

ROLA ALTERNATYWNYCH CZYNNIKÓW SIGMA S (σ^S) I SIGMA B (σ^B) W ODPOWIEDZI KOMÓRKI BAKTERYJNEJ NA STRES ORAZ ICH REGULACJA

Marzena Opęchowska^{1*}, Stanisław Bielecki¹

¹ Instytut Biochemii Technicznej, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka

Wpłynęło w czerwcu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Alternatywny czynnik sigma B (σ^B). 2.1. Regulacja σ^B u *Bacillus subtilis*. 2.2. Regulacja σ^B u *Bacillus cereus*. 2.3. Geny zależne od σ^B . 3. Alternatywny czynnik sigma S ($\sigma^S/rpoS$). 3.1. Regulacja transkrypcji *rpoS*. 3.1.1. Czynniki kontrolujące transkrypcję *rpoS*. 3.1.1.1. cAMP-CRP i EIIA(Glc). 3.1.1.2. Wpływ ppGpp na transkrypcję *rpoS*. 3.2. Regulacja translacji *rpoS*. 3.2.1. Funkcje regulatorowych RNA w translacji *rpoS*. 3.2.2. Wpływ UDP-glukozy na translację *rpoS*. 3.3. Regulacja proteolizy σ^S . 3.3.1. Degradacja σ^S przez kompleks proteazy ClpXP zależnej od ATP. 4. Podsumowanie

The role of alternative sigma factor S (σ^S) and sigma factor B (σ^B) in bacterial cell stress response and their regulation

Abstract: Bacteria successfully take possession of almost every recess of the earth. However bacteria can be liable to big changes of environmental conditions in every settled biotope. Some of them living in a high specialized medium do not show usually ability of tolerate others media than their most favourable. In case of changes of medium parameters some of bacteria start to migrate and look for others media securing them proper growth and development approximate optimum conditions. There are also bacteria which are able to survive in spite of changes happen in their direct environmental. Their survival competence is caused by the lack of susceptibility on specified medium changes or ability of adaptation to new conditions moreover by taking the profits from the medium. The tolerance and adaptation bacterial cells to different conditions which following in the nearest environmental result from cells response on stress factors. Precised signals coming from the medium cause in the cells a number of changes happen in genes expression regulated on transcription and translation level. The information coded in bacterial genome enable cells to produce many different proteins. However not all proteins are synthesized in the same time and the process of their synthesis is subject to strict control. Cells under stress synthesize proteins which secure them survival in untypical for their growing conditions. The main roles in this process play alternative sigma factors. Bacterial cells contain also general sigma factor (for example σ^{70} in *Escherichia coli*, σ^{43} in *Bacillus subtilis*) responsible for transcription most of the genes. However alternative sigma factors rarely regulate initiation of transcription. They are active only in case of cell stress conditions and also they take part in gene expression connected with the life cycle of the cell and stationary or exponential growth phase of bacteria. The most important function in stress conditions of *E. coli* plays an alternative sigma S (σ^S , σ^{38}) factor. Because of its regulatory function a lot of attention is dedicated to researches refer to σ^S in a recent time. Sigma B – which is one of the best known alternative sigma factors in Gram-positive bacteria – plays a similar role to sigma S. Factor σ^B functions as a general response regulator to stress in such bacteria as *Bacillus*, *Staphylococcus* and *Listeria*. These two alternative sigma factors: sigma S and sigma B often, if not always work in connection with others form of regulation. Bacteria show ability of detection many signals coming from the environment by means of sensors systems situated in cell envelope. Although σ^S and σ^B play the similar role in the cell they are controlled by completely different mechanisms.

1. Introduction. 2. Alternative sigma factor B (σ^B). 2.1. Regulation of σ^B in *Bacillus subtilis*. 2.2. Regulation of σ^B in *Bacillus cereus*. 2.3. σ^B – dependent genes. 3. Alternative sigma factor S ($\sigma^S/rpoS$). 3.1. Regulation of *rpoS* transcription. 3.1.1. Factors controlling *rpoS* transcription. 3.1.1.1. cAMP-CRP i EIIA(Glc). 3.1.1.2. The influence of ppGpp on *rpoS* transcription. 3.2. Regulation of *rpoS* translation. 3.2.1. The functions of regulatory RNAs in *rpoS* translation. 3.2.2. The influence of UDP-glucose on *rpoS* translation. 3.3. Regulation of σ^S proteolysis. 3.3.1. Degradation of σ^S by the ClpXP ATP-dependent protease complex. 4. Conclusion

Słowa kluczowe: alternatywne czynniki sigma, ClpXP, odpowiedź komórki na stres, sigma B, sigma S

Key words: alternative sigma factors, ClpXP, cell stress response, sigma B, sigma S

1. Wstęp

Zasadniczą rolę we właściwej inicjacji transkrypcji genów pełni główny czynnik sigma polimerazy RNA. W przypadku *Escherichia coli* jest to σ^{70} , natomiast u *Bacillus subtilis* – σ^{43} . Czynnik ten tworząc holoenzym w kompleksie z rdzeniem polimerazy RNA odpowiada za prawidłową regulację transkrypcji większości genów. To zapewnia komórkom bakteryjnym prawidłowy wzrost w optymalnych warunkach [41, 68].

Adaptacja komórek bakteryjnych do nietypowych dla ich wzrostu warunków otoczenia oraz umiejętność przetrwania w takim środowisku jest wynikiem odpowiedzi komórek na zaistniały stres. Na skutek wywołanego w komórce stresu, następują określone zmiany w jej metabolizmie. Ma to na celu zapewnienie przeżycia komórkom w środowisku o zmienionych parametrach, jak i ich ochronę przed szkodliwym jego wpływem. Wówczas w wyniku ekspresji ściśle określonych genów, regulowanych na poziomie transkrypcji

* Autor korespondencyjny: Instytut Biochemii Technicznej, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. B. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź; tel. (42) 631 34 32; e-mail: marzena.nowakowska@p.lodz.pl

i translacji, zachodzi synteza odpowiednich białek. Za inicjację transkrypcji tych genów odpowiedzialne są alternatywne czynniki sigma, które w kompleksie z rdzeniem polimerazy RNA regulują ten proces. Do alternatywnych czynników sigma należą m.in. sigma B (σ^B , SigB), zidentyfikowany u bakterii Gram-dodatnich oraz sigma S (RpoS, σ^S , σ^{38} , sigma-38), którego obecność stwierdzono w przypadku komórek bakterii Gram-ujemnych. Wspomniane alternatywne czynniki sigma pełnią podobną funkcję w komórce. Wykazują one również aktywność w przypadku, gdy w komórce zachodzi konieczność ekspresji genów mających związek z cyklem życiowym komórki oraz fazą (stacjonarną czy wykładniczą) jej wzrostu [40, 43, 83].

2. Alternatywny czynnik sigma B (σ^B)

Do najlepiej poznanych alternatywnych czynników sigma bakterii Gram-dodatnich należy sigma B. Funkcjonuje on jako główny regulator odpowiedzi na stres bakterii z rodzaju *Bacillus*, *Staphylococcus* i *Listeria*. W przypadku innych bakterii Gram-dodatnich, np. bakterii kwasu mlekowego i Clostridia, o niskiej zawartości par GC, nie stwierdzono obecności σ^B [83]. Pomimo, iż obecność białek typu σ^B jest charakterystyczna dla bakterii Gram-dodatnich o wysokiej zawartości par GC, to w przypadku, np. *Mycobacterium* i *Streptomyces*, zidentyfikowano SigF (σ^F) – stanowiącego homolog σ^B . Białko SigF pochodzące z *Mycobacterium tuberculosis* pełni podobną funkcję do alternatywnego czynnika sigma B bakterii *B. subtilis*. Natomiast σ^F bakterii *Streptomyces coelicolor* odgrywa inną niż σ^B rolę w komórce,

choć wykazuje podobną sekwencję aminokwasową do sekwencji SigB *B. subtilis* [34, 83, 89].

Na skutek odbieranych przez komórkę różnych sygnałów wywołujących w niej stres następuje synteza i aktywacja czynnika sigma B w komórce [35].

Stres może być pochodzenia środowiskowego oraz energetycznego (Rys. 1) [1, 19, 42, 86].

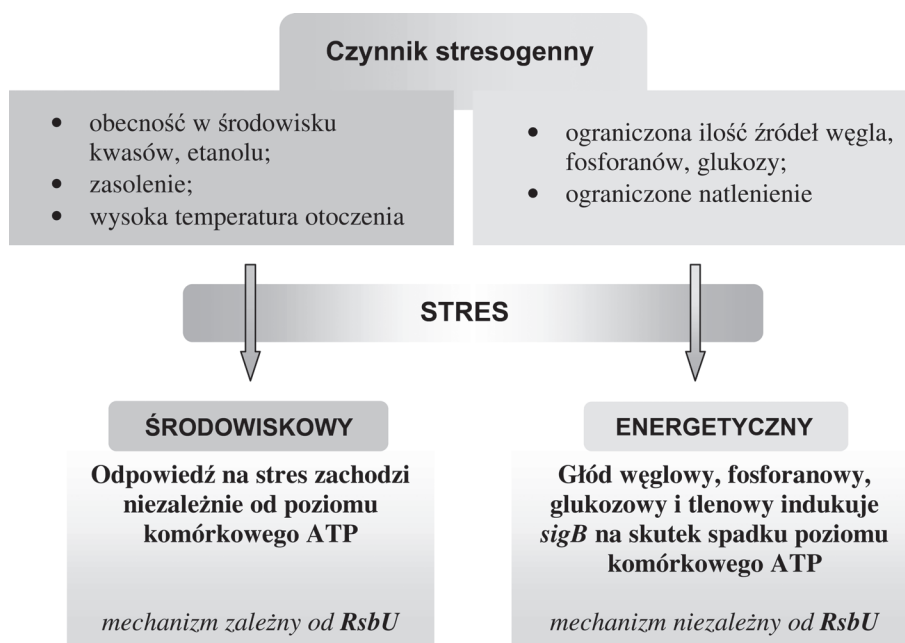
Czynnik σ^B bierze udział w inicjacji transkrypcji wielu genów stresu, które należą do regulonu σ^B [35].

2.1. Regulacja σ^B u *Bacillus subtilis*

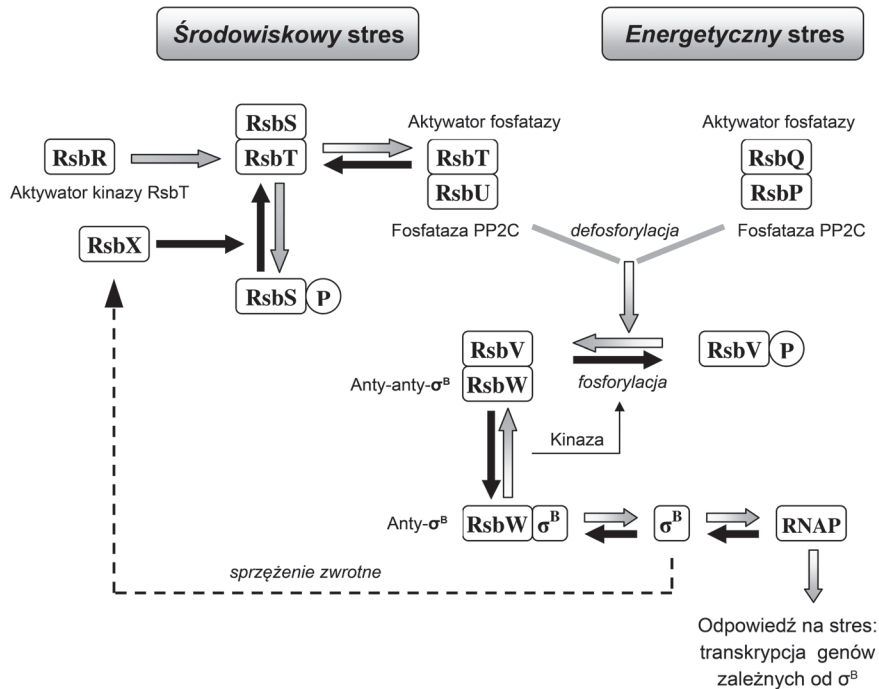
W przypadku bakterii *B. subtilis* zbadano dwie drogi aktywacji alternatywnego czynnika sigma B, w których uczestniczy zespół siedmiu białek regulatorowych: RsbR, RsbS, RsbT, RsbU, RsbV, RsbW i RsbX, kodowanych przez geny *rsb* (regulator of sigma B) należące do operonu *sigB*, rozmieszczone według podanej kolejności: *rsbR*, *rsbS*, *rsbT*, *rsbU*, *rsbV*, *rsbW*, *sigB*, *rsbX*. Siódmym genem w tym operonie jest gen *sigB*, kodujący σ^B [19, 35, 78].

Przed genem *rsbR* zlokalizowany jest promotor zależny od czynnika σ^A . Jego zadaniem jest utrzymanie podstawowego poziomu ekspresji wszystkich ośmiu genów podczas wzrostu komórki. Drugi wewnętrzny promotor, umiejscowiony przed genem *rsbV* i rozpoznawany przez występujący w aktywnej formie σ^B , ma wpływ na wzrost poziomu ekspresji genów *rsbV*, *rsbW*, *sigB* i *rsbX* [42].

W komórce nie będącej pod wpływem stresu, czynnik σ^B występuje w stanie nieaktywnym, będąc związanym z czynnikiem anty-sigma RsbW. W komórkach *Bacillus subtilis* przekaz środowiskowego i energetycz-



Rys. 1. Czynniki stresogenne bodźców środowiskowych i energetycznych (objaśnienia w tekście)

Rys. 2. Schemat aktywacji czynnika σ^B w komórkach *B. subtilis*.

Zmodyfikowany na podstawie Marles - Wright i wsp. [60] za zgodą wydawnictwa Elsevier i autorów

nego typu bodźca komórkowego do czynnika sigma B zachodzi poprzez dwie powiązane, ale oddzielne drogi przekazu sygnału (Rys. 2) [19, 60].

Transfer bodźców pochodzących ze środowiska zachodzi za pośrednictwem białek regulatorowych, kodowanych przez operon *sigB*. W przypadku stresu energetycznego, w transmisję sygnału zaangażowane są białka kodowane przez operon zbudowany z dwóch genów *rsbQ-rsbP*, zlokalizowany w pewnej odległości od operonu *sigB*. W przypadku *Listeria monocytogenes* nie wykazano obecności operonu *rsbQ-rsbP*.

Białka RsbV i RsbW stanowią dwa pierwsze regulatory aktywności σ^B u *Bacillus subtilis*. W fazie wzrostu wykładniczego, czynnik anti-sigma RsbW związany jest bezpośrednio z czynnikiem σ^B , co zapobiega asocjacji czynnika σ^B do rdzenia polimerazy RNA. Zarówno aktywność kinazy RsbW jak i działanie dwóch fosfataz typu PP2C – RsbP i RsbU regulują stan ufosforylowania RsbV. Fosfataza RsbP uczestniczy w aktywacji σ^B w odpowiedzi na zaistniałe zaburzenia na energetycznym poziomie komórki (droga stresu energetycznego), podczas gdy RsbU odpowiada za przekazanie sygnałów, wynikających ze stresu fizycznego i chemicznego (droga stresu środowiskowego). Ufosforylowany RsbV (na skutek aktywności kinazy serynowej RsbW) staje się nieaktywny, jako czynnik anti-anti-sigma. Jedynie nieufosforylowany RsbV może współzawodniczyć z σ^B o związanie się z RsbW. Uwolniony w ten sposób σ^B może wówczas związać się z polimerazą RNA i w dalszej kolejności może nastąpić transkrypcja zależnych od σ^B genów ściślej odpowiedzi na stres [20]. Defosfo-

rylacja RsbV następuje w wyniku działania aktywnej fosfatazy RsbU lub RsbP, w zależności od rodzaju odebranego sygnału, wywołującego w komórce stres [19].

Pod wpływem stresu środowiskowego, zachodzi aktywacja fosfatazy RsbU przez drugie białko RsbT. W czasie, gdy komórka nie podlega stresowi, białko RsbT związane jest (co zapobiega oddziaływaniu RsbT z RsbU) z negatywnym regulatorem – RsbS, w dużym (1,8 MDa) wielobiałkowym kompleksie, określanym jako stresosom (*stressosome*) [71]. Stresosom składa się z RsbS i RsbR, a także czterech paralogów białka RsbR (RsbRA): YkoB (RsbRB), YojH (RsbRC), YqhA (RsbRD) i YtvA [26, 60, 69, 71, 72].

RsbS składa się z pojedynczej domeny STAS (sulphate transporter and anti-anti-sigma factor). Wiążąc się z paralogami RsbR poprzez silnie konserwowane domeny STAS C-terminalne, tworzy z nimi określoną strukturę. W wyniku stresu środowiskowego zachodzi ufosforylowanie domen STAS przez kinazę RsbT, która następnie oddysocjuje od kompleksu [60]. Następnie uwolniony RsbT wiąże i aktywuje fosfatazę RsbU, która wówczas ma możliwość oddziaływania na substrat RsbV-P, na skutek czego następuje defosforylacja czynnika anti-anti-sigma, RsbV, co prowadzi do aktywacji czynnika sigma B.

Białka RsbR pełnią niezbędną rolę we właściwym oddziaływaniu pomiędzy białkami RsbS i RsbT. Podczas stresu RsbR odgrywa rolę aktywatora kinazy RsbT względem RsbS, co prowadzi do oddzielenia się RsbT od kompleksu tworzonych z RsbS i związanie się z RsbU. Fosforylacja RsbS jest kluczowym procesem,

który pozwala RsbT na związanie z RsbU. W tym procesie RsbR również jest fosforylowane przez RsbT przez co traci swoją zdolność aktywacji RsbT [20]. Jak dotąd nie poznano mechanizmu, w wyniku którego następuje ufosforylowanie białek RsbR i RsbS przez RsbT.

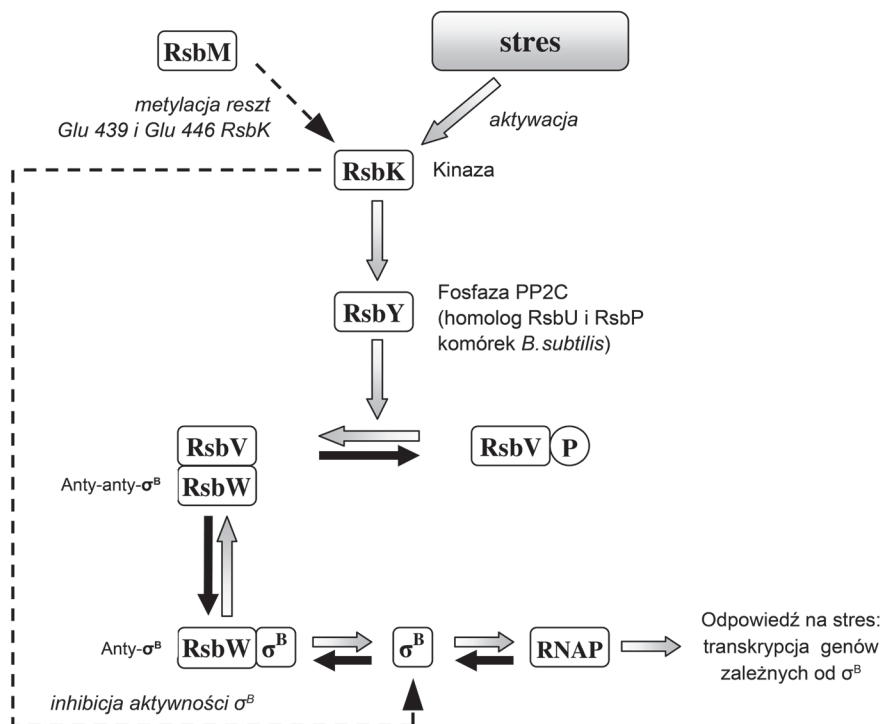
W następstwie aktywacji σ^B rośnie poziom RsbX. Wzrost aktywności σ^B , wynikający z zaistniałego stresu pochodzenia środowiskowego, zostaje przywrócony do poziomu wyjściowego przy udziale fosfatazy RsbX, która defosforyluje i reaktywuje zarówno RsbR jak i RsbS (będący inhibitorem aktywności kinazy RsbT). Nieufosforylowana forma białka RsbS wiąże się z kinazą RsbT, co przerywa aktywację regulonu odpowiedzi na stres. Nie jest wyjaśnione czy wzrost poziomu RsbX przyczynia się do redukcji aktywności σ^B . Jednak w przypadku eliminacji białka RsbX następuje wzrost aktywności σ^B do bardzo wysokich poziomów.

W odpowiedzi na zaistniały stres energetyczny, następuje aktywacja RsbV przez fosfatazę RsbP, która aktywowana jest przez RsbQ. Dokładny mechanizm tej aktywacji nie jest znany, ale analizy strukturalne RsbQ wykazują, że białko jest α/β hydrolazą, wiążącą małe, niezidentyfikowane hydrofobowe cząsteczki, które mogą brać udział w aktywacji RsbP [18, 43, 49, 60].

2.2. Regulacja σ^B u *Bacillus cereus*

W przypadku bakterii *Bacillus cereus* wykazano, że regulacja czynnika σ^B znacząco różni się od poznanych dróg regulacji σ^B innych Gram-dodatnich bak-

terii o niskiej zawartości par GC. Stwierdzono, że w przeciwieństwie do *B. subtilis* u bakterii *B. cereus* nie występują obydwie drogi aktywacji σ^B zachodzące pod wpływem stresu środowiskowego czy energetycznego. De Been i wsp. [25] wskazali bowiem, że droga powstałego sygnału wynikającego ze stresu pochodzenia środowiskowego i wewnątrzkomórkowego jest jednakowo skierowana do jednego białka – membranowej multisensorowej hybrydowej kinazy histydynowej BC1008 (RsbK, Regulator of sigma b; “K” – hybrid Kinase), odgrywającej istotną rolę w regulacji σ^B (Rys. 3). Stwierdzono to w oparciu o analizę sekwencyjną, świadczącą o obecności wielu domen w RsbK, m.in. CHASE3 (zewnątrzkomórkowy sensor, prawdopodobnie oskrzydłony dwiema transmembranowymi helisami), GAF (wewnątrzkomórkowy sensor wiążący małe ligandy) i PAS/PAC (sensor redoks, światła, metabolitów) [24, 25, 36]. Wyniki badań dowodzą, iż RsbK fosforyluje regulator odpowiedzi RsbY (serynową fosfatazę typu PP2C – kontrolującą aktywność σ^B ; homolog RsbU i RsbP komórek *B. subtilis*) prowadząc do defosforylacji RsbV. Następnie nieufosforylowany RsbV wiąże się z antagonistą σ^B , RsbW, uwalniając ostatecznie σ^B [21, 84]. Wykazano, że gen *rsbK* zlokalizowany jest blisko *sigB* w genomie. Zarówno *rsbK* jak i *rsbY* zlokalizowane są w konserwowanym obszarze genu. Badania genomu sugerują, że RsbK i RsbY stanowią jeden funkcjonalny moduł RsbKY w kontroli aktywności σ^B u *B. cereus*, a także u patogenów *B. thuringiensis* i *B. anthracis* [24, 25]. Dalsze badania wykazały, że



Rys. 3. Schemat aktywacji czynnika σ^B w komórkach *B. cereus*. Zmodyfikowany na podstawie Chen i wsp. [21] za zgodą wydawnictwa Wiley i autorów

Tabela I

Grupy białek kodowanych przez geny zależne od σ^B

Grupa	Geny zależne od σ^B
I	<p>Geny kodujące podjednostki proteaz/ATP-az, pełniące istotną rolę w odpowiedzi komórki na stres.</p> <p>ClpP, ClpC i ClpX uczestniczą w procesie renaturacji lub degradacji niepoprawnie sfałdowanych czy zdenaturowanych białek, które gromadzą się w warunkach zaistniałego stresu i mogą być dla komórki toksyczne [38, 39]. Mutanty <i>clpP</i>, <i>clpC</i> i <i>clpX</i> są bardzo wrażliwe na stres cieplny, etanolowy, oraz na zasolenie. Wykazują także słabszy wzrost oraz obniżoną zdolność przeżycia w warunkach stresu głodowego. Mutanty te są o wiele bardziej wrażliwe niż mutanty <i>sigB</i> [38, 42, 52, 64].</p>
II	<p>Geny kodujące białka biorące udział w niespecyficjnej ochronie komórki przed stresem tlenowym.</p> <p>Głód glukozowy wywołuje w komórkach <i>B. subtilis</i> niespecyficzną odpowiedź na stres tlenowy, mimo, iż komórki te nie znajdują się pod wpływem stresu tlenowego [27].</p> <p>Do genów zależnych od σ^B, prawdopodobnie zaangażowanych w tę niespecyficzną ochronę przed stresem tlenowym należą: gen katalazy <i>katE</i> oraz gen kodujący białko Dps, chroniące DNA (zapewne poprzez zwiążanie się z kwasem nukleinowym) przed uszkodzeniem, jakie może spowodować tlen [6, 31].</p> <p>W procesie adaptacji komórki do nowych warunków tlenowych mogą także uczestniczyć tioredoksyna, ClpC, ClpP oraz produkty piątego i szóstego genu operonu <i>clpC</i> (<i>sms</i>, <i>yacK</i>). Reaktywne rodniki tlenu prawdopodobnie generowane w komórkach bakterii tlenowych (narażonych m. in. na głód, którego przyczyną jest brak lub zmniejszenie stężenia glukozy albo będących pod wpływem stresu, wynikającego ze wzrostu temperatury otoczenia) mogą utleniać i przez to uszkadzać białka, powodując ich niestabilną konformację. ClpC oraz tioredoksyna mogą pomagać w naprawie uszkodzonych białek albo w odzyskiwaniu ich natywnej struktury. Białka nieodwracalnie uszkodzone mogą być degradowane przez ClpP, prawdopodobnie we współpracy z ClpX (albo ClpC?). <i>Sms</i> oraz <i>YacK</i> mogą uczestniczyć w naprawie DNA, który uległ uszkodzeniu w wyniku zaistniałego stresu tlenowego. Ochrona przed uszkodzeniami membran, białek oraz DNA jest bardzo istotna w odpowiedzi komórki na ten niespecyficzny stres [42, 48].</p>
III	<p>Geny, których produktami są białka biorące udział w adaptacji komórki do stresu solnego i wodnego.</p> <p>W wyniku zaistniałego stresu osmotycznego zachodzi indukcja <i>YkzA</i> wykazującego wysoki stopień identyczności z <i>OsmC</i> <i>E. coli</i>. Wykazano, iż σ^B nie jest niezbędny w procesie adaptacji komórki do zmian zasolenia, ponieważ mutanty <i>sigB</i> również dają odpowiedź na stres solny [42].</p>
IV	<p>Produkty genów, których rola w adaptacji do stresu nie jest w pełni wyjaśniona.</p> <p>Do tej różnorodnej grupy należą m. in. białka <i>GspA</i>, których indukcja może zachodzić wskutek głodu wywołanego brakiem aminokwasów, a także białka te mogą być zaangażowane w ekspresję <i>hag</i> kodującego flagellinę. Do białek tych należy również zidentyfikowana u <i>B. subtilis</i> pirofosforylaza UDP-glukozy (UDPGP; urydylylotransferaza-glukozy-1-fosforanowa) – enzym katalizujący syntezę UDP-glukozy. Genem strukturalnym kodującym to białko jest <i>gtaB</i>, częściowo zależne od czynnika sigma B (σ^B) [4, 32, 42, 85]. Inne białka uczestniczą w syntezie dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD) lub mogą katalizować reakcje redoks zależne od zredukowanego fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADP[H]) [5, 42].</p>
V	<p>Białka kodowane przez geny zależne od σ^B, których funkcja jak dotąd nie została poznana, a ich podobieństwo do znanych białek występujących w bazach danych, jest mało istotne.</p>

metylacja reszt Glu⁴³⁹ i Glu⁴⁴⁶ RsbK przez metylotransferazę BC1007 typu Che-R (określaną jako RsbM, ang. Regulator of sigma B Methyltransferase) może hamować aktywację σ^B w warunkach niestresowych, a więc RsbM (BC1007) negatywnie reguluje aktywność σ^B poprzez metylację RsbK. W momencie zaistnienia czynnika stresu, uaktywniony RsbK przenosi sygnał do kolejnych regulatorów (RsbY, RsbV, RsbW) by uwolnić σ^B , który może związać się z polimerazą RNA i wywołać bezpośrednią transkrypcję genów odpowiedzi na stres, zależnych od *sigB*. Moduł RsbK-M-Y kontroluje zróżnicowany rozkład sieci przekazu sygnału, w szczególności tych obejmujących czynniki stresu związane z σ^B [21].

2.3. Geny zależne od σ^B

Komórki odpowiadają na różne warunki stresowe, poprzez zwiększoną produkcję m.in. białek kodowanych przez geny zależne od σ^B . Wyodrębniono pięć funkcjonalnych grup tych genów (Tabela I) [42].

W przypadku bakterii Gram-dodatnich, σ^B stanowi główny regulator odpowiedzi komórki na stres, natomiast u bakterii Gram-ujemnych (do których należą liczne gatunki o szczególnym znaczeniu dla ludzi, ze względu na ich patogenny lub korzystny wpływ), funkcję tę pełni alternatywny czynnik σ^S .

3. Alternatywny czynnik sigma S ($\sigma^S/rpoS$)

Sigma S (σ^S , RpoS, KatF, σ^{38}) to alternatywna podjednostka polimerazy RNA, która jest indukowana w wyniku wielu warunków stresowych i może częściowo zastąpić główny czynnik sigma σ^{70} (RpoD).

Gen *rpoS* kodujący σ^S został najpierw zidentyfikowany w komórkach *E. coli*. Następnie jego obecność stwierdzono w komórkach *Salmonella sp.* (*S. dublin*, *S. enterica*, *S. typhimurium*), *Erwinia carotovora*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Yersinia enterocolitica*. Obecność homologów σ^S stwierdzono również

u *Acetobacter methanolicus*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas putida* i *Rhizobium meliloti* [29, 33].

Czynnik ten kieruje transkrypcją genów nie tylko w stacjonarnej fazie wzrostu, ale również odgrywa decydującą rolę w odpowiedzi komórki na stres [7, 43]. W wyniku stresu, następuje aktywacja transkrypcji licznych genów, zależnych od σ^S . Dlatego też, σ^S określany jest jako nadrzędny regulator odpowiedzi na stres, wywoływanej przez wiele różnych sygnałów stresowych, ale także często przez obniżony poziom wzrostu komórek lub jego zahamowanie. Wywołana odpowiedź na stres ma na celu stworzenie możliwości przetrwania komórki w aktualnych warunkach stresowych, a także dodatkowo uchronić ją przed stresem jeszcze nie zaistniałym.

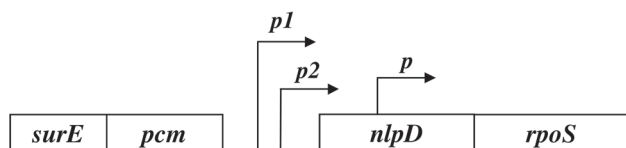
Wzrost poziomu σ^S w komórce zachodzi w odpowiedzi na głód spowodowany brakiem źródeł węgla, azotu, fosforu, a także aminokwasów. Indukcja σ^S może również nastąpić w wyniku zahamowania wzrostu komórek w stacjonarnej fazie wzrostu, jak i stresu wywołanego zbyt wysoką lub niską temperaturą, hiperosmolarnością, niskim pH, obecnością etanolu, dużą gęstością komórek, a także stresu tlenowego. Produkty genów kontrolowanych przez σ^S mogą także powodować zmiany morfologii komórki [43].

Badania także wskazują, że ponad 40% genów kontrolowanych przez QS (ang. *quorum sensing*) jest także zależnych od RpoS. W *ongtrakongate* i wsp. [88] wykazali, że białka biorące udział w odpowiedzi na szok ciepła, stres oksydacyjny, stres osmotyczny czy białka indukowane w stanie głodu komórki, są współregulowane zarówno przez RpoS jak i QS co wskazuje, że obydwa te czynniki są równie istotne w regulacji adaptacji bakterii do zmian warunków wzrostu [76, 77, 88].

Ekspresja samego genu *rpoS* jest kontrolowana na poziomie transkrypcji, translacji oraz proteolizy samego białka [33, 54, 57, 61].

3.1. Regulacja transkrypcji *rpoS*

RpoS należy do operonu *nlpD-rpoS* znajdującego się w odległości 141 nukleotydów za operonem *surE-pcm* (Rys. 4). Mimo, że geny: *surE*, *pcm*, *nlpD* pełnią funkcje podobne do *rpoS*, uczestnicząc w reakcjach biochemicznych mających na celu umożliwienie komórkom



Rys. 4. Transkrypcja *rpoS*. W regulacji transkrypcji genu kodującego σ^S biorą udział trzy promotory: *nlpDp1* (*p1*), *nlpDp2* (*p2*) i *rpoSp* (*p*). Zmodyfikowany na podstawie Eisenstark i wsp. [29] za zgodą wydawnictwa Elsevier i autorów oraz Santos i wsp. [75] za zgodą wydawnictwa Wiley i autorów

przetrwanie w warunkach fazy stacjonarnej, to operon *surE-pcm* nie ma wpływu na ekspresję *rpoS*, jak również czynnik sigma S nie jest zaangażowany w ekspresję operonu *surE-pcm* [29]. Pomimo nieznannej funkcji *surE* wykazano, że uszkodzenie tego genu przejawia się obniżoną przeżywalnością komórek w stacjonarnej fazie oraz ich ograniczoną wytrzymałością na podwyższoną temperaturę i stres osmotyczny. Produkt genu *pcm* bierze udział w naprawie uszkodzonych komórek. Mutanty *pcm* wykazują zwiększoną wrażliwość na stres tlenowy [29].

W transkrypcji *rpoS* uczestniczy kilka promotorów [43]. Policistronowy mRNA *nlpD-rpoS* składa się z dwóch, blisko położonych względem siebie promotorów: *nlpDp1* i *nlpDp2*, powyżej genu *nlpD*, kodującego lipoproteinę o nieznannej funkcji. Kolejny promotor *rpoSp* zlokalizowany jest wewnątrz genu strukturalnego *nlpD* [43, 44, 55, 75].

Promotory *nlpDp1* i *nlpDp2* operonu *nlpD-rpoS* biorą udział w ekspresji *rpoS*, nie są jednak regulowane przez szybkość i fazę wzrostu komórek. Główny promotor *rpoSp1* genu kodującego *rpoS* podlega indukcji w momencie wejścia komórek w fazę stacjonarną, a także na skutek wywołanego stresu [43, 75].

3.1.1. Czynniki kontrolujące transkrypcję *rpoS*

3.1.1.1. cAMP-CRP i EIIA(Glc)

Mutacje genu *cya*, kodującego cyklazę adenylową oraz genu *crp*, kodującego białko receptorowe [CRP] cyklicznego AMP [cAMP] powodują, że poziom σ^S w komórce już w wykładniczej fazie wzrostu jest wysoki [43]. Tak więc cAMP-CRP jest negatywnym regulatorem transkrypcji *rpoS* w wykładniczej fazie wzrostu komórek. Mechanizm działania cAMP-CRP w kontroli transkrypcji *rpoS* zależy od fazy wzrostu. Wyniki badań wskazują, że podczas wejścia komórek w fazę stacjonarną, cAMP-CRP pozytywnie kontroluje transkrypcję *rpoS* [43].

Cyklaza adenylowa jest pozytywnie kontrolowana przez *crr*, kodujący EIIA(Glc). Wynikiem mutacji *crr* jest podwyższony poziom σ^S w czasie trwania fazy wykładniczej, będący skutkiem zwiększonej transkrypcji oraz translacji *rpoS*. Transkrypcję można ograniczyć przez dodatek cAMP, co oznacza, że EIIA(Glc) wpływa na transkrypcję *rpoS* poprzez kierowanie aktywnością cyklazy adenylowej. Fenotypowo, mutanty *crr* wykazują w fazie logarymicznej podobieństwo do mutantów *cya* [43].

3.1.1.2. Wpływ ppGpp na transkrypcję *rpoS*

Bezpośrednią przyczyną zmian stężenia RpoS są cząsteczki sygnałowe, generowane pod wpływem zmian środowiskowych, zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych. Do tych cząsteczek zalicza się m.in. czterofosforan

guanozynowy (ppGpp) [37]. Jego poziom znacznie wzrasta w odpowiedzi na zmniejszenie stężenia aminokwasów, niezbędnych do syntezy białek, a także na skutek głodu węglowego, fosforanowego oraz azotowego [37, 82]. W tej sytuacji u bakterii następuje ograniczenie wielu aktywności metabolicznych, co określa się mianem odpowiedzi ścisłej. Ma ona charakter adaptacyjny i stwarza komórce możliwość przetrwania w niesprzyjających warunkach [7]. Kumulowanie się w komórce nietypowych nukleotydów, m.in. ppGpp ma związek z odpowiedzią ścisłą. Odpowiedź ta jest bezpośrednio indukowana przez przyłączenie się nienaładowanych tRNA w miejscu A rybosomu, na skutek czego dochodzi do zahamowania tworzenia wiązania peptydowego, zatrzymania przemieszczających się rybosomów po RNA i zapoczątkowania reakcji, w wyniku której na rybosomach zachodzi synteza ppGpp. Reakcję tę katalizuje białko RelA (produkt genu *relA*), wykazujące aktywność syntetazy ppGpp. W reakcji syntezy tego nukleotydu katalizowanej przez RelA, donorem grupy fosforanowej jest ATP, natomiast akceptorem GDP [23, 58, 62].

W przypadku innych głodowych warunków, w syntezie ppGpp pośredniczy również białko SpoT, produkt genu *spoT* [23, 62, 90]. Białko SpoT uczestniczy również w degradacji nukleotydu ppGpp do GDP, poprzez reakcję pirofosforolizy. Odpowiedź ścisła ulega wygaśnięciu na skutek degradacji ppGpp. Jedynie mutanty *relA spoT* są zupełnie pozbawione ppGpp [53, 58, 63, 90]. Mutanty ppGpp wykazują wysoce zredukowany poziom σ^S . Niedobór glukozy i fosforanów (nie dotyczy to braku aminokwasów) nadal indukuje σ^S , jednakże na niższym poziomie niż w przypadku natywnego szczepu [37, 43]. Przypuszcza się, że cząsteczki ppGpp mają wpływ raczej na elongację transkrypcji albo stabilność transkryptu *rpoS* niż na samą inicjację transkrypcji [43, 53].

3.2. Regulacja translacji *rpoS*

Translacja mRNA *rpoS* zachodzi na skutek zmian, których wynikiem jest hiperosmolarność, zakwaszenie środowiska, niska temperatura i in. Proces translacji zachodzi również w późnej fazie wykładniczej, gdy hodowla bakterii osiąga odpowiednio wysoką gęstość komórek [43].

3.2.1. Funkcje regulatorowych RNA w translacji *rpoS*

Adaptacja do zmian zachodzących w środowisku wymaga zarówno integracji sygnałów pochodzących z zewnątrz jak i koordynacji wewnątrzkomórkowych odpowiedzi. Dotychczas opisano około 50 niekodujących małych RNA (sRNA) obecnych w komórkach *E. coli*. Poziomy ekspresji wielu z nich różni się w zależności od zmieniających się warunków środo-

wiska, co wskazuje, że pełnią określoną rolę w procesie adaptacji komórki.

RpoS jest najwcześniej poznanym genem regulowanym posttranskrypcyjnie przez przynajmniej trzy sRNA: DsrA, RprA oraz OxyS [74].

DsrA i RprA biorą udział w translacji *rpoS*, natomiast OxyS pełni funkcję inhibitora [43].

DsrA pełni niewielką rolę w translacji *rpoS* przy wzroście komórek w temperaturze 37°C lub 42°C. Staje się jednak głównym czynnikiem stymulującym w temp. 30°C, a szczególnie w temp. 20°C [43, 79]. Przyczyną indukcji translacji σ^S w niskiej temperaturze jest znaczny wzrost transkrypcji *dsrA*, jak również sześciokrotny wzrost stabilności DsrA [43, 73].

W procesie regulacji translacji *RpoS*, DsrA jest negatywnym regulatorem HNS [43, 74]. HNS jest białkiem histonopodobnym, biorącym udział w organizacji nukleoidu, jak również w regulacji genu [43]. Mutanty HNS wykazują znacznie podwyższony poziom σ^S już w wykładniczej fazie wzrostu, porównywalny do poziomu σ^S , osiąganego przez natywny szczep dopiero w fazie stacjonarnej albo na skutek innych warunków stresowych [8, 43, 91]. Poza tym, w komórkach mutantów *hns* zwiększona jest szybkość translacji *rpoS*, a proteoliza σ^S jest silnie zredukowana, a nawet może nie zachodzić. Wolny wzrost i typowa dla mutantów *hns* niestabilność genetyczna, są w pewnym stopniu związane z nieprawidłowym, wysokim poziomem σ^S , który może zostać obniżony na skutek mutacji *rpoS* [8, 43]. Dotychczas nie wyjaśniono, w jaki sposób: pośrednio czy bezpośrednio HNS powoduje spadek poziomu translacji *rpoS* [43].

Regulatorowe białko LeuO pełni rolę represora transkrypcji *dsrA*. Nadprodukcja LeuO redukuje translację *rpoS*, zwłaszcza w niskiej temperaturze. Efekt ten zależy całkowicie od obecności DsrA. Mutacja LeuO nie jest przyczyną wzrostu poziomu translacji *rpoS* podczas trwania późnej fazy wykładniczej, jak i w odpowiedzi na wysoką osmolarność czy niską temperaturę. Nie jest to zjawisko całkowicie zaskakujące, ponieważ w takich warunkach ekspresja *leuO* jest ograniczona lub nawet wyciszona przez HNS [43, 50]. Jednakże w określonych warunkach (niedobór aminokwasów czy wejście komórek w fazę stacjonarną), następuje indukcja LeuO z udziałem pośrednika ppGpp.

Przypuszcza się, że LeuO redukuje poziom DsrA w stacjonarnej fazie wzrostu, co może być przyczyną zmian ekspresji innych genów zależnych od DsrA – nie ma to jednak wpływu na poziom σ^S , prawdopodobnie z powodu działania innych mechanizmów indukujących σ^S , rekompensujących w ten sposób zredukowany poziom DsrA [43].

DsrA wraz z **RprA** uczestniczy w pozytywnej regulacji translacji *rpoS*. Obecność tych dwóch, znacząco różniących się sRNA – regulatorów translacji *RpoS*

dowodzi, że takie dodatkowe regulatorowe RNA mogą uczestniczyć nie tylko w regulacji RpoS, ale prawdopodobnie w regulacji innych istotnych komponentów komórkowych [73].

Promotor *rprA* nie wykazuje takiej samej odpowiedzi na temperaturę jak *dsrA* (którego poziom syntezy wzrasta w niskich temperaturach i w związku z tym wzrasta też ilość RpoS). Wykazano, że promotor *rprA* jest pozytywnie regulowany przez RcsB, należący do systemu RcsC/YojN/RcsB, gdzie RcsC to sensorowe białko – kinaza, YojN – fosfotransferaza a RcsB – regulator odpowiedzi. Uważa się, że stres wywołany na powierzchni komórki, jako środowiskowy sygnał, prowadzi do aktywacji kinazy RcsC, w wyniku czego następuje pobudzenie docelowych genów RcsB [59, 74]. Na wzrost poziomu RprA ma również wpływ wzrost gęstości komórek w środowisku [74]. W komórkach narażonych na szok osmotyczny, również zachodzi translacja RpoS. Ta odpowiedź jest ściśle uzależniona od DsrA jak i RprA. Nawet, gdy ekspresja małych RNA jest na niskim poziomie, mogą one pośredniczyć w translacji RpoS, której wzrost następuje wówczas stopniowo [74].

Nie udowodniono wpływu RprA na HNS, co może wskazywać na współdziałanie innych czynników wraz z RprA w regulacji RpoS, pełniących istotną rolę w szczególnych warunkach środowiskowych [59].

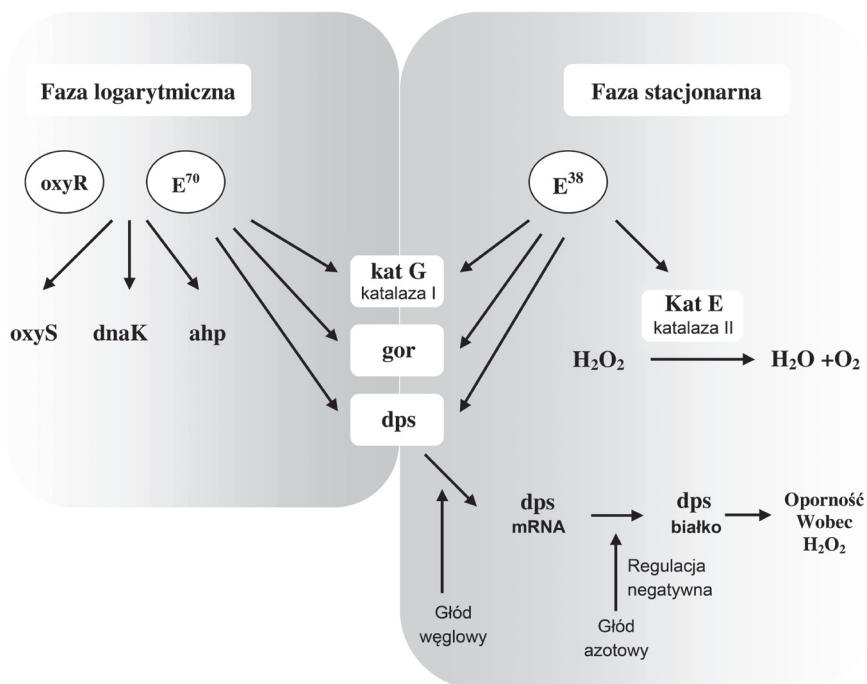
Trzeci regulatorowy RNA – **OxyS**, należy do operonu OxyR. OxyS jest indukowany w wyniku stresu oksydacyjnego (obecność nadtlenu wodoru) i odgrywa rolę regulatora o właściwościach pleiotropowych [2, 43]. Ekspresja OxyS powoduje zahamowanie

translacji RpoS [53]. Białko OxyR jest transkrypcyjnym regulatorem, aktywującym ekspresję genów odpowiedzialnych za ochronę komórki w warunkach szoku tlenowego. OxyR jest także negatywnym regulatorem własnej ekspresji [29].

Sekwencje homologiczne *oxyR* zostały zidentyfikowane u bakterii Gram-ujemnych *E. carotovora*, *S. typhimurium* i *H. Influenzae* [22, 29].

Po związaniu OxyR ze specyficznym promotorem, zachodzi szybka transkrypcja z udziałem polimerazy RNA z podjednostką sigma-70 (Esig70) (Rys. 5). W warunkach tlenowych OxyR powoduje wzrost ekspresji genów kodujących: alkilohydroperoksydazy (*ahpCF*), oksydoreduktazę glutationową (*gor*), hydroperoksydazę I (*katG*), białka wiążące DNA (*dps*) [29].

Szczególną uwagę skupia się wokół wzajemnego oddziaływania pomiędzy OxyR/Esig70 oraz Esig38, a promotorami *katG*, *dps* i *gor*. Gen *katG*, koduje hydroperoksydazę/katalazę (HPI) [29, 56]. Początkowo uważano, że ten gen jest transkrybowany jedynie jako część regulonu *oxyR* przez Esig70 i OxyR. Natomiast I v a n o w a i wsp. [45] zauważyli, że szczepy z uszkodzeniem zarówno *rpoS* i *oxyR* posiadają znacznie mniej HPI niż pojedynczy mutant *oxyR*. Mutanty *oxyR*, posiadające podwyższony poziom HPI i wykazujące oporność wobec H_2O_2 traciły tę zdolność, gdy *rpoS* został zainaktywowany. Interesujące jest to, że zarówno Esig70, jak i Esig38 inicjują transkrypcję z tego samego miejsca startu w promotorze *katG*. T a n a k a i wsp. [81] i N g u y e n i i wsp. [67] zauważyli, że *in vitro* pewne promotory mogą być rozpoznawane przez więcej niż



Rys. 5. Odpowiedź komórek *E. coli* na stres oksydacyjny. Zmodyfikowany na podstawie E i s e n s t a r k i i wsp. [29] za zgodą wydawnictwa Elsevier i autorów

jedną formę holoenzymu polimerazy RNA [29]. RpoS pełni istotną rolę w oporności na stres oksydacyjny nie tylko poprzez regulację genów *katG* (katalazy I) ale i *katE* (katalazy II). Aktywności tych enzymów są bardzo istotne w oporności na nadtlenek wodoru [47].

Wykazano, że dwa kolejne elementy regulonu *oxyR*: *dps* i *gor* zawierają zarówno komponent OxyR/sigma-70 i sigma-38. W przypadku ekspresji Dps, różne formy polimerazy mogą oddziaływać z promotorem *dps* wyłącznie w różnych etapach cyklu życiowego komórki. Zatem ekspresja zależna od sigmy S następuje jedynie w późnej fazie stacjonarnej lub w odpowiedzi na głód, a transkrypcja *oxyR*/sigma-70 zachodzi jedynie podczas logarytmicznego wzrostu i w warunkach stresu tlenowego.

Gen *gor* koduje enzym oksydoreduktazę glutationową, który katalizuje reakcję redukcji utlenionego glutationu poprzez utlenienie NADPH [13, 22, 87]. W większości komórek glutation pełni istotną rolę względem komponentów komórkowych, chroniąc je przed destrukcyjnym wpływem tlenu. Wiadomo już, że *gor* wymaga OxyR do maksymalnej ekspresji i wykazano, że promotor *gor* jest także regulowany (bezpośrednio lub pośrednio) przez sigma-38. Beckert-Hapak i Eisenstark [13] wykazali, że poziom Gor jest znacznie niższy u podwójnych mutantów *oxyR rpoS*, w porównaniu do mutantów *oxyR*. Ta obserwacja daje również odpowiedź na pytanie, dlaczego poziom glutationu wzrasta, gdy komórki osiągają stacjonarną fazę wzrostu, ale nie zwiększa się poziom enzymów syntetyzujących glutation.

Jang i wsp. [46] wskazali również na niezbędną rolę RpoS w ekspresji genu regulatora stresu oksydacyjnego, OxyR u *Burkholderia pseudomallei*. Mutanty szczepów pozbawione RpoS nie wykazywały ekspresji *oxyR* zarówno w normalnych warunkach wzrostu, jak i w warunkach stresu oksydacyjnego. Dowiedziono, iż RpoS pełni rolę pozytywnego transkrypcyjnego regulatora ekspresji *oxyR* i *dps* (*dpsA*), a OxyR jako negatywnego transkrypcyjnego regulatora operonu *katG-dpsA* (w przypadku normalnych warunków wzrostu), jak i pozytywnego transkrypcyjnego regulatora (w warunkach stresu oksydacyjnego). Dlatego też zarówno RpoS jak i OxyR są niezbędne w ekspresji operonu *katG-dpsA* i genu *dpsA*. U mutantów *oxyR* lub *rpoS* lub mutantów obu wymienionych genów stwierdzono spadek indukcji KatG w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Podobną zależność stwierdzono dla genu *dpsA*, przy czym w tym wypadku RpoS i OxyR funkcjonują jako dwa niezależne pozytywne transkrypcyjne regulatory ekspresji *dpsA*. Tak więc w normalnych warunkach wzrostu RpoS pozytywnie reguluje *oxyR* i *dpsA* podczas gdy OxyR negatywnie reguluje operon *katG-dpsA*. W warunkach stresu oksydacyjnego wzrasta ekspresja *rpoS* oraz *oxyR*, a represja OxyR wywo-

luje pozytywną regulację *katG-dpsA*. W konsekwencji ekspresja operonu *katG-dpsA* wzrasta niezależnie od ekspresji genu (*dpsA*), zachodzącej z promotora rozpoznawanego przez RpoS [46].

3.2.2. Wpływ UDP-glukozy na translację *rpoS*

Böhringer i wsp. [14] zasugerowali, że w komórkach *E. coli* UDP-glukoza może pełnić rolę wewnątrzkomórkowej cząsteczki sygnałowej, kontrolującej ekspresję *rpoS* i genów zależnych od *rpoS*. Manipulacja ilością wewnątrzkomórkowej UDP-glukozy (głównie przez zastosowanie różnych stężeń glukozy w podłożu hodowlanym), z pewnością wpływa na zmiany poziomu *rpoS*. Te obserwacje mogą ułatwić zrozumienie wpływu wysokich stężeń glukozy na drastyczny spadek aktywności katalazy, co czyni komórki wrażliwymi na H_2O_2 [29, 30, 33]. Również mutanty posiadające defekt głównego metabolizmu węgla, którego skutkiem jest brak UDP-glukozy, wykazują podwyższony poziom σ^S podczas trwania wykładniczej fazy wzrostu. Te defekty mogą dotyczyć izomerazy fosfoglukozowej (kodowanej przez *pgi*) u mutantów wykorzystujących do wzrostu fruktozę, a także fosfoglukomutazy (*pgm*) lub urydylotransferazy glukozo-1-fosforanowej (*galU*) u mutantów wykorzystujących do wzrostu glukozę [14, 43]. Wprowadzenie określonej ilości glukozy mutantom *pgi* oraz galaktozy mutantom *pgm*, powoduje szybkie uzupełnienie niedoboru UDP-glukozy, co wyraża się poprzez gwałtowny spadek poziomu σ^S . Podwyższony poziom σ^S w komórkach mutantów *galU* obserwuje się w przypadku nieuszkodzonego genu *hfq* (kodującego białko Hfq, prawdopodobnie bezpośrednio zaangażowane w proces inicjacji translacji), co sugeruje, że UDP-glukoza bezpośrednio lub pośrednio zakłóca funkcję Hfq w translacji *rpoS*.

Ze względu na to, że molekularny mechanizm działania UDP-glukozy nie został jeszcze wyjaśniony, nie można odpowiedzieć na pytanie, czy poziom UDP-glukozy w komórce zmienia się w odpowiedzi na jakiegokolwiek sygnały stresu, które mają wpływ na translację *rpoS* [14, 66].

3.3. Regulacja proteolizy σ^S

Transkrypcja i translacja *rpoS* jest determinowana przez określone warunki stresu [43]. Degradacja czynnika sigma S zostaje wówczas zahamowana, następuje jego kumulacja, a aktywacji ulega liczna grupa genów zależnych od σ^S , których produkty chronią komórki przed skutkami stresu [51].

W przypadku komórek wzrastających w bezstresowych warunkach również zachodzi synteza *rpoS*, jednak poziom komórkowego σ^S pozostaje niski z powodu szybkiej jego degradacji [43, 54, 80].

3.3.1. Degradacja σ^S przez kompleks proteazy ClpXP zależny od ATP

Za degradację σ^S odpowiedzialna jest proteaza ClpXP (Rys. 6) [43]. ClpX pełni rolę białka opiekuńczego (chaperonu), a podjednostce proteolitycznej ClpP nadaje specyficzność substratową. W przeciwieństwie do innych substratów ClpXP, σ^S nie może zostać rozpoznany przez sam ClpXP [28, 43, 91]. Wymagana jest obecność specyficznego regulatora odpowiedzi RssB (określany również jako: SprE, MviA – *Salmonella* i ExpM – *Erwinia*) [3, 10, 16, 43, 51, 65, 70].

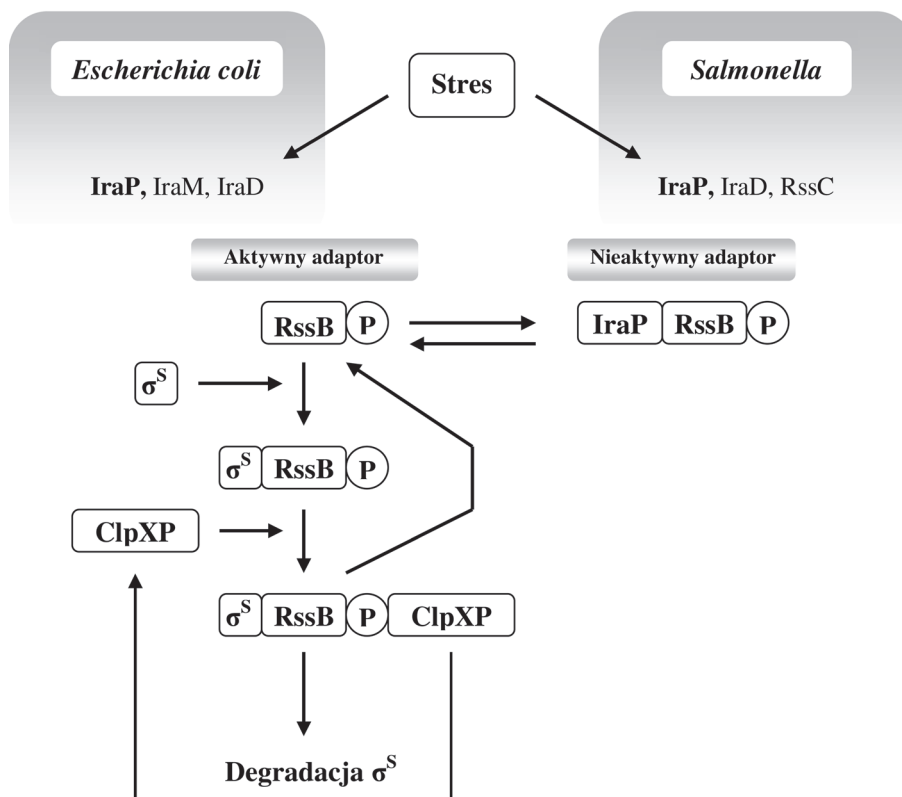
RssB należy do grupy białek dwuskładnikowych regulatorów odpowiedzi, których aktywność uwarunkowana jest przez fosforylację konserwowanej reszty aspartylowej (D58 w RssB). Eksperymenty *in vitro* wykazały, że jedynie ufosforylowany RssB wiąże się z σ^S [11, 43, 51]. Fosforylacja, jak również wiązanie σ^S nie zachodziły w przypadku wariantów RssB, w których D58 został zamieniony przez inny aminokwas. Mutanty te wykazywały wysoki poziom stabilnego σ^S [12, 15, 43, 51]. Tak jak większość regulatorów odpowiedzi, RssB składa się przynajmniej z dwóch domen, N-terminalnej domeny receptorowej, odbierającej sygnał (receiver domain) i C-terminalnej domeny, przetwarzającej sygnał (output – signal transduction – domain). Unikatowa rola RssB w proteolizie wyraża się poprzez obecność domeny (domen), przetwarzają-

cej sygnał (output), niewykazującej podobieństwa do żadnego innego białka o znanej funkcji. RssB nie ulega dimeryzacji ani oligomeryzacji w wyniku fosforylacji i wiąże σ^S tworząc kompleks 1:1, w stosunku stechiometrycznym [43, 51]. Decydujące znaczenie w proteolizie σ^S odgrywa aminokwas K173, niezbędny we współdziałaniu z RssB. Jednopunktowa mutacja K173E, eliminuje szybką proteolizę σ^S [11, 43].

Związany z RssB sigma S, jest transportowany do proteazy ClpXP, tak jak inne substraty tej proteazy, a następnie ulega rozwinęciu i zostaje całkowicie zdegradowany przez mechanizm zależny od hydrolizy ATP.

Zaobserwowano *in vitro* obecność potrójnych kompleksów RssB- σ^S -ClpX oraz poczwórnych kompleksów, zawierających również ClpP. W kolejnym etapie RssB zostaje uwolniony z kompleksu. RssB pełni katalityczną rolę w inicjacji degradacji σ^S [43].

Bougourd i wsp. [16, 17] zidentyfikowali i scharakteryzowali w komórkach *E. coli* regulator stabilności σ^S – białko IraP (zidentyfikowane również u *Salmonella*, *Shigella* i *Erwinia*), które pośród innych białek (tj: IraD (odgrywającego funkcję inhibitora aktywności RssB – w sytuacji wystąpienia uszkodzeń DNA), IraM (inhibitora aktywności RssB – w czasie niedoboru Mg^{2+}) oraz RssC komórek *Salmonella* – stanowiącego homolog IraM *E. coli*) pełni rolę inhibitora degradacji σ^S . Może się ona wyrażać poprzez zakłócanie aktywności zarówno proteazy ClpXP, jak i białka RssB



Rys. 6. Schemat degradacji alternatywnego czynnika σ^S . Zmodyfikowany na podstawie Battesti i wsp. [9] za zgodą wydawnictwa Elsevier i autorów oraz Bougourd i wsp. [17] za zgodą wydawnictwa Wiley i autorów

(wiążąc się z nim bezpośrednio, blokując jego działanie względem σ^S), lub poprzez ochronę σ^S przed działaniem tych obydwu czynników.

Zahamowanie procesu degradacji σ^S może nastąpić w wyniku stresu, wywołanego brakiem glukozy lub fosforanów.

4. Podsumowanie

W komórce bakteryjnej oprócz głównego czynnika sigma (np. σ^{70} *E. coli*) wyróżnia się także alternatywne czynniki sigma (np.: σ^B , σ^S). Wpływają one na wzrost poziomu ekspresji genów uczestniczących w przemianach komórkowych, intensywnie zachodzących w komórce poddanej stresowi bądź znajdującej się w określonej fazie wzrostu. Alternatywne czynniki sigma również podlegają regulacji na poziomie transkrypcji (np. przez cząsteczki sygnałowe) i translacji (np. przez określone regulatorowe RNA). Współpracują one także z innymi formami regulacji, m.in. dwuskładnikowymi systemami regulacji, które tworzą białka sensorowe i regulatorowe. Dzięki umiejscowionym w błonie komórkowej białkom sensorowym, odebrany sygnał pochodzący ze środowiska zostaje przekazany na białko regulatorowe, które następnie inicjuje zmiany w ekspresji pewnych genów, na skutek czego w komórce zachodzą reakcje stanowiące jej odpowiedź na zadany środowiskowy czy energetyczny stres.

Ze względu na istotne znaczenie alternatywnych czynników sigma w komórce, wiele prac badawczych skoncentrowanych jest na poznaniu interakcji pomiędzy alternatywnymi czynnikiem sigma a innymi cząsteczkami regulatorowymi, jak również na funkcji regulatorowej tych białek. Alternatywne czynniki sigma, które pełnią podobną funkcję w komórce mogą również podlegać różnym systemom regulacji, co zostało stwierdzone w przypadku białek sigma B i sigma S.

Podziękowania

Serdeczne podziękowania dla Pani Prof. Marii Koziółkiewicz za cenne wskazówki i uwagi dotyczące pracy.

Piśmiennictwo

- Akbar S., Gaidenko T.A., Kang C.M., O'Reilly M., Devine K.M., Price C.W.: New family of regulators in the environmental signaling pathway which activates the general stress transcription factor σ^B of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**, 1329–1338 (2001)
- Altuvia S., Weinstein-Fischer D., Zhang A., Postow L., Storz G.: A small, stable RNA induced by oxidative stress: roles as a pleiotropic regulator and antimitator. *Cell*, **90**, 43–53 (1997)
- Andersson R.A., Palva E.T., Pirhonen M.: The response regulator expM is essential for the virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and acts negatively on the sigma factor RpoS (σ^S). *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**, 575–584 (1999)
- Antelmann H., Bernhardt J., Schmid R., Hecker M.: A gene at 333 degrees on the *Bacillus subtilis* chromosome encodes the newly identified sigma B-dependent general stress protein GspA. *J. Bacteriol.* **177**, 3540–3545 (1995)
- Antelmann H., Bernhardt J., Schmid R., Mach H., Völker U., Hecker M.: First steps from a two-dimensional protein index towards a response-regulation map for *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis*, **18**, 1451–1463 (1997)
- Antelmann H., Engelmann S., Schmid R., Sorokin A., Lapidus A., Hecker M.: Expression of a stress- and starvation-induced dps/pexB-homologous gene is controlled by the alternative sigma factor sigmaB in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179**, 7251–7256 (1997)
- Baj J., Markiewicz Z.: *Biologia molekularna bakterii*. Wyd. Naukowe PWN Warszawa, 2007
- Barth M., Marschall C., Muffler A., Fischer D., Hengge-Aronis R.: Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of σ^S and many σ^S -dependent genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**, 3455–3464 (1995)
- Battesti A., Gottesman S.: Role of adaptor proteins in regulation of bacterial proteolysis. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 140–147 (2013)
- Bearson S.M.D., Benjamin Jr, W.H., Swords W.E., Foster J.W.: Acid shock induction of RpoS is mediated by the mouse virulence gene *mviA* of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **178**, 2572–2579 (1996)
- Becker G., Klauck E., Hengge-Aronis R.: Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: The response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6439–6444 (1999)
- Becker G., Klauck E., Hengge-Aronis R.: The response regulator RssB, a recognition factor for σ^S proteolysis in *Escherichia coli*, can act like an anti- σ^S factor. *Mol. Microbiol.* **35**, 657–666 (2000)
- Becker-Hapak M., Eisenstark A.: Role of *rpoS* in the regulation of glutathione oxidoreductase (*gor*) in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **134**, 39–44 (1995)
- Böhringer J., Fischer D., Mosler G., Hengge-Aronis R.: UDP-Glucose is a potential intracellular signal molecule in the control of expression of σ^S and σ^S -dependent genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**, 413–422 (1995)
- Bouché S., Klauck E., Fischer D., Lucassen M., Jung K., Hengge-Aronis R.: Regulation of RssB-dependent proteolysis in *Escherichia coli*: a role for acetyl phosphate in a response regulator-controlled process. *Mol. Microbiol.* **27**, 787–795 (1998)
- Bougdour A., Wickner S., Gottesman S.: Modulating RssB activity: IraP, a novel regulator of σ^S stability in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **20**, 884–897 (2006)
- Bougdour A., Cunnig C., Baptiste P.J., Elliott T., Gottesman S.: Multiple pathways for regulation of σ^S (RpoS) stability in *Escherichia coli* via the action of multiple anti-adaptors. *Mol. Microbiol.* **68**, 298–313 (2008)
- Brody M.S., Vijay K., Price C.W.: Catalytic function of an α/β hydrolase is required for energy stress activation of the σ^B transcription factor in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**, 6422–6428 (2001)
- Chaturongakul S., Boor K.J.: RsbT and RsbV Contribute to σ^B -Dependent Survival under Environmental, Energy, and Intracellular Stress Conditions in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5349–5356 (2004)
- Chen C.C., Lewis R.J., Harris R., Yudkin M.D., Delumeau O.: A supramolecular complex in the environmental stress signaling pathway of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **49**, 1657–1669 (2003)

21. Chen L.-C., Chen J.-C., Shu J.-C., Chen C.-Y., Chen S.-C., Chen S.-H., Lin C.-Y., Lu C.-Y., Chen C.-C.: Interplay of RsbM and RsbK controls the σ^B activity of *Bacillus cereus*. *Environ. Microbiol.* **14**, 2788–2799 (2012)
22. Christman M.F., Morgan R.W., Jacobson F.S., Ames B.N.: Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell*, **41**, 753–762 (1985)
23. Dalebroux Z.D., Svensson S.L., Gaynor E.C., Swanson M.S.: ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 171–199 (2010)
24. De Been M., Francke C., Siezen R.J., Abee T.: Novel σ^B regulation modules of Gram-positive bacteria involve the use of complex hybrid histidine kinases. *Microbiol.* **157**, 3–12 (2011)
25. De Been M., Tempelaars M.H., van Schaik W., Moezelaar R., Siezen R.J., Abee T.: A novel hybrid kinase is essential for regulating the σ^B -mediated stress response of *Bacillus cereus*. *Environ. Microbiol.* **12**, 730–745 (2010)
26. Delumeau O., Chen C.C., Murray J.W., Yudkin M.D., Lewis R.J.: High-molecular-weight complexes of RsbR and paralogues in the environmental signaling pathway of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **188**, 7885–7892 (2006)
27. Dowds B.C.A.: The oxidative stress response in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **124**, 255–263 (1994)
28. DuBow M.S., Ryan T., Young R.A., Blumenthal T.: Host factor for coliphage Q/ β RNA replication: Presence in prokaryotes and association with the 30S ribosomal subunit in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **153**, 39–43 (1977)
29. Eisenstark A., Calcutt M.J., Becker-Hapak M., Ivanova A.: Role of *Escherichia coli* *rpoS* and associated genes in defense against oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.* **21**, 975–993 (1996)
30. Eisenstark A., Miller C., Jones J., Levén S.: *Escherichia coli* genes involved in cell survival during dormancy: role of oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 1054–1059 (1992)
31. Engelmann S., Lindner C., Hecker M.: Cloning, nucleotide sequence and regulation of *katE* encoding a sigma B-dependent catalase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**, 5598–5605 (1995)
32. Eymann C., Hecker M.: Induction of sigma (B)-dependent general stress genes by amino acid starvation in a *spo0H* mutant of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **199**, 221–227 (2001)
33. Fang F.C., Chen C., Guiney D.G., Xu Y.: Identification of σ^S -regulated genes in *Salmonella typhimurium*: complementary regulatory interactions between σ^S and cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol.* **178**, 5112–5120 (1996)
34. Ferreira A., Gray M., Wiedmann M., Boor K.J.: Comparative genomic analysis of the *sigB* operon in *Listeria monocytogenes* and in other Gram-positive bacteria. *Curr. Microbiol.* **48**, 39–46 (2004)
35. Fouet A., Namy O., Lambert G.: Characterization of the operon encoding the alternative σ^B factor from *Bacillus anthracis* and its role in virulence. *J. Bacteriol.* **182**, 5036–5045 (2000)
36. Galperin M.Y.: Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ. Microbiol.* **6**, 552–567 (2004)
37. Gentry D.R., Hernandez V.J., Nguyen L.H., Jensen D.B., Cashel M.: Synthesis of the stationary-phase sigma factor σ^S is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.* **175**, 7982–7989 (1993)
38. Gerth U., Krüger E., Derre I., Msadek T., Hecker M.: Stress induction of the *Bacillus subtilis* *clpP* gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance. *Mol. Microbiol.* **28**, 787–802 (1998)
39. Gottesman S.: Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Genet.* **30**, 465–506 (1996)
40. Gruber T.M., Gross C.A.: Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 441–466 (2003)
41. Haldenwang W.G.: The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* **59**, 1–30 (1995)
42. Hecker M., Völker U.: Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the σ^B regulon. *Mol. Microbiol.* **29**, 1129–1136 (1998)
43. Hengge-Aronis R.: Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 373–395 (2002)
44. Ichikawa J.K., Li C., Fu J., Clarke S.: A gene at 59 minutes on the *Escherichia coli* chromosome encodes a lipoprotein with unusual amino acid repeat sequences. *J. Bacteriol.* **176**, 1630–1638 (1994)
45. Ivanova A., Miller C., Glinsky G., Eisenstark A.: Role of the *rpoS* (*katF*) in oxyR-independent regulation of hydroperoxidase I in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **12**, 571–578 (1994)
46. Jangiam W., Loprasert S., Smith D.R., Tungpradabkul S.: *Burkholderia pseudomallei* RpoS regulates OxyR and the *katG-dpsA* operon under conditions of oxidative stress. *Microbiol. Immunol.* **54**, 389–397 (2010)
47. Jangiam W., Loprasert S., Tungpradabkul S.: Role of *Burkholderia pseudomallei* RpoS in regulation of catalase activities under hydrogen peroxide induction. *Science Asia*, **34**, 23–29 (2008)
48. Kaan T., Jurgen B., Schweder T.: Regulation of the expression of the cold shock proteins CspB and CspC in *Bacillus subtilis*. *Molec. Gen. Genet.* **262**, 351–354 (1999)
49. Kaneko T., Tanaka N., Kumasaka T.: Crystal structures of RsbQ, a stress-response regulator in *Bacillus subtilis*. *Protein Sci.* **14**, 558–565 (2005)
50. Klauck E., Böhringer J., Hengge-Aronis R.: The LysR-like regulator LeuO in *Escherichia coli* is involved in the translational regulation of *rpoS* by affecting the expression of the small regulatory DsrA-RNA. *Mol. Microbiol.* **25**, 559–569 (1997)
51. Klauck E., Lingnau M., Hengge-Aronis R.: Role of the response regulator RssB in σ^S recognition and initiation of σ^S proteolysis in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **40**, 1381–1390 (2001)
52. Kruger E., Völker U., Hecker M.: Stress induction of *clpC* in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance. *J. Bacteriol.* **176**, 3360–3367 (1994)
53. Lange R., Fischer D., Hengge-Aronis R.: Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the σ^S subunit of RNA-polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**, 4676–4680 (1995)
54. Lange R., Hengge-Aronis R.: The cellular concentration of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev.* **8**, 1600–1612 (1994)
55. Lange R., Hengge-Aronis R.: The *nlpD* gene is located in an operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation. *Mol. Microbiol.* **13**, 733–743 (1994)
56. Loewen P.C.: Regulation of bacterial catalase synthesis (w) Molecular biology of free radical scavenging systems, red. J. Scandalios, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1992, s. 96–116
57. Loewen P.C., von Ossowski I., Switala J., Mulvey M.R.: KatF (σ^S) synthesis in *Escherichia coli* is subject to posttranscriptional regulation. *J. Bacteriol.* **175**, 2150–2153 (1993)
58. Magnusson L.U., Farewell A., Nyström T.: ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* **13**, 236–242 (2005)
59. Majdalani N., Chen S., Murrow J., John K.S., Gottesman S.: Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol. Microbiol.* **39**, 1382–1394 (2001)

60. Marles-Wright J., Lewis R.J.: Stress responses of bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 755–760 (2007)
61. McCann M.P., Fraley C.D., Matin A.: The putative sigma factor KatF is regulated posttranscriptionally during carbon starvation. *J. Bacteriol.* **175**, 2143–2149 (1993)
62. Mechold U., Potrykus K., Murphy H., Murakami K.S., Cashel M.: Differential regulator by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.* **41**, 6175–6189 (2013)
63. Mittenhuber G.: 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 (2001)
64. Msadek T., Kunst F., Rapoport G.: MecB of *Bacillus subtilis*, a member of the ClpC ATPase family, is a pleiotropic regulator controlling competence gene expression and growth at high temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5788–5792 (1994)
65. Muffler A., Fischer D., Altuvia S., Storz G., Hengge-Aronis R.: The response regulator RssB controls stability of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **15**, 1333–1339 (1996)
66. Muffler A., Traulsen D.D., Fischer D., Lange R., Hengge-Aronis R.: The RNA-binding protein HF-I plays a global regulatory role which is largely, but not exclusively, due to its role in expression of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 297–300 (1997)
67. Nguyen L.H., Jensen D.B., Thompson N.E., Gentry D.R., Burgess R.R.: In vitro functional characterization of overproduced *Escherichia coli* katF/rpoS gene product. *Biochemistry*, **32**, 11112–11117 (1993)
68. Paget M.S.B., Helmann J.D.: The σ^{70} family of sigma factors. *Genome Biol.* **4**, 203.1–203.6 (2003)
69. Pane-Farre J., Lewis R.J., Stulke J.: The RsbRST stress module in bacteria: a signalling system that may interact with different output modules. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 65–76 (2005)
70. Pratt L.A., Silhavy T.J.: The response regulator, SprE, controls the stability of RpoS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2488–2492 (1996)
71. Reeves A., Haldenwang W.G.: Isolation and characterization of dominant mutations in the *Bacillus subtilis* stressosome components RsbR and RsbS. *J. Bacteriol.* **189**, 1531–1541 (2007)
72. Reeves A., Martinez L., Haldenwang W.: Expression of, and *in vivo* stressosome formation by, single members of the RsbR protein family in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* **156**, 990–998 (2010)
73. Repoila F., Gottesman S.: Signal Transduction Cascade for Regulation of RpoS: Temperature Regulation of DsrA. *J. Bacteriol.* **183**, 4012–4023 (2001)
74. Repoila F., Majdalani N., Gottesman S.: Small non-coding RNAs, co-ordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: the RpoS paradigm. *Mol. Microbiol.* **48**, 855–861 (2003)
75. Santos J.M., Freire P., Mesquita F.S., Mika F., Hengge R., Arraiano C.M.: Poly(A)-polymerase I links transcription with mRNA degradation via σ^S proteolysis. *Mol. Microbiol.* **60**, 177–188 (2006)
76. Schuster M., Hawkins A.C., Harwood C.S., Greenberg E.P.: The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol. Microbiol.* **51**, 973–985 (2004)
77. Schuster M., Lostroh C.P., Ogi LT., Greenberg E.P.: Identification, timing and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* **185**, 2066–2079 (2003)
78. Scott J.M., Haldenwang W.G.: Obg, an essential GTP binding protein of *Bacillus subtilis*, is necessary for stress activation of transcription factor σ^B . *J. Bacteriol.* **181**, 4653–4660 (1999)
79. Sledjeski D.D., Gupta A., Gottesman S.: The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *E. coli*. *EMBO J.* **15**, 3993–4000 (1996)
80. Takayanagi Y., Tanaka K., Takahashi H.: Structure of the 5' upstream region and the regulation of the rpoS gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **243**, 525–531 (1994)
81. Tanaka K., Kusano S., Fujita N., Ishihama A., Takahashi H.: Promoter determinants for *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme containing 638 (the rpoS gene product). *Nucleic Acids Res.* **23**, 827–834 (1995)
82. Traxler M.F., Summers S.M., Nguyen H.T., Zacharia V.M., Hightower G.A., Smith J.T., Conway T.: The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **68**, 1128–1148 (2008)
83. Van Schaik W., Abee T.: The role of σ^B in the stress response of Gram-positive bacteria – targets for food preservation and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 218–224 (2005)
84. Van Schaik W., Tempelaars M.H., Zwietering M.H., de Vos W.M., Abee T.: Analysis of the role of RsbV, RsbW and RsbY in regulating σ^B activity in *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* **187**, 5846–5851 (2005)
85. Varón D., Boyland S.A., Okamoto K., Price C.W.: *Bacillus subtilis* gtaB encodes UDP-Glucose pyrophosphorylase and is controlled by stationary-phase transcription factor σ^B . *J. Bacteriol.* **175**, 3964–3971 (1993)
86. Voelker U., Voelker A., Maul B., Hecker M., Dufour A., Haldenwang W.G.: Separate mechanisms activate σ^B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *J. Bacteriol.* **177**, 3771–3780 (1995)
87. Volkert M.R., Loewen P.C., Switala J., Crowley D., Conley M.: The $\Delta(\argF-lacZ)205(U169)$ deletion greatly enhances resistance to hydrogen peroxide in stationary-phase *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**, 1297–1302 (1994)
88. Wongtrakongate P., Tumapa S., Tungpradabkul S.: Regulation of a quorum sensing system by stationary phase sigma factor RpoS and their co-regulation of target genes in *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiol. Immunol.* **56**, 281–294 (2012)
89. Wösten M.M.S.M.: Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 127–150 (1998)
90. Xiao H., Kalman M., Ikehara K., Zemel S., Glaser G., Cashel M.: Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of relA null mutants can be eliminated by spoT null mutations. *J. Biol. Chem.* **266**, 5980–5990 (1991)
91. Yamashino T., Ueguchi C., Mizuno T.: Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, σ^S , in *Escherichia coli*: involvement of the nucleoid protein H-NS. *EMBO J.* **14**, 594–602 (1995)