul YfiA (Rak *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2002) ning *Haemophilus influenzae* homoloogil H10257 (Parsons *et al.*, 2001) on määratud TMR (tuuma magnet resonantsi) meetodiga struktuurid. *H. influenzae* homoloog on 107 aminohappejäägi pikkune ning omab võrreldes *E. coli* YfiA-ga 64% protsendilist identsust.

Võrreldes mõlemat struktuuri selgub, et nad on väga sarnased (Rak *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2002). Nad mõlemad koosnevad jäigast N-terminaalsest osast, mis moodustavad β - α - β - β - α topoloogiaga struktuuri, kusjuures α -heeliksid ja β -lehed moodustavad kaks eraldi kihti (Joonis 12). C-terminaalne osa see-eest ei oma kindlat struktuuri.



Joonis 12. *H. Influenzae* YfiA struktuur. Kindlat struktuuri mitte omav C-terminaalne osa on välja jäetud (Rak *et al.*, 2002).

α -heeliks 1 ja β -leht 2 vaheline aas ning α -heeliks 1 C-terminaalne ots omavad ka teatud liikuvust, millel võib olla ka bioloogiline funktsioon. Oletatavasti osaleb see piirkond ribosoomiga seondumisel. Selliseks oletuseks annavad tuge varasemad andmed sellest, et mitmetes teistes valkudes sarnast liikuvust omavad piirkonnad vastutavad seondumise eest teiste molekulidega (Ye *et al.*, 2002).

Enamus konserveerunud aminohappejääkidest asuvad valgu N-terminaalses piirkonnas. Valgu sisse jäävad hüdrofoobsed aminohapped on ka suuresti konserveerunud ja tagavad valgu konformatsiooni püsimise. α -heeliksile C-terminaalsetes osades paiknevad konserveerunud aminohapped kannavad valdavalt positiivset laengut (Ye *et al.*, 2002). Võiks oletada, et nad osalevad negatiivselt laetud rRNA sidumisel, mida võib oletada ka kristallstruktuuranalüüsi järgi (Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004).

YfiA struktuur meenutab kaheaahelalist RNA-d siduvate valkude struktuuri, ainult et nemad moodustavad α - β - β - β - α topoloogiaga struktuuri. Erinevuseks on üks lisa β -leht YfiA-l. dsRBD (*double-stranded RNA-binding domain*) valkudel on heeliksid omavahel nurga all, kuid YfiA puhul paiknevad nad paralleelselt. Lisaks on mitmed topoloogilised struktuurid erinevate pikkustega ning konserveerumise aste YfiA ja dsRBD valkude vahel madal (Ye *et al.*, 2002). Ka ei nähtud YfiA-l võimet seonduda mitte-spetsiifiliselt kaksikahelalise või tetra-aasa sisaldava RNA-ga nagu paljud dsRBD valgud (Rak *et al.*, 2002). Kõik see viib oletusele, et YfiA ja tema homologid esindavad uut klassi RNA-d siduvaid valke.

1.4.3. YhbH

Erinevalt YfiA-st leiti valk YhbH alles suhteliselt hiljuti, kui uuriti, kuidas muutub ribosoomides valkude koosseis pikemajalisel statsionaarses faasis oleku ajal. Siis leiti kahedimensionaalselt geelilt YfiA pleki kõrvalt veel üks plekk. Valgu N-terminaalse aminohappelise järjestuse määramisega identifitseeriti see valk kui lugemisraami *yhbH* produkt (Maki *et al.*, 2000).

Geen *yhbH* paikneb *rpoN* operonis, mis on saanud nime σ^N , kui alternatiivset sigma faktor kodeeriva geeni järgi. σ^N reguleerib mitmeid σ^N -sõtluvaid promootereid ning on sellega olulisel kohal lämmastiku metabolismis. Samas operonis paiknevad lisaks mitmete teadmata funktsiooniga geenidele ka *ptsN* ja *ptsO* geenid, mis kodeerivad vastavalt valke IIA^{Ntr} ja NPr. Mõlemad nad kuuluvad fosfoenoolpüruvaadi fosfotransferaasi süsteemi, mis osaleb süsiniku ja lämmastiku metabolismi omavahelises regulatsioonis (Powell *et al.*, 1995). Algselt arvati, et ka YhbH on seotud lämmastiku metabolismiga ning oletati, et ta on σ^N modulatsiooni faktor (DeLisa *et al.*, 2001).

YhbH on 10,8 kDa suurune valk, mis koosneb 95 aminohappejäägist. YhbH aminohappeline järjestus on väga sarnane YfiA-le (identsus 40%), kuid YhbH-l puudub võrreldes YfiA-ga 18 aminohappeline C-terminaalne järjestus (Maki *et al.*, 2000; Ueta *et al.*, 2005). Kuna aminohappeline järjestus nendel kahe valgul on suhteliselt sarnane, võib eeldada, et ka nende struktuur on väga sarnane. Kuna paljud aminohappejäägid, mida peetakse oluliseks YfiA seondumisel ribosoomiga, on konserveerunud ka YhbH-l, võib arvata, et YhbH seondumiskoht ribosoomil on sama (Ueta *et al.*, 2005).

Kui YfiA seondus eelistatult 70S ribosoomiga, siis YhbH seondub praktiliselt ainult 100S ribosoomidega (Joonis 10). Samas on näha, et katse käigus ei ületa YfiA ja YhbH summaarne koopiaarv ribosoomi kohta ühte. Ka see viitab, et YfiA ja YhbH võivad konkureerida samale seondumiskohale ribosoomis (Maki *et al.*, 2000).

Kõige uuemad andmed näitavad, et valk YhbH osaleb 100S ribosoomide moodustamisel. Kui varem peeti 70S ribosoomide dimeriseerumise eest vastutavaks ainult RMF-i, ning kahtlustati ka statsionaarse faasi spetsiifilist faktorit, siis praegused andmed näitavad, et RMF moodustab vaid 90S ribosoomi, mis on näha YfiA ja YhbH topeltmutandi puhul. Oletatavasti

moodustub 100S ribosoom alles YhbH seandumisel 90S ribosoomiga. Seetõttu on YhbH uueks nimeks pakutud HPF (*hibernation promoting factor*) (Ueta *et al.*, 2005). Kuna RMF ise ei suuda eksponentsiaalsest faasist pärit ribosoomide dimeriseerumist põhjustada (Wada, 1998), jääb õhku rippuma küsimus, kas ka 90S ribosoomi tekkimiseks on vajalik veel mõni statsionaarse faasi spetsiifiline faktor.

100S ribosoomide moodustumine ei pruugi olla astmeline protsess. Ilmselt võib YhbH ribosoomiga iseseisvalt või siis RMF-iga samaaegselt seonduda, nii et 90S aste jääb vahele. Astmelist protsessi läbi 90S ribosoomi näeb bakterikultuuri statsionaarsesse faasi minekul, kus eksponentsiaalse faasi 70S ribosoomide kõrvale tekivad statsionaarsesse faasi üleminekul 90S ribosoomid, mis mõne aja pärast asenduvad 100S ribosoomidega (Ueta *et al.*, 2005). On näidatud, et hulga tunnetuse signaalmolekul AI-2 (*autoinducer 2*), mis osaleb kultuuri statsionaarsesse faasi viimisel, tõstab transkriptsiooni *yhbH* geenilt 2,5 korda (DeLisa *et al.*, 2001). Kuigi selles töös oletatakse, et *yhbH* produkt võib osaleda hoopis hulga tunnetuse protsessis, näitab see, et *yhbH* geen võib-olla reguleeritud, nii et statsionaarses faasis YhbH hulk tõuseb. Seetõttu võib vahepealne 90S ribosoomide ilmumine olla tingitud esialgsest madalast YhbH hulgast.

Mis puutub *yhbH* geeni vajalikkusesse, siis nagu eelmises peatükis mainitud on $\Delta yhbH$ mutant (nagu $\Delta yfiA$ mutantki) statsionaarses faasis suurema koolniate moodustamise võimega kui metsik-tüüpi tüvi. See ei tähenda seda, et need mõlemad geenid oleksid rakule statsionaarse faasis kahjulikud, sest elujõulisust on vaadeldud ainult kolooniate moodustamise võime järgi (Ueta *et al.*, 2005). Ilmselt on need geenid ikkagi olulised viisil, mida paljalt kolooniate moodustamise võime järgi ei näe, vastasel korral ei oleks need geenid erinevate bakterite hulgas niivõrd konserveerunud.

Varem sai mainitud, et YfiA-l on paljudes erinevates bakterites homoloog, samuti on homolooge ka YhbH-le. Huvitav on seejuures, et nende mõlema homolooge leidub valdavalt ainult enterobakterites (Ueta *et al.*, 2005), kus leidub ka RMF-i homolooge (Wada, 1998). Ja kuna paljud enterobakterid on patogeensed võiks 70S ribosoomide dimeriseerumise protsess olla potentsiaalne uute ravimite kujundamise sihtmärk (Yoshida *et al.*, 2004).

1.5. ANTIBIOOTIKUMIDE TOIMED

1.5.1. Aminoglükosiidid

Aminoglükosiidid on suur grupp varieeruva struktuuriga bakteriotsiidseid antibiootikume, mis enamasti põhjustavad translatsioonil valelugemist. Aminoglükosiidid on inimesele kergelt toksilised, kuna mõjuvad nii tsütoplasmaatilistele ja mitokondriaalsetele ribosoomidele, samas on aminoglükosiididel väike võime tungida eukarüootsesse rakku (Kotra *et al.*, 2000; Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; Pestka, 1977).

Kolm tuntumat ja enim kasutatavat suurt rühma aminoglükosiidide hulgas on gentamütsiini, neomütsiini ja kanamütsiini perekonnad. Aminoglükosiidide keskne osa on 2-desoksüstrepamiin, mille külge on seotud kaks kuni kolm aminosuhkrujääki. Aminoglükosiidide struktuurid varieeruvad aminosuhkrujääkide, aminorühmade ning teiste funktsionaalsete rühmade arvu ja paigutuse poolest (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999)

Aminoglükosiidid põhjustavad translatsioonil valelugemist, nii et valku lülitatakse valesid aminohappeid ning toimub stop-koodonite ülelugemine. Aminoglükosiidid põhjustavad ribosoomi 30S alaühiku heeliks 44 konformatsiooni muutust, mistõttu nukleotiidid A1492 ja A1493 pöörduvad sellisesse asendisse, mis meenutab seisust, kui kognaatne aminoatsüül-tRNA on A-kohta seondunud. See annab võimaluse piisavalt tugevasti ribosoomile seonduda ka tRNA-del, mille antikoodon ei vasta mRNA koodonile ning lülitada peptiidahelasse valesid aminohappeid (Ogle *et al.*, 2001). Lisaks takistavad neomütsiini perekonna antibiootikumid ribosoomis translokatsiooni (Spahn & Prescott, 1996).

Kuna aminoglükosiidid on tänu rohketele amino- ja hüdroksüülrühmadele positiivselt laetud, seonduvad nad kergesti negatiivselt laetud nukleiinhapetega. Peale ribosoomi on näidatud seondumist veel mõnedele ribosüümidele, isesplaisseeruvatele intronitele, tRNA^{Phe}-le jne. (Kotra *et al.*, 2000).

1.5.2. Ampitsilliin

Ampitsilliin on poolsünteetiline β -laktaam antibiootikum, mis kuulub aminopenitsilliinide hulka. Nagu kõik β -laktaam antibiootikumid inhibeerib ka ampitsilliin peptidoglükaanikihi sünteesi. Peptidoglükaan moodustab rakku ümber kaitsva kesta, mis kaitseb bakterit sealhulgas ka osmootse rõhu eest. β -laktaam antibiootikumid mõjutavad transpeptidatsioonireaktsiooni,

millega ühendatakse omavahel erinevad peptidoglükaanahelad. β -laktaam antibiootikumid meenutavad struktuurilt peptidoglükaani peptiidset osa D-alanüül-D-alaniini, mis on üks transpeptidatsiooni reaktsioonist osa võttev grupp. Selle sarnasuse tõttu kasutab transpeptidatsiooni reaktsiooni läbiviiv transpeptidaas substraadina ka β -laktaam antibiootikume. Tagajärjeks on β -laktaam antibiootikumi kovalentne seondumine ensüümi aktiivtsentrisse, mis viib ensüümi inaktiiveerumiseni. Kui peptidoglükaani süntees on häiritud muutub bakterit kaitsev kest nõrgemaks ja osmootse rõhu toimele bakter lüüsub (Kernodle, 2000).

1.5.3. Fluorokinoloonid

Fluorokinoloonid on sünteetilised laia toimespektriga antibiootikumid. Nad kuuluvad kinoloonide hulka, moodustades eraldi rühma kuna on fluoreeritud. Kinoloonide näiteks võib tuua nalidiksiinhappe ja fluorokinoloonide esindajateks norfloksatsiini ning ofloksatsiini (Appelbaum & Hunter, 2000).

Fluorokinoloonid inhibeerivad DNA güraasi (topoisomeraas II) ja topoisomeraas IV. Mõlemad ensüümid on vajalikud DNA replikatsioonil ja tekitavad DNA kaheaheelalisi lõikeid. DNA güraas tekitab DNA negatiivset superspiralisatsiooni ja vähendab positiivset superspiralisatsiooni. Ilmselt on DNA güraas vajalik ka rekombinatsioonil ja transkriptsioonil. Topoisomeraas IV vastutab üksteisest läbi põimunud DNA molekulide lahutamise eest (Blondeau, 2004).

Kinoloonid seonduvad ensüüm-DNA kompleksiga. Tagajärjeks on DNA-ensüüm komplekside kuhjumine, sest ensüümi aktiivsus kaob ja replikatsioonikahvel seiskub. Selge ei ole kuidas kinoloonid täpselt toimivad, kuid oletatakse, et nad *stack*'uvad lõigatud DNA 5'-otsa lämmastikalusega. Kindel on, et kinoloonide toimele on DNA replikatsioon inhibeeritud ja järgneb kiire rakkude surm (Blondeau, 2004; Walsh, 2003).

1.5.4. Fosfomütsiin

Fosfomütsiin on looduslik antibiootikum, mis takistab bakteril rakukesta sünteesi. Fosfomütsiin inhibeerib rakukesta sünteesi varajases etapis osalevat ensüümi enoolpürüvüül transferaasi, mis katalüüsib fosfoenoolpürüvaadi liitmist UDP-N-atsetüülglükoosamiinile. Reaktsiooni tulemusena tekib UDP-N-atsetüülmuraamhape. Struktuurilise sarnasuse tõttu

fosfoenoolpüruvaadile kasutab enoolpüruvüül transferaas substraadina ka fosfomütsiini. Tagajärjeks on fosfomütsiini kovalentne seondumine ensüümi aktiivsaiiti, mistõttu ensüüm inaktiveerub (Suarez & Mendoza, 1991; Walsh, 2003).

1.5.5. Klooramfenikool

Klooramfenikool on bakteriostaatiline antibiootikum ning antibiootikumidest ühe lihtsaima struktuuriga. Klooramfenikool inhibeerib valgusünteesi nii gram-positiivsetes kui ka gram-negatiivsetes bakterites, seondudes ribosoomi suurele alaühikule peptidüültransferaases tsentris. Eukarüootides takistab klooramfenikool valgusünteesi mitokondrites ja kloroplastides ning omab seetõttu inimese raviks kasutades mitmeid kõrvalmõjusid (Pestka, 1977).

Klooramfenikool takistab peptidüültransferaasest reaktsiooni. Arvatavasti takistab ta A-koha aminoatsüül-tRNA 3'-ACC otsal korralikult katalüütilises tsentris asetuda, samal ajal oluliselt vähendamata kogu aminoatsüül-tRNA seondumist ribosoomi. Samas sõltub peptidüültransferaasest reaktsiooni inhibeerimise aste ka peptiidahelast ja lisatavatest aminohapetest (Spahn & Prescott, 1996). Tundub, et klooramfenikool segab ka kasvava peptiidi seondumist ribosoomile ning põhjustab väga lühikeste peptidüül-tRNA-de dissotsieerumist ribosoomist (Rheinberger & Nierhaus, 1990).

Klooramfenikool põhjustab translatsioonil ka valelugemist (Thompson *et al.*, 2002), nähakse nii lugemisraami nihet kui ka stop-koodoni ülelugemist, kuid mitte valede aminohapete lisamist peptiidahelasse. Mehhanism, kuidas klooramfenikool peptidüültransferaasest tsentrist selliseid nähtusi põhjustab, ei ole selge.

1.5.6. Linkosamiidid

Linkosamiidid kuuluvad MLS_B antibiootikumide klassi, mis on üksteisest struktuuriliselt erinevad, kuid funktsionaalselt sarnased. Linkosamiidide näiteks võib tuua linkomütsiini ja klindamütsiini. Nad takistavad peptidüültransferaasest reaktsiooni, kuna seonduvad ribosoomi 50S alaühikus peptidüültransferaasest tsentri lähedusse. Ilmselt võivad linkosamiidid häirida A-koha aminoatsüülühma ja P-koha peptidüülühma paiknemist ning isegi ruumiliselt takistada peptiidahela liikumist väljumistunnelis. (Douthwaite, 1992; Hansen *et al.*, 2002; Schlunzen *et al.*, 2001; Tenson *et al.*, 2003).

1.5.7. Makroliidid

Makroliidid on makrotsükliilise laktoonringiga antibiootikumid, neist meditsiiniliselt tähtsamate tsükli suurus on 14-16 aatomit. Nad on varieeruva struktuuriga ja tihti on laktoonringiga seotud mitmeid suhkrujääke või hüdrofoobseid rühmi. 14-aatomilise tsükliga makroliidide näiteks võib tuua erütromütsiini ja klaritromütsiini ning 15-aatomilise laktoonsükliga ühenditest azitromütsiini ja 16-aatomilistest tülosiini. Makroliidid inhibeerivad prokarüootset valgusünteesi, seondudes ribosoomi 50S alaühiku peptidüültransferaasse tsentri lähedusse. Makroliidid kuuluvad samuti MLS_B antibiootikumide klassi (Douthwaite, 2001; Shiomi & Omura, 2002).

Erinevat tüüpi makroliididel on erinev toime. Peptiidi väljumistunneli algusesse seondudes takistavad erütromütsiini tüüpi antibiootikumid ruumiliselt peptiidahela kasvu. See põhjustab lühikeste peptiidahelaga peptidüül-tRNA dissotsieerumise ehk ärakukkumise ribosoomist. Ärakukkuva peptidüül-tRNA peptiidse osa pikkus on korrelatsioonis antibiootikumi kaugusega peptidüültransferaasest tsentrist (Tenson *et al.*, 2003).

16-aatomilise laktoonsükliga makroliidid, millel on C5 positsioonis disahhariid ning viimane suhkrujääk on mükaroos, inhibeerivad peptidüültransferaasest reaktsiooni. Nende toime on seletatav sahhariidse C5 pikendusega, mis ulatub peptidüültransferaasessse tsentrisse või sellele hästi lähedale ning ei lase reaktsioonil toimuda (Hansen *et al.*, 2002; Schlunzen *et al.*, 2001).

Mõningad makroliidid takistavad *E. coli*'s ja mitmetes teistes bakterites ribosoomi suure alaühiku assambleerumist, põhjustades rakus ribosoomide puuduse. Samas ei põhjusta nad juba valmis alaühikute lagunemist. Teistel MLS_B grupi antibiootikumidel ribosoomi formeerumist takistavat toimet ei ole nähtud (Champney & Burdine, 1995).

1.5.8. Puromütsiin

Puromütsiin inhibeerib samuti peptidüültransferaasest reaktsiooni. Tema struktuur on sarnane aminoatsüleeritud türosüül-tRNA 3'-otsale ning tänu sellele kasutab ribosoom puromütsiini A-koha substraadina. Tagajärjeks on translatsiooni peatumine, kuna ribosoom ei suuda puromütsiinisese amiidsideme osavõtul peptidüültransferaasest reaktsiooni katalüüsida ja

peptidüül-puromütsiin dissotsieerub ribosomist. Puromütsiini peptidüültransferaasset reaktsiooni kasutatakse mudelmehhanismina uurimaks peptiidsideme tekkimist valgusünteesil, kuna peptiidahela ülekannet puromütsiinile toimub sama mehhanismiga, mis aminoatsüül-tRNA puhul (Pestka, 1977; Spahn & Prescott, 1996).

1.5.9. Rifampitsiin

Rifampitsiin on laia toimespektriga ansamütsiinide klassi kuuluv bakteriotsiidne antibiootikum, mis on oluline tuberkuloosi ravil. Rifampitsiini märklauaks on RNA polümeraas, olles ainuke kliiniliselt kasutatav bakteriaalset transkriptsiooni peatav antibiootikum (Walsh, 2003). Täpne seondumiskoht on ensüümi β -alaühikus DNA/RNA kanalis. Selles piirkonnas on suhteliselt madal konserveerumise tase eukarüootide ja prokarüootide vahel, mis seletab rifampitsiini aktiivsuse puudumist eukarüootsete RNA polümeraaside suhtes. Rifampitsiin seondub aktiivtsentrist rohkem kui 12 Å kaugusele, kuid transkriptsiooni inhibitsioon toimub takistades ruumiliselt RNA pikenemist. RNA molekuli pikkuse juures 2-3 nukleotiidi, põhjustab rifampitsiin RNA lahkumise ensüümi küljest. DNA jääb polümeraasiga endiselt seotuks, samuti rifampitsiin ning tsükkel võib jälle alata (Campbell *et al.*, 2001).

1.5.10 Spektinomütsiin

Spektinomütsiini on ajalooliselt vaadeldud koos aminoglükosiididega, kuigi viimasel ajal käsitletakse bakteriostaatilist spektinomütsiini eraldiseisva ühendina. Põhjuseks on suhteliselt erinev struktuur ja ka toime, mis seisneb elongatsioonifaktori G poolt katalüüsitud peptidüül-tRNA translokatsiooni inhibeerimises A-kohast P-kohta (Bilgin *et al.*, 1990). Kristallstruktuuranalüüs näitab, et spektinomütsiin seondub ribosoomi 30S alaühiku heeliks 34-ga. Translokatsiooni käigus toimub 30S alaühiku „pea“ piirkonna liikumine, milles ilmselt osaleb ka heeliks 34 ja spektinomütsiin võib ruumiliselt seda liikumist takistada. Võimalik, et spektinomütsiin takistab veel heeliks 34 konformatsioonilisi muutusi, mis on samuti vajalikud „pea“ piirkonna liikumiseks (Carter *et al.*, 2000).

1.5.11 Streptomütsiin

Streptomütsiin on struktuurilt sarnane aminoglükosiididele ning põhjustab samuti translatsioonil valelugemist. Vaatamata sellele vaadeldakse streptomütsiini eraldi, kuna tema toime molekulaarne mehhanism on erinev ning ka ribosoomis seondub ta teise kohta kui aminoglükosiidid (Carter *et al.*, 2000). Imselt mõjutab streptomütsiin ribosoomi konformatsioonilist muutust, mis järgneb koodoni ära tundmisele ja indutseerib GTP hüdroolüüsi. Streptomütsiini tulemusel on GTP hüdroolüüsi kiirus nii kognaatse kui ka lähikognaatse tRNA korral sarnased, mis viib alla tRNA algse valiku selektiivsuse. Streptomütsiin vähendab ka *proofreading*'u selektiivsust (Gromadski & Rodnina, 2004).

1.5.12. Tetratsükliin

Tetratsükliin on tuntuim esindaja tetratsükliinide perekonnast. Tetratsükliinid on bakteriostaatilise toimega ning inhibeerivad efektiivselt translatsiooni nii gram-negatiivsetes kui ka gram-positiivsetes bakterites. Lisaks mõjutavad nad nõrgalt eukarüootide valgusünteesi (Chopra & Roberts, 2001). Tetratsükliin seondub ribosoomi 30S alaühikule ning üldise mudeli järgi takistab tRNA-del ribosoomi A-kohta seondumist. Tetratsükliin ei takista tRNA esialgset ribosoomile kinnitumist tRNA·EF-Tu·GTP kolmik-kompleksi koosseisus. Tetratsükliin jääb tRNA-le ruumiliselt ette alles peale GTP hüdroolüüsi ja EF-Tu vabanemist, mis tingib tRNA asendi muutumise ribosoomi suhtes. Tagajärjeks on tRNA lahkumine ribosoomist. Samamoodi võib kolmik-kompleks korduvalt seonduda ja see viib ribosoomi tühitsükliisse, mille käigus hüdroolüüsitakse kasutult GTP-d. Nii takistab tetratsükliin translatsiooni ja lisaks kulutab veel bakteri energiavarusid (Brodersen *et al.*, 2000).

1.5.13. Trimetoprim

Trimetoprim kuulub aminopürimidiinide hulka ja on dihüdrofolaadi reduktaasi inhibiitor. Dihüdrofolaadi reduktaas on ensüüm, mis redutseerib dihüdrofolaati tetrahüdrofolaadiks. Tetrahüdrofolaat on tähtis ülekandemolekul ühe-süsinikulisteks ülekanneteks. Sellistes ülekannetes on produktideks metioniin, glütsiin, tümidüülhape, puriinid ja Met-tRNA^{fMet} (Laskowska *et al.*, 2003). Enamasti arvatakse, et trimetoprimi antibakteriaalne toime tuleneb tümidüülhappe puudusest rakus (nn. „tümiinitu surm“) (Quinlivan *et al.*, 2000). Tümidüülhappet

saadakse uridüülhappe metüleerimise teel, kusjuures metüülrühma doonoriks on tetrahüdrofolaat. Tümidüülhape on allikaks dTTP-le, mis on vajalik DNA sünteesil. Seetõttu ongi raku kasv trimetoprimi juuresolekul DNA sünteesi häirituse tõttu takistatud. Inimestele trimetoprim ei toimi, kuna inimese dihidrofolaaadi reduktaas on bakteri vastavast ensüümist tugevasti erinev (Walsh, 2003).

2. TÖÖ EESMÄRK

Käesolev töö on osa suuremast projektist, mille eesmärgiks on uurida bakteriaalset valgusünteesiapparaati erinevates stressitingimustes, lülitades välja geene, mille produktid on osalised translatsiooni moduleerivates mehhanismides. Kirjeldades fenotüüpe, mis erinevate stressitingimuste (ka antibiootikumid) rakendamisel ilmnevad, oleks võimalik selgitada translatsiooni moduleerivate ja kaitsvate mehhanismide toimimist ja omavahelisi seoseid.

Kuigi stressitingimustel valgusünteesiapparaati kaitses ja moduleerimises osalevaid geene ja nende produkte on juba mitmeti iseloomustatud, puuduvad praktiliselt andmed või on neid suhteliselt vähe, kuidas on üks või teine neist seotud raku vastusega antibiootikumidele. Sellised andmed oleksid vajalikud hindamaks translatsiooni moduleerivate geenide sobivust sihtmärgina ühenditele, mis võiksid võimendada olemas olevate antibiootikumide toimet (Markham *et al.*, 1999).

Käesoleva töö eesmärgiks oli selgitada translatsiooni moduleerivate geenide seost antibiootikumidega, määraes kui palju muutub *E. coli* tundlikkus antibiootikumidele, kui genoomist on üksikhaaval välja lülitatud valgusünteesiapparaati kaitsvaid ja moduleerivaid mehhanisme kodeerivad geenid *relA*, *rmf*, *yfiA*, *yhbH*, *ssrA* ning paarina *relB* ja *relE* geenid. Antibiootikumidest kasutati ka selliseid, mille sihtmärgiks ei ole otseselt ribosoom.

Lisaks bakterikultuuri optilise tiheduse jälgimisele vaadati, kuidas muutub bakterikultuuri koloonia moodustamise võime. See annab võimaluse hinnata, kuidas muutuvad antibiootikumide bakteriostaatilised või bakteriotsiidised omadused erinevatel mutantsetel tüvedel, seehulgas kas mõni bakteriostaatiline antibiootikum muutub bakteriotsiidseks.

3. MATERJAL JA METOODIKA

Kemikaalid.

Kasutatud kemikaalid on firmadelt Amresco (erütromütsiin), Balkanpharma (ampitsilliin), FATOL-Arzneimittel (rifampitsiin) ja Sigma (fosfomütsiin, kanamütsiin, klindamütsiin, klooramfenikool, norfloksatsiin, ofloksatsiin, puromütsiin, spektinomütsiin, streptomütsiin, tetratsükliin, trimetoprim).

Aparatuur.

Bakterikultuuri tihedust mõõdeti spektrofotomeetriga (Pharmacia ja Thermo Helios β).

Söötmed.

Baktereid kasvatati 37°C juures M9 söötmes või Lurian-Bertani (LB) agarooosi plaatidel (Sambrook & Russel, 2001).

M9 sööde:		5 X M9 sool:	
5 X M9 sool	200 ml	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	64 g
1 M Mg ₂ SO ₄	2 ml	KH ₂ PO ₄	15 g
20% glükoos	20 ml	NaCl	2,5 g
1 M CaCl ₂	0,1 ml	NH ₄ Cl	5,0 g
deioniseeritud H ₂ O lõppmahuni 1 liiter		deioniseeritud H ₂ O lõppmahuni 1 liiter	

Tüved, plasmiidid.

Metsik-tüüpi tüvena kasutati *E. coli* tüve BW25113 (lacI^q rrnBT₁₄ DlacZ_{WJ16} hsd R514 DaraBADAH33 DrhaBAD_{LD78}).

Metsik-tüüpi tüvi ja Δ *ssrA* tüvi (Hallier *et al.*, 2004b) on saadud lahke kingitusena professor Brice Feldenilt (Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique, Faculte de Pharmacie, Universite de Rennes).

Mutantsed tüved Δ *ssrA* ja Δ *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 ning elektroporatsioonil kasutati 0,2 cm elektroporatsiooni küveti ja 40 μ l 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.

Antibiootikumi mõju uurimine.

1. Kasvu inhibeerimise katse.

Üleöö kasvatati ~ 4 ml metsik-tüüpi ja mutantseid kultuure. Mõõdeti bakterikultuuri tihedus (A600 nm) ja lahjendati tiheduseni OD 0,02. Alternatiivina lahjendati bakterikultuur OD 0,1 ning kasvatati OD ~0,8 ning lahjendati tiheduseni OD 0,02. Lahjendustest tõsteti katseklaasidesse á 2 ml lahjendust, üks katseklaas jäeti ilma antibiootikumita kontrolliks ja teistesse lisati antibiootikumi kasvavas kontsentratsioonis. Bakterikultuure kasvatati 12 tundi ning seejärel mõõdeti bakterikultuuri tihedus.

2. Bakteriotsiidsuse katse.

Üleöö kasvatati ~ 6 ml metsik-tüüpi ja $\Delta ssrA$ kultuuri. Mõõdeti bakterikultuuri tihedus ja lahjendati koguses 100 ml tiheduseni OD 0,02. Saadud kultuurid kasvatati tiheduseni OD ~ 0,2 ning jagati kahte kolbi (50 ml mõlemasse). Ühte kolbi lisati antibiootikum ja teine jäeti kontrolliks ning mõlemat osa kasvatati edasi. Kanamütsiini, ampitsilliini ja fosfomütsiini puhul lahjendati hiljem üleöö kultuur ka 200 ml-sse ja OD ~ 0,2 korral jagati kolvi sisu neljaks ja kolmele lisati erinevas kontsentratsioonis antibiootikum. Ajapunktides mõõdeti bakterikultuuride tihedused ning igast kultuurist tehti kaks külvi LB plaadile. Plaaditavad lahjendused tehti kultuurist arvestusega, et ühele plaadile tuleks 50 ja teisele 250 kolooniat, sellisel juhul peaks vähemalt ühele plaadile tulema loetav hulk kolooniaid. Samas eeldati, et bakterikultuur tihedusega OD 1 sisaldab $5 \cdot 10^8$ CFU-d ühes milliliitris. Juhul kui oli teada, et bakterid hakkavad

antibiootikumi mõjul surema, tehti plaaditavad lahjendused väiksemad. Hiljem loeti kolooniad ning arvutati CFU ühe milliliitri bakterikultuuri kohta.

Algselt kasutati antibiootikume järgnevate kontsentratsioonidega: ampitsiliin 3 µg/ml, erütromütsiin 400 µg/ml, fosfomütsiin 20 µg/ml, kanamütsiin 6 µg/ml, klooramfenikool 16 µg/ml, norfloksatsiin 0,1 µg/ml, puromütsiin 160 µg/ml ja streptomütsiin 8 µg/ml.

Hiljem kasutati järgnevaid kontsentratsioone: ampitsiliin 0,75, 1,5 ja 3 µg/ml, fosfomütsiin 10, 15 ja 20 µg/ml ning norfloksatsiin 0,025, 0,05 ja 0,1 µg/ml

Tabel 1. Deletsiooniga tüvede valmistamisel kasutatud praimerid.

Praimerid geenide eemaldamiseks vajalike insertide amplifitseerimiseks	
geenid	praimerid
<i>relA</i>	RelAH1 CGATTTTCGGCAGGTCTGGTCCCTAAAGGAGAGGACGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	RelAH2 CAATCTACATTGTAGATACGAGCAAATTTTCGGCCTAATTCCGGGGATCCGTCGACC
<i>relB</i> ja <i>relE</i>	RelBH1 TTGTAATGACATTTGTAATTACAAGAGGTGTAAGACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	RelEH2 CTTCGGTGCGAAACAGAGATGTCATGCTTTGGTTCAATTCCGGGGATCCGTCGACC
<i>rmf</i>	RmfH1 CTTTTCCACCAGAAACCAGTATGAGGGAAACGAGGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	RmfH2 GCAATGCGGAGGTTTCTTTTTAAAGAGACAGAATCAATTCCGGGGATCCGTCGACC
<i>yfiA</i>	YfiAH1 GAATTCACCAAGACGGGAAGACAAGAGGTAAAATTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	YfiAH2 AAGGCGCGTTGGCGATACTCAATATAAAGGACTAATTCCGGGGATCCGTCGACC
<i>yhbH</i>	YhbHH1 AACAACTCGTTTGACCCAACCGATAAGGAAGACACTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	YhbHH2 AGACCGCCATGCACATGCTAATTGCCCGGACAATTAATTCCGGGGATCCGTCGACC
Praimerid <i>knock-out</i> tüvede korrektsuse kontrolliks	
geenid	praimerid
<i>relA</i>	RelAk1 TCTGGTCCCTAAAGGAGAGGA
	RelAk2 CCCTTTCCTCAAACCGCTAT
<i>relB</i> ja <i>relE</i>	RelBk1 CTTCGTGACTTGCCCTAAGC
	RelEk2 GGTGCGAAACAGAGATGTCA
<i>rmf</i>	Rmfk1 CCACCAGAAACCAGTATGAGG
	Rmfk2 CAATGCGGAGGTTTCTTTTT
<i>yfiA</i>	YfiAk1 CCAAGACGGGAAGACAAGAG
	YfiAk2 GCGTTGGCGATACTCAAT
<i>yhbH</i>	YhbHk1 CCCAACCGATAAGGAAGACA
	YhbHk2 GCCATGCACATGCTAATTG

4. TULEMUSED

Kasvu inhibeerimise katse

Erinevate tüvede antibiootikumitundlikkuse määramist alustati $\Delta ssrA$ tüvest. Lisaks $\Delta ssrA$ tüve tundlikkuse leidmisele, taheti nii leida ka antibiootikumide kontsentratsioonide vahemikud, mille järgi saaks valida sobivad vahemikud ka teistele tüvedele. Antibiootikumide kontsentratsioonide vahemik pidi olema selline, kus bakterikultuuride OD-dest joonistuksid graafikud, mille puhul oleksid kaetud piirkonnad antibiootikumi minimaalsest, vahepealsest ja maksimaalsest mõjust.

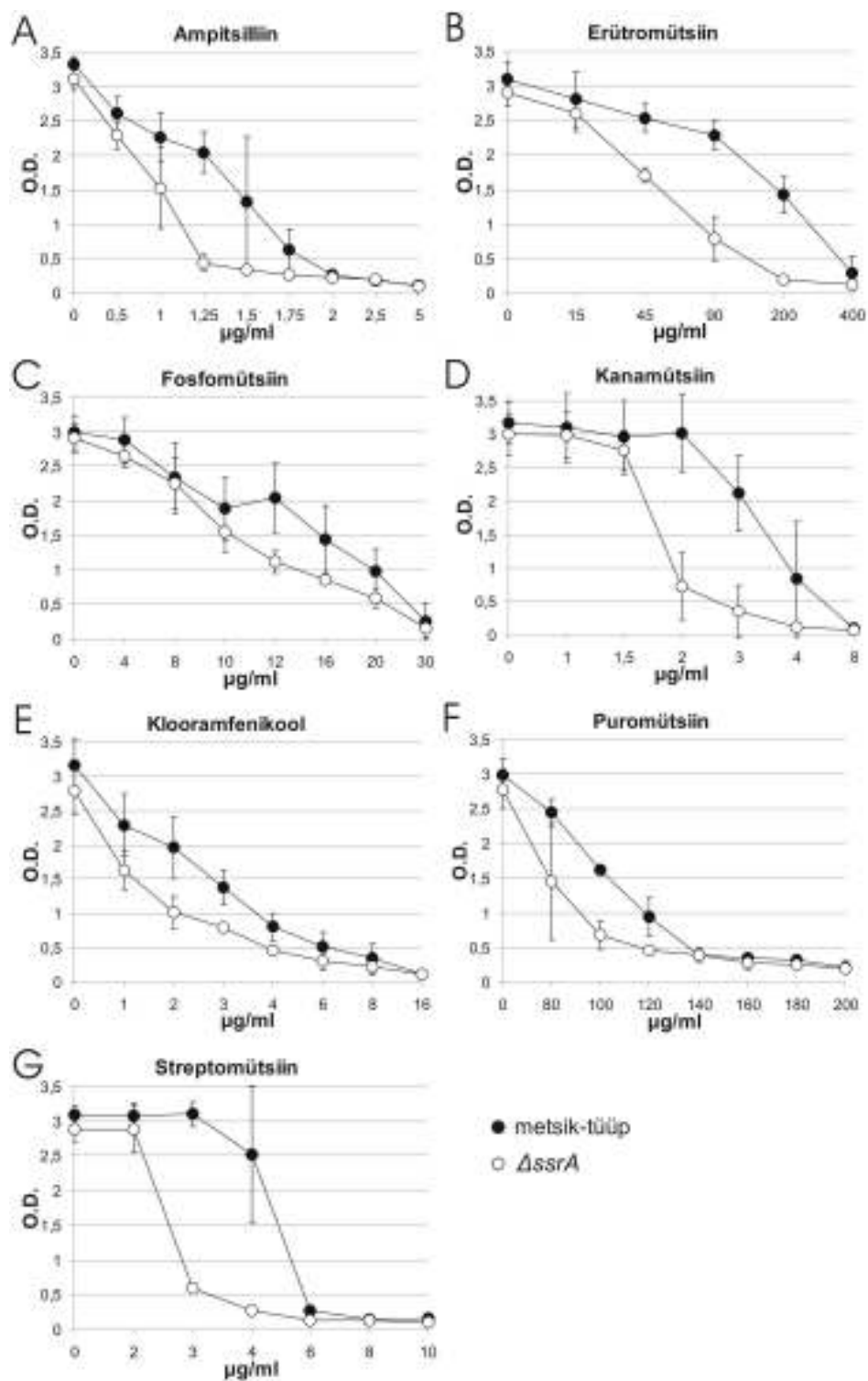
$\Delta ssrA$ tüve testimisel kasutati neljateistkümnet antibiootikumi, millest kaheksa mõjuvad ribosoomile (aminoglükosiid kanamütsiin, klooramfenikool, linkosamiid klindamütsiin, makroliid erütromütsiin, puromütsiin, spektinomütsiin, streptomütsiin ja tetratsükliin) ning ülejäänud kuus (ampitsilliin, fosfomütsiin, fluorokinoloonid norfloksatsiin ja ofloksatsiin, rifampitsiin, trimetoprim) toimivad läbi teiste sihtmärkide.

$\Delta ssrA$ tüvel sooritati allalahjendusi nii statsionaarse kui ka eksponentsiaalse faasi bakterikultuuridest, kusjuures tulemused olid mõlemal juhul üldjoontes samad. Iga antibiootikumiga tehti vähemalt kolm katset.

Ampitsilliini, erütromütsiini, fosfomütsiini, kanamütsiini, klooramfenikooli, puromütsiini ja streptomütsiini korral nähti, et metsik-tüüpi tüvi kasvas paremini kui $\Delta ssrA$ tüvi (Joonis 13). Ampitsilliini juures on oluline, et $\Delta ssrA$ tüve nõrgem kasv ilmnes ainult värske ampitsilliini lahuse kasutamisel. Korduvalt jäätumise ja sulamise tsükli läbi teinud ampitsilliini lahuse korral oli metsik-tüüpi kui ka $\Delta ssrA$ tüvel kasvuerinevust ei olnud (andmeid ei ole näidatud). Võimalik seletus muutunud inhibitsioonimustrile on külmumis-jäätumistsüklite jooksul suhteliselt ebastabiilse ampitsilliini lagunemisel tekkinud laguproduktide ampitsilliinist erineval toimel.

Klindamütsiini, rifampitsiini, spektinomütsiini, tetratsükliini ja trimetoprimi juuresolekul metsik-tüüpi ja $\Delta ssrA$ tüve kasvus olulist erinevust ei olnud (Joonis 14).

Eraldi rühma moodustasid fluorokinoloonid norfloksatsiin ja ofloksatsiin. Nende juuresolekul esines aeg-ajalt nii eksponentsiaalsest kui ka statsionaarsest faasist allalahjendamisel $\Delta ssrA$ tüve suurem tundlikus võrreldes metsik-tüüpi tüvega. Varieeruvuse põhjust me ei suutnud kindlaks teha, kuigi tegime korduvalt katseid, kus enne bakterikultuuri alla



Joonis 13. Kasvu inhibeerimise katse tulemused antibiootikumidega, mille puhul esines kasvu erinevus metsik-tüüpi ja $\Delta ssrA$ tüve vahel. Kasutatud on statsionaarse faasi bakterikultuuri. Ampitsilliin (A), erütromütsiin (B), fosfomütsiin (C), kanamütsiin (D), klooramfenikool (E), puromütsiin (F) ja streptomütsiin (G). Vertikaalteljel on bakterikultuuri tihedus ning horisontaalteljel on antibiootikumi kontsentratsioon. Tulemused on esitatud kolme katse keskmisena.

lahjendamist varieerisime statsionaarse faasis viibimise aega 0 tunnist kuni 30 tunnini (andmed ei ole näidatud). Tulemused näitasid, et kasvuerinevuse ilmumine metsik-tüüpi ja $\Delta ssrA$ tüve vahel ei sõltunud kasvufaasist, ega ka statsionaarses faasis viibimise ajast. Keskmise optiline tihedus rohkem kui 20-st katsest andis mõlemale tüvele sarnase tundlikkuse fluorokinoloonidele (Joonis 14).

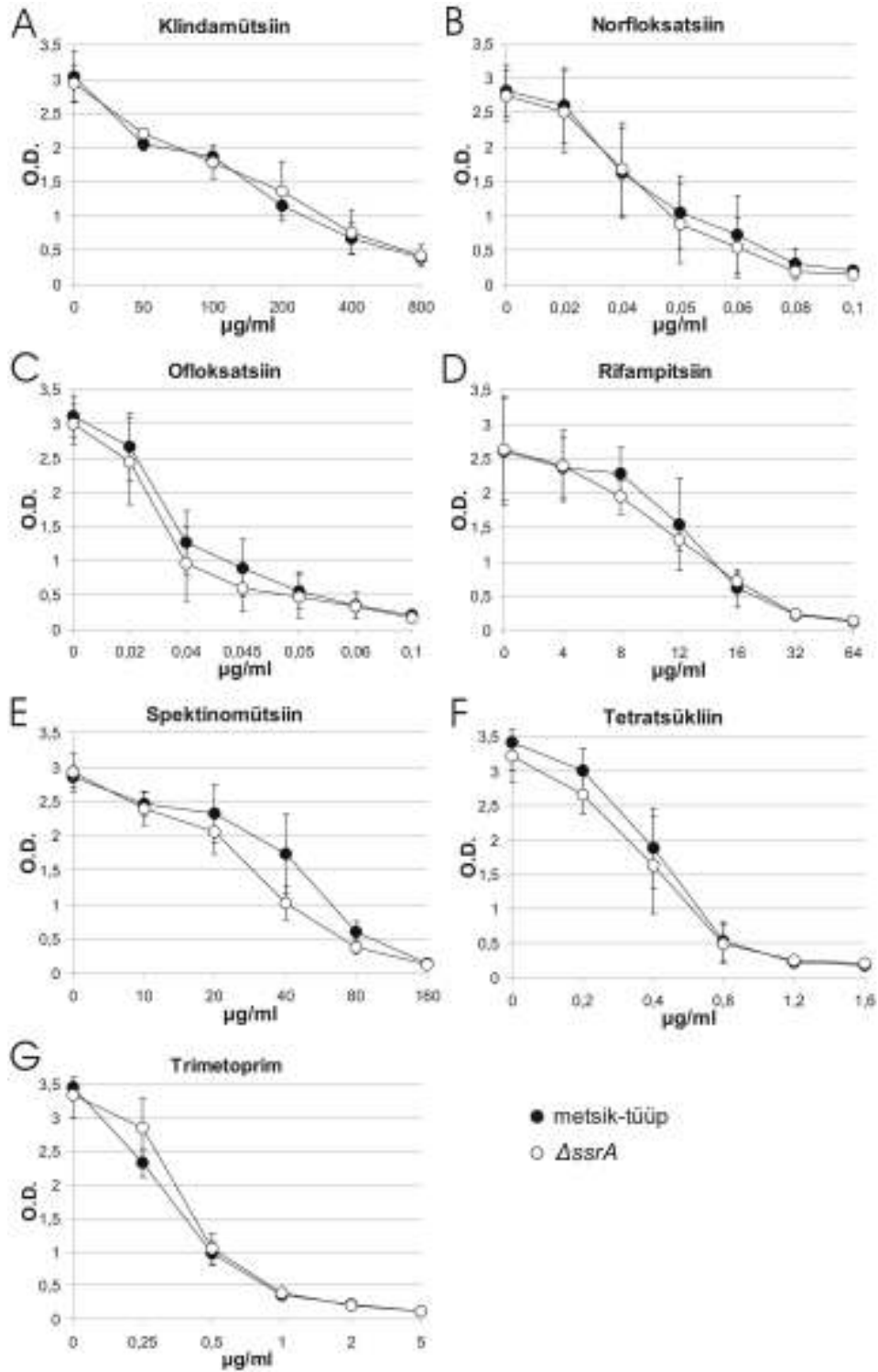
Laiemaks mitmeid tüvesid hõlmavaks testimiseks kaasati 7 antibiootikumi. Antibiootikumide valikul lähtuti, et nad oleksid rohkem levinud ning osa neist toimiks läbi ribosoomi, kuid esindatud oleksid ka teiste sihtmärkidega antibiootikumid. Samuti jälgiti, et oleks kaasatud antibiootikumid, mille juuresolekul esines $\Delta ssrA$ ja metsik-tüüpi tüvede vahel kasvuerinevus, kui ka sellised antibiootikumid, mille juuresolekul kasvuerinevus puudus. $\Delta relA$, $\Delta relBE$, Δrmf , $\Delta yfiA$, $\Delta yhbH$ tüvede testimiseks osutusid valituks aminoglükosiid kanamütsiin, ampitsilliin, klooramfenikool, linkosamiid klindamütsiin, makroliid erütromütsiin, rifampitsiin, trimetoprim. (Joonised 15-18).

Ampitsilliini juuresolekul (Joonis 15A) esines $\Delta relA$ ja $\Delta ssrA$ tüvedel metsik-tüüpi tüvest suurem kasvu inhibitsioon. $\Delta yfiA$ tüvi kasvas metsik-tüüpi tüvega enam-vähem võrdselt. $\Delta relBE$, Δrmf ja $\Delta yhbH$ tüved näitasid aga võrreldes metsik-tüüpi tüvega vähenenud tundlikust, kusjuures igal ühel neist joonistus erineva kujuga graafik.

Kanamütsiini juuresolekul (Joonis 15B) oli metsik-tüüpi tüvest palju tundlikum $\Delta yhbH$ nagu ka $\Delta ssrA$ tüvi. Veidi oli tundlikkus langenud ka $\Delta relA$ tüvel. $\Delta yfiA$ ja metsik-tüüpi tüve tundlikkus oli järjekordselt suhteliselt sarnane ning Δrmf ja $\Delta relBE$ tüvedel oli taas vähenenud tundlikkus võrreldes metsik-tüüpi tüvega.

Rifampitsiini (Joonis 16A), trimetoprimi (Joonis 16B), klooramfenikooli (Joonis 17A), klindamütsiini (Joonis 17B) ja erütromütsiini (Joonis 18) juuresolekul olid kõikide uute tüvede tundlikkused suhteliselt sarnased metsik-tüüpi tüvedele. Trimetoprimi juuresolekul eristusid kergelt ehk $\Delta relA$ ja Δrmf tüved ning klindamütsiini juuresolekul Δrmf tüvi. Siiski jäid nende mutantsete tüvede ja metsik-tüüpi tüve vahelised erinevused suhteliselt väikeseks ja võrreldamatuks ampitsilliini ja kanamütsiini puhul esinenud kasvuinhibitsiooni erinevustega.

Klooramfenikooli (Joonis 17A) ja erütromütsiini (Joonis 18) juuresolekul jäi $\Delta ssrA$ tüvi ainukeseks, mille korral mutantsel tüvel oli suurenenud tundlikkus võrrelduna metsik-tüüpi tüvega.



Joonis 14. Kasvu inhibeerimise katse tulemused antibiootikumidega, mille puhul ei esinenud olulist kasvuerinevust. Kasutatud on statsionaarse faasi bakterikultuuri. Klindamütsiin (A), norfloksatsiin (B), ofloksatsiin (C), rifampitsiin (D), spektinomütsiin (E), tetratsükliin (F) ja trimetoprim (G). Vertikaalteljel on bakterikultuuri tihedus ning horisontaalteljel on antibiootikumi kontsentratsioon. Tulemused on esitatud kolme katse keskmisena, norfloksatsiini ja ofloksatsiini rohkem kui 20 katse keskmisena.

Kasvu inhibeerimise katsetesse, kus kasutati tüvesid $\Delta relA$, $\Delta relBE$, Δrmf , $\Delta yfiA$, $\Delta yhbH$ tuli valida võrreldes $\Delta ssrA$ tüvega läbiviidud katsesse uued ampitsilliini kontsentratsioonid, kuna antibiootikumi võeti uuest varupotikesest ning metsik-tüüpi tüvi oli sealt saadud ampitsilliinile natuke rohkem tundlikum. Ilmselt tulenes selline efekt ebastabiilse ampitsilliini mõningasest lagunemisest. Kõik see tingis $\Delta ssrA$ tüve kaasamise uuesti ampitsilliini kasvu inhibeerimise katsetesse. Samas bakteriotsiidsuse katse oli tehtud esimesest varupotikesest pärit ampitsilliniiga.

Ka trimetoprimi puhul kasutati teiste mutantsete tüvede korral erinevaid kontsentratsioone kui algselt $\Delta ssrA$ tüve korral. Kontsentratsioonid said uuesti valitud kuna selliste kontsentratsioonidega olid piirkonnad antibiootikumi minimaalsest, vahepealsest ja maksimaalsest mõjust paremini kaetud.

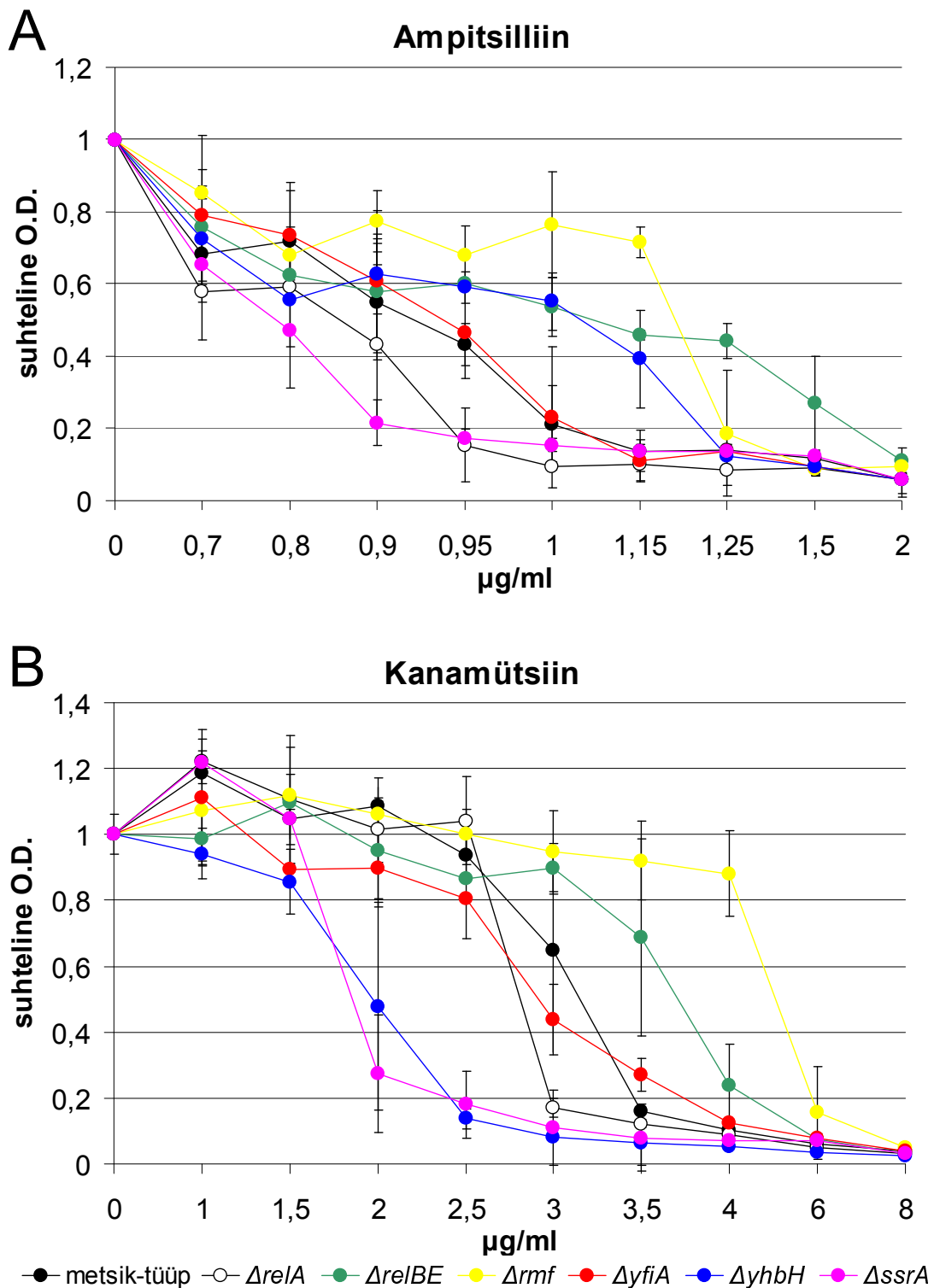
Bakteriotsiidsuse katse

Bakteriotsiidsuse katse on tehtud ainult $\Delta ssrA$ tüvega ning sinna kaasati antibiootikumid, mille puhul esines oluline kasvu inhibitsiooni erinevus $\Delta ssrA$ ja metsik-tüüpi tüve vahel. Niisiis kasutati ampitsilliini, erütromütsiini, fosfomütsiini, kanamütsiini, klooramfenikooli, norfloksatsiini ja streptomütsiini. Kuna nii ofloksatsiini kui ka norfloksatsiini puhul esines aegajalt kasvuerinevus ning nende toimemehhanism on sama, valiti siiski üks neist (norfloksatsiin) bakteriotsiidsuse katsesse. Iga antibiootikumiga viidi katse läbi vähemalt kolm korda.

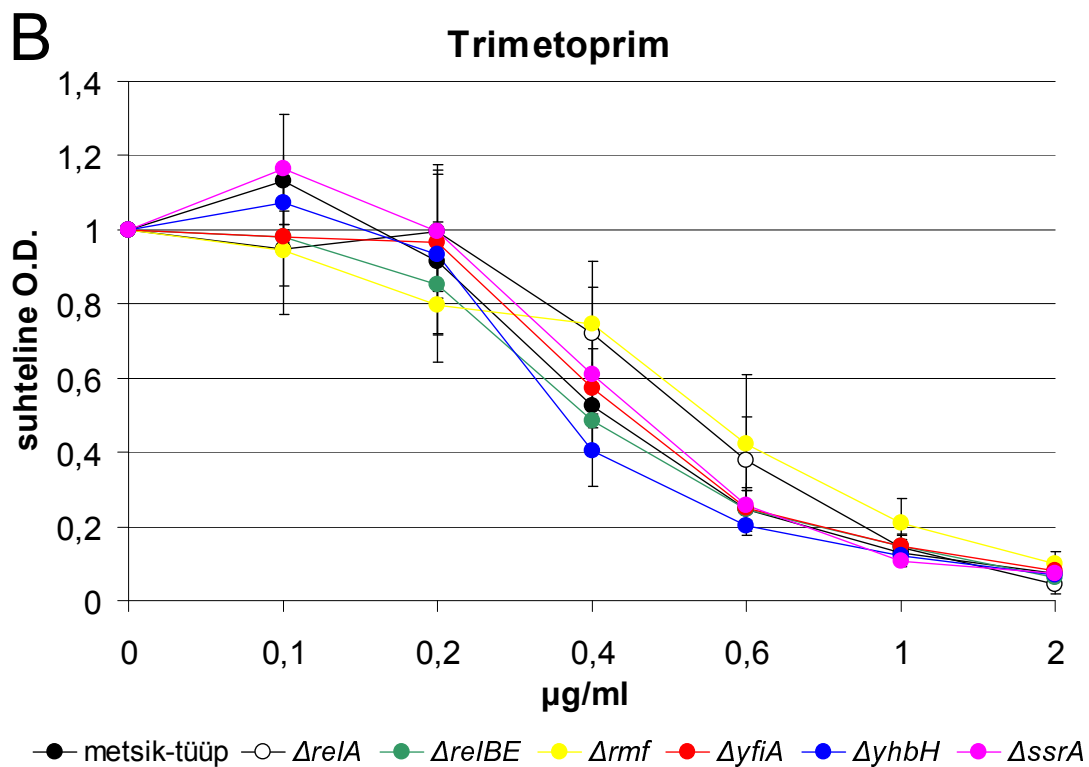
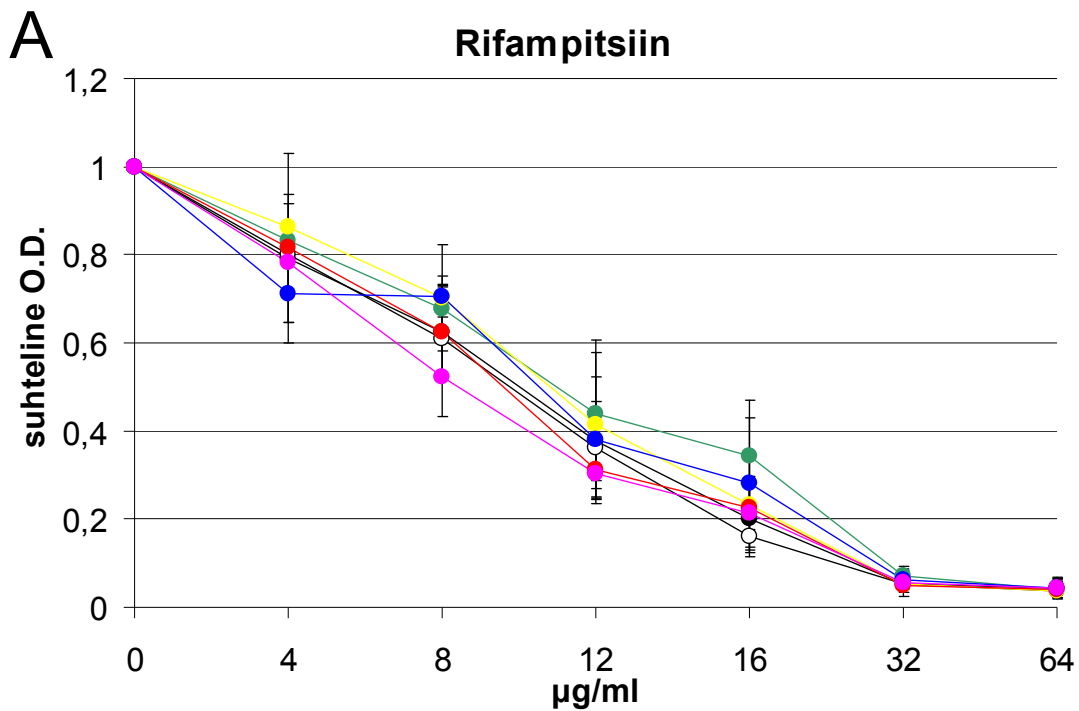
Kasutatavateks kontsentratsioonideks valiti sellised, kus nii metsik-tüüpi kui ka $\Delta ssrA$ tüve kasv oli kasvu inhibeerimise katses inhibeeritud ligikaudu 10 korda. Juhul kui esinevad erinevused CFU/ml dünaamikas, peaksid need rohkem välja tulema just sellistel kontsentratsioonidel.

Fosfomütsiin, kanamütsiin, norfloksatsiin ja streptomütsiin on tuntud kui bakteriotsiidsed antibiootikumid, mis hakkavad kiiresti bakterid tapma. Seetõttu piisas bakteriotsiidsuse katses eelpool nimetatud antibiootikumide puhul ajapunktidest, mis ulatusid peale antibiootikumi lisamist kuuenda kuni kümnenda tunnini.

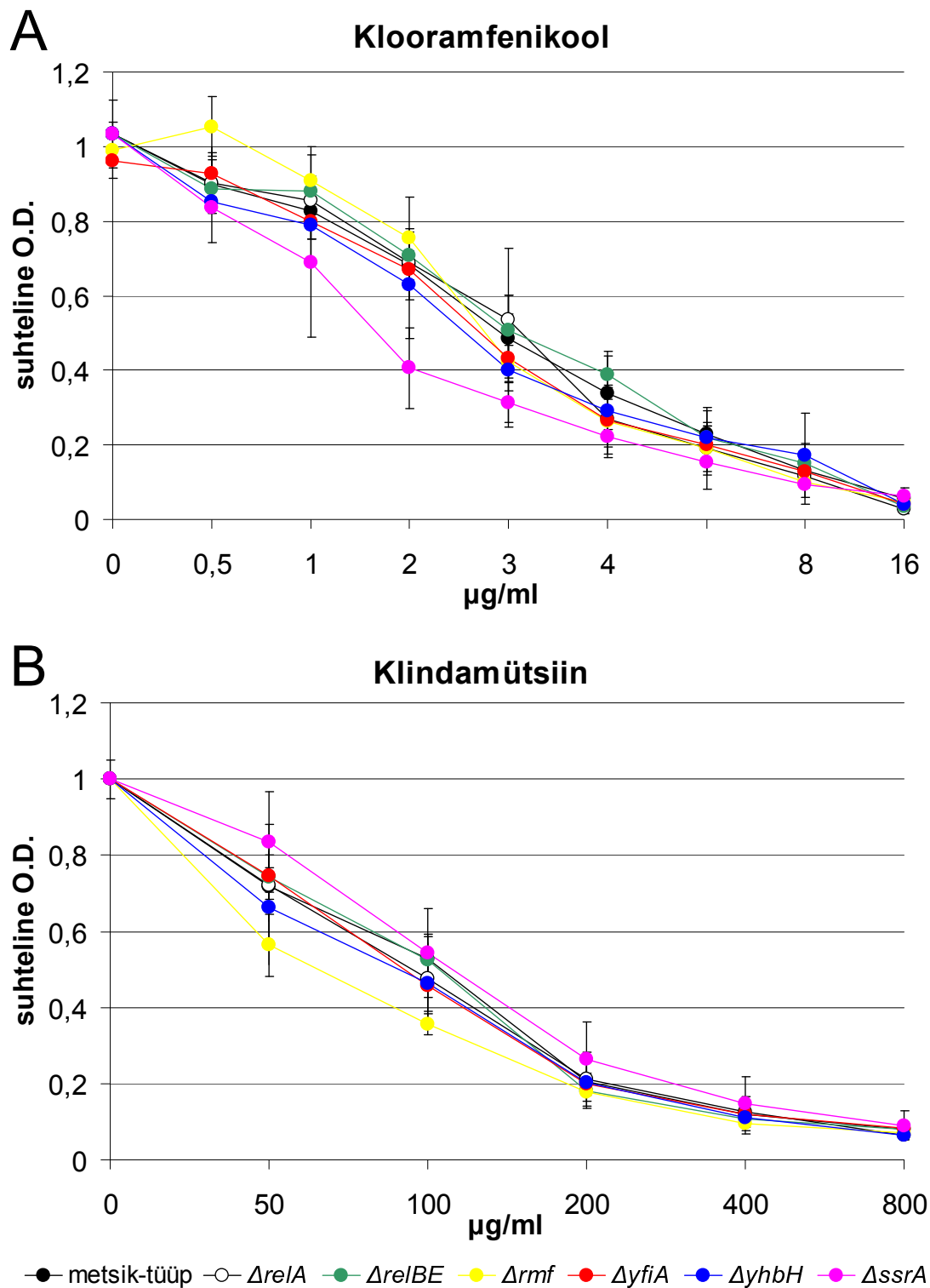
Erütromütsiin ja klooramfenikool omavad bakteriostaatilist toimet ning valitud kontsentratsioonil ei hakka ka puromütsiin bakterid tapma. Lootes näha mingit kasvuerinevust $\Delta ssrA$ ja metsik-tüüpi tüve vahel võeti nende antibiootikumide puhul viimaseks ajapunktiks kahekümnes tund peale antibiootikumi lisamist.



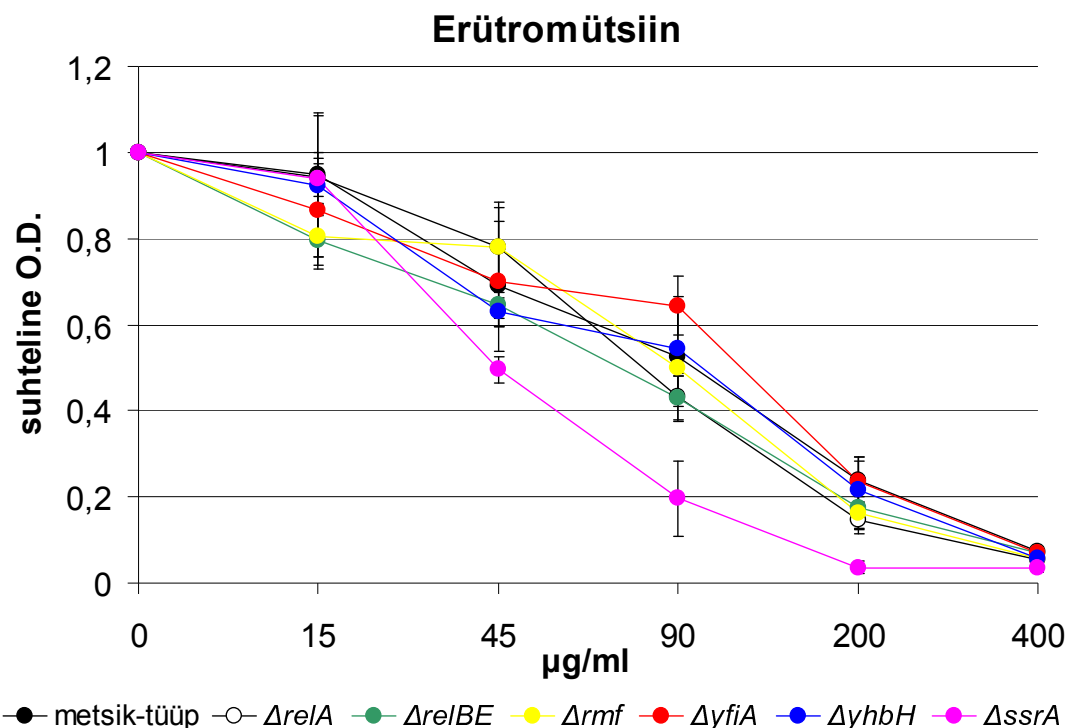
Joonis 15. Metsik-tüüpi ja deletsiooniga tüvede tundlikkus ampitsilliinile (A) ja kanamütsiinile (B). Vertikaalteljel on bakterikultuuri tihedus metsik-tüüpi tüve kontrolli suhtes ning horisontaalteljel on antibiootikumi kontsentratsioon. Tulemused on esitatud kolme katse keskmisena.



Joonis 16. Metsik-tüüpi ja deletsiooniga tüvede tundlikkus rifampitsiinile (A) ja trimetoprimile (B). Vertikaalteljel on bakterikultuuri tihedus metsik-tüüpi tüve kontrolli suhtes ning horisontaalteljel on antibiootikumi kontsentratsioon. Tulemused on esitatud kolme katse keskmisena.



Joonis 17. Metsik-tüüpi ja deletsiooniga tüvede tundlikkus klooramfenikoolile (A) ja klindamütsiinile (B). Vertikaalteljel on bakterikultuuri tihedus metsik-tüüpi tüve kontrolli suhtes ning horisontaalteljel on antibiootikumi kontsentratsioon. Tulemused on esitatud kolme katse keskmisena.



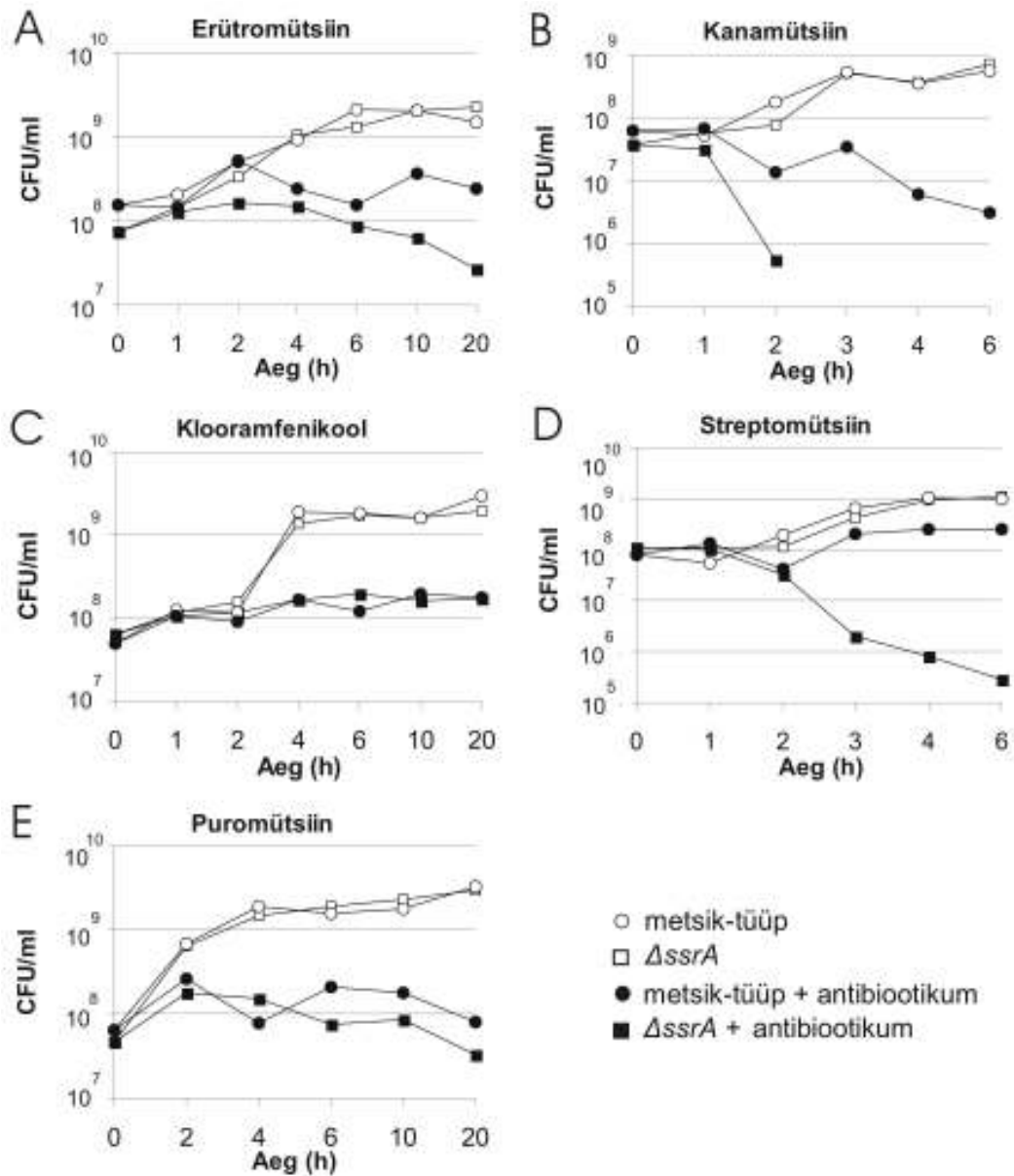
Joonis 18. Metsik-tüüpi ja deletsiooniga tüvede tundlikkus erütromütsiinile. Vertikaalteljel on bakterikultuuri tihedus metsik-tüüpi tüve kontrolli suhtes ning horisontaalteljel on antibiootikumi kontsentratsioon. Tulemused on esitatud kolme katse keskmisena.

Igas ajapunktis plaaditi igast kultuurist lahjendus ning arvestades tehtud lahjendust arvutati tekkinud kolooniatest CFU hulk ühe milliliitri bakterikultuuri kohta.

Klooramfenikooli ja puromütsiini juuresolekul ei esinenud olulisi erinevusi $\Delta ssrA$ ja metsik-tüüpi tüvede CFU/ml dünaamikas. Klooramfenikool lisamisel söötmesse jäi nii $\Delta ssrA$ kui ka metsik-tüüpi tüve korral kolooniate moodustamise võime enam-vähem samale tasemele ja ei muutunud oluliselt isegi 20 tunni möödudes. Väike CFU/ml langus toimus puromütsiini juuresolekul, seejuures püsis metsik-tüüpi tüvel CFU/ml tase natukene kõrgem (Joonis 19).

Kanamütsiini ja streptomütsiini juuresolekul on selgelt näha, et $\Delta ssrA$ tüvel hakkas kolooniate moodustamise võime kiiresti langema. Kanamütsiini lisamisel ei olnud enam kolmandaks tunniks võimalik ühtegi kolooniat lugeda, kuna CFU/ml langes väljapoole kasutatud bakterikultuuri lahjendusega nähtavat CFU/ml piirkonda. Samal ajal hakkas metsik-tüüpi tüvel kanamütsiini juuresolekul CFU/ml ainult aeglaselt vähenema, langedes kuue tunni jooksul vähem

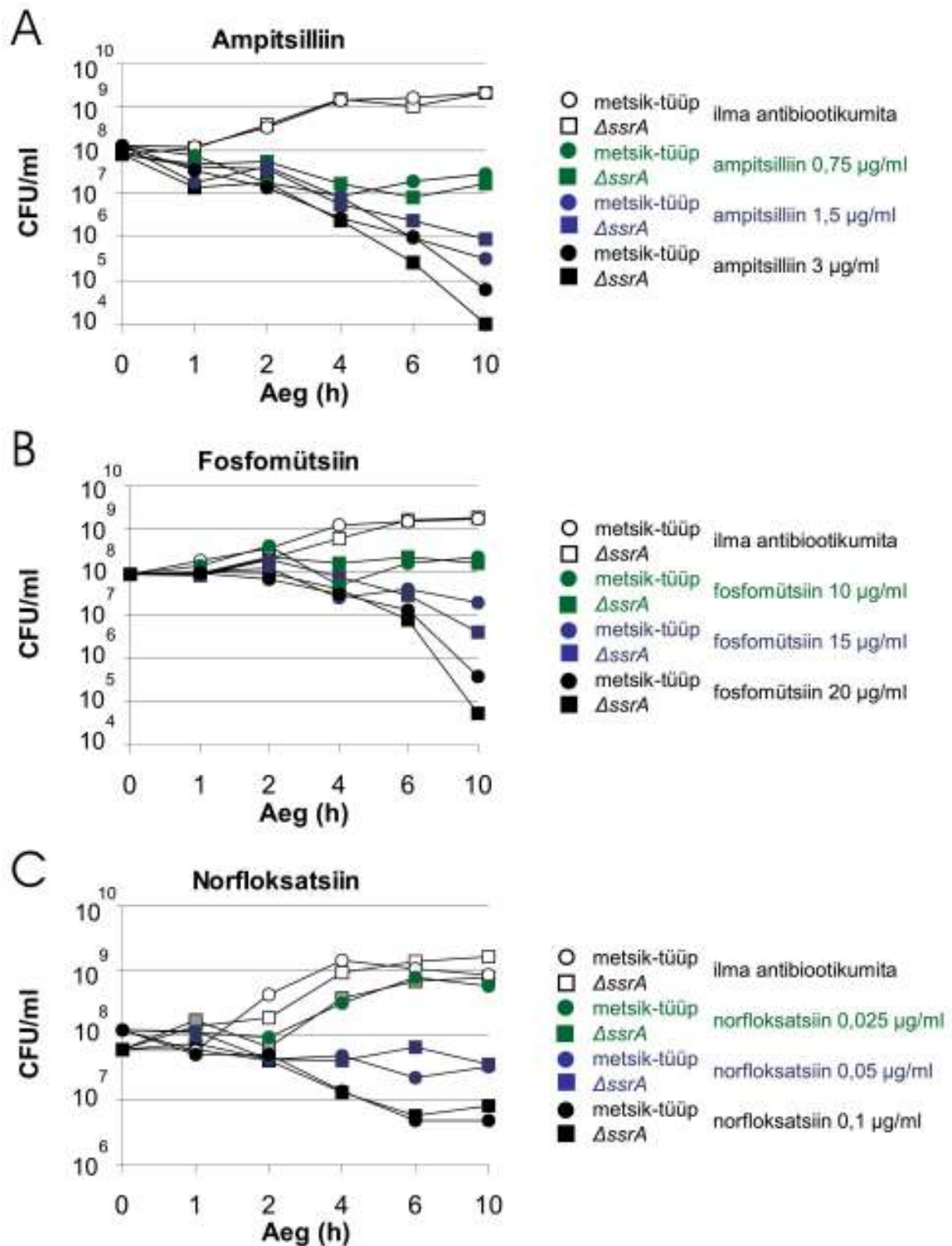
kui kaks suurusjärku. Streptomütsiini juuresolekul ei hakanud metsik-tüüpi tüvel CFU/ml üldse langema, vaid jäi enam-vähem samale tasemele (Joonis 19).



Joonis 19. Bakterikultuuri CFU/ml ajaline sõltuvus läbi ribosoomi mõjuvate antibiootikumide juuresolekul. Kasutatud antibiootikumid: erütromütsiin (400 µg/ml) (A), kanamütsiin (6 µg/ml) (B), klooramfenikool (16 µg/ml) (C), puromütsiin (20 µg/ml) (D) ja streptomütsiin (8 µg/ml) (E). Vertikaalteljel on CFU arv ühes milliliitris bakterikultuuris ning horisontaalteljel on ajapunktid.

Erütromütsiinil oli enamasti näha, et $\Delta ssrA$ tüvel hakkas CFU/ml kahekümnendaks tunniks peale antibiootikumi lisamist mõningal määral langema. Langus ei olnud enamasti suurem kui üks suurusjärg. Metsik-tüüpi tüvel säilis CFU/ml enam-vähem ühtlasel tasemel (Joonis 19).

Ampitsilliini, fosfomütsiini ja norfloksatsiini puhul hakkasid $\Delta ssrA$ ja metsik-tüüpi tüve rakud ligikaudu võrdses tempos surema. Kuna oletasime, et bakterid võisid hakata surema liiga kiiresti, ilma et vahe kahe tüve vahel ilmneks, otsustasime kasutada ka kahte madalamat antibiootikumi kontsentratsiooni. Kokku kasutati kolme erinevat kontsentratsiooni, mis põhjustasid igaüks erineval tasemel kolooniate moodustamise võime muutust. Samade kontsentratsioonide puhul näitasid mõlemad tüved enamasti võrdset kolooniate moodustamise võimet, kuigi ampitsilliini ja fosfomütsiini juuresolekul ilmnis mõningates katsetes metsik-tüüpi tüve kergelt suurem kolooniate moodustamise võime (Joonis 20).



Joonis 20. Bakterikultuuri CFU/ml ajaline sõltuvus teiste sihtmärkidega antibiootikumide juuresolekul. Kasutatud antibiootikumid: ampitsilliin (0,75, 1,5 ja 3 $\mu\text{g/ml}$) (A), fosfomütsiin (10, 15 ja 20 $\mu\text{g/ml}$) (B) ning norfloksatsiin (0,025, 0,05 ja 0,1 $\mu\text{g/ml}$) (C). Vertikaalteljel on CFU arv ühes milliliitris bakterikultuuris ning horisontaalteljel on ajapunktid.

5. ARUTELU

Bakteritel on mitmeid mehhanisme, millega tagatakse valgusünteesiaparaadi võime töötada erinevates stressitingimustes ning töö jätkamine peale stressi. Ribosoomid võivad jääda mRNA-le kinni erinevatel põhjustel ning nende vabastamine toimub läbi *trans*-translatsioon, mida viib läbi tmRNA (Withey & Friedman, 2003). Aminohappe nälja korral tagab RelA poomisvastuse indutseerumise (Magnusson *et al.*, 2005). Aminohappe näljaga kiiremale kohanemisele aitab kaasa ka toksiin-antitoksiini paar RelBE (Christensen *et al.*, 2001). Statsionaarses faasis toimub ribosoomide nn hoiule panek ja stabiliseerimine läbi dimeriseerumise, kus osalevad RMF, YfiA ja YhbH (Ueta *et al.*, 2005).

Kõik need mehhanismid annavad mingis kindlas stressitingimuses metsik-tüüpi tüvele kasvu või kohanemise eelise võrreldes mutantsete tüvedega. Kahjuks ei ole süstemaatiliselt uuritud kõikide translatsiooni moduleerivaid ja kaitsvaid mehhanisme kodeerivate geenide muteerimisel või genoomist eemaldamisel ilmnevaid fenotüüpe. Valdavalt on olemas vaid üksikud uurimused, kus on jälgitud mõne konkreetse geeni eemaldamisel mõnes kindlas stressitingimuses ilmnenu kasvu või stressiga kohanemise häiret. Enamasti on sellisteks stressi tingimusteks kuuma või külma šokk või on jälgitud statsionaarse faasi üleelamist. Selliste andmete puudumine takistab mõistmist, kuidas erinevad translatsiooni kaitsvad ja moduleerivad mehhanismid on omavahel ning bakterifüsioloogiaga seotud.

Eriti vähe on teada translatsiooni moduleerivate ja kaitsvate mehhanismide seosed antibiootikumidega (Abo *et al.*, 2002; de la Cruz & Vioque, 2001; Greenway & England, 1999; Vioque & de la Cruz, 2003). Kuna valgusüntees on väga paljude antibiootikumide sihtmärk (Walsh, 2003), pakuks selline info paljudele huvi ning aitaks mõista laiemaid seoseid antibiootikumide ja bakterifüsioloogia vahel.

Kõige rohkem on teada andmeid *trans*-translatsiooni seotuse kohta antibiootikumidega (Abo *et al.*, 2002; de la Cruz & Vioque, 2001; Vioque & de la Cruz, 2003). Algne *trans*-translatsiooni mudel nägi ette, et ribosoomide vabastamine ja tagasi ringlusesse saatmine toimub poolikute mRNA-de korral, millel puudub stop-koodon (Keiler *et al.*, 1996). Nüüd on juba teada, et *trans*-translatsioon võib toimuda ka tervete mRNA-de korral, kus ribosoom mingil põhjusel peatub. Põhjuseks võib olla ebaefektiivne terminatsioon (Collier *et al.*, 2002), haruldased

koodonid (Hayes *et al.*, 2002b; Roche & Sauer, 2001) või spetsiaalne elongatsiooni peatav järjestus (Sunohara *et al.*, 2004a; Sunohara *et al.*, 2004b).

Ilmselt suudab tmRNA päästa ka antibiootikumide tõttu mRNA-le pidama jäänud ribosoomi, kuna mitmel korral on näidatud, kuidas $\Delta ssrA$ tüvi on mitmetele ribosomaalsetele antibiootikumidele tundlikum kui metsik-tüüpi tüvi (Abo *et al.*, 2002; de la Cruz & Vioque, 2001; Vioque & de la Cruz, 2003). Näidatud ei ole siiski, kuidas muutub ajas mutantse tüve võime moodustada kolooniaid.

Enamasti on võimalik läbi antibiootikumi toimemehhanismi ja tmRNA mõju valgusünteesile seletada, miks osadele ribosomaalsetele antibiootikumidele on $\Delta ssrA$ tüvi tundlikum kui metsik-tüüpi tüvi ja osadele ei ole. Kõige lihtsam on see ilmselt kanamütsiini ja streptomütsiini juuresolekul, mille kasutamisel esines $\Delta ssrA$ ja metsik-tüüpi tüve vahel väga selge erinevus kasvu inhibeerimisel (Joonis 13), mis on kooskõlas ka kirjanduse andmetega (Abo *et al.*, 2002). Kanamütsiin ja streptomütsiin vähendavad translatsiooni täpsust (Ogle *et al.*, 2001). Tagajärjeks on potentsiaalselt toksilised ebanormaalsed valgud, mis tekivad valede aminohapete lülitamisel peptiidahelasse või translatsiooni valeaegsel terminatsioonil. Juhul kui toimub stop-koodoni ülelugemine, võib ribosoom jõuda mRNA 3'-otsa ja sinna pidama jääda. Võimalik, et $\Delta ssrA$ tüve rakkudes jääb suur hulk ribosoomi kiiresti mRNA 3'-otsaga seotuks, kuid funktsionaalset tmRNA-d omavad bakterid suudavad osa ribosoomi vabastada. Sellega hoiaksid nad translatsiooni piisavalt efektiivsena, nii et ribosoomide vähesus ei muutu metsik-tüüpi tüve rakkudele niivõrd ohtlikuks.

Võiks arvata, et mRNA 3'-otsa jõudnud ribosoomide translatsiooni produktid, mida $\Delta ssrA$ tüves kiiresti ei lagundata, võivad olla põhjuseks $\Delta ssrA$ ja metsik-tüüpi tüvede erinevale kasvu inhibitsioonile. Tehtud on katseid SsrA-DD mutandiga (Abo *et al.*, 2002), mille puhul degradatsioonisüsteem ei tunne ära SsrA-märgitud valke. Tundlikkus aminoglükosiidide suhtes oli sellisel tüvel pigem sarnane metsik-tüüpi tüvele. See viitab sellele, et $\Delta ssrA$ tüve suurem kasvu inhibitsioon võrrelduna metsik-tüüpi tüvega on seotud pigem vähesel ribosoomide vabanemisega mRNA-delt ja mitte stop-koodoni ülelugemisel tekkinud ebanormaalsete ning potentsiaalselt toksiliste valkude aeglasema lagundamisega.

Ka klooramfenikooli kasutamisel kasvu inhibeerimise katses esines selge erinevus $\Delta ssrA$ ja metsik-tüüpi tüvede kasvu vahel (Joonis 13). See tulemus langeb kokku ka kirjanduse

andmetega, mis baseeruvad organismidel *Synechocystis* (de la Cruz & Vioque, 2001) ja *E. coli* (Abo *et al.*, 2002).

Kuna klooramfenikooli täpsem toimemehhanism on ribosoomi A-koha tRNA 3'-otsa korraliku seondumise takistamine (Spahn & Prescott, 1996), siis võiks eeldada, et aeg-ajalt toimub ka A-koha tRNA dissotsieerumine ribosoomilt. See annaks tmRNA-le võimaluse seonduda A-kohta ja kuidagi klooramfenikooli vältides jätkata valgusünteesi *trans*-translatsiooniga ning ribosoom mRNA-lt vabastada. Liskas on näidatud, et klooramfenikooli põhjustab ka stop-koodonite ülelugemist (Thompson *et al.*, 2002), mis võib põhjustada arvestatava hulga ribosoomide mRNA 3'-otsa jõudmise ja sinna kinni jäämise. Selliseid ribosoomide saaks tmRNA samuti vabastada.

Huvitaval kombel ei nähtud klindamütsiini juuresolekul kasvuerinevust $\Delta ssrA$ ja metsik-tüüpi tüvede vahel. Linkosamiid klindamütsiin seondub klooramfenikooliga samasse ribosoomi piirkonda ning nad mõlemad inhibeerivad peptidüültransferaasest reaktsiooni, nii et ribosoomi A-kohas olevale tRNA-le ei suudeta peptiidahelat ülekanda (Schlunzen *et al.*, 2001; Spahn & Prescott, 1996). Võimalik, et vahe tuleb sellest, et klooramfenikoolil on stop-koodoni üle lugemist põhjustav aktiivsus, mida klindamütsiinil näidatud ei ole. Samas katsed tsüanobakteriga *Synechocystis* (de la Cruz & Vioque, 2001) näitasid, et klindamütsiiniga struktuurilt väga sarnane linkomütsiin põhjustas $\Delta ssrA$ ja metsik-tüüpi tüve vahel kasvuerinevuse.

Ka puromütsiini juuresolekul oli tmRNA puudumise mõju liikide *Synechocystis* ja *E. coli* tüvedele erinev. Tsüanobakteri *Synechocystis* (de la Cruz & Vioque, 2001) korral ei esinenud kasvuerinevusi, see-eest *E. coli* (Abo *et al.*, 2002) korral oli metsik-tüüpi tüve kasv tugevam kui $\Delta ssrA$ tüvel, mis langeb kokku ka käes oleva töö tulemustega (Joonis 13). Puromütsiin osalbe peptidüültransferaasest reaktsioonis tRNA 3-otsa analoogina nin lõpp kokkuvõttes viib peptidüül-puromütsiini dissotsieerumiseni ribosoomist (Pestka, 1977). Tekib kompleks, kus ribosoom on seotud mRNA-ga ning sellise kompleksi lagunemine on ilmselt suhteliselt aegalane. tmRNA võiks seda protsessi aga kiirendada, viies läbi *trans*-translatsiooni protsessi.

Spektinomütsiini juuresolekul, mis takistab translatsioonilist translokatsiooni, ei nähtud $\Delta ssrA$ ja metsik-tüüpi tüvevahel kasvu inhibeerimise erinevust (joonis 14), mis on kooskõlas varasemate *E. coli* andmetega (Abo *et al.*, 2002). Samas tsüanobakteril *Synechocystis* esines nimetatud kahe tüve vahel erinevus (de la Cruz & Vioque, 2001). Kuna spektionmütsiin häirib EF-G seondumist ribosoomile ja takistab sellega translokatsiooni (Bilgin *et al.*, 1990), on

võimalik, et tmRNA lihtsalt lükkab peptidüül-tRNA A-kohast P-koha ning jätkab *trans*-translatsiooniga. Teoreetiliselt oleks see võimalik, kuna on näidatud, et translokatsioon saab toimuda ka ilma EF-G osaluseta (Fredrick & Noller, 2003).

Huvitaval kombel ei kattu omavahel tsüanobakteri *Synechocystis* ja *E. coli* metsik-tüüpi ja $\Delta ssrA$ tüvede kasvuerinevustemuster linkosamiidide, puromütsiini ja spektinomütsiini vahel. Eeldades, et tmRNA-st tulenev eelis metsik-tüüpi tüvele tuleneb otseselt mõjust translatsioonile jääme sellise efekti seletamisel hätta. Samas võivad need erinevused tulla ka erinevatest meetoditest (tahke või vedel sööde), millega võrreldi antibiootikumide mõju kasutatud tüvedele või siis sellest, et mõnes töös kasutati kontsentratsioone, mille juures kasvuerinevused ei tule lihtsalt välja.

Erütromütsiin põhjustas $\Delta ssrA$ ja metsik-tüüpi tüve vahel samuti kasvu inhibitsiooni erinevuse (Joonis 13), mis langeb kokku varasemate katsetega liikidel *Synechocystis* ja *E. coli* (Abo *et al.*, 2002; de la Cruz & Vioque, 2001). Erütromütsiin põhjustab valgusünteesi seiskumise takistades peptiidahela kasvamist peptiidi väljumistunnelis, mis toob kaasa lühikese peptiidahelaga peptidüül-tRNA-de dissotsieerumise ribosoomist (Hansen *et al.*, 2002). Sarnaselt puromütsiiniga tekib ka siin kompleks, kus ribosoom jääb mRNA-ga seotuks. Kasvuerinevust kahe tüve vahel saaks seletada sellega, et tmRNA vabastab ribosoomi, tagades sellega raku suurema valgusünteesivõime.

Tetratsükliin omakorda ei põhjustanud $\Delta ssrA$ ja metsik-tüüpi tüve vahel kasvuerinevust (Joonis 14), mis vastab ka varem avaldatud andmetele (Abo *et al.*, 2002; de la Cruz & Vioque, 2001). Tetratsükliin ei takista tRNA·EF-Tu·GTP kolmik-kompleksi seondumist ribosoomile, vaid põhjustab tRNA lahkumise ribosoomist alles peale GTP hüdrolüüsi. Sellist tsükliit korrates takistab raku kasvu lisaks valgusünteesi seiskumisele ka GTP liigne tarbimine (Brodersen *et al.*, 2000). Võimalik, et tetratsükliini mõju juures ongi GTP liigne hüdrolüüs ja raku energiavarude kulutamine olulisem kui valgusünteesi peatumine. Sellisel juhul ei saakski tmRNA tetratsükliini mõju kuidagi vähendada ning metsik-tüüpi tüvele kasvueelise anda.

Üllataval kombel leidis ka mõningaid otseselt ribosoomile mitte mõjuvaid antibiootikume, mille juuresolekul $\Delta ssrA$ tüve ja metsik-tüüpi tüve vahel esinesid kasvuerinevused. Samas ei ole varasemates katsetes selliste antibiootikumidega kasvuerinevust metsik-tüüpi ja $\Delta ssrA$ tüve vahel nähtud.

Näiteks oli norfloksatsiini ja ofloksatsiini juuresolekul aeg-ajalt näha $\Delta ssrA$ tüve suurem tundlikkus võrreldes metsik-tüüpi tüvega. Kahjuks me ei suutnud välja selgitada, millest tulenes selline varieeruvus erinevate katsete vahel ning rohkem kui 20 katse keskmisena joonistunud graafikud olid metsik-tüüp ja $\Delta ssrA$ tüvel sarnased (Joonis 14). Varem on näidatud, et kinoloon nalidiksiinhape ei põhjusta kasvuerinevusi $\Delta ssrA$ ja metsik-tüüpi tüve vahel (Abo *et al.*, 2002). Nalidiksiinhappe toimemehhanism on sama, mis fluorokinoloonidel (Walsh, 2003), nad inhibeerivad topoisomeraaside tööd ja peatavad lõppkokkuvõttes replikatsiooni.

Ampitsilliini ja fosfomütsiini puhul oli $\Delta ssrA$ ja metsik-tüüpi tüve vahel samuti kasvuerinevus (Joonis 13). Huvitaval kombel ei ole varem ampitsilliini juuresolekul $\Delta ssrA$ tüvel suuremat tundlikust võrreldes metsik-tüüpi tüvega nähtud (Abo *et al.*, 2002; de la Cruz & Vioque, 2001). Meie nägime erinevusi kahe tüve vahel, alles siis kui kasutasime värsket ampitsilliini lahust. Võimalik, et varasemates töodes ei kasutatud värsket vaid seisnud ja osaliselt lagununud ampitsilliini lahuseid. Nii ampitsilliini kui ka fosfomütsiini takistavad rakukesta sünteesi. Siiski leidub ka rakukesta ja tmRNA vahel teatav seos. Nimelt osaleb tmRNA SecA ekspressiooni regulatsioonis (Collier *et al.*, 2004). SecA on ATPaas, mis osaleb SecY/E/G sekretsiooni-kompleksi töös. Võimalik, et $\Delta ssrA$ tüvi ei suuda SecA ekspressiooni häirumise tõttu piisavalt hästi vastata ekstratsellulaarsetele stressidele.

On teada, et antibiootikumid võivad muuta raku füsioloogiat ja indutseerida mitmeid erinevaid stressivastuseid (Bianchi & Baneyx, 1999; Goh *et al.*, 2002; Sabina *et al.*, 2003; Shapiro & Baneyx, 2002; Shaw *et al.*, 2003; VanBogelen & Neidhardt, 1990). Seoses sellega on võimalik, et ehk tmRNA suudab vähendada ka mõnda antibiootikumide poolt põhjustatud stressi, olles ise osaline mõnes stressivastuses. Seda toetavad faktid, et tmRNA põhifunktsioon ei ole ainult mRNA-le kinni jäänud ribosoomide vabastamise ja poolikute valkude degradatiooni suunamine. tmRNA osaleb ka mitmetes regulatsiooniprotsessides ning on oluline komponent mõnes rakulises metabolismi protsessis (Abo *et al.*, 2000; Collier *et al.*, 2004; Keiler & Shapiro, 2003a; Pedersen *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003) Lisaks esineb teatud stressitingimustes nii *E. coli* kui ka *B. subtilis*'e $\Delta ssrA$ tüvedel võrreldes metsik-tüüpi tüvega suurem kasvu inhibitsioon (Komine *et al.*, 1994; Muto *et al.*, 2000).

Kuigi ampitsilliini ja fosfomütsiini toime ning tmRNA vahel on hüpoteetilisi seoseid, on siiski suhteliselt mõistlik oletada, et tmRNA osaleb mõnes stressivastuses ning suudab vähendada mõningate antibiootikumide poolt esilekutsutud stresside.

Üks kirjeldatud stressivastus, mida antibiootikumid esile kutsuvad, on külmašoki vastus. Külmašoki vastust kutsuvad muuhulgas esile ka klooramfenikool, erütromütsiin ja tetratsükliin (VanBogelen & Neidhardt, 1990). Nendest ainult tetratsükliini suhtes ei olnud $\Delta ssrA$ tüvi tundlikum kui metsik-tüüpi tüvi. Samas kuumašoki vastust indutseerivatele antibiootikumidele kanamütsiin, streptomütsiin ning puromütsiin (VanBogelen & Neidhardt, 1990) oli $\Delta ssrA$ tüvi kõigile tundlikum kui metsik-tüüpi tüvi. Seetõttu on raske tmRNA-d seostada konkreetsete stressivastusega ning tmRNA seosed erinevate stressi vastustega on ilmselt suhteliselt komplitseeritud.

Kuna antibiootikumide juures on oluline omadus võime tappa bakterid, siis sai ka jälgitud, kuidas muutub antibiootikumide juuresolekul metsik-tüüpi tüve ja $\Delta ssrA$ tüvede kolooniate moodustamise võime (Joonis 19 ja 20). Kasutati ainult selliseid antibiootikume, mille juuresolekul esines kasvu erinevus kasvuinhibitsiooni katsetes. Fluorokinolonidest, mis samuti aegajalt põhjustasid kasvuerinevusi, kasutati norfloksatsiini.

$\Delta ssrA$ tüvi näitas suurt kolooniate moodustumise võime langust võrreldes metsik-tüüpi tüvega vaid kanamütsiini ja streptomütsiini juuresolekul (Joonis 19). Ilmselt suudab siis tmRNA hoida mRNA-le kinnijäänud ribosoomide hulga madala ja suunata lagundamisele ka mRNA 3'-otsa jõudnud ribosoomide translatsiooni produktid, mida $\Delta ssrA$ tüves kiiresti ei lagundata.

Aminoglükosiidide ja streptomütsiini bakteriotsiidsuse põhjuseks peetakse vigaderohke translatsiooni produkte, millel võib olla tavatu hüdrofoobsuse muster, mistõttu nad satuvad kergelt rakumembraani koostisesse ja põhjustavad rakumembraani läbilaskvuse muutust (ebaloomulikud valgud tekivad nn kanaleid), mis saabki bakterile ohtlikuks (Davis *et al.*, 1986). Huvitav oleks teada, kuidas muutub SsrA-DD mutandil bakteriotsiidsus. Kasvuinhibitsioon oli SsrA-DD mutandil küll sarnasem metsik-tüüpi tüvele (Abo *et al.*, 2002), kuid kui eeldada, et bakteriotsiidsus on põhjustatud ebaloomulikest valkudest, siis võiks arvata, et bakteriotsiidsus on sarnasem $\Delta ssrA$ tüvele. Ei saadeta ju mRNA 3'-otsa jõudnud ribosoomide poolt sünteesitud ebaloomulikud valgud lagundamisele nagu metsik-tüüpi tüves, mistõttu need valgud võivad samuti rakumembraani koostisesse sattuda. Võimalik, et SsrA-DD mutandile mõjuksid aminoglükosiidid ja streptomütsiin veel bakteriotsiidsemalt kui $\Delta ssrA$ tüvele, kuna ribosoomid võivad korduvalt jõuda mRNA 3'-otsa ja sedasi ebaloomulikke valke tekitada.

Teised bakteriotsiidsed antibiootikumid mõjusid nii metsik-tüüpi kui ka $\Delta ssrA$ tüvele võrdse bakteriotsiidsusega (Joonis 20).

Bakteriostaatilise erütromütsiini juuresolekul hakkas $\Delta ssrA$ tüvel korduvalt koloonite moodustamise võime viimastes ajapunktide kergelt langema, mis tõttu mõjus erütromütsiin $\Delta ssrA$ tüvele kergelt bakteriotsiidset. Metsik-tüüpi tüvel jäi kolooniate moodustamise võime samale tasemele või pigem tõusis (Joonis 19).

Samas bakteriostaatilise klooramfenikooli ja valitud kontsentratsioonil bakteriostaatilise puromütsiini juuresolekul, käitusid mõlemad tüved võrdselt ja nende CFU/ml jäi püsivaks või langes suhteliselt vähe (Joonis 19).

Teiste mutantsete tüvede korral kasutati kasvu inhibeerimise katses vähem antibiootikume ja olulised vahed võrreldes metsik-tüüpi tüvega tulid ainult ampitsilliini ja kanamütsiini juuresolekul (Joonis 15). Huvitav, et seejuures nad mõlemad põhjustavad bakterite surma läbi memraani kahjustuse (Davis *et al.*, 1986; Kernodle, 2000). Veelgi huvitavam on seejuures, et geenide eemaldamine mõningatel juhtudel suurendas tundlikkust antibiootikumidele, mõningatel kordadel aga hoopis vähendas.

Kuigi tulemused $\Delta ssrA$ tüvega viisid oletusele, et tmRNA osaleb stressivastustes, mis vähendavad erinevates antibiootikumidest tingitud rakulist stressi, saab *trans*-translatsiooni vahetu mõjuga seletada ka mõningate antibiootikumide suuremat mõju $\Delta ssrA$ tüvele. Samamoodi saaks ka mõningate teiste mutantsete tüvede puhul kasvuerinevust metsik-tüüpi tüvega seletada eemaldatud geeni otsese mõjuga.

$\Delta relBE$ tüvi on ampitsilliinile ja kanamütsiinile vähem tundlik kui metsik-tüüpi tüvi (Joonis 15). Kuna on teada, et toksiin-antitoksiin paar MazEF-i poolt põhjustatud rakusurm on bakteris *E. coli* indutseeritav mitmete antibiootikumide poolt, oletatakse, et ka teised toksiin-antitoksiin süsteemid (seal hulgas RelBE) võivad olla kaasatud antibiootikumidega seotud rakusurma (Sat *et al.*, 2001; Sat *et al.*, 2003).

Käesolevas töös kasutatud meetoodika puhul sõltub nähtav kasvuinhibitsioon kahest komponendist: rakkude kasvu ja jagunemise aeglustumine/peatumine ning rakkude suremine. Bakteriostaatiliste antibiootikumide puhul on tegemist ainult esimese komponendiga, bakteriotsiidsete antibiootikumidel juuresolekul aga mõlemaga, seejuures on raske on öelda, kui suured on nende osakaalud. Võimalik on, et madalamate kontsentratsioonide juures tuleb kasvuinhibitsioon põhiliselt kasvu ja jagunemise aeglustumisest, kõrgematel kontsentratsioonidel hakkab määravamaks saama aga rakkude suremine. Ilmselt sõltub see siiski konkreetsest antibiootikumist.

Nüüd kui üks oletatav rakusurma põhjustav mehhanism on RelBE näol puudu, võib juhtuda, et rakkude suremise komponent hakkab mõju avaldama alles kõrgema antibiootikumi kontsentratsiooni juures. Ilmselt on siis rakkude surma põhjustavad mehhanismid madalama antibiootikumi kontsentratsiooni juures kokkuvõttes nõrgemad või puudub madalama kontsentratsiooni juures aktiveeruv rakusurma põhjustav mehhanism. Nii saaks seletada, miks *ΔrelBE* tüvi on ampitsilliinile ja kanamütsiinile vähem tundlik kui metsik-tüüpi tüvi.

Rifampitsiin ja trimetoprim on samuti bakteriotsiidid, kuid nende juuresolekul ei esinenud metsik-tüüpi ja *ΔrelBE* tüve vahel kasvuerinevust. Võimalik, et nende antibiootikumide juuresolekul muutub rakkude suremist põhjustav kasvuinhibitsiooni komponent oluliseks alles kõrgematel kontsentratsioonidel, kus rakkude kasv ja jagunemine on juba peatunud ning rakkude suremist põhjustavad mehhanismid, mis on RelBE puudumise tõttu kokkuvõttes nõrgemad, ei jõuagi oma osa kasvuinhibitsioonis etendada. Teiseks võimaluseks on, et rakkude suremist põhjustav komponent muutub küll suuremate kontsentratsioonide korral olulisemaks aga RelBE süsteem aktiveerub alles kõrgematel kontsentratsioonidel, kus rakkude kasv on juba peatunud. On ka võimalik, et nende antibiootikumide juuresolekul RelBE ei aktiveerugi.

Selline käsitlus lubab eeldada, et rakkude suremisega võivad olla seotud mitmed mehhanismid, võimalik, et ka kõik toksiin-antitoksiin paarid. Et sellist hüpoteesi kontrollida on meil praegu käsil kõikide *E. coli* teadaolevate toksiin-antitoksiin paarideide ükshaaval eemaldamine genoomist. Hiljem on plaanis vaadata saadud mutantide antibiootikumitundlikkust.

Eelnevale tuleks siiski lisada rifampitsiini, klooramfenikooli, spektinomütsiini (Sat *et al.*, 2001) ja trimetoprimi juuresolekul (Sat *et al.*, 2003) on näidatud, et rakusurm on põhjustatud ainult MazEF toksiin-antitoksiin süsteemist, sest *ΔmazEF* tüves eelpool nimetatud antibiootikumid enam kolooniate moodustamise võime langust esile kutsuda ei suutnud. Huvitav on see, et spektinomütsiin ja klooramfenikool on klassikalised bakteriostaatilised antibiootikumid, mistõttu tuleks saadud tulemustesse ettevaatlikult suhtuda. Ka nähti klooramfenikooli ja spektinomütsiini juuresolekul erinevusi ainult minimaalsöötmetel kasvatades.. Sellest võib eeldada, et antibiootikumidest tingitud rakusurmaga seotud toksiin-antitoksiin paarid (juhul kui neid on ikkagi mitu) võivad aktiveeruda ka erinevatel tingimustel. See omakorda lubab oletada iga konkreetse tingimuse korral võib rakkude suremine olla aktiveeritud antibiootikumi erineva kontsentratsiooni juures ja rakkude suremisega võib olla seotud ka erinev toksiin-antitoksiin süsteem või süsteemid.

Kuna sellised oletused jätavad väga palju lahtisi otsi ning on äärmiselt hüpoteetilised, jääme huviga ootama kasvu inhibeerimise katse tulemusi teiste toksiin-antitoksiin paaride deletsiooni mutantidega. Kui ka teistel mutantidel esineb väiksem tundlikkus kanamütsiinile ja ampitsilliinile, suurendab see võimalust, et kasvuinhibitsioon neile antibiootikumidele sõltub suuresti rakkude suremise komponendist ning MazEF ei ole ainuke toksiin-antitoksiin paar, mis on antibiootikumide indutseeritud rakkude suremisega seotud. Aga selleks oleks vaja teha toksiin-antitoksiin paaride deletsiooni mutantidega ka bakteriotsiiduse katseid, et vaadata, kuidas muutub antibiootikumi juuresolekul bakterikultuuri kolooniate moodustamise võime. Juhul kui neil tüvedel on antibiootikumi juuresolekul kolooniate moodustamise võime suurem kui metsik-tüüpi tüvel, saab suurema kindlusega oletada, et kasvu inhibeerimise katses esinev $\Delta relBE$ tüve (võimalik, et ka teistel toksiin-antitoksiin paaride deletsiooni mutantidel esinev) vähenenud tundlikkus ampitsilliinile ja kanamütsiinile on seotud RelBE osalusega antibiootikumidest tingitud rakusurmas.

relA mutant oli ampitsilliinile ja vähemal määral ka aminoglükosiid kanamütsiinile tundlikum kui metsik-tüüpi tüvi (joonis 15). See langeb kokku varasemate andmetega, kus on näha, et β -laktaam antibiootikumide ja aminoglükosiidi gentamütsiini minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon (MIC) oli $\Delta relA$ tüvel väiksem kui metsik tüüpi tüvel (Greenway & England, 1999). Sama nähti ka trimetoprimi juuresolekul, kuid käesolevas töös oli metsik-tüüpi ja $\Delta relA$ tüvede kasv trimetoprimi puhul sarnane (joonis 16). Tähele tuleb panna, et kasutatud on kahte erinevat lähenemist antibiootikumitundlikkuse määramisel, millest võivad tulla ka erinevused trimetoprimi juuresolekul. Võimalik, et ka meie katsetes oleks $\Delta relA$ ja metsik-tüüpi tüvi MIC järgi võetuna näidanud erinevat tundlikkust trimetoprimile.

Kuna aeglaselt kasvavates rakkudes on ppGpp kontsentratsioon suurem kui kiiresti kasvavates tüvedes ning aeglaselt kasvavad tüved on ka erinevatele antibiootikumitele vastupidavamad, siis oletakse, et just kõrgem ppGpp tase tagab suurema vastupanuvõime mõningatele antibiootikumidele (Cozens *et al.*, 1986; Greenway & England, 1999).

Bakteritel *H. influenzae* ja *E. coli* on näidatud, et streptomütsiin ja trimetoprim põhjustab ppGpp taseme tõusu, samas mitmed läbi ribosomi mõjuvad antibiootikumid (sh puromütsiin, erütromütsiin, klooramfenikool) ning rifampitsiin viivad jälle ppGpp taseme alla (Evers *et al.*, 2001). Need andmed sobivad valdavalt käesoleva töö $\Delta relA$ tüve tulemustega ja suures osas piisavad selgitamiseks $\Delta relA$ tüve suuremat tundlikkust ainult osadele antibiootikumidele. Ilmselt

reageeritakse metsik-tüüpi tüves ppGpp sõltuva σ^S juhitud stressivastusega ainult neile antibiootikumidele, millele $\Delta relA$ tüvi oli tundlikum kui metsik-tüüpi tüvi. $\Delta relA$ tüvi ei suuda ilmselt sellist ppGpp sõltuva σ^S juhitud stressivastust oma puuduliku (p)ppGpp sünteesi aktiivsusega läbi viia.

ppGpp ise on positiivseks regulaatoriks σ^S -le (Gentry *et al.*, 1993), mis omakorda on üldise stressivastuse regulaator. σ^S aktiveerub paljude stresside korral: toitainete nälg, pH langus, temperatuuri langus ja tõus, statsionaarne faas jne (Loewen *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2005). σ^S defektne tüvi näitas väga sarnast suurenenud antibiootikumitundlikkust nagu ka RelA mutant ja RelA ning SpoT topeltmutant (Greenway & England, 1999), mis viitab σ^S ja ppGpp seotusele ühises vastuses antibiootikumidele. See tähendaks, et ka kanamütsiin ja ampitsilliin, millele $\Delta relA$ tüvi oli tundlikum kui metsik-tüüpi tüvi (Joonis 15), võiksid põhjustada σ^S ekspressiooni tõusu, kuid geeni ekspressioon uuringud näitavad, et ainult kanamütsiini juuresolekul indutseeritakse σ^S ekspressioon (Shaw *et al.*, 2003). Võimalik, et RelA seos tundlikkusega ampitsilliinile toimub σ^S sõltuvast mehhanismist erinevalt.

relA mutantse tüve tundlikkus ampitsilliinile ega ka kanamütsiinile ei ole nii suur kui $\Delta srrA$ tüvel, mis tekitab huvi teada saada, kui suur oleks RelA ja SpoT topeltmutandi tundlikkus neile antibiootikumidele. $\Delta relA$ tüves on siiski mõningane (p)ppGpp sünteesi võime olemas, mis ilmselt teataval määral suudaks indutseerida bakeri vastust antibiootikumidele ning vähendada bakteri tundlikkust antibiootikumile. Nüüd kui kaotada ka SpoT võime (p)ppGpp-d sünteesida, peaks kõikide eelduste kohaselt mutantse tüve tundlikkus veelgi suurenema.

ppGpp ja σ^S rolli ainult osadele antibiootikumidele reageerimises toetab ka fakt, et bakteritel *S. typhimurium* ja *E. coli* ei erine *relA* mutandi transkriptsiooniprofiil paljude antibiootikumide (sh erütromütsiin, rifampitsiin ja mõned vähem levinud antibiootikumid) juuresolekul metsik-tüüpi tüve transkriptsiooniprofiilist (Goh *et al.*, 2002; Sabina *et al.*, 2003). Erinevust on nähtud ainult mupirotsiini korral (Sabina *et al.*, 2003).

Ribosoomide dimeriseerumises osalevate geenide eemaldamisel saadud mutantide korral olid kasvuinhibitsioonimustrid samuti väga põnevad. Kuigi $\Delta yfiA$ tüve tundlikkus sarnanes kõikide antibiootikumide juuresolekul metsik-tüüpi tüve tundlikkusega, erinesid Δrmf ja $\Delta yhbH$ tüved oma tundlikkusega ampitsilliinile ja kanamütsiinile tunduvalt metsik-tüüpi tüvest.

On teada, et geen *rmf* on reguleeritud ppGpp poolt (Izutsu *et al.*, 2001) ning on võimalik, et ampitsilliini ja kanamütsiini juuresolekul ppGpp tase metsik-tüüpi tüves tõuseb. Tulenevalt

sellest võib ka transkriptsioon *rmf* -ilt olla aktiveeritud ning RMF-i hulk tõusta. Kuigi enamasti seostatakse RMF-i ribosoomide dimeriseerumisega (Wada, 1998) on tõendeid, et RMF võib seonduda 70S ribosoomidega ilma, et ta põhjustaks dimerisatsiooni (el-Sharoud & Niven, 2005; Niven, 2004). Ilmselt moodustub sellisel juhul translatsiooniliselt inaktiivne kompleks, mis on stabiilsem kui ilma RMF-ita 70S ribosoom. Δrmf tüves selliseid inaktiivseid ribosoomide komplekse ei saaks moodustuda, mis võib viia selleni, et Δrmf tüves oleks üldine valgusünteesi võime suurem. Suurem valgusünteesi võime võiks omakorda tähendada, et rakk suudab suuremal määral sünteesida valke, mis oleksid antibiootikumidest tingitud stressi üleelamiseks vajalikud. Samas kui arvestada, et kanamütsiin muudab valgusünteesi vigaderohkemaks, ei pruugi paljalt suuremast valgusünteesi võimest kasu olla, kuna siis sünteesitaks rohkem bakterile potentsiaalselt kahjulikke valke.

YfiA korral on näidatud, et ta suudab suurendada valgusünteesi täpsust (Agafonov & Spirin, 2004) ning samuti vähendab ribosoomide translatsioonilist aktiivsust (Agafonov *et al.*, 2001). Δrmf tüves võiks YfiA eelistatult ribosoomidega seonduda, kuna RMF ja YfiA seondumiskohad ribosoomis on ilmselt kattuvad ja nad konkureerivad omavahel ribosoomiga seondumises (Ueta *et al.*, 2005). Juhul kui YfiA ekspressioon on kanamütsiini juuresolekul indutseeritud, saab YfiA takistada valgusünteesi täpsuse vähenemist, nii et kanamütsiinist tingitud valgusünteesi täpsuse langus ja selle tõttu sünteesitud ebaloomulikud valgud ei ohusta enam nii suurel määral baktereid. Siiski on YfiA ekspressiooni regulatsioon vähe uuritud ning on raske öelda, kas YfiA on ka antibiootikumide juuresolekul ekspresseerunud. Praegu on teada, et YfiA ekspressioon indutseeritakse külmašoki korral ja statsionaarsesse faasi sisenemisel (Agafonov *et al.*, 2001). Lisaks oletatakse, et YfiA reguleerib külmašoki korral ribosoomide mRNA spetsiifikat šoki paremaks üleelamiseks vajalike valkude sünteesi suunas. Võimalik, et ka antibiootikumide juuresolekul suunab YfiA valgusünteesi suunas, mis on vajalik antibiootikumidest tingitud stressi paremaks üleelamiseks. Kuna *yfiA* puudumine bakteris erilist efekti ei andnud, jääb mulje, et YfiA ei pruugi siiski antud töös kasutatud antibiootikumide juuresolekul ekspresseeruda või ekspresseerumise korral olulist rolli mängida.

$\Delta yhbH$ tüvi oli kanamütsiinile tundlikum ja ampitsiliinile vähem tundlik kui metsik-tüüpi tüvi (Joonis 15). Kuna YhbH kohta on äärmiselt vähe teada, on raske selgitada $\Delta yhbH$ tüve antibiootikumitundlikkust. YhbH ekspresseerub samuti statsionaarses faasis ning on valdavalt seondunud dimeriseerunud ribosoomidega moodustades 100S ribosoomi (Maki *et al.*, 2000; Ueta

et al., 2005). Kuna YhbH järjestus on sarnane YfiA-le ning nende seondumiskoht ribosoomiga on sama, võib oletada, et ka YhbH võiks omada valgusünteesis mRNA spetsiifikat suunavat võimet või vähendada valgusünteesil vigade arvu. Võimalik, et YhbH on ka seotud Δrmf tüve omapärase antibiootikumitundlikkusega. Siiski peab arvestama, et YhbH mõju bakterifüsioloogiale on hoopis teine kui YfiA-l, kuna antibiootikumitundlikkuse muster $\Delta yhbH$ ja $\Delta yfiA$ tüve vahel on väga erinev.

Jääme lootma, et YfiA ja YhbH edasine kirjeldamine aitab ehk selgitada Δrmf , $\Delta yfiA$ ja $\Delta yhbH$ tüvel esinenud antibiootikumitundlikkuse põhjuseid. Lähiajal on meil endal plaanis mõõta, kuidas muutub Δrmf , $\Delta yfiA$ ja $\Delta yhbH$ tüve valgusünteesi täpsus. Saadud tulemused aitaksid hinnata YfiA võimalikku valgusünteesi täpsust suurendavast omadusest tulenevat rolli eelpool nimetatud tüvede antibiootikumitundlikuses.

$\Delta relA$, $\Delta relBE$, Δrmf ja $\Delta yhbH$ tüvega on plaanis teha veel bakteriotsiidsuse katseid, mis aitaksid täpsustada ja selgitada geeni eemaldamisega genoomist ilmnevaid nähtusi ning näidata kuidas muutub antibiootikumi bakteriostaatilised või bakteriotsiidsed omadused. Pole ka välistatud kasvuinhibeerimise katsete tegemine veel mõne antibiootikumiga (norfloksatsiin, puromütsiin), mis samuti aitaks selgitada translatsiooni moduleerivate geenide rolli antibiootikumitundlikuses.

RelA, RelBE, RMF ja YhbH olid põhiliselt seotud tundlikkusega ainult kanamütsiinile ja ampitsiliinile, mis võib viidata, et ribosoomiga seotud faktorid osalevad stressivastustes ainult nendele antibiootikumidele. tmRNA see-eest oli seotud ka tundlikkusega erütromütsiinile ja klooramfenikoolile. Eeldusel, et translatsiooniga seotud faktorid on proovitud antibiootikumide puhul seotud valdavalt vaid stressivastustega kanamütsiinile ja ampitsilliinile siis tmRNA puhul võiks efekti klooramfenikooli ja erütromütsiini tundlikkusele seletada tmRNA otsese mõjuga antibiootikumidest häiritud translatsioonile.

Kuna on suur huvi ühendite vastu (Markham *et al.*, 1999), mis võimendaksid hetkel olemas olevate ravimite toimet, võib väita, et tmRNA, RelA ja YhbH oleksid head potentsiaalsed sihtmärgid ühenditele, millega saaks võimendada mitmete läbi ribosoomi ja rakukesta sünteesi mõjuvate antibiootikumide toimet.

KOKKUVÕTE

Siia maani ei ole süstemaatiliselt uuritud erinevate translatsiooni moduleerivate geenide eemaldamisel genoomist tekkivaid fenotüüpe. Käesolev töö on osa sellisest laialdasest projektist, mis üritab seda tühimikku täita ning keskendub erinevate antibiootikumide poolt põhjustatud fenotüüpidele. Seejuures on oluline, et varem on vaid üksikutel kordadel kirjeldatud translatsiooni moduleerivate geenide suhtes mutantsete tüvede antibiootikumitundlikkust, kusjuures enamasti on kasutatud suhteliselt vähe erineva toimega antibiootikume.

Käesolevas töös selgus, et $\Delta ssrA$ tüvi oli metsik-tüüpi tüvest paljudele läbi ribosoomi toimivatele antibiootikumidel tundlikum, kusjuures enamusi neid efekte saab selgitada läbi antibiootikumi poolt häiritud valgusünteesi ja *trans*-translatsiooni omavahelise toime. Siiski selgus, et $\Delta ssrA$ tüvi oli tundlikum ka mõningatele otseselt ribosoomile mitte mõjuvate antibiootikumide juuresolekul (ampitsilliin, fosfomütsiin), mis viitab, et tmRNA mõjutab ka antibiootikumide poolt põhjustatud stressivastusteid.

Lisaks leiti, et tmRNA puudumine võimendas tunduvalt kanamütsiini ja streptomütsiini bakteriotsiidset mõju ning tmRNA puudumisel muutus ka muidu bakteriostaatiline erütromütsiin kergelt bakteriotsiidseks.

Teiste mutantsete tüvede ($\Delta relA$, $\Delta relBE$, Δrmf , $\Delta yfiA$ ja $\Delta yhbH$) korral kasutati 7 suhteliselt erineva toimega antibiootikumi, millest ainult kanamütsiini ja ampitsilliini juuresolekul nähti olulisi erinevusi mutantsete tüvede antibiootikumitundlikkuses. Äärmiselt huvitav on, et mõningatel mutantidel suurenes ($\Delta relA$) ja mõningatel vähenes tundlikkus kanamütsiinile ja ampitsilliinile ($\Delta relBE$, Δrmf , $\Delta yhbH$ tüvi oli aga kanamütsiinile tundlikum ja ampitsilliinile vähem tundlik kui metsik-tüüpi tüvi. *yfiA* puudumine ei põhjustanud aga üldse antibiootikumitundlikkuse muutust.

Tähelepanuväärne on, et häirides mõningaid protsesse ($\Delta relBE$ ja Δrmf tüved), mis moduleerivad ja kaitsevad valgusünteesi, suureneb bakteri vastupanuvõime antibiootikumidele (sealhulgas valgusünteesi inhibeerivale kanamütsiinile). Iseenesest on see teataval määral paradoksaalne ja kindlasti edasist uurimist väärt, mis on ka plaanis.

tmRNA, RelA ja YhbH võiksid olla sihtmärgiks ühenditele, mis võimendaksid mitmete antibiootikumide toimet.

SUMMARY

Since now there is no systematic research aimed to observe phenotypes caused by the deletion of genes modulating translation. This work is a part of project that attempts to fill this gap and concentrates on the antibiotic sensitivity phenotypes. It is important to note that only a few cases exist when antibiotic sensitivity of mutants defective in the genes modulating translation modulating are described. And even a limited number of different antibiotics has been used.

During current work we saw that $\Delta ssrA$ cells are more sensitive to many ribosome targeting antibiotics as compared to the wild-type cells. Therefore these sensitization effects are explainable by the action of the *trans*-translation on the antibiotic affected translation. However, the $\Delta ssrA$ strain is also more sensitive to antibiotics targeting other sites than ribosome (fosfomicin and ampicillin) as compared to the wild-type strain. This refers that tmRNA also influences the antibiotic triggered stress responses.

Additionally, we found that the absence of tmRNA enhances bactericidal activity of kanamycin and streptomycin. We saw also that the bacteristatic erythromycin has small bactericidal effect to the tmRNA defective cells.

In case of the other defective strains ($\Delta relA$, $\Delta relBE$, Δrmf , $\Delta yfiA$ and $\Delta yhbH$) seven antibiotics with relatively different targets were used. Only in case of kanamycin and ampicillin the changed sensitivities to the antibiotics were observed. Interestingly there were some defective strains were the susceptibility to kanamycin and ampicillin increased ($\Delta relA$) or quite the contrary decreased ($\Delta relBE$ and Δrmf). The $\Delta yhbH$ cells were more sensitive to kanamycin and less sensitive to ampicillin compared to the wild-type cells. Deletion of *yfiA* didn't cause any sensitization effect.

It is remarkable that disturbing processes that are modulating and protecting protein synthesis (in the $\Delta relBE$ and Δrmf strains) causes resistance to antibiotics (including ribosome targeting antibiotics). By itself it is to an extent paradoxical and certainly worth of further investigations.

Since there is an increasing interest in searching for novel compounds that would potentiate the effect of the current antibiotics the tmRNA, RelA and YhbH could be targets for such compounds.

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.
- Abo, T., Ueda, K., Sunohara, T., Ogawa, K. & Aiba, H. (2002).** SsrA-mediated protein tagging in the presence of miscoding drugs and its physiological role in Escherichia coli. *Genes Cells* **7**, 629-638.
- 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. & Spirin, A. S. (2004).** The ribosome-associated inhibitor A reduces translation errors. *Biochem Biophys Res Commun* **320**, 354-358.
- Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H. & Glaser, G. (1996).** An Escherichia coli chromosomal "addiction module" regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6059-6063.
- Appelbaum, P. C. & Hunter, P. A. (2000).** The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents* **16**, 5-15.
- Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, S., Vassylyeva, M. N., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S. & Vassylyev, D. G. (2004).** Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell* **117**, 299-310.
- Avarbock, A., Avarbock, D., Teh, J. S., Buckstein, M., Wang, Z. M. & Rubin, H. (2005).** Functional regulation of the opposing (p)ppGpp synthetase/hydrolase activities of RelMtb from Mycobacterium tuberculosis. *Biochemistry* **44**, 9913-9923.
- Barends, S., Karzai, A. W., Sauer, R. T., Wower, J. & Kraal, B. (2001).** Simultaneous and functional binding of SmpB and EF-Tu-TP to the alanyl acceptor arm of tmRNA. *J Mol Biol* **314**, 9-21.
- 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.

- Bech, F. W., Jorgensen, S. T., Diderichsen, B. & Karlstrom, O. H. (1985).** Sequence of the relB transcription unit from Escherichia coli and identification of the relB gene. *Embo J* **4**, 1059-1066.
- Bianchi, A. A. & Baneyx, F. (1999).** Stress responses as a tool To detect and characterize the mode of action of antibacterial agents. *Appl Environ Microbiol* **65**, 5023-5027.
- Bilgin, N., Richter, A. A., Ehrenberg, M., Dahlberg, A. E. & Kurland, C. G. (1990).** Ribosomal RNA and protein mutants resistant to spectinomycin. *Embo J* **9**, 735-739.
- Block, R. & Haseltine, A. W. (1975).** Purification and properties of stringent factor. *J Biol Chem* **250**, 1212-1217.
- Blondeau, J. M. (2004).** Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv Ophthalmol* **49 Suppl 2**, S73-78.
- Bolon, D. N., Grant, R. A., Baker, T. A. & Sauer, R. T. (2004).** Nucleotide-dependent substrate handoff from the SspB adaptor to the AAA+ ClpXP protease. *Mol Cell* **16**, 343-350.
- Bordeau, V. & Felden, B. (2002).** Ribosomal protein S1 induces a conformational change of tmRNA; more than one protein S1 per molecule of tmRNA. *Biochimie* **84**, 723-729.
- 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.
- Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Carter, A. P., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T. & Ramakrishnan, V. (2000).** The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* **103**, 1143-1154.
- Bubunenko, M. G. & Subramanian, A. R. (1994).** Recognition of novel and divergent higher plant chloroplast ribosomal proteins by Escherichia coli ribosome during in vivo assembly. *J Biol Chem* **269**, 18223-18231.
- Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A. & Darst, S. A. (2001).** Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell* **104**, 901-912.
- Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T. & Ramakrishnan, V. (2000).** Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**, 340-348.
- Champney, W. S. & Burdine, R. (1995).** Macrolide antibiotics inhibit 50S ribosomal subunit assembly in Bacillus subtilis and Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2141-2144.

- Chang, D. E., Smalley, D. J. & Conway, T. (2002).** Gene expression profiling of Escherichia coli growth transitions: an expanded stringent response model. *Mol Microbiol* **45**, 289-306.
- Chatterji, D. & Ojha, A. K. (2001).** Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr Opin Microbiol* **4**, 160-165.
- Chopra, I. & Roberts, M. (2001).** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**, 232-260.
- 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., Pedersen, K., Hansen, F. G. & Gerdes, K. (2003).** Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *J Mol Biol* **332**, 809-819.
- Christensen, S. K. & Gerdes, K. (2004).** Delayed-relaxed response explained by hyperactivation of RelE. *Mol Microbiol* **53**, 587-597.
- Christensen, S. K., Maenhaut-Michel, G., Mine, N., Gottesman, S., Gerdes, K. & Van Melderen, L. (2004).** Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in Escherichia coli: involvement of the yefM-yoeB toxin-antitoxin system. *Mol Microbiol* **51**, 1705-1717.
- Collier, J., Binet, E. & Bouloc, P. (2002).** Competition between SsrA tagging and translational termination at weak stop codons in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **45**, 745-754.
- Collier, J., Bohn, C. & Bouloc, P. (2004).** SsrA tagging of Escherichia coli SecM at its translation arrest sequence. *J Biol Chem* **279**, 54193-54201.
- Corvaisier, S., Bordeau, V. & Felden, B. (2003).** Inhibition of transfer messenger RNA aminoacylation and trans-translation by aminoglycoside antibiotics. *J Biol Chem* **278**, 14788-14797.
- Cozens, R. M., Tuomanen, E., Tosch, W., Zak, O., Suter, J. & Tomasz, A. (1986).** Evaluation of the bactericidal activity of beta-lactam antibiotics on slowly growing bacteria cultured in the chemostat. *Antimicrob Agents Chemother* **29**, 797-802.
- 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.

- Davis, B. D., Chen, L. L. & Tai, P. C. (1986).** Misread protein creates membrane channels: an essential step in the bactericidal action of aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 6164-6168.
- de la Cruz, J. & Vioque, A. (2001).** Increased sensitivity to protein synthesis inhibitors in cells lacking tmRNA. *Rna* **7**, 1708-1716.
- DeLisa, M. P., Wu, C. F., Wang, L., Valdes, J. J. & Bentley, W. E. (2001).** DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 5239-5247.
- Diderichsen, B., Fiil, N. P. & Lavalley, R. (1977).** Genetics of the relB locus in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **131**, 30-33.
- Dong, G., Nowakowski, J. & Hoffman, D. W. (2002).** Structure of small protein B: the protein component of the tmRNA-SmpB system for ribosome rescue. *Embo J* **21**, 1845-1854.
- Douthwaite, S. (1992).** Interaction of the antibiotics clindamycin and lincomycin with *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* **20**, 4717-4720.
- Douthwaite, S. (2001).** Structure-activity relationships of ketolides vs. macrolides. *Clin Microbiol Infect* **7 Suppl 3**, 11-17.
- Drider, D., DiChiara, J. M., Wei, J., Sharp, J. S. & Bechhofer, D. H. (2002).** Endonuclease cleavage of messenger RNA in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **43**, 1319-1329.
- el-Sharoud, W. M. & Niven, G. W. (2005).** The activity of ribosome modulation factor during growth of *Escherichia coli* under acidic conditions. *Arch Microbiol* **184**, 18-24.
- Evers, S., Di Padova, K., Meyer, M., Langen, H., Fountoulakis, M., Keck, W. & Gray, C. P. (2001).** Mechanism-related changes in the gene transcription and protein synthesis patterns of *Haemophilus influenzae* after treatment with transcriptional and translational inhibitors. *Proteomics* **1**, 522-544.
- Farrell, C. M., Grossman, A. D. & Sauer, R. T. (2005).** Cytoplasmic degradation of ssrA-tagged proteins. *Mol Microbiol* **57**, 1750-1761.
- Felden, B., Massire, C., Westhof, E., Atkins, J. F. & Gesteland, R. F. (2001).** Phylogenetic analysis of tmRNA genes within a bacterial subgroup reveals a specific structural signature. *Nucleic Acids Res* **29**, 1602-1607.
- Flynn, J. M., Levchenko, I., Seidel, M., Wickner, S. H., Sauer, R. T. & Baker, T. A. (2001).** Overlapping recognition determinants within the ssrA degradation tag allow modulation of proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10584-10589.

- Fredrick, K. & Noller, H. F. (2003).** Catalysis of ribosomal translocation by sparsomycin. *Science* **300**, 1159-1162.
- 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.
- 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., Christensen, S. K. & Lobner-Olesen, A. (2005).** Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol* **3**, 371-382.
- Gillet, R. & Felden, B. (2001a).** Transfer RNA(Ala) recognizes transfer-messenger RNA with specificity; a functional complex prior to entering the ribosome? *Embo J* **20**, 2966-2976.
- Gillet, R. & Felden, B. (2001b).** Emerging views on tmRNA-mediated protein tagging and ribosome rescue. *Mol Microbiol* **42**, 879-885.
- Givens, R. M., Lin, M. H., Taylor, D. J., Mechold, U., Berry, J. O. & Hernandez, V. J. (2004).** Inducible expression, enzymatic activity, and origin of higher plant homologues of bacterial RelA/SpoT stress proteins in *Nicotiana tabacum*. *J Biol Chem* **279**, 7495-7504.
- Goh, E. B., Yim, G., Tsui, W., McClure, J., Surette, M. G. & Davies, J. (2002).** Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 17025-17030.
- Gotfredsen, M. & Gerdes, K. (1998).** The *Escherichia coli* relBE genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Mol Microbiol* **29**, 1065-1076.
- Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y. & Sauer, R. T. (1998).** The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev* **12**, 1338-1347.
- Greenway, D. L. & England, R. R. (1999).** The intrinsic resistance of *Escherichia coli* to various antimicrobial agents requires ppGpp and sigma s. *Lett Appl Microbiol* **29**, 323-326.
- Gromadski, K. B. & Rodnina, M. V. (2004).** Streptomycin interferes with conformational coupling between codon recognition and GTPase activation on the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 316-322.

- Gropp, M., Strausz, Y., Gross, M. & Glaser, G. (2001).** Regulation of Escherichia coli RelA requires oligomerization of the C-terminal domain. *J Bacteriol* **183**, 570-579.
- Gualerzi, C. O., Giuliodori, 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. (2004a).** Pre-binding of small protein B to a stalled ribosome triggers trans-translation. *J Biol Chem*.
- Hallier, M., Ivanova, N., Rametti, A., Pavlov, M., Ehrenberg, M. & Felden, B. (2004b).** Pre-binding of small protein B to a stalled ribosome triggers trans-translation. *J Biol Chem* **279**, 25978-25985.
- Hallier, M., Desreac, J. & Felden, B. (2006).** Small protein B interacts with the large and the small subunits of a stalled ribosome during trans-translation. *Nucleic Acids Res* **34**, 1935-1943.
- Hansen, J. L., Ippolito, J. A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2002).** The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol Cell* **10**, 117-128.
- Hayes, C. S., Bose, B. & Sauer, R. T. (2002a).** Proline residues at the C terminus of nascent chains induce SsrA tagging during translation termination. *J Biol Chem* **277**, 33825-33832.
- Hayes, C. S., Bose, B. & Sauer, R. T. (2002b).** 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. & 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.
- Herman, C., Thevenet, D., Bouloc, P., Walker, G. C. & D'Ari, R. (1998).** Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the Escherichia coli protease HflB (FtsH). *Genes Dev* **12**, 1348-1355.
- Hersch, G. L., Baker, T. A. & Sauer, R. T. (2004).** SspB delivery of substrates for ClpXP proteolysis probed by the design of improved degradation tags. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12136-12141.
- 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.

Hong, S. J., Tran, Q. A. & Keiler, K. C. (2005). Cell cycle-regulated degradation of tmRNA is controlled by RNase R and SmpB. *Mol Microbiol* **57**, 565-575.

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.

Hutchison, C. A., Peterson, S. N., Gill, S. R., Cline, R. T., White, O., Fraser, C. M., Smith, H. O. & Venter, J. C. (1999). Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science* **286**, 2165-2169.

Hutter, B., Schaab, C., Albrecht, S. & other authors (2004). Prediction of mechanisms of action of antibacterial compounds by gene expression profiling. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2838-2844.

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

Ivanova, N., Pavlov, M. Y., Felden, B. & Ehrenberg, M. (2004). Ribosome rescue by tmRNA requires truncated mRNAs. *J Mol Biol* **338**, 33-41.

Ivanova, N., Pavlov, M. Y., Bouakaz, E., Ehrenberg, M. & Schiavone, L. H. (2005). Mapping the interaction of SmpB with ribosomes by footprinting of ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* **33**, 3529-3539.

Jensen, R. B. & Gerdes, K. (1995). Programmed cell death in bacteria: proteic plasmid stabilization systems. *Mol Microbiol* **17**, 205-210.

Johnson, C. H., Kruft, V. & Subramanian, A. R. (1990). Identification of a plastid-specific ribosomal protein in the 30 S subunit of chloroplast ribosomes and isolation of the cDNA clone encoding its cytoplasmic precursor. *J Biol Chem* **265**, 12790-12795.

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., Susskind, M. M. & Sauer, R. T. (1999). SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA). *Embo J* **18**, 3793-3799.

Karzai, A. W., Roche, E. D. & Sauer, R. T. (2000). The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat Struct Biol* **7**, 449-455.

- 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.
- Keiler, K. C., Waller, P. R. & Sauer, R. T. (1996).** Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* **271**, 990-993.
- Keiler, K. C., Shapiro, L. & Williams, K. P. (2000).** tmRNAs that encode proteolysis-inducing tags are found in all known bacterial genomes: A two-piece tmRNA functions in *Caulobacter*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7778-7783.
- Keiler, K. C. & Shapiro, L. (2003a).** tmRNA in *Caulobacter crescentus* is cell cycle regulated by temporally controlled transcription and RNA degradation. *J Bacteriol* **185**, 1825-1830.
- Keiler, K. C. & Shapiro, L. (2003b).** TmRNA is required for correct timing of DNA replication in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **185**, 573-580.
- Kernodle, D. S. (2000).** Mechanisms of Resistance to beta-Lactam Antibiotics. In *Gram-Positive Pathogens*. Edited by V. A. Fischetti. Washington: American Society for Microbiology.
- 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.
- Kotra, L. P., Haddad, J. & Mobashery, S. (2000).** Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 3249-3256.
- 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.
- 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.
- Laskowska, E., Kuczynska-Wisnik, D., Bak, M. & Lipinska, B. (2003).** Trimethoprim induces heat shock proteins and protein aggregation in *E. coli* cells. *Curr Microbiol* **47**, 286-289.
- 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.

- Levchenko, I., Seidel, M., Sauer, R. T. & Baker, T. A. (2000).** A specificity-enhancing factor for the ClpXP degradation machine. *Science* **289**, 2354-2356.
- Levchenko, I., Grant, R. A., Wah, D. A., Sauer, R. T. & Baker, T. A. (2003).** Structure of a delivery protein for an AAA+ protease in complex with a peptide degradation tag. *Mol Cell* **12**, 365-372.
- Li, X., Hirano, R., Tagami, H. & Aiba, H. (2006).** Protein tagging at rare codons is caused by tmRNA action at the 3' end of nonstop mRNA generated in response to ribosome stalling. *Rna* **12**, 248-255.
- Loewen, P. C., Hu, B., Strutinsky, J. & Sparling, R. (1998).** Regulation in the rpoS regulon of Escherichia coli. *Can J Microbiol* **44**, 707-717.
- Loomis, W. P., Koo, J. T., Cheung, T. P. & Moseley, S. L. (2001).** A tripeptide sequence within the nascent DaaP protein is required for mRNA processing of a fimbrial operon in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **39**, 693-707.
- 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.
- Maivali, U. & Remme, J. (2004).** Definition of bases in 23S rRNA essential for ribosomal subunit association. *Rna* **10**, 600-604.
- 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.
- Markham, P. N., Westhaus, E., Klyachko, K., Johnson, M. E. & Neyfakh, A. A. (1999).** Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 2404-2408.
- 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.
- Metzinger, L., Hallier, M. & Felden, B. (2005).** Independent binding sites of small protein B onto transfer-messenger RNA during trans-translation. *Nucleic Acids Res* **33**, 2384-2394.

- Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y. & Tulkens, P. M. (1999).** Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 727-737.
- 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.
- Munavar, H., Zhou, Y. & Gottesman, S. (2005).** Analysis of the Escherichia coli Alp phenotype: heat shock induction in *ssrA* mutants. *J Bacteriol* **187**, 4739-4751.
- 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.
- Nameki, N., Tadaki, T., Himeno, H. & Muto, A. (2000).** Three of four pseudoknots in tmRNA are interchangeable and are substitutable with single-stranded RNAs. *FEBS Lett* **470**, 345-349.
- 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.
- Nonin-Lecomte, S., Felden, B. & Dardel, F. (2006).** NMR structure of the Aquifex aeolicus tmRNA pseudoknot PK1: new insights into the recoding event of the ribosomal trans-translation. *Nucleic Acids Res* **34**, 1847-1853.
- Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Tarry, M. J., Carter, A. P. & Ramakrishnan, V. (2001).** Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* **292**, 897-902.
- Ogura, T. & Hiraga, S. (1983).** Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4784-4788.
- Okan, N. A., Bliska, J. B. & Karzai, A. W. (2006).** A Role for the SmpB-SsrA system in Yersinia pseudotuberculosis pathogenesis. *PLoS Pathog* **2**, e6.
- Pandey, D. P. & Gerdes, K. (2005).** Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res* **33**, 966-976.
- Parsons, L., Eisenstein, E. & Orban, J. (2001).** Solution structure of HI0257, a bacterial ribosome binding protein. *Biochemistry* **40**, 10979-10986.
- Pedersen, F. S. & Kjeldgaard, N. O. (1977).** Analysis of the *relA* gene product of Escherichia coli. *Eur J Biochem* **76**, 91-97.

- Pedersen, K., Christensen, S. K. & Gerdes, K. (2002).** Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins. *Mol Microbiol* **45**, 501-510.
- 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.
- Pestka, S. (1977).** Inhibitors of Protein Synthesis. In *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis*, pp. 467-553. Edited by S. P. H. Weissbach. New York, San Francisco, London: Academic Press.
- Powell, B. S., Court, D. L., Inada, T., Nakamura, Y., Michotey, V., Cui, X., Reizer, A., Saier, M. H., Jr. & Reizer, J. (1995).** Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the rpoN operon of Escherichia coli. Enzyme IANtr affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an erats mutant. *J Biol Chem* **270**, 4822-4839.
- Quinlivan, E. P., McPartlin, J., Weir, D. G. & Scott, J. (2000).** Mechanism of the antimicrobial drug trimethoprim revisited. *Faseb J* **14**, 2519-2524.
- Rak, A., Kalinin, A., Shcherbakov, D. & Bayer, P. (2002).** Solution structure of the ribosome-associated cold shock response protein Yfia of Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Commun* **299**, 710-714.
- 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.
- Rheinberger, H. J. & Nierhaus, K. H. (1990).** Partial release of AcPhe-Phe-tRNA from ribosomes during poly(U)-dependent poly(Phe) synthesis and the effects of chloramphenicol. *Eur J Biochem* **193**, 643-650.
- 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.
- Sabina, J., Dover, N., Templeton, L. J., Smulski, D. R., Soll, D. & LaRossa, R. A. (2003).** Interfering with different steps of protein synthesis explored by transcriptional profiling of Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* **185**, 6158-6170.

- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001).** *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. New York: Cold Spring Laboratory Press.
- Sarubbi, E., Rudd, K. E. & Cashel, M. (1988).** Basal ppGpp level adjustment shown by new spoT mutants affect steady state growth rates and rrnA ribosomal promoter regulation in Escherichia coli. *Mol Gen Genet* **213**, 214-222.
- Sat, B., Hazan, R., Fisher, T., Khaner, H., Glaser, G. & Engelberg-Kulka, H. (2001).** Programmed cell death in Escherichia coli: some antibiotics can trigger mazEF lethality. *J Bacteriol* **183**, 2041-2045.
- Sat, B., Reches, M. & Engelberg-Kulka, H. (2003).** The Escherichia coli mazEF suicide module mediates thymineless death. *J Bacteriol* **185**, 1803-1807.
- 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.
- Shapiro, E. & Baneyx, F. (2002).** Stress-based identification and classification of antibacterial agents: second-generation Escherichia coli reporter strains and optimization of detection. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 2490-2497.
- Sharkady, S. M. & Williams, K. P. (2004).** A third lineage with two-piece tmRNA. *Nucleic Acids Res* **32**, 4531-4538.
- Shaw, K. J., Miller, N., Liu, X., Lerner, D., Wan, J., Bittner, A. & Morrow, B. J. (2003).** Comparison of the changes in global gene expression of Escherichia coli induced by four bactericidal agents. *J Mol Microbiol Biotechnol* **5**, 105-122.
- Shimizu, Y. & Ueda, T. (2006).** SmpB triggers GTP hydrolysis of EF-Tu on ribosome by compensating for the lack of codon-anticodon interaction during trans-translation initiation. *J Biol Chem*.
- Shiomi, K. & Omura, S. (2002).** Discovery of New Macrolides. In *Macrolide Antibiotics*, pp. 2-46. Edited by S. Omura. Amsterdam, Boston, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Academic Press.
- Shpanchenko, O. V., Zvereva, M. I., Ivanov, P. V. & other authors (2005).** Stepping transfer messenger RNA through the ribosome. *J Biol Chem* **280**, 18368-18374.
- Smulski, D. R., Huang, L. L., McCluskey, M. P., Reeve, M. J., Vollmer, A. C., Van Dyk, T. K. & LaRossa, R. A. (2001).** Combined, functional genomic-biochemical approach to intermediary metabolism: interaction of acivicin, a glutamine amidotransferase inhibitor, with Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* **183**, 3353-3364.

- Spahn, C. M. & Prescott, C. D. (1996).** Throwing a spanner in the works: antibiotics and the translation apparatus. *J Mol Med* **74**, 423-439.
- Stagg, S. M., Frazer-Abel, A. A., Hagerman, P. J. & Harvey, S. C. (2001).** Structural studies of the tRNA domain of tmRNA. *J Mol Biol* **309**, 727-735.
- Suarez, J. E. & Mendoza, M. C. (1991).** Plasmid-encoded fosfomycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 791-795.
- Sundermeier, T. R., Dulebohn, D. P., Cho, H. J. & Karzai, A. W. (2005).** A previously uncharacterized role for small protein B (SmpB) in transfer messenger RNA-mediated trans-translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2316-2321.
- 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.
- Sunohara, T., Jojima, K., Tagami, H., Inada, T. & Aiba, H. (2004a).** Ribosome stalling during translation elongation induces cleavage of mRNA being translated in Escherichia coli. *J Biol Chem* **279**, 15368-15375.
- Sunohara, T., Jojima, K., Yamamoto, Y., Inada, T. & Aiba, H. (2004b).** Nascent-peptide-mediated ribosome stalling at a stop codon induces mRNA cleavage resulting in nonstop mRNA that is recognized by tmRNA. *Rna* **10**, 378-386.
- Takagi, H., Kakuta, Y., Okada, T., Yao, M., Tanaka, I. & Kimura, M. (2005).** Crystal structure of archaeal toxin-antitoxin RelE-RelB complex with implications for toxin activity and antitoxin effects. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 327-331.
- Tanner, D. R., Dewey, J. D., Miller, M. R. & Buskirk, A. R. (2006).** Genetic analysis of the structure and function of transfer messenger RNA pseudoknot 1. *J Biol Chem* **281**, 10561-10566.
- 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.
- Tenson, T., Lovmar, M. & Ehrenberg, M. (2003).** The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol* **330**, 1005-1014.
- Thompson, J., O'Connor, M., Mills, J. A. & Dahlberg, A. E. (2002).** The protein synthesis inhibitors, oxazolidinones and chloramphenicol, cause extensive translational inaccuracy in vivo. *J Mol Biol* **322**, 273-279.

- Ueda, K., Yamamoto, Y., Ogawa, K., Abo, T., Inokuchi, H. & Aiba, H. (2002).** Bacterial SsrA system plays a role in coping with unwanted translational readthrough caused by suppressor tRNAs. *Genes Cells* **7**, 509-519.
- 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.
- 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. (1998).** Growth phase coupled modulation of Escherichia coli ribosomes. *Genes Cells* **3**, 203-208.
- Valle, M., Gillet, R., Kaur, S., Henne, A., Ramakrishnan, V. & Frank, J. (2003).** Visualizing tmRNA entry into a stalled ribosome. *Science* **300**, 127-130.
- Walsh, C. (2003).** *Antibiotics: action, origins, resistance*. Washington DC: ASM Press.
- van der Biezen, E. A., Sun, J., Coleman, M. J., Bibb, M. J. & Jones, J. D. (2000).** Arabidopsis RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3747-3752.
- 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.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F. & Hengge, R. (2005).** Genome-wide analysis of the general stress response network in Escherichia coli: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* **187**, 1591-1603.
- 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.
- Williams, K. P., Martindale, K. A. & Bartel, D. P. (1999).** Resuming translation on tmRNA: a unique mode of determining a reading frame. *Embo J* **18**, 5423-5433.
- Wilson, D. N. & Nierhaus, K. H. (2004).** The how and why of cold shock. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1026-1028.
- Vioque, A. & de la Cruz, J. (2003).** Trans-translation and protein synthesis inhibitors. *FEMS Microbiol Lett* **218**, 9-14.

- Withey, J. & Friedman, D. (1999).** Analysis of the role of trans-translation in the requirement of tmRNA for lambdaimmP22 growth in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 2148-2157.
- Withey, J. H. & Friedman, D. I. (2003).** A salvage pathway for protein structures: tmRNA and trans-translation. *Annu Rev Microbiol* **57**, 101-123.
- Wower, I. K., Zwieb, C. W., Guven, S. A. & Wower, J. (2000).** Binding and cross-linking of tmRNA to ribosomal protein S1, on and off the *Escherichia coli* ribosome. *Embo J* **19**, 6612-6621.
- Yamagishi, M., Matsushima, H., Wada, A., Sakagami, M., Fujita, N. & Ishihama, A. (1993).** Regulation of the *Escherichia coli* *rmf* 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. (2003).** Temperature-sensitive growth and decreased thermotolerance associated with *relA* mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**, 5765-5771.
- Ye, K., Serganov, A., Hu, W., Garber, M. & Patel, D. J. (2002).** Ribosome-associated factor Y adopts a fold resembling a double-stranded RNA binding domain scaffold. *Eur J Biochem* **269**, 5182-5191.
- Yegian, C. D., Stent, G. S. & Martin, E. M. (1966).** Intracellular condition of *Escherichia coli* RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**, 839-846.
- 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.
- Yusupov, M. M. & Spirin, A. S. (1986).** Are there proteins between the ribosomal subunits? Hot tritium bombardment experiments. *FEBS Lett* **197**, 229-233.
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. & Noller, H. F. (2001).** Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **292**, 883-896.

LISA 1