

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Alen Požgajčić

6888/BT

MUTACIJE KAO ODGOVOR
BAKTERIJA NA STRES
ZAVRŠNI RAD

Modul: Molekularna genetika

Mentor: Prof. dr. sc. *Višnja Bačun-Družina*

Zagreb, 2016

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Završni rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Mutacije kao odgovor bakterija na stres

Alen Požgajčić, 6888/BT

Sažetak: Bakterije su izložene promjenjivim uvjetima okoliša i zbog toga su razvile mehanizme prilagodbe na stres. Stanice se prilagođavaju tako što započinje ekspresija proteina koji pospješuju adaptaciju na stres preko glavnog regulatora RpoS. Posljedično, povećanje koncentracije RpoS povećava stopu mutacija u stanici. Za takve mutacije uzrokovane stresom je potreban dodatni stres kao što je dvostruki lom DNA koji uzrokuje ekspresiju translezijskih polimeraza koje na kraju rezultiraju uvođenjem mutacija. Ovaj mehanizam mutacije je potencijalno ključan za evoluciju patogenih bakterija, a ujedno i stanica raka zbog sličnih načina popravka u prokariota i eukariota. Razumijevanje puteva kojim mutacije nastaju također otvara nove mogućnosti u biotehnologiji i medicini.

Ključne riječi: stresom inducirane mutacije, mehanizmi prilagodbe, odgovor SOS, popravak krivo sparenih baza

Rad sadrži: 31 stranica, 4 slike, 1 tablica, 86 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom obliku i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Prof. dr. sc. Višnja Bačun-Družina,

Rad predan: 4. srpnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Final work

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Mutations as Bacterial Stress Response

Alen Požgajčić, 6888/BT

Abstract: Bacteria are exposed to changing environmental conditions and they are equipped with mechanisms of adaptation. Primarily, cells start to express proteins which enhance adaptation to stress through main stress regulator RpoS. Consequently, higher concentration of RpoS increases rate of mutation in a cell. For those stress induced mutations, there is needed additional stress on the molecule of the DNA like double stranded DNA break which causes expression of translesion polymerases that induce mutations in the molecule of the DNA. This mechanism is potentially key in the evolution of pathogen bacteria and cancer cells because of the similar mismatch repairs in eukaryotes and prokaryotes. Understanding the pathways in which mutations are induced can open new possibilities in biotechnology and medicine.

Key words: stress induced mutations, mechanisms of adaptation, SOS response, mismatch repair

Thesis contains: 31 pages, 4 figures, 1 tables, 86 references

Original in: Croatian

Final work is printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Ph.D. Višnja Bačun-Družina, Full Professor*

Thesis delivered: July, 2014

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. GLAVNI DIO	2
2.1. Mehanizmi popravka DNA u <i>E. coli</i>	2
2.1.1. Sustav za popravak krivo sparenih baza	2
2.1.2. Odgovor SOS.....	5
2.1.3. Homologna rekombinacija	6
2.2. Mehanizmi odgovora na stres	8
2.2.1. RNA polimeraza	8
2.2.2. Faktori σ	9
2.2.2.1. Protein RpoS i gen <i>RpoS</i>	10
2.2.2.1.1. Regulacija gena <i>rpoS</i> na razini transkripcije	11
2.2.2.1.2. Regulacija gena <i>rpoS</i> na razini translacije	12
2.2.2.1.3. Regulacija sinteze RpoS na razini stabilnosti proteina	14
2.2.2.1.4. Regulacija sinteze RpoS na razini aktivnosti proteina	15
2.2.3. Stres uzrokovan nedostatkom aminokiselina	17
2.2.4. Dvokomponentni sustav PhoP/PhoQ.....	18
2.3. Mutacije uzrokovane stresom	19
2.3.1. Mutacije uzrokovane dvolančanim lomom DNA	19
3. ZAKLJUČAK	22
LITERATURA	23

1.UVOD

Bakterije kao organizmi nižeg organizacijskog nivoa žive u dinamičnom okolišu što se tiče uvjeta i izvora nutrijenata. Preživljenje bakterije ovisi o tome koji će dobiti ekstracelularni signal i odgovoriti na njega promjenom u svom metabolizmu. Kao okolišni signali mogu biti koncentracija nutrijenata : ugljika, dušika, fosfora, izvora iona ili uvjeti u kojima bakterija raste kao što su : pH, temperatura, oksidativni i osmotski stres. Bakterije, kada dođe do nedostatka nutrijenata ili nagle promjene uvjeta, prilagođene su tako da uđu u stacionarnu fazu rasta. U toj fazi stanice nesporogenih bakterija ostaju dok ne dođu u ponovni kontakt s nutrijentima ili uvjetima pogodnim za njihov rast.

Prilagodba bakterija se većinom odvija preko globalnih regulatora koji djeluju na transkripcijskoj razini. Uz globalne faktore u prilagodbi bakterija na uvjete su ključni σ faktori koji povećavaju afinitet RNA polimeraze prema određenim promotorskim regijama bakterijskog operona. U bakteriji *Escherichia coli* pronađeno je sedam σ faktora od kojih je glavni regulator u bakterijskom odgovoru na stres σ^S odnosno RpoS. Protein RpoS posreduje u transkripciji gena čija je funkcija zaštita i preživljenje stanice u nepovoljnim uvjetima.

Jedan od načina kako se bakterija prilagođava na stres je taj da eksprimira translezijske polimeraze u prisutstvu dvostrukog loma DNA (*engl.* deoxyribonucleic acid) i nekog drugog okolišnog stresa (Rosenberg i sur., 2012). Stres koji može uzrokovati dvostruki lom DNA je UV svjetlost zbog koje se aktivira mehanizam popravka DNA pomoću odgovora SOS u kojem sudjeluju translezijske polimeraze čija je stopa pogrešaka veća od polimeraza koje sudjeluju u normalnim mehanizmima popravka DNA. Mutagenost translezijskih polimeraza pospješuje protein RpoS što rezultira ubrzanom evolucijom i prilagodbom bakterija.

U ovom radu opisani su mehanizmi evolucije u bakterija preko mutacija uzrokovanih stresom i prilagodba samih bakterija na preživljenje u stresnim uvjetima.

1. GLAVNI DIO

1.1 Mehanizmi popravka DNA u *E.coli*

Bakterija *Escherichia coli* je Gram-negativna bakterija koja nastanjuje donji dio probavnog trakta sisavac, a služi kao modelni organizam u mikrobiologiji za istraživanje biokemijskih procesa od kojih je jedan popravak DNA. Općenito mehanizmi popravka DNA su prijeko potrebni staniци zbog toga što se njima održava genetički materijal nekog organizma stabilnim. Kako se za života stanice događa puno mutacija, bez funkcijalnog mehanizma popravka pogrešaka u sparivanju baza, stanice bi bile genetički nestabilne, a ujedno i podložne smrti.

2.1.1 Sustav za popravak krivo sparenih baza

Sustav za popravak krivo sparenih baza (*engl.* mismatch repair, MMR), u stanici ima funkciju održavanja DNA stabilnom i popravlja moguće greške nastale krivim sparivanjem baza tijekom replikacije odnosno grešaka nastalih tijekom rekombinacije unutar homolognih regija DNA (Modrich i Lahue, 1996). Važno je napomenuti da MMR sustav sadrži slične mehanizme u prokariota i eukariota što ga čini zanimljivim za promatranje na modelnim organizmima odnosno *E. coli* i *Saccharomyces cerevisiae*. Za MMR sustav u *E. coli* potrebni su sljedeći proteini: MutS, MutL, MutH, DNA helikaza II (MutU/UvrD), četiri egz nukleaze (ExoI, ExoVII, ExoX i RecJ), proteini koji se vežu na jednolančanu DNA (single stranded DNA binding proteins, SSB), DNA polimeraza III holoenzim i DNA ligaza.

Protein MutS prvi započinje mehanizam popravka DNA tako da prepoznaje krivo sparene baze u DNA (Su i Modrich, 1986). On sadrži ATP-aznu aktivnost koja je potrebna u MMR kod *E. coli*. MutS je homodimer koji se sastoji od dvije podjedinice koje su jednake dok se ne vežu na mjesto gdje je došlo do krivo sparene baze. Nakon stvaranja kompleksa DNA i proteina, MutS djeluje kao heterodimer jer se podjedinice izmjene prostorno i funkcijalno (Lamers i sur, 2003).

Na MutS koji je vezan na krivo sparenu bazu, veže se MutL čije je funkcija da aktivira MutH. Protein MutL također služi za stvaranje funkcijalnog MMR kompleksa te stimulira vezanje i procesivnost helikaze II na MMR inicijacijskom mjestu. Kao i MutS, MutL je homodimer koji ima ATP-aznu aktivnost koja služi za aktiviranje vezanog proteina MutL te u mutantima koji nemaju funkcionalnu ATP-aznu aktivnost MutL protein, ne dolazi do aktivnog popravka krivo sparenih baza mehanizmom MMR (Spampinato i Modrich, 2000).

U *E. coli*, molekula DNA je metilirana na N⁶ poziciji adenina u sekvenciji nukleotida GATC. Razlog tomu je taj što tijekom replikacije se razlikuje stara molekule DNA od nove molekule DNA po tome što je stara metilirana. Hemimetilirana DNA određuje prema kojem

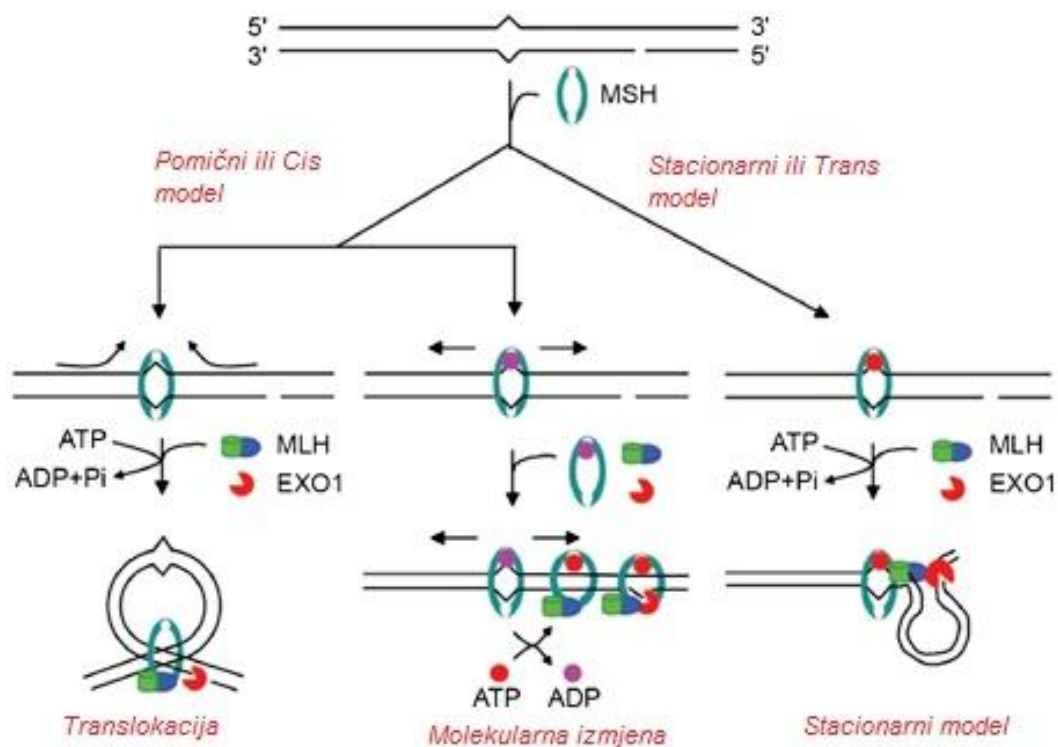
lanca od ta dva će se popravljati drugi, nemetilirani, odnosno novi prema metiliranom, odnosno starom. (Marinus i Olsen, 2014). Protein MutH, restrikcijska endonukleaza, u prisutstvu MutS, MutL i ATP-a, specifično se veže na novosintetizirani lanac te napravi jednolančani lom u sekvenciji GATC koji služi kao inicijacijsko mjesto za eksciziju pogrešno sparene baze.

U prisutstvu MutL, DNA helikaza II (UvrD) se veže na jednolančani lom i razmotava lanac u smjeru krivo sparene baze te se tako dobivaju dvije jednolančane molekule DNA na koje se vežu proteini SSB kako bi ih zaštitili od utjecaja egzonukleaza koje mogu razgraditi molekulu DNA (Yamaguchi i sur., 1998). Ovisno o smjeru krivo sparene baze od jednolančanog loma, djeluju različite egzonukleaze. U 5'→3' smjeru djeluju ExoVII i RecJ zbog svoje 5'→3' egzonukleazne aktivnosti, a u 3'→5' smjeru djeluju ExoI i ExoX zbog svoje 3'→5' egzonukleazne aktivnosti (Harris i sur., 1998). Egzonukleaze cijepaju nemetiliranu DNA poslije krivo sparene baze tako da nastaje jednolančani razmak (*engl.* gap) između krivo sparene baze i regije GATC. Taj razmak se popravljiva uobičajenim mehanizmom popravka koji se sastoji od DNA polimeraze III holoenzima koji ima 5'→3' polimeraznu aktivnost te sintetizira novi lanac DNA prema kalupu starog lanca. Na kraju popravka pomoću DNA polimeraze III holoenzima, krajevi lanaca se spoje posredstvom DNA ligaze koja je NAD⁺ ovisna u bakteriji *Escherichia coli* (Sriskanda i Shuman, 2002).

Unatoč velikom poznavanju biokemijskih mehanizama modelnog organizma *E. coli*, još nije razjašnjeno na koji način se dolazi do stvaranja kompleksa proteina s dva jako udaljena mjesta, mjesto pogrešno sparene baze i mjesto jednolančanog loma GATC regije. Postoje dva modela koji su predloženi kako bi objasnili taj nerazjašnjeni problem, cis ili pokretni model i trans ili stajajući model (slika 1.). Model trans se nalazi na desno na slici 1. U tom modelu je predloženo da se interakcijom proteina koji sudjeluju u popravku krivo sparenih baza DNA savija u zavojnicu koja približava udaljena mjesta dok je MutS i dalje vezan na krivo sparenu bazu (Guarné i sur., 2004). Također u ovom modelu ATP-azna aktivnost MutS služi kako bi provjerila vjerodostojnost krivo sparenih baza i aktivirala egzonukleaze koje cijepaju molekulu DNA jer se istovremeno moraju vezati ATP i DNA s krivo sparenom bazom kako bi došlo do spajanja ostalih proteina koji sudjeluju u sustavu za popravak nesparenih i krivo sparenih baza (Junop i sur., 2001)

U modelu cis, postoje dva tipa modela koji su predloženi, ali se baziraju na tome da nastaje kompleks MutS-MutL koji je vezan na mjesto krivo sparene baze i miče se od njega prema jednolančanom lomu gdje aktivira egzonukleaze koje cijepaju novosintetizirani lanac DNA. Prvi model takozvani „translokacijski“ model (Slika 1., lijevo) predlaže da hidroliza ATP-a pomiče MutS u svim smjerovima dok ne dođe do signala za novosintetizirani lanac, jednolančani lom (Allen i sur., 1997). Pomicanjem MutS-MutL kompleksa po molekuli DNA, tvori se formacija nalik α -uzvojnicu. Dolaskom kompleksa do signala, jednolančani lom aktiviraju se egzonukleaze koje onda cijepaju hemimetiliranu DNA odnosno lanac koji nije metiliran. Ovaj model sadrži nekakve nelogičnosti kao na primjer ta što MutS-MutL nema sposobnost izmjene ATP-a i ADP-a kada se odvoji od mjesta krivo sparene baze što bi značilo da kompleks ne bi mogao ići po molekuli DNA (Fischel i Acharya., 2005).

Drugi model, model „molekularne izmjene“ se sastoji od MutS koji je vezan na krivo sparenu bazu na kojem je molekula ADP-a. Izmjenom ADP-a i ATP-a, MutS se pokreće po molekuli DNA te otvara novo mjesto za sljedeći protein MutS. Takvim iterativnim vezanjem više molekula MutS se dobiva velika vjerodostojnost popravka molekule DNA. Na MutS se veže MutL koji onda tvori kompleks za vezanje ostalih efektora u popravku DNA kao što su DNA helikaza II, egzonukleaze i DNA polimeraza III holoenzim. Egzonukleaze se aktiviraju kada kompleks MutS-MutH dođe do signala (jednolančani lom). Na Slika 1. se ovaj model nalazi u sredini.



Slika 1. Modeli predloženi za opisivanje mehanizma popravka krivo sparenih baza. Signal za nemitilirani lanac je jednolančani lom u 5' smjeru, ali slično je mehanizam i u suprotnom smjeru. Na slici MSH predstavlja homolog proteina MutS u eukariotima, MLH homolog proteina MutL i EXO1 egzonukleazu Exo1. Prilagođeno prema (Li i sur.,2008).

2.1.2 Odgovor SOS

Odgovor SOS je, kao što ime kaže, stresni mehanizam mikroorganizma u kojem dolazi do popravka DNA nevažno o tome hoće li se sačuvati genetička stabilnost molekule DNA, odnosno u bakteriji se aktiviraju translezijske DNA koje su podložne greškama (krivo sparenim bazama) kako bi se vratila molekula u stabilno stanje (dvolančane uzvojnice). Dva najvažnija proteina u odgovoru SOS su RecA i LexA te se izmjenom jednog ili drugog regulira ekspresija gena koji sudjeluju u samom odgovoru..

Protein LexA je protein molekulske mase 27 kDa (Clark i Margulies, 1965) i po funkciji je transkripcijski represor koji drži ekspresiju gena *sos* niskom u stanici kada je molekula DNA u stabilnom stanju. Protein LexA sadrži slabu autokatalitičku aktivnost koja se ne odvija sve dok ne dođe u kontakt s koproteazom RecA. Svi geni koji se eksprimiraju tijekom odgovora SOS takozvani geni *sos* sadrže sekvencu DNA dugu 20 nukleotida koja se naziva SOS regija (*engl. box*) ili LexA regija na koju je vezan protein LexA te sprječava vezanje RNA polimeraze odnosno ekspresiju gena. Regija SOS je palindromska sekvenca te se zbog toga shvatilo da se LexA na njega veže kao dimer.

Protein RecA je protein molekulske mase od 36 kDa (Clark i Margulies, 1965) koji ima koproteaznu funkciju u SOS odgovoru. Ima veliki afinitet prema jednolančanoj DNA to jest da tvori kompleks nukleotid-protein dok je taj afinitet jako slab kod dvolančane DNA. Taj veliki afinitet prema jednolančanoj DNA vjerojatno služi kako bi se zaštitila DNA od razgradnje nukleazama. Protein RecA se veže na jednolančanu DNA u smjeru 5'→3' u odnosu od jedan protein RecA na tri nukleotida. Za vezanje na jednolančanu DNA, potrebna je molekula dATP ili ATP koja se hidrolizira tijekom otpuštanja RecA s jednolančane DNA.

Odgovor SOS započinje tako da se u okolini stanice nalazi kemijski agens (metilmetan sulfonat) ili fizikalni agens (UV-zračenje) koji oštećuju molekulu DNA, zaustavljaju sintezu DNA i diobu stanica te posljedično uzrokuju nakupljanje velike količine jednolančane DNA. Jednolančana DNA je signal proteinu RecA te se on veže na nju i aktivira svoju koproteaznu aktivnost. Uz prisutstvo koproteaze RecA, LexA aktivira autokatalitičku aktivnost koja cijepa LexA dimer, a koji se oslobađa sa SOS regije te tako omogućava normalnu ekspresiju gena *sos*. Protein RecA još služi kako u procesuiranju proteina UmuD tako što stvara lom na Cys24-Gly25 mjestu (Burckhardt i sur., 1988) koji je preduvjet za sastavljanje translezijske DNA polimeraze V koja se sastoji od proteina UmuD₂C. Korak procesiranja proteina UmuD u UmuD' pomoću RecA je ograničavajući korak odgovora SOS zato što traje puno duže od razgradnje LexA. Svi spomenuti protein : LexA, UmuD, PolB/DinA (Pol II) i DinB (Pol IV) su homologni u svojem karboksi-terminalnom kraju i za sve kodiraju geni *sos* koji su regulirani pod odgovorom SOS (Janion , 2008)

Osim što služi za popravljjanje molekule DNA čija je struktura narušena uslijed vanjskog faktora, odgovor SOS također uvodi spontane mutacije čija je svrha da se stanica genetički prilagodi na taj stres koji je uzrokovao degradaciju DNA. Ta pretpostavka vodi do novog zaključka da odgovor SOS jako evolucijsko sredstvo bakterije zbog svog svojstva da je

mutagen. Toj mutagenosti pridonose translezijske polimeraze koje nemaju 3'→5' egzonukleaznu aktivnost, odnosno nemaju mehanizam popravka krivo sparene baze.

DNA polimeraza V je glavni razlog mutagenosti odgovora SOS. Njegova ekspresija je jako slaba u stanicama koje nisu pod stresom, ali se aktivira vezanjem RecA na jednolančanu DNA. Geni koji kodiraju za polimerazu V su umuD i umuC i kao takvi su pod regulacijom LexA koji ih suprimira kao što je prethodno objašnjeno. Vezanjem RecA na jednolančanu DNA, LexA se razgradi te RNA polimeraza počinje transkribirati gene koji kodiraju za proteine UmuD i UmuC. Nakon sinteze proteina UmuD, potrebna je naknadno procesuiranje kako bi došlo do njegovog aktivnog oblika UmuD' koje provodi RecA. Vezanjem dvije podjedinice UmuD' i UmuC se dobiva aktivna polimeraza V. Njezino svojstvo je da replicira DNA preko mogućih oštećenja koje polimeraza III ne može, ali to čini uz visoku stopu pogrešaka, kako za oštećenu DNA, tako i za neoštećenu (Tang i sur., 1999). To svojstvo ga čini jakim mutatorom koji genetički mijenja bakterijske stanice.

2.1.3 Homologna rekombinacija

Stanicama je dvolančani lom molekule DNA ugroza za opstanak jer postoje stanični mehanizmi koji bi omogućili replikaciju ili transkripciju preko takvih oštećenja. Za to postoji homologna rekombinacija kojom se dvolančani lom popravlja prema homolognoj regiji unutar same molekule DNA. Homologna rekombinacija, osim očuvanja genomske stabilnosti organizama, također služi kako bi povećala genetičku raznolikost tako što promovira izmjenu DNA koja na kraju rezultira novim sekvencama (Michael i sur.,2007). U ovom radu će biti opisana funkcija homologne rekombinacije u očuvanju genomske stabilnosti.

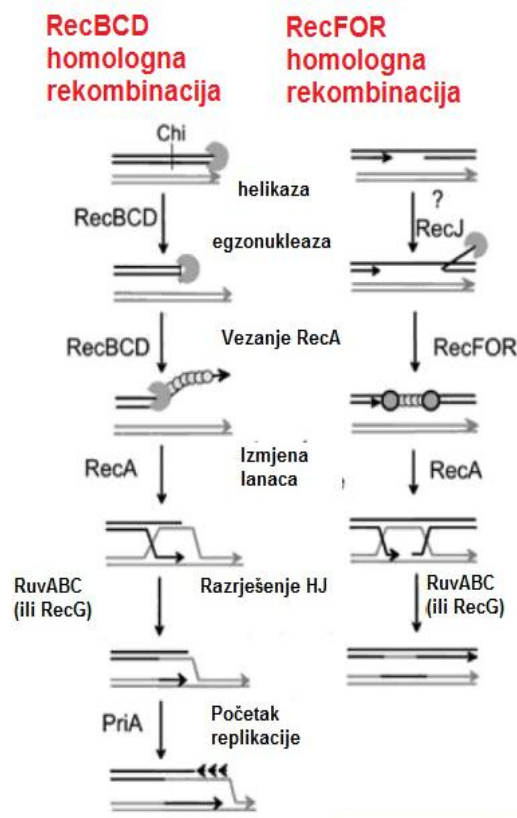
U popravku DNA pomoću homologne rekombinacije su uočena dva puta popravka, ovisno o supstratu: dvolančani lom molekule DNA, RecBCD ovisan put homologne rekombinacije, i jednolančane rupe DNA, RecFOR ovisan put homologne rekombinacije. U oba puta popravka, enzim koji služi izmjeni homologni sekvenci je rekombinacijski protein RecA. Aktivna forma ovog proteina je kada je vezan na jednolančanu molekulu DNA kao što je objašnjeno u odjeljku odgovor SOS. Glavne funkcije RecA u aktivnom obliku vezanom na jednolančanu molekulu DNA tijekom homologne rekombinacije je traženje homologne sekvence, izmjena lanaca i pomicanje točke izmjene lanaca (Michael i sur.,2007).

Razlika u dva puta homologne rekombinacije osim supstra je i taj na koji način dolazi do vezanja proteina RecA na jednolančanu DNA. Kod dvolančanog loma molekule DNA se veže enzimski kompleks koji se sastoji od tri enzima, RecBCD koji ima više funkcija od kojih su da razmata molekulu DNA dok istovremeno razgrađuje lance u jednolančanom obliku. To se događa sve dok ne dođe do sekvence koja se sastoji od osam nukleotida koja je naziva Chi. Dolaskom do te sekvence, 5'→3' egzonukleazna aktivnost RecBCD se poveća dok 3'→5' egzonukleazna aktivnost u potpunosti staje što rezultira nastankom lanca DNA u 5'→3' koji je supstrat za vezanje RecA.

Drugi put homologne rekombinacije je pomoću tri enzima: RecF, RecO, RecR zbog kojeg je još i dobio ime RecFOR ovisan put homologne rekombinacije. Njihova funkcija je da omogućuje vezanje RecA na jednolančanu molekulu DNA odnosno da zaobiđu već vezani SSB. U putu RecFOR dolazi do sastavljanja dva kompleksa enzima, RecFR i RecOR. Protein RecFR služi kako bi omogućio vezanje RecA na jednolančanu DNA koja već na sebi ima SSB, a funkcija kompleksa proteina RecOR je da veže RecA točno na mjesto gdje se nalazi jednolančana rupa u molekuli DNA. Uz ova tri enzima još RecJ sudjeluje u ovom tipu homologne rekombinacije. Protein RecJ je 5'→3' egzonukleaza koja najvjerojatnije proširuje jednolančanu rupu. Vezanjem RecA, dolazi do homologne rekombinacije središnjeg dijela jednolančane rupe ili 3' krajem dijela molekule DNA na kojem se nalazi jednolančani lom.

Nakon vezanja RecA, dolazi do preklapanja lanaca koji tvore intermedijer u obliku X, a zove se Hollidayjeva struktura (Hollidayjev čvor). Ta struktura je kratkog roka i dolazi do razrješenja pomoću enzima: RuvA, RuvB, RuvC i RuvG. Proteini RuvA i RuvB zajedno daju kompleks koji katalizira izmjenu lanaca unutar Hollidayjeve strukture. Također, RuvA se veže na čvor dok RuvB povećava njegov afinitet za vezanje na čvor. Funkcija RuvB je da on služi u izmjeni lanaca tijekom homologne rekombinacije (Shinagaw i sur., 1996). Kako bi došlo do razrješenja čvora, potreban je još enzim RuvC koji služi kao egzonukleaza specifična za razmotavanje Hollidayevog čvora. Uz prisutnost dvovalentnih kationa, Mg^{2+} ili Mn^{2+} , RuvC reže homologne molekule DNA na isto mjestu, u istom usmjerenju kako bi se pri ponovnom povezivanju s lancem druge molekule DNA, dobila stabilna molekula. Pri nukleaznoj aktivnosti RuvC, veći je afinitet za rezanje kod nukleotida timidina u 3' smjeru. Alternativno, helikaza RuvG može poslužiti u rekombinaciji zbog svog svojstva da kao i RuvB katalizira izmjenu lanaca između homolognih regija te tvori Hollidayjevu strukturu između tri lanca DNA za razliku od RuvAB kompleksa kojima su potrebna četiri lanca. Pri djelovanju RuvG nije potrebna egzonukleaza za razrješenje Hollidayjeve strukture.

Zadnju funkciju u popravku DNA homolognom rekombinacijom ima protein PriA koji uz pomoć proteina PriB, PriC i DnaT započinje replikaciju DNA unutar D strukture ili strukture replikacijskih rašlji. Protein PriA prepoznaje strukturu D omče koja nastane tijekom popravka DNA pomoću kompleksa RecBCD koji katalizira vezanje replikativne helikaze, DnaB. Vezanjem DnaB, omogućuje se vezanje replisoma, odnosno enzima odgovornih za replikaciju DNA koji započinje replikaciju rekombinantnog intermedijera kao što je to pokazano na slici 2.



Slika 2. Dva modela popravka DNA homolognom rekombinacijom. Legenda : Hollidayev čvor (*engl.* Holliday junction, HJ). Prilagođeno prema Michael i sur.- (2007)

2.2 Mehanizmi odgovora na stres

Bakterije su rasprostranjene u svim nišama koje nas okružuju i u simbiotskim odnosima s drugim bakterijama i organizmima. Nalaze se mnogim mjestima gdje mogu dobro rasti, ali i onima u kojima im uvjeti nisu pogodni za rast. Takvi uvjeti mogu biti nepovoljna temperatura, pH, osmotski tlak, nedostatak izvora ugljika, dušika, fosfora. Za takve uvjete kod bakterija postoje mehanizmi za preživljenje dok se oni ne promjene u uvjete koji pogoduju njihovom rastu

2.2.1 RNA polimeraza

RNA (*engl.* ribonucleic acid) polimeraza je enzim čija je funkcija prepisivanje iz molekule DNA u molekulu RNA. RNA polimeraza provodi prvi korak u ekspresiji gena. DNA ovisna RNA polimeraza provodi transkripciju u tri faze: inicijacija, elongacija i

terminacija tijekom kojih pomoću ribonukleotida sintetizira mRNA (*engl.* messenger ribonucleic acid), a koristi DNA kao kalup prema kojem sintetizira mRNA.

Multienzimski kompleks RNA polimeraza može biti u dva oblika, kao jezgra enzima ili kao holoenzimski kompleks koji se sastoji od dvije α podjedinice, jedne β , jedne β' te jedne ω podjedinice. Funkcija dvije α podjedinice je u sastavljanju enzimskog kompleksa i prepoznavanje regulatornih faktora, β podjedinica ima polimeraznu aktivnost odnosno katalizira sintezu RNA, β' služi za nespecifično vezanje enzima na DNA, a ω podjedinica služi za renaturiranje RNA polimeraze u aktivnu formu *in vitro* (Bačun-Družina i sur., 2011). Jezgra enzima sama po sebi ne može prepoznati promotore na DNA te se događa nasumično vezanje RNA polimeraze na DNA. Holoenzimski kompleks nastaje kada se na jezgru RNA polimeraze veže σ podjedinica. Podjedinica σ daje holoenzimskom kompleksu specifičnost za vezanje na određene promotore te više ne dolazi do nasumičnog vezanja RNA polimeraze na molekulu DNA. (Cho i sur., 2014). Faktor σ vrši selekciju promotorskih područja bakterijskih gena na koje se veže holoenzim RNA polimeraze i tvori transkripcijski kompleks.

2.2.2 Faktori σ

Za prvi korak u sintezi mRNA, inicijaciju, RNA polimerazi su potrebni σ -faktori. Funkcija σ -faktora je da smanjuje nespecifično vezanje RNA polimeraze na DNA dok ujedno povećava specifično vezanje RNA polimeraze na određenu promotorsku regiju koja ovisi o σ -faktoru koji je vezan na jezgru RNA polimeraze (Bačun-Družina i sur., 2011). Kod označavanja σ faktora potrebno je znati da broj u superskriptu označava njegovu molekulsku masu u kDa kao na primjer σ^{70} što govori da je to sigma faktor koji ima molekulsku masu od 70 kDa.

U *Escherichia coli* su do sada opisana sedam σ -faktora od kojih je svaki specifičan za pojedinu stimulaciju iz okoliša. Primarna je ekspresija σ^{70} koji je potreban za ekspresiju konstitutivnih gena i gena potrebnih u eksponencionalnoj fazi rasta. Ostali faktori σ su: σ^{54} , σ^{38} , σ^{32} , σ^{28} , σ^{24} i σ^{19} . Kao što je već spomenuto, svaki σ faktor ima svoju funkciju i uvjete kada se eksprimira, a od ostalih šest σ -faktora je: σ^{19} –transport iona, σ^{24} –ekstremne temperature, σ^{28} –biosinteza bičeva, σ^{32} –toplinski šok, σ^{38} –stacionarna faza i σ^{54} –regulacija dušika, a geni koji kodiraju su *fecI*, *rpoE*, *rpoF*, *rpoH* i *rpoN*. Funckije i geni koji kodiraju za faktore σ prikazane su u tablici 1. Također je uočeno da dolazi do kompeticije između faktora σ za RNA polimerazu zbog toga što se vežu na isto mjesto u enzimu jer, dok je razina RNA polimeraze u stanici jednaka u svim uvjetima, količina faktora σ se mijenja ovisno o uvjetima i stanju u kojem se nalazi stanica. Bakterija *E. coli* W3350 u bogatom mediju sadrži koncentraciju RNA polimeraze od otprilike 2000 jedinica po genomskom ekvivalentu DNA, dok je samo jedna trećina disocirana s DNA. Kako u stanici postoji 1200 različitih molekula svih sedam faktora σ , vidljivo je da ih ima puno više nego što je jezgri enzima RNA polimeraze (Ishima, 2000).

Tablica 1. Faktori σ i njihova funkcija

Sigma faktor	Gen	Funkcija
σ^{70}	<i>rpoD</i>	Ekspresija konstitutivno eksprimiranih gena
σ^{54}	<i>rpoN</i>	Ekspresija gena za regulacija dušika
σ^{38}	<i>rpoS</i>	Ekspresija gena tijekom stacionarne faze
σ^{32}	<i>rpoH</i>	Ekspresija gena za odgovor na toplinski šok
σ^{28}	<i>rpoF</i>	Ekspresija gena odgovornih za sintezu bičeva i kemotaksiju
σ^{24}	<i>rpoE</i>	Ekspresija gena odgovora na ekstremne temperaturne uvjete
σ^{19}	<i>fecI</i>	Ekspresija gena odgovornih za transport iona

2.2.2.1 Protein RpoS i gen *rpoS*

Protein RpoS ili σ^{38} je jedan od sedam sigma faktora. Glavni je regulator općeg odgovora stanice na stres u *E. coli* koji se eksprimira ulaskom stanice u stacionarnu fazu rasta ili utjecajem nekog vanjskog stresa. RpoS sudjeluje u ekspresiji 500 gena što je otprilike 10% sveukupnih gena u bakteriji *E. coli* (Weber i sur., 2005).

Protein RpoS se sintetizira u stanici tijekom dvije faze: kada je stanica izložena nekom stresu ili kada stanica ulazi u stacionarnu fazu rasta. Ekspresija gena *rpoS* se također odvija u eksponencionalnoj fazi rasta bakterije, ali neznatno naspram σ^{70} podjedinice. U bakterijskoj stanici tijekom stresnog stanja kao što je niski pH, nepovoljna temperatura, nedostatak nutrijenata ili ulaskom u stacionarnu fazu rasta, počinje ekspresija proteina RpoS koji prilagođava stanični metabolizam intenzivnog rasta u metabolizam održavanja. Važno je napomenuti da količina proteina RpoS ne raste ulaskom u stacionarnu fazu nego je već povišena i u eksponencionalnoj fazi tijekom rasta bakterije na minimalnom mediju (Mandel i Silhavy, 2005).

U daljnjem dijelu teksta će biti objašnjena regulacija ekspresije gena *rpoS* na razini transkripcije, na razini translacije, na razini stabilnosti proteina i na razini aktivnosti proteina.

2.2.2.1.1 Regulacija gena *rpoS* na razini transkripcije

U stanicama uvijek postoji određena količina mRNA koja kodira za protein RpoS, čak i u uvjetima neefikasne translacije *rpoS* mRNA ili brze degradacije proteina RpoS. Koncentracija *rpoS* mRNA se stalno održava u stanici transkripcijom gena *rpoS*. Transkripcija se provodi RNA polimerazom holoenzimom koji je sastavljen od jezgre i podjedinice σ^{70} koji se konstitutivno eksprimira u stanicama. Uočeno je da regulacija gena *rpoS* na razini transkripcije nema utjecaj na ekspresiju gena *rpoS* pod utjecajem stresa na stanicu, ali ima tijekom ulaska stanice u stacionarnu fazu rasta (Hengge, 2011).

Na regulaciju gena *rpoS* na razini transkripcije utječu dvije molekule koje se još nazivaju alarmoni. Alarmoni su male signalne molekule koje se počinju sintetizirati u stanici dok je u uvjetima stresa, a funkcija im je da bakterijskim stanicama omogućuju brzi odgovor na stres. Prvi alarmon, cAMP (*engl.* cyclic adenosine 3',5'-monophosphate) povezan s CRP (*engl.* cAMP receptor protein) tvori kompleks koji ima dvojaku funkciju u regulaciji ekspresije gena *rpoS*. Tijekom eksponencijalne faze rasta, cAMP-CRP reprimiraju ekspresiju gena *rpoS*, a tijekom stacionarne faze se veže na aktivatorsko mjesto na poziciji -62 do -5 uzvodno od gena *rpoSp* i doprinosi aktivaciji transkripcije (Mika i Hengge, 2005). Drugi alarmon u stanici je ppGpp (guanozin 3',5'-tetrafosfat) koji se sintetizira u stanici tijekom stresa uzrokovanog nedostatkom nutrijenata. Njegova funkcija je aktivacija ekspresije gena, ali mehanizam djelovanja nije razjašnjen. Jedino je uočeno da djeluje na elongaciju tijekom sinteze mRNA. Regulacija se još vrši pomoću proteina ArcA u fosforiliranom obliku koji se veže na -63 i +23 mjestu u odnosu na gen *rpoSs* te se preklapa s mjestom za vezanje cAMP-CRP (Mika i Hengge, 2005). Protein ArcA djeluje kao represor u fosforiliranom obliku te se njegovo djelovanje može umanjiti pomoću aktivacije kompleksom cAMP-CRP. Mehanizam djelovanja je da kinaza ArcB fosforilira ArcA i RssB. Enzim RssB djeluje proteolitički na protein RpoS. Takvim djelovanjem se protein RpoS regulira na razini transkripcije i na razini stabilnosti proteina. Dvokomponentni sustav, BarA/UvrA djeluje kao aktivator transkripcije ali točan mehanizam djelovanja je nepoznat (Hengge, 2008).

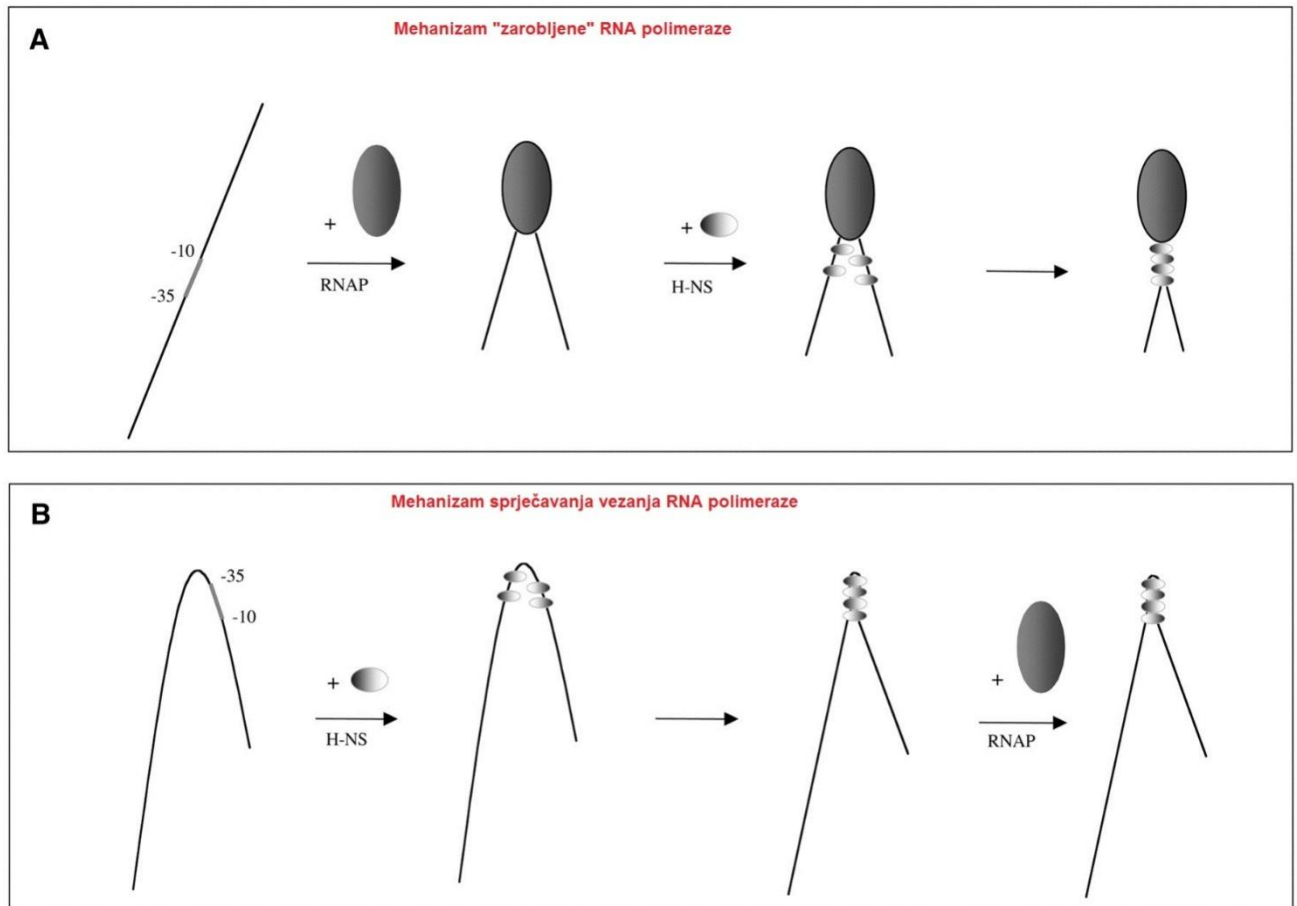
2.2.2.1.2 Regulacija gena *rpoS* na razini translacije

Molekule mRNA su ključne za sintezu proteina jer sadrže informaciju koju prenose s DNA na ribosom gdje se translatira u protein. Enzimi koji sprječavaju vezanje *rpoS* mRNA tako što razgrađuju molekulu mRNA su RNaza E i RNaza III. Moguća stabilizacija molekule je moguća pomoću sRNA (*engl.* small ribonucleic acid) koja pospješuje translaciju mRNA (McCullen i sur., 2010)

Molekula mRNA koja se transkribira s *rpoSp* promotora sadrži 565 parova baza dugu regiju koja se ne translatira (*engl.* 5'- untranslated region, UTR) (Lange i sr.,1995). Dok se stanica nalazi u uvjetima bez stresa, regija UTR je preklopljena u sekundarnu strukturu u kojoj regija za inicijaciju translacije nije dostupna ribosomu i ne dolazi do sinteze proteina. U stresnim uvjetima, inicijacijska regija (*engl.* translation initiation region, TIR) se ne sparuje s komplementarnim bazama unutar sebe i ne tvori sekundarnu strukturu te je dostupna ribosomu koji onda provodi translaciju. Za to su potrebni dodatni proteini i sRNA. Jedan od tih proteina je Hfq protein koji služi kao platforma za vezanje mRNA i sRNA te regulaciju translacije same mRNA. Protein Hfq ima najveći afinitet za najmanje tri sRNA: DsrA, ArcZ i RprA. Ove tri sRNA se vežu na anti-TIR regiju koja je komplementarna TIR regiji te tako sprječavaju unutarlančano sparivanje *rpoS* mRNA i omogućuju vezanje ribosoma na mRNA i translaciju. Dodatna funkcija DsrA i RprA je ta da čuvaju *rpoS* mRNA od razgradnje uzrokovane RNazom E. Uvjeti u kojima se sRNA sintetizira su različiti za svaku pa tako se DsrA sintetizira tijekom stresa uzrokovanog niskom temperaturom (Majdalani i sur.,1998), ArcZ tijekom negativne sprege dvokomponentnog sustava ArcB/ArcA (Mandin i Gottesman, 2010) te RprA tijekom visokog osmotskog tlaka (Majdalani i sur. 2002)

Od ostalih faktora koji reguliraju transkripciju *rpoS* su poznati proteini nalik histonima. Njihova funkcija u bakterijskim stanicama je nalik onoj u stanicama eukariota, doprinose organizaciji bakterijskog nukleoida kao što histoni djeluju u kromatinu eukariota. Jedan dio njih utječe na ekspresiju gena u stanici, a ujedno i rekombinaciju i replikaciju DNA. Od tih proteina, najvažniji su HU i H-NS (*engl.* Heat unstable, HU i Histon-like nucleoid structuring, H-NS). Uočeno je da protein HU se veže na TIR regiju unutar *rpoS* regulona i posljedično uzrokuje aktivaciju transkripcije *rpoS* mRNA, međutim kako ju aktivira nije poznato. Nasuprot HU, protein H-NS djeluje antagonistički i pospješuje proteolizu RpoS (Dorman i Deighan,2003). H-NS djeluje tako da se veže na DNA koja je zavijena, a to je

većinom u promotorskoj regiji, i tako vrši represiju na više od 100 gena od kojih je jedan i *rpoS* (Dame i sur.,2002). Slika 3. prikazuje dva predložena načina na koja H-NS djeluje i vrši represiju gena.



Slika 3. Dva modela vezanja H-NS na molekulu DNA i zaustavljanja transkripcije. Prvi model prikazuje kako proteini H-NS vežu RNA polimerazu (RNAP) u otvorenom inicijacijskom kompleksu tako što prostorno ne dopuštaju elongaciju mRNA i zaustavljaju transkripciju. U drugom modelu se početno veže H-NS na promotorsku regiju te ne dopušta vezanje RNAP i ne dolazi do inicijacijskog koraka transkripcije. Prilagođeno prema Dame i sur.- (2002)

Uz HU i H-NS postoji još puno mehanizama i puteva kojim se gen *rpoS* regulira, ali mnogo ih nije objašnjeno. Dva transkripcijska faktora utječu na ekspresiju gena *rpoS* od kojih transkripcijski faktor LeuO utječe tako da reprimira ekspresiju gena *dsrA* pri niskoj temperaturi i tako indirektno utječe na ekspresiju gena *rpoS*. Drugi transkripcijski faktor,

LrhA, vrši represiju transkripcije gena *rpoS* po nepoznatom mehanizmu, ali je reguliran sustavom za otpuštanje fosfata Rcs, koji ga reprimira dok ujedno aktivira ekspresiju gena *rpoS* (Peterson i sur., 2006).

2.2.2.1.3 Regulacija sinteze RpoS na razini stabilnosti proteina

U stanicama tijekom eksponencionalne faze rasta, protein RpoS je veoma nestabilan odnosno vrijeme poluraspada je par minuta (Hengge i Aronis, 2002). Bez faktora koji bi stabilizirali protein, zbog razgradnje njegova koncentracija u stanici je vrlo niska, međutim postoji bazalna ekspresija gena *rpoS*. Pojavom vanjskog stresa na stanicu, dolazi do nagle stabilizacije RpoS. U odnosu na vanjski stres, ulaskom stanice u stacionarnu fazu rasta, postepeno se povećava koncentracija RpoS.

Protein RpoS se razgrađuje u stanici proteazom ClpX (Zhou i sur., 2001). Proteaza ClpX je ATP ovisna te joj je za razgradnju RpoS potreban protein koji služi kao faktor prepoznavanja, regulator RssB (Pratt i Silhavy, 1998). Protein RssB u svom fosforiliranom obliku se veže visokim afinitetom za domenu 3 proteina RpoS koja sadrži aminokiselinu K173 i nužna je za vezanje RssB (Becker i sur., 1999). Fosforilacija RssB povećava afinitet za vezanje na RpoS u stanicama *in vivo* koji tako pospješuje degradaciju RpoS. Koncentracija RssB u stanicama je 20 puta manja od RpoS (Pruteanu i Hengge-Aronis, 2002), te je potrebna efikasna regulacija preko fosforilacije. Pokusima *in vitro* je dokazano da se odvija razgradnja RpoS u prisustvu nefosforiliranog proteina RssB, kada je u povećanoj koncentraciji što dovodi do pretpostavke da u stanici postoji kompeticija između fosforiliranog i nefosforiliranog RssB za protein RpoS (Klauck i Hengge, 2012). Vezanjem RssB na RpoS događa se konformacijska promjena u RpoS koja uzrokuje pristup N-terminalnoj regiji u RpoS koju prepoznaje proteaza ClpX. Za aktivnost ClpX su potrebni: ATP, RssB i acetilfosfat kao donor fosfata za RssB. Regulacija na razini stabilnosti proteina se uočava kod ulaska stanice u stacionarnu fazu rasta kada se počinje smanjivati koncentracija donora fosfora za fosforilaciju RssB te se tako povećava stabilnost samog proteina RpoS. Također autofosforilacija donora fosfata, acetil fosfat i fosforilirana ArcB, je inhibirana tijekom ulaska stanice u stacionarnu fazu rasta pomoću oksidiranih kinona koji nastaju zbog ograničenja energije u stanici uz prisutstvo kisika (Mika i Hengge, 2005). Ovim načinom stanica regulira koncentraciju RpoS postepeno.

U kontaktu sa stresom, stanici je potreban brzi odgovor i zaustavljanje razgradnje proteina RpoS. To se postiže omjerom između RssB i RpoS odnosno količinom jednog i drugog koji mogu stupiti zajedno u interakciju. Taj omjer je reguliran negativnom povratnom spregom jer ekspresija RssB je ovisna o proteinu RpoS-u. Regulacija omjera RssB i RpoS se postiže povećanjem koncentracije RpoS u stanici uslijed stresa što uzrokuje stabiliziranje samog proteina ili smanjenjem koncentracije RssB koji se može vezati na RpoS. Povećanje koncentracije RpoS stabilizira sam protein zbog toga što, iako se i dalje događa vezanje RssB na RpoS i samim time razgradnja, u stanici postoji puno RpoS na koji se RssB neće vezati i tako neće uzrokovati proteolizu većeg dijela RpoS u stanici. Isto tako se RssB može regulirati preko malih anti-RssB protein: IraP, IraM, IraD. Njihova funkcija je vezanje za RssB i tako onemogućavanje njegove interakcije s RpoS. Iako jednako djeluju, eksprimiraju se u različitim situacijama: IraP prilikom nedostatka fosfata, IraM pri niskoj koncentraciji magnezija, a IraD nakon oštećenja DNA ili u kontaktu stanice s H₂O₂ koje je jako oksidirajuće sredstvo (Bougdour i sur., 2006, 2008; Merrih i sur., 2009).

Vezanje RpoS proteina za jezgru enzima RNA polimeraze ili protein RssB je međusobno isključivo (Klauck i Hegge, 2012). Kada je protein RpoS vezan na jezgru RNAP on je zaštićen i ne može biti razgrađen proteazom ClpX. Pomoću proteina Crl koji povećava afinitet vezanja RpoS za jezgru RNAP, postiže se regulacija stabilnosti RpoS. Isto tako ppGpp pospješuje stvaranje holoenzima RNA polimeraza i RpoS i tako dodatno stabilizira molekulu RpoS.

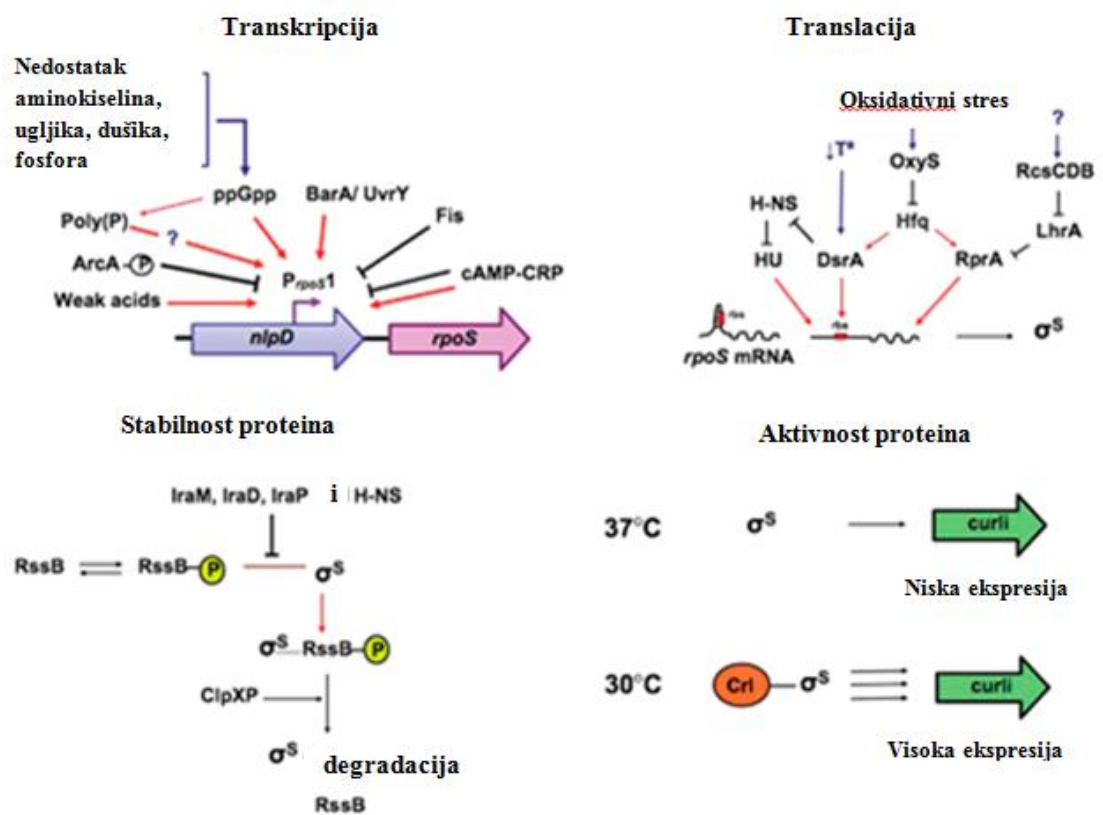
2.2.2.1.4 Regulacija sinteze RpoS na razini aktivnosti proteina

Aktivnost sigma faktora je ovisna o vezanju na jezgru RNA polimeraze te se na razini toga regulira aktivnost samog RpoS proteina (Helmann, 2011). Budući da protein RpoS nije jedini sigma faktor u stanici, postoji kompeticija za vezanje na jezgru RNA polimeraze. Regulator RpoS u toj kompeticiji ima najmanji afinitet od svih sigma faktora (Colland i sur., 2002) zbog čega mu je potreban efikasan mehanizam regulacije kako bi tvorio RNA polimeraza holoenzim.

Glavni konkurent za vezanje alternativnih sigma faktora, a ujedno i RpoS, u stanici je σ^{70} zbog toga što je njegova koncentracija u stanici tijekom ekspanzionalne faze rasta najveća. Regulacija aktivnosti sigma faktora se postiže anti- σ^{70} proteinom Rsd koji se in vitro veže na σ^{70} faktor u odnosu 1:1 i aktivira ekspresiju ovisnih gena RpoS (Mitchell i sur., 2007).

Također je uočeno da vezanjem Rsd na jezgru RNAP uzrokuje odvajanje σ^{70} iz holoenzima (Ilag i sur.2004). Protein Rsd svojom funkcijom pospješuje vezanje svih alternativnih sigma faktora, ne samo RpoS-a. Za RpoS postoje dva proteina koji striktno reguliraju njegovu aktivnost, a to su proteini Crl i FliZ koji djeluju suprotno jedan od drugog u ovisnosti o proteinu RpoS. Protein Crl se veže na RpoS i pospješuje specifično formiranje RNAP holoenzima s proteinom RpoS tijekom ulaska stanice u stacionarnu fazu rasta dok protein FliZ negativno djeluje na ovisne gene *rpoS* (Pesavento i sur., 2008). Protein FliZ regulira aktivnost tako što se veže na promotorsku regiju koja se nalazi uzvodno od gena *rpoS* i tako sprječava vezanje RNA polimeraza i aktiviranje ovisnih gena RpoS. Osim regulacije proteina RpoS, njegova je funkcija da privremeno aktivira ekspresiju gena za bičeve koja traje u post-eksponencionalnoj fazi nakon koje se sam inhibira ulaskom u stacionarnu fazu rasta.

Na slici 4. je shematski prikaz regulacije proteina RpoS na svim razinama spomenutim tijekom ovog poglavlja.



Slika 4: Regulacija aktivnosti proteina RpoS na razini transkripcije, translacije, stabilnosti proteina i aktivnosti proteina. Prilagođeno prema Navarro Llorens i sur.- (2010)

2.2.3 Stres uzrokovan nedostatkom aminokiselina

Aminokiseline su gradivni materijal stanice bakterije i prijeko su potrebne za njen rast, a mogu biti korištene za energiju. Nedostatkom aminokiselina stanici je potrebna adaptacija jer dolazi do zaustavljanja translacije uslijed vezanja neacilirane tRNA (*engl.* transport ribonucleic acid). Funkcija tRNA je da aktivira i dovede aminokiseline do ribosoma gdje se odvija translacija. Zbog male količine aminokiselina događa se da nema vezanja aminokiseline na tRNA, posljedično se neacilirana tRNA veže na A (amino-acilno) mjesto na ribosomu (Jenvert i Schiavone, 2005). Na prazno mjesto, umjesto aminokiseline, veže se SF (*engl.* stringent factor) ili protein RelA. Njegovom vezanju pridonosi ribosomski protein L11 svojim N-terminalnim pokretnim dijelom koji katalizira vezanje na ribosom pomoću dijela bogatog aminokiselinom prolinom (Jenvert i Schiavone, 2007). Protein RelA kod vezanja prolazi konformacijske promjene koje aktiviraju doniranje β - i γ fosfata s ATP na guanozin trifosfat (GTP) ili guanozin difosfat (GDP) od kojih je većinski produkt koji nastaje ppGpp ili guanozin pentaosfat odnosno pppGpp. Prekursor pppGpp u stanici nema aktivnost te se mora hidrolizirati u ppGpp pomoću guanozin 5' fosforilaze koja cijepa jedan fosfat te nastaje efektor ppGpp koji djeluje na RNAP kao što je već opisano u tekstu. Također funkcija ppGpp u ovom kontekstu je ta da osim aktiviranja gena *rpoS*, djeluje na sintezu stabilnih RNA u stanici (tRNA i rRNA) tako što reprimira njihove gene dok ujedno aktivira gene za sintezu mRNA, a koja kodira za enzime u sintezi aminokiselina (Jenvert i Schiavone, 2005). Na taj način stanica zaustavlja daljnji rast i usmjerava se na preživljavanje u stresnim uvjetima.

Nakon vraćanja stanice u normalne uvjete, protein SpoT djeluje u razgradnji ppGpp natrag u GDP hidrolizom pirofosfata. Također protein SpoT ima slabu sposobnost sinteze pppGpp iako mehanizam kojim to radi nije poznat i ne zna se kako dolazi do prepoznavanja vanjskog stresa.

2.2.4 Dvokomponentni sustav PhoP/PhoQ

Dvokomponentnim sustavom PhoP i PhoQ određene Gram-negativnih bakterija se prilagođavaju na nepovoljne uvjete kao što su nizak pH, niska koncentracija divalentnih kationa i prisutstvo antimikrobnih peptida koji štetno djeluju na bakterijsku stanicu (Groisman, 2001). Sustav se sastoji od dva glavna proteina: PhoP koji je unutarnji membranski senzor i citoplazmatskog regulatora odnosno transmembranski protein PhoQ. U bakterije *Salmonella typhimurium*, protein PhoQ se sastoji od dvije domene od koje je C-terminalna dugačka citoplazmatska regija koja se sastoji od histidina čija je funkcija autofosforilacijska i od periplazmatske regije, regija između dva lipopolisaharidna sloja u staničnoj membrani Gram-negativnih bakterija, koja sadrži kisele aminokiselinske ostatke čija je funkcija u određivanju divalentnih kationa u okolini (García i sr., 1996). Vezanjem Mg^{2+} i Ca^{2+} na periplazmatsku regiju uzrokuje defosforilaciju fosfo-PhoP proteina pomoću C-terminalne regije, a koja uzrokuje represiju gena u *phoPQ* operonu. Operon *phoPQ* se sastoji od dva promotora od kojeg jedan aktivira rast stanice bakterije u niskoj koncentraciji Mg^{2+} dok drugi se konstitutivno eksprimira tijekom cijelog života bakterije. Sam operon se sastoji od gena koji kodiraju primarno za adaptaciju na niske koncentracije Mg^{2+} , gena koji kodiraju za proteine koji stvaraju promjene u staničnoj membrani i gene za virulentnost Gram-negativnih bakterija. Za adaptaciju na nisku koncentraciju Mg^{2+} su zaslužni geni *mgtA* i *mgtB* koji kodiraju za P-tip ATPaza *MgtA* i *MgtB* čija je funkcija unos Mg^{2+} niz elektrokemijski gradijent, a ujedno kotransport liganda iz stanice (Smith i Maguire, 1998).

Optimalan pH za bakterijske stanice je oko neutralnog te je blago kiseli medij za njih nepovoljan uvjet odnosno stres. U blago kiselom mediju, ekspresija dijela operona *phoPQ* je povećana te se smatra da pH također utječe na sustav regulacije PhoP-PhoQ (Bearson i sr. 1998). Mehanizam kako sam pH djeluje još nije poznat, ali se zna da ne ide preko transmembranskog regulatora PhoQ i ne aktivira ga PhoP unutarnji membranski senzor kao što je to u prisutstvu Mg^{2+} .

2.3 Mutacije uzrokovane stresom

Teorija evolucije kaže da se mutacije događaju stalno, postepeno i nasumično tijekom vremena. Naknadno je uočeno da se stopa mutacije može povećati uslijed okolišnog stresa koji uzrokuje aktivaciju proteina RpoS. Sama adaptacija je prijeko potrebna bakterijama zbog njihovog života u dinamičnim okolišnim uvjetima od kojih većina nije optimalna za rast same bakterije. Mutacije uzrokovane stresom uzrokuju mutacije koje potencijalno mogu povećati genetičku raznolikost i sposobnost stanice da se adaptira na uvjete u kojima se nalazi. U rijetkim stanicama kod kojih dođe do mutacija koje uzrokuju preživljavanje u stresnim uvjetima, također se akumulira i velik broj mutacija koje su potencijalno važne za evoluciju samog organizma. Predložena su dva modela kako stres može uzrokovati mutaciju oko kojih se još uvijek raspravlja, a to su mutageneza izazvana stresom (*engl.* stress induced mutagenesis, SIM) i mutageneza povezana sa stresom (*engl.* stress associated mutagenesis, SAM). Razlika je u tome što SAM pretpostavlja da je uzrok mutacija tijekom izlaganja stanice stresu nasumičan i nema direktne povezanosti između ta dva događaja, a za SIM se smatra da postoji povezanost te da stres direktno uvjetuje stopu mutacije preko regulacije DNA polimeraza u stanici. U ovom radu će se razmatrati SIM model.

2.3.1 Mutacije uzrokovane dvolančanim lomom DNA

Mutacija uzrokovana stresom uslijed dvolančanog loma u DNA je predloženi mehanizam kojim stanica uvodi mutacije u svoj genom. Za taj mehanizam potrebno je da se istovremeno zadovolje tri uvjeta u stanici: (i) popravak dvolančanog loma u DNA (*engl.* double stranded break, DSB, *engl.* double stranded end, DSE) pomoću homologne rekombinacije kao što je već navedeno u tekstu; (ii) odgovor SOS i (iii) vanjski stres koji uzrokuje glavni odgovor stanice na stres odnosno ekspresiju gena transkripcijskog faktora RpoS.

Stopa spontane pojavnosti DSB u stanici je 10^{-3} , a samo 25 % dvolančanih lomova se popravljaju pomoću odgovora SOS (Pennington i Rosenber, 2007). To ukazuje da pojava dvolančanih lomova automatski aktivira odgovor SOS u stanici. Kao što je prethodno objašnjeno, odgovor SOS aktivira ekspresiju translezijskih polimeraza koje su važne u

popravku molekule DNA. Njihova mana je što nemaju 3'→5' egzonukleaznu aktivnost (*engl. proof reading*). U stanicama gdje dolazi do odgovora SOS, povećava se ekspresija gena *dinB* za 10 puta, a koji kodira za PolIV (Shee i sr., 2011). Unatoč tome, popravak DSB i dalje nije mutagen dok ne dođe do ekspresije faktora RpoS odnosno u okolici se ne pojavi neki stres za stanicu. Faktor RpoS aktivira ekspresiju *dinB* dvaput više te iz nemutagenog popravka DNA prelazi u mutageni. Također je uočeno da PolIV ima visoki stupanj vjernosti uslijed replikacije DNA nasuprot lezija, ali nizak stupanj nasuprot neoštećenog dijela DNA (Bjedov i sr., 2007). Uz protein RpoS, transkripcijski faktor NusA u stanici povećava aktivnost translezijskih polimeraza PolIV i PolV fizičkim vezanjem na njih no uzrok tome još nije razjašnjen (Cohen i sur.,2009).

Funkcija proteina RpoS u popravku DSB/DSE je aktiviranje polimeraza koje rade greške (*engl. error-prone polymerase*) i koje nemaju 3'→5' egzonukleaznu aktivnost te uvode različite mutacije u DNA. Kao jedna od polimeraza s niskim stupnjem vjernosti, PolIV uvodi 85 % mutacija delecije nukleotida u odnosu na PolIII s visokim stupnjem vjernosti koja uvodi samo 15% (McKenzie i sr., 2001). Polimeraze PolV i PolIV, u prisutstvu RpoS i DSE, uvode mutacije supstitucije parova baza dok PolI sudjeluje u preraspodjeli genetičkog materijala uključujući povećanje broja kopija nekog gena unutar genoma (*engl. gene amplification*) (Haistings i sr., 2004). Popravci DSB DNA tijekom stresa su drugačiji nasuprot popravaka istih kada je stanica u normalnim uvjetima zbog toga što tada DSB popravljaju pomoću DNA polimeraze III koja ima visok stupanj vjernosti zbog 3'→5' egzonukleazne aktivnosti (*engl. high fidelity*). Točan mehanizam aktivacije polimeraza pomoću RpoS nije razjašnjen no postoji hipoteza da utječe na DNA polimerazu III tako što smanji aktivnost enzima i omogući vezanje drugih DNA polimeraza u stanici između kojih je postojala komepticija s DNA polimerazom III (Frisch i sr., 2010). Od aktivatora DNA polimeraza je još zapažen protein GroE koji se sintetizira uslijed visoke temperature kao vanjskog stresa i njegova funkcija osim ekspresije gena za preživljavanje toplinskog šoka je i stabilizacija DNA polimeraze IV.

Pojava delecija nukleotida kao greška u molekuli DNA se u stanici bakterija popravljaju sustavom MMR i kao takva nije opasna za genetičku stabilnost stanice to jest događa se i u stanicama koje nisu pod stresom. Problem nastaje kada u stanici nastaje puno delecija/insercija nukleotida ili supstitucija za čiji popravak je potreban protein MutL kojeg nema dovoljno u stanici naspram grešaka unutar molekule DNA i dolazi do zasićenja samog sustava MMR te nemogućnosti popravka grešaka. Također stanicama koje su izložene malo

koncentraciji ugljika ili ulaskom u stacionarnu fazu rasta, smanjuje se ekspresija MutS proteina koji je potreban za vezanje na krivo sparene baze u DNA i započinje sam popravak kako je opisano u tekstu prije (Miller, 1996). U stanicama u kojima se tijekom ulaska u stacionarnu fazu rasta ekspimirao gen *mutS* je uočen veliki pad preživljavanje što pokazuje da u stanicama mijenja visoka stopa genetičke stabilnosti naspram visokog stupnja preživljavanja.

Hipoteza o mogućem putu evolucije pomoću SIM je još upitna te nije dokazana da bi sami mehanizmi mogli direktno utjecati na nju odnosno ubrzati je u stresnim uvjetima. Nađeno je puno dokaza da postoji povezanost između mutacija i stresa, no nisu poznati točni mehanizmi preko kojih se reguliraju mutacije.

3. ZAKLJUČAK

Pojavom novih radova u kojima su proučavane mutacije uvjetovane stresom su se pojavile hipoteze koje bi mogle potencijalno značiti puno u saznanjima o patogenim bakterijama i njihovoj povećanoj rezistenciji na antibiotike koja je u današnje vrijeme aktualna. Također se ta saznanja mogu primjeniti i na eukariote odnosno ljude. Zbog visokog stupnja očuvanja MMR sustava tijekom evolucije, sam sustav je sličan u stanicama prokariota odnosno bakterija i eukariote to jest ljudi. Razumijevanjem molekularnog mehanizma MMR u bakterijama može imati korist za liječenje ljudi u borbi protiv raka jer je uočeno da stanice raka imaju defektni sustav popravka DNA odnosno MMR i da se u njima odvija DSB-ovisan mutageni popravak DNA.

Lijekovi koje si koriste u borbi protiv patogena ili stanica raka služe kako bi uništili stanicu ili joj zaustavili daljnji rast te kao takvi čine stres na bakterije ili stanice raka. Samim time potencijalno mogu uzrokovati promjene u stanici zbog kojih bi njezin genetički materijal mutirao odnosno stalno se mijenjao. Kao primjer toga su antibiotici koji djeluju na bakteriju kako bi spriječili daljnji rast ili potpuno je inaktivirali. Uočeno je da se bakterije mogu prilagoditi na utjecaj antibiotika što je mogući uzrok samog utjecaja stresa koji on čini na stanicu. Čvrsti dokazi za to još ne postoje i kao takva hipoteza je jako kontroverzna, ali postoji sve više saznanja i polako se prihvaća da SIM postoji u stanici i da bi mogao imati evolucijski utjecaj.

Moguća primjena takvog saznanja bi bili lijekovi koji bi mogli zaustaviti povećanje stope mutacije, patogenih bakterija ili stanica raka, i kao takvi čine velik potencijal za pronalaženje i sintezu novih lijekova.

LITERATURA

- Allen, D. J., Makhov, A., Grilley, M., Taylor, J., Thresher, R., Modrich, P., Griffith, J. D. (1997) MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism. *EMBO Journal*. **16**, 4467-4476
- Baćun-Družina, V., Butorac, A., Mrvčić, J., Dragičević, T. L., and Stehlik-Tomas, V. (2011) Bacterial stationary-phase evolution. *Food Technol. Biotechnol.* **49**, 13-23.
- Battesti, A., Majdalani, N., Gottesman, S. (2011) The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli**. *Annu. rev. micro.* **65**, 189-213.
- Bearson, B. L., Wilson, L., Foster, J. W. (1998) A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *J Bacteriol.* **180**, 2409–2417
- Becker, G., Klauck, E., Hengge-Aronis, R. (1999) 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. U. S. A.* **96**, 6439-44
- Bjedov, I., Dasgupta, C. N., Slade, D., Le Blastier, S., Selva, M., Matic, I. (2007) Involvement of *Escherichia coli* DNA polymerase IV in tolerance of cytotoxic alkylating DNA lesions *in vivo*. *Genetics*. **176**, 1431-1440.
- Bougdour, A., Cunning, C., Baptiste, P. J., Elliott, T., Gottesman, S. (2008) Multiple pathways for regulation of σ S (RpoS) stability in *Escherichia coli* via the action of multiple anti-adaptors. *Mol. Microbiol.* **68**, 298-313.
- Bougdour, A., Wickner, S., Gottesman, S. (2006) Modulating RssB activity: IraP, a novel regulator of sigmaS stability in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **20**, 884-897.
- Burckhardt SE, Woodgate R, Scheuermann RH, Echols H. (1988) UmuD mutagenesis protein of *Escherichia coli*: overproduction, purification, and cleavage by RecA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 1811–1815.
- Cho, B. K., Barrett, C. L., Knight, E. M., Park, Y. S., Palsson, B. (2008) Genome-scale reconstruction of the Lrp regulatory network in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19462-19467.

- Cho, B.-K., Federowicz, S., Park, Y.-S., Zengler, K., Palsson, B. Ø. (2011) Deciphering the transcriptional regulatory logic of amino acid metabolism. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 65-71.
- Cho, B. K., Kim, D., Knight, E.M., Zengler, K., Palsson, B.O. (2014) Genome scale reconstruction of the sigma factor network in *Escherichia coli*: topology and functional states. *BMC Biology*, **12**, 1-11. doi: 10.1186/1741-7007-12-4
- Cho, B. K., Knight, E. M., Barrett, C. L., Palsson, B. (2008) Genome-wide analysis of Fis binding in *Escherichia coli* indicates a causative role for A-/AT-tracts. *Genome Res.* **18**, 900-910.
- Clark, A. J., Margulies, A. D. (1965) Isolation and characterization of recombinantion-deficient mutants of *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **53**, 451-459.
- Cohen, S. E., Godoy, V. G., Walker, G. C. (2009) Transcriptional modulator nusA interacts with translesion DNA polymerases in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **191**, 665-672.
- Colland, F., Fujita, N., Ishihama, A., Kolb, A. (2002) The interaction between σ , the stationary phase σ factor, and the core enzyme of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Genes Cells*, **7**, 233-247.
- Dame, R. T., Wyman, C., Wurm, R., Wagner, R., & Goosen, N. (2002) Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the *rrnB* P1. *J. Biol. Chem.* **277**, 2146-2150.
- Dorman, C. J., Deighan, P. (2003) Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **13**, 179-84.
- Farewell, A., Kvint, K. and Nyström, T. (1998) Negative regulation by RpoS: a case of sigma factor competition. *Mol. Microbiol.*, **29**: 1039-1051
- Fishel R., Acharya S. (2005) Biochemistry of mismatch repair proteins. U: DNA Damage Recognition (Wolfram S., Yoke W. K., Paul W.D., ured.), *CRC Press*, str. 466-471.
- Foster, P. L. (2007) Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **42**, 373-397.

- Frisch, R. L., Su, Y., Thornton, P. C., Gibson, J. L., Rosenberg, S. M., Hastings, P. J. (2010). Separate DNA Pol II- and Pol IV-Dependent Pathways of Stress-Induced Mutation during Double-Strand-Break Repair in *Escherichia coli* Are Controlled by RpoS. *J. Bacteriol.*, **192**, 4694–4700.
- García Vescovi E, Soncini F C, Groisman E A. (1996) Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of Salmonella virulence. *Cell*, **84**, 165–174
- Groisman, E. A. (2001) The Pleiotropic Two-Component Regulatory System PhoP-PhoQ. *J. Bacteriol.* **183**, 1835–1842.
- Guarné, A., Ramon-Maiques, S., Wolff, E. M., Ghirlando, R., Hu, X., Miller, J. H., Yang, W. (2004) Structure of the MutL C-terminal domain: a model of intact MutL and its roles in mismatch repair. *The EMBO Journal*, **23**, 4134–4145.
- Harris, R. S., Ross, K. J., Lombardo, M.-J., Rosenberg, S. M. (1998) Mismatch Repair in *Escherichia coli* Cells Lacking Single-Strand Exonucleases ExoI, ExoVII, and RecJ. *J. Bacteriol.* **180**, 989–993.
- Hastings, P. J., Slack, A., Petrosino, J. F., Rosenberg, S. M. (2004) Adaptive Amplification and Point Mutation Are Independent Mechanisms: Evidence for Various Stress-Inducible Mutation Mechanisms. *PLoS Biology*, **2**, e399. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020399>
- Helmann, J. (2011) Regulation by Alternative sigma Factors. U: Bacterial Stress Responses, (Storz, G., Hengge, R., ured.), *ASM Press*, str. 31-43
- Hengge, R. (2008) The two-component network and the general stress sigma factor RpoS (σ^S) in *Escherichia coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **631**, 40-53
- Hengge, R. (2011) The general stress response in Gram-negative bacteria. U: Bacterial Stress Responses (Storz, G. Hengge, R., ured.), *ASM Press*, str 251-289
- Hengge-Aronis, R. (2002) Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the σ^S (RpoS) Subunit of RNA Polymerase. *Micro. Mol. Biol. Rev.* **66**, 373–395.

- Herring, C. D., Raffaele, M., Allen, T. E., Kanin, E. I., Landick, R., Ansari, A. Z., alsson, B. Ø. (2005) Immobilization of *Escherichia coli* RNA Polymerase and Location of Binding Sites by Use of Chromatin Immunoprecipitation and Microarrays . *J. Bacteriol.* **187**, 6166–6174.
- Ilag, L., Westblade, L., Deshayes, C., Kolb, A., Busby, J. W. S., Robinson, C. V. (2004) Mass Spectrometry of Escherichia coli RNA Polymerase: Interactions of the Core Enzyme with $\sigma 70$ and Rsd Protein. *Structure*, **12**, 269-75.
- Ishima, A. (1998) Promoter selectivity of prokaryotic RNA polymerases, *Trends Genet.* **4**, 282-286.
- Ishima, A. (2000) Functional Modulation of Escherichia Coli RNA Polymerase, *Ann. Rev. Microbiol.* **54**, 499-518.
- Janion, C. (2008) Inducible SOS Response System of DNA Repair and Mutagenesis in Escherichia coli. *Int. J. Biol. Sci.* **4**, 338–344.
- Jenvert, R. M. K., Schiavone, L. H. (2005) Characterization of the tRNA and ribosome-dependent pppGpp-synthesis by recombinant stringent factor from Escherichia coli. *FEBS.* **272**, 685-695.
- Jenvert, R. M. K., Schiavone, L. H. (2007) The Flexible N-terminal Domain of Ribosomal Protein L11 from Es-cherichia coli Is Necessary for the Activation of Stringent Factor. *JMB.* **365**, 764-772.
- Jishage, M., Ishihama, A. (1995). Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in Escherichia coli: intracellular levels of sigma 70 and sigma 38. *J. Bacteriol.* **177**, 6832–6835.
- Junop, M. S., Obmolova, G., Rausch, K., Hsieh, P. and Yang, W. (2001) Composite active site of an ABC ATPase: MutS uses ATP to verify mismatch recognition and authorize DNA repair. *Mol. Cell.* **7**, 1–12.
- Klauck, E., Hengge, R. (2012) sigmaS-Controlling Networks in Escherichia coli. U: Bacterial Regulatory Networks (Filloux, A., ured.), *Caister Academic Press*, str. 1-16.

- Lamers, M. H., Winterwerp, H. H. K., Sixma, T. K. (2003) The alternating ATPase domains of MutS control DNA mismatch repair. *EMBO J.* **22**, 746–756.
- Lange, R., Fischer, D., Hengge-Aronis, R. (1995) Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of rpoS, the structural gene for the sigma S subunit of RNA polymerase in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **177**, 4676–4680.
- Li, G.M. (2008) Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.*, **18**, 85–98.
- Loewen, P. C., Hu, B., Strutinsky J, Sparling R. (1998) Regulation in the rpoS regulon of Escherichia coli. *Can. J. Microbiol.* **44**, 707-17.
- MacLean, R. C., Torres-Barceló, C., Moxon, R.. (2013) Evaluating evolutionary models of stress-induced mutagenesis in bacteria. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 221-227.
- Majdalani, N., Cunning, C., Sledjeski, D., Elliott, T., Gottesman, S. (1998) DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12462–12467.
- Majdalani N., Hernandez D, Gottesman S. (2002) Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol. Microbiol.* **46**, 813-26.
- Mandel, M. J., Silhavy, T. J. (2005) Starvation for Different Nutrients in *Escherichia coli* Results in Differential Modulation of RpoS Levels and Stability. *J. Bacteriol.* **187**, 434–442.
- Mandin, P., Gottesman, S. (2010) Integrating anaerobic/aerobic sensing and the general stress response through the ArcZ small RNA. *EMBO J.* **29**, 3094–3107.
- Marinus, M. G., Løbner-Olesen, A. (2014) DNA Methylation. *EcoSal Plus*, **6**, doi :10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2013. <http://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2013>
- McCullen, C. A., Benhammou, J. N., Majdalani, N., Gottesman, S. (2010) Mechanism of positive regulation by DsrA and RprA small noncoding RNAs: Pairing increases translation and protects rpoS mRNA from degradation. *J. Bacteriol.* **192**, 5559-5571

- McKenzie, G. J., Lee, P. L., Lombardo, M. J., Hastings, P. J., Rosenberg, S. M. (2001) SOS mutator DNA polymerase IV functions in adaptive mutation and not adaptive amplification. *Mol. Cell.* **7**, 571-579.
- Merrick, H., Ferrazzoli, A. E., Bougdour, A., Olivier-Mason, A., Lovett, S. T. (2009) A DNA damage response in *Escherichia coli* involving the alternative sigma factor, RpoS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 611-6.
- Michael, B., Baharoglu, Z., Lestini, R. (2007) Genetics of recombination in the model bacterium *Escherichia coli*. U: Molecular Genetics of Recombination (Aguilera, A., Rothstein, R. ed.), *Springer*, 1-19.
- Mika, F., Hengge, R. (2005) A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of sigmaS (RpoS) in *E. coli*. *Gen. Dev.* **19**, 2770-2781.
- Miller, J. H. (1996) Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair. *Ann. Rev. Microbiol.* **50**, 625-643.
- Mitchell, J. E., Oshima, T., Piper, S. E., Webster, C. L., Westblade, L. F., Karimova, G., Ladant, D., et al. (2007) The *Escherichia coli* regulator of sigma 70 protein, Rsd, can up-regulate some stress-dependent promoters by sequestering sigma 70. *J. Bacteriol.* **189**, 3489-3495.
- Modrich, P., Lahue, R. (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Ann. Rev. Biochem.* **65**, 101-33.
- Moon, K., Gottesman, S. (2009) A PhoQ/P-regulated small RNA regulates sensitivity of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides. *Mol. Microbiol.* **74**, 1314-1330.
- Navarro Llorens, J. M., Tormo, A., Martínez-García, E. (2010) Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 476-495. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00213.x
- Österberg, S., Peso-Santos, T. D., Shingler, V. (2011) Regulation of Alternative Sigma Factor Use. *Ann. Rev. Microbiol.* **65**, 37-55.

- Pennington, J. M., Rosenberg, S. M. (2007) Spontaneous DNA breakage in single living *Escherichia coli* cells. *Nat. Genet.* **39**, 797-802.
- Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehliis, A., Hengge, R. (2008) Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **22**, 2434-2446.
- Peterson, C. N., Carabetta, V. J., Chowdhury, T., Silhavy, T. J. (2006) LrhA regulates rpoS translation in response to the Rcs phosphorelay system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 3175-3181.
- Powell, B. S., Court, D. L., Inada, T., Nakamura, Y., Michotey, V., Cui, X., Reizer, A., et al. (1995) Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the rpoN operon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**, 4822-4839.
- Pratt, L. A., Silhavy, T. J. (1998) Crl stimulates RpoS activity during stationary phase. *Mol. Microbiol.* **29**, 1225-1236.
- Pruteanu, M., & Hengge-Aronis, R. (2002) The cellular level of the recognition factor RssB is rate-limiting for σ^S proteolysis: Implications for RssB regulation and signal transduction in σ^S turnover in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **45**, 1701-1713.
- Qiu, Y., Cho, B. K., Park, Y. S., Lovley, D., Palsson, B., Zengler, K. (2010) Structural and operational complexity of the *Geobacter sulfurreducens* genome. *Genome Res.* **20**, 1304-1311.
- Rosenberg, S. M., Shee, C., Frisch, R. L., Hastings, P. J. (2012) Stress-induced mutation via DNA breaks in *Escherichia coli*: A molecular mechanism with implications for evolution and medicine. *BioEssays*, **34**, 885-892.
- Saint-Ruf, C., Pesut, J., Sopta, M., Matic, I. (2007) Causes and consequences of DNA repair activity modulation during stationary phase in *Escherichia coli*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **42** 259-270.
- Sharma, U. K., Chatterji, D. (2010) Transcriptional switching in *Escherichia coli* during stress and starvation by modulation of σ^{70} activity. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 646-57

- Shee, C., Gibson, J. L., Darrow, M. C., Gonzalez, C., Rosenberg, S. M. (2011) Impact of a stress-inducible switch to mutagenic repair of DNA breaks on mutation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13659-13664.
- Shinagawa, H., Iwasaki, H. (1996) Processing the Holliday junction in homologous recombination. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 107-11.
- Smith, R. L., Maguire, M. E. (1998) Microbial magnesium transport: Unusual transporters searching for identity. *Mol. Microbiol.* **28**, 217-26.
- Spampinato, C., Modrich, P. (2000) The MutL ATPase is required for mismatch repair. *J. Biol. Chem.* **275**, 9863-9869.
- Striskanda, V., Shuman, S. (2002) Conserved residues in domain Ia are required for the reaction of *Escherichia coli* DNA ligase with NAD⁺. *J. Biol. Chem.* **277**, 9695-9700.
- Su, S. S., Modrich, P. (1986) *Escherichia coli* mutS-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 5057-5061.
- Tang, M., Shen, X., Frank, E. G., O'Donnell, M., Woodgate, R., & Goodman, M. F. (1999) UmuD'2C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8919-8924.
- Typas, A., Becker, G., Hengge, R. (2007) The molecular basis of selective promoter activation by the σ S subunit of RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* **63**, 1296-306.
- Typas, A., Hengge, R. (2006) Role of the spacer between the -35 and -10 regions in σ S promoter selectivity in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **59**, 1037-1051.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F., Hengge, R. (2005) Genome-Wide Analysis of the General Stress Response Network in *Escherichia coli* : σ S -Dependent Genes , Promoters , and Sigma Factor Selectivity. *J. Bacteriol.* **187**, 1591-1603.
- Yamaguchi, M., Dao, V., Modrich, P. (1998). MutS and MutL activate DNA helicase II in a mismatch-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **273**, 9197-9201.
- Yamamoto, K., Hirao, K., Oshima, T., Aiba, H., Utsumi, R., Ishihama, A. (2005). Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**, 1448-1456.

Zhang, A., Altuvia, S., Tiwari, A., Argaman, L., Hengge-Aronis, R., Storz, G. (1998). The OxyS regulatory RNA represses rpoS translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *EMBO Journal*, **17**, 6061-6068.

Zhou, Y., Gottesman, S., Hoskins, J. R., Maurizi, M. R., Wickner, S. (2001). The RssB response regulator directly targets sigmaS for degradation by ClpXP. *Genes Dev.* **15**, 627-637.