

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

THE STRINGENT RESPONSE AND CELL CYCLE ARREST IN
Escherichia coli

ZAUSTAVLJANJE STANIČNOG CIKLUSA U OSKUDNIM
UVJETIMA U BAKTERIJI *Escherichia coli*

SEMINARSKI RAD

Branimir Berežić
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate study of Biology)
Mentor: doc. dr. sc. Ivana Ivančić-Baće

Zagreb, 2012.

Sadržaj

Uvod	2
Zaustavljanje staničnog ciklusa bakterija divljeg tipa u različitim uvjetima rasta	3
Sinteza ppGpp ovisna o RelA je potrebna i dostatna za zaustavljanje staničnog ciklusa.....	4
Ovisnost zastoja ciklusa o SeqA i metilazi Dam	5
Razdvajanje specifičnih kromosomskih regija nakon zastoja zbog oskudnih uvjeta	7
Zastoj ciklusa u stanicama divljeg tipa se odvija sa jednim dekondeziranim nukleoidom	8
Završetak zastoja	10
Inhibicija formiranja kolonija uslijed nakupljanja ppGpp je olakšana u mutantima Δdam i $\Delta seqA$	11
Sojevi $\Delta seqA$ i Δdam imaju normalnu kontrolu nad ostalim značajkama stresnog odgovora	11
Zaključak.....	13
Literatura	14
Sažetak.....	15
Summary	15

Uvod

Tijekom svog života, bakterijske se stanice susreću sa različitim stresnim događajima uslijed kojih započinju specifične prilagodbe kako bi osigurale svoj opstanak. Jedan od stresnih odgovora se naziva "odgovor u oskudnim uvjetima" (*stringent response*) koji započinje ukoliko se stanica nađe u uvjetima nedostatka aminokiselina.

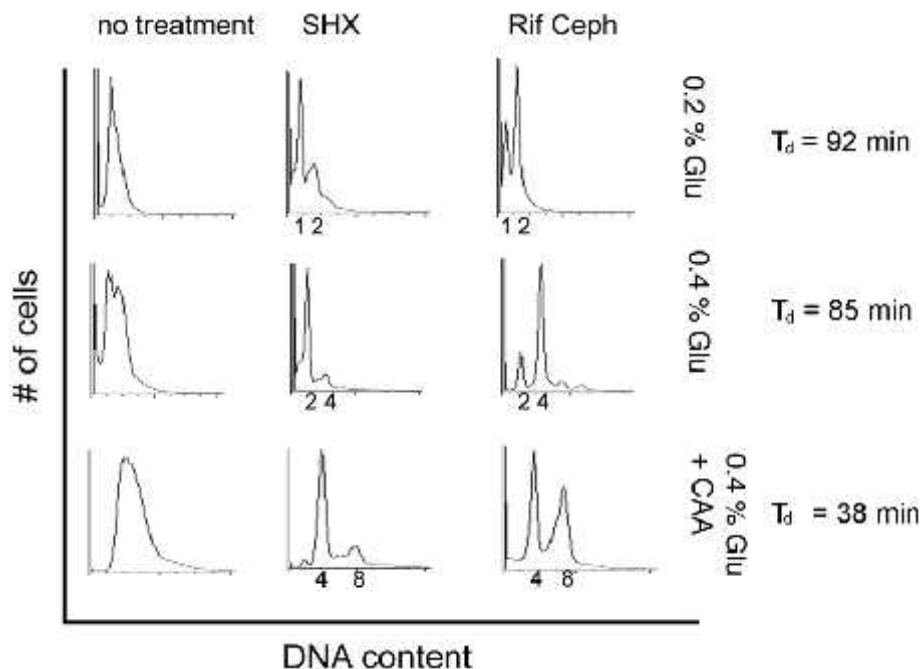
Signal za početak oskudnog odgovora jest nakupljanje efektorskih nukleotida gvanozin tetrafosfat (ppGpp) i gvanozin pentafosfat (pppGpp) (*Potrykus, Cashel, 2008.*), pri čemu je gvanozin tetrafosfat dominantniji i stabilniji. Enzimi RelA i SpoT kontroliraju njegovu razinu. Enzim RelA (ppGpp sintetaza I) sintetizira gvanozin tetrafosfat kada se u stanici nakupi određena količina nenabijene tRNA, što je samo po sebi posljedica nedostatka amino kiselina u stanici, dok enzim SpoT (ppGpp sintetaza II) ima slabu sintetičku aktivnost te služi kao hidrolaza za razgradnju gvanozin tetrafosfata. Prema tome, oskudni odgovor ovisi o enzimu RelA kojemu je princip rada taj da se veže na ribosom i ukoliko se u akceptorskom mjestu nalazi tRNA bez pripadajuće aminokiseline zaustavlja se daljnja translacija mRNA i replikacija DNA, smanjuje se sinteza rRNA, povećava se transkripcija gena za biosintezu aminokiselina (*Barker, i sur., 2001.*).

Međutim, akumulacija ppGpp možda nije jedini faktor koji dovodi do zaustavljanja replikacije DNA - inicijaciju replikacije kontrolira koncentracija proteina DnaA koji sudjeluje u stvaranju kompleksa *oriC*/DnaA i stvaranje petlje na koju se može vezati helikaza DnaB; nasuprot tome, protein SeqA se veže na hemimetilirane GATC sljedove u cijelom genomu, a ukoliko se veže unutar *oriC* sprječava vezanje DnaA i time onemogućuje inicijaciju replikacije.

Zaustavljanje staničnog ciklusa bakterija divljeg tipa u različitim uvjetima rasta

Količina DNA u bakterijama određena je u uvjetima kada su stanice tretirane sa serin hidrokсамatom i bez (koji služi kao inhibitor seril-tRNA sintetaze koja omogućava prijenos serina na tRNA što bi trebalo dovesti do stresnog odgovora) (Tosa, Pizer, 1971.), te u stanicama kojima su u medij dodani rifampicin i cefaleksin (antibiotici koji blokiraju inicijaciju replikacije).

U stanicama koje nisu bile tretirane, replikacija DNA je trajala bez inhibicija sukladno obogaćenosti medija u kojem su se nalazile. Nakon obrade s rifampicinom i cefaleksinom zapele replikacije se dovršavaju, daljnje diobe i replikacije DNA su onemogućene - opet sukladno obogaćenosti medija u kojem su se nalazile (u bogatijim medijima stanice su imale više u količinu replikirane DNA); stanice obrađene serin hidrokсамatom su također zaustavljale daljnju replikaciju DNA, ali neke stanice su već obavile diobu što je doprinijelo manjem udjelu DNA po pojedinačnoj stanici nego u prethodnim slučajevima.



Slika 1. Analiza staničnog ciklusa i utjecaj odgovora na oskudne uvjete protozom citometrijom

Neobrađene stanice regularno prolaze kroz replikaciju DNA i diobu stanica. (Slika 1, lijevi stupac)

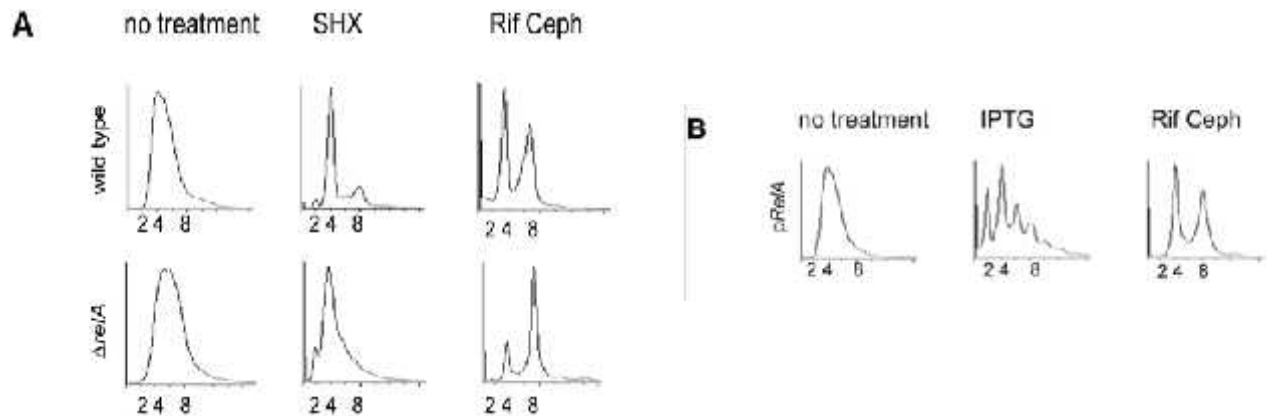
Stanice obrađene sa serin hidrokсамatom sprječavaju daljnju replikaciju, no dovršavaju zapele. Stresni odgovor zapele nakon diobe. (Slika 1, srednji stupac)

Stanice obrađene antibioticima sprječavaju daljnju replikaciju i diobu, te u sebi sadrže veću količinu DNA. U ovom slučaju broj molekula DNA u stanici (1N i 2N; 2N i 4N) ukazuje na broj oriC (ishodišta replikacije) u kojima su se formirale replikacijske rašlje i imale priliku dovršiti replikaciju DNA. (Slika 1, desni stupac)

Sinteza ppGpp ovisna o RelA je potrebna i dostatna za zaustavljanje staničnog ciklusa

Stanice bez gena RelA nisu u mogućnosti proizvoditi ppGpp koji bi signalizirao po etak stresnog odgovora u oskudnim uvjetima, tako da u njima replikacija nije zaustavljena te je količina DNA u stanicama veća od 1N (što bi značilo da su stanice nastavile replikaciju, te se nisu preusmjerile na biosintezu aminokiselina). Ako su takvim mutantima u podlogu dodani rifampicin i cefaleksin, količina DNA u njima se poprimiti omjere slične kao u stanicama divljeg tipa. (Slika 2. A)

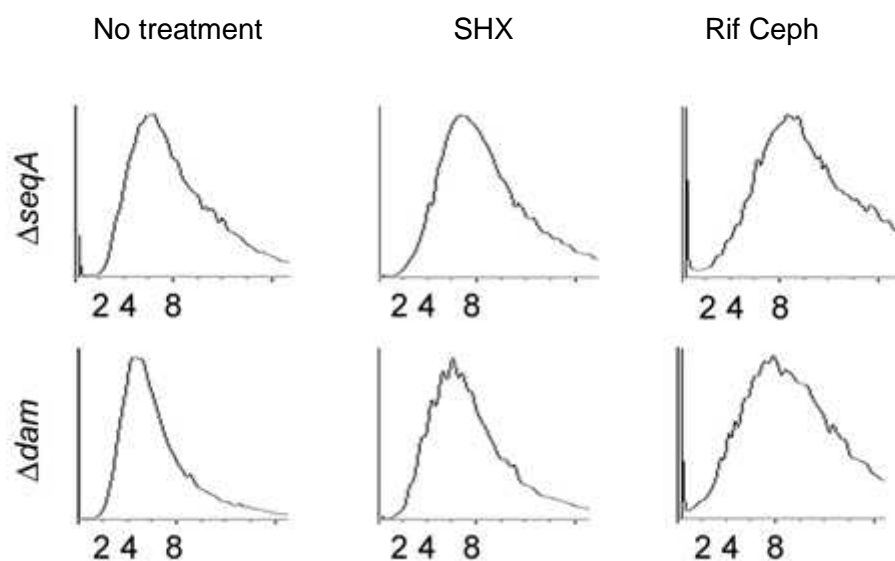
Osim *relA* mutanata promatrane su i stanice u kojima je potaknuta iznadprosječna ekspresija katalitički vrlo aktivnog RelA' fragmenta. Njegova ekspresija dovodi do proizvodnje ppGpp neovisno o ribosomima i uvjetima u stanici (odnosno neovisno o nedostatku aminokiselina) (Schreiber, i sur., 1991.). Budući da iznadprosječna sinteza ppGpp dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa, možemo pretpostaviti kako je baš to uzrok stresnog odgovora, a ne nedostatak aminokiselina ili gladovanje stanice. (Slika 2. B)



Slika 2. A, B Zaustavljanje staničnog ciklusa ovisi o RelA.

Ovisnost zastoja ciklusa o SeqA i metilazi Dam

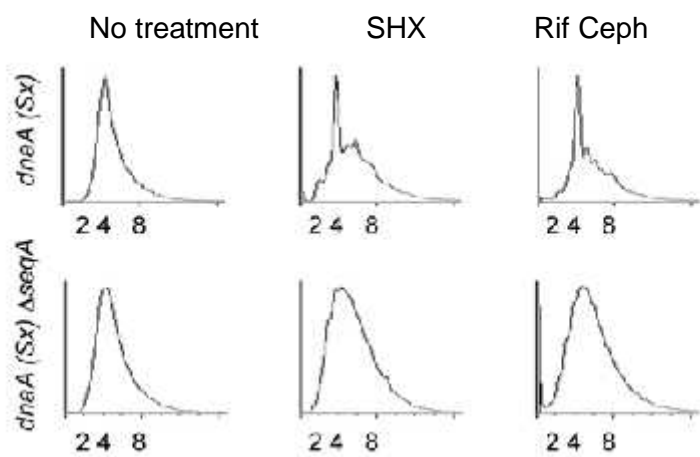
Protein SeqA ima sposobnost vezanja na DNA i utječe na inicijaciju replikacije i razdvajanje kromosoma. Zbog svoje uloge u kontroli inicijacije replikacije testirani su mutanti *seqA* kako bi se proučilo količina DNA u njihovim stanicama nakon izazivanja stresnog odgovora na oskudne uvjete. Taj se protein preferirano veže na hemi-metilirane GATC slijedove (Skarsta, i sur., 2000.), za što je zaslužna DNA adenin metilaza (Dam). Radi toga su testirani i mutanti *dam* i bi rezultati trebali biti slični mutantima *seqA*. Rezultati oba mutanta su vrlo slični i mogli bi ukazivati na nastavak replikacije otporne na utjecaj rifampicina, budući da u stanicama nema karakteristične raspodjele količine DNA molekula (Slika 3).



Slika 3. Zaustavljanje staninog ciklusa ovisi o SeqA i DNA hemi-metilaciji

U bakterijskim stanicama koje imaju povišenu aktivnost DNA metilaze smanjuje se sposobnost vezanja SeqA na DNA jer se GATC slijedovi potpuno metiliraju što konačno dovodi do poremećaja u prirodnom započinjanju stresnog odgovora na oskudne uvjete (von Freiesleben, i sur., 1994.). S obzirom na to, njihovi bi rezultati bili slični rezultatima mutantima *seqA* i *dam*.

Razlog za povećanu količinu molekula DNA u mutantima *seqA* jest njihov nedostatak kontrole inicijacije replikacije (divlji tip bi onemogućavao stalnu replikaciju) (Lu M, i sur., 1994.). Kako bi se provjerilo utječe li prekomjerna inicijacija replikacije na neki ključni faktor u odgovoru na oskudne uvjete, konstruiran je hipomorfni (propusni) *dnaA(Sx)* alel koji pri niskim temperaturama snižava frekvenciju inicijacije, a pri odgovarajućoj temperaturi potiskuje prekomjernu inicijaciju (vidljivu u mutantima *seqA*) (Boye, i sur., 2001.). Samostalno taj alel ne utječe na stresni odgovor, no prilikom obrade sa serin hidrokсамatom dolazi do karakteristične promjene u količini DNA molekula (Slika 4.). Ako se *dnaA(Sx)* alel nalazi u *seqA* bakteriji, količina DNA će biti slična onoj u stanicama divljeg tipa, no nakon obrade sa serin hidrokсамatom ne pokazuju aktiviranje stresnog odgovora. Taj nedostatak aktivacije bi mogao ukazivati na to da SeqA posjeduje aktivnost značajnu za stresni odgovor, a ne da je nedostatak stresnog odgovora posljedica prekomjerne inicijacije.

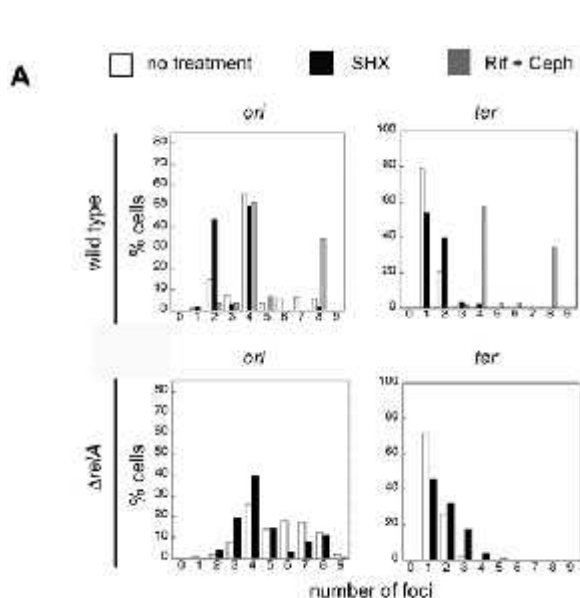


Slika 4. Ovisnost zaustavljanja stani nog ciklusa o SeqA

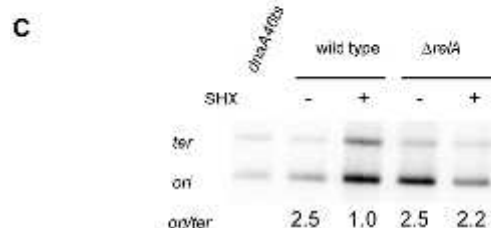
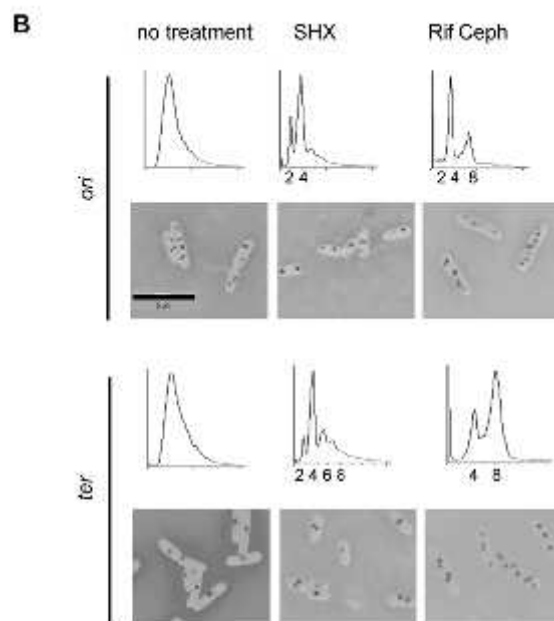
Razdvajanje specifičnih kromosomskih regija nakon zastoja zbog oskudnih uvjeta

Kako bi se provjerio na in razdvajanja specifičnih sparnih kromosomskih regija korišteni su bakterijski sojevi u kojima je slijed *parS* dodan u blizini ishodišta ili terminacijskog slijeda replikacije. Slijed *parS* služi kao mjesto za vezanje proteina GFP-ParB (nastao ekspresijom plazmidnog gena). Taj protein omogućava vizualizaciju slijeda koji želimo promatrati (Li, i sur., 2002.). Divlji tip bakterijskih stanica je imao obilježena dva ili četiri zasebna *oriC* lokusa (Slika 6.), dok je broj vidljivih *ter* lokusa bio samo jedan ili dva. Ali nakon induciranja stresnog odgovora omjer vidljivih *oriC/ter* slijedova je 1.0 što ukazuje na završetak replikacije. Nasuprot tome, mutanti *relA* zadržavaju omjer *oriC/ter* iznad 2 (Slika 5.), čak i nakon tretiranja sa serin hidroksumatom koji bi trebao inducirati stresni odgovor nakon što replikacija i dioba stanice završe. Slično mutantu *relA*, omjer *oriC/ter* u mutantima *dnaA(Sx)* *seqA* je iznosio 2.8 prije obrade sa serin hidroksumatom, odnosno 2.7 nakon obrade - to ukazuje da u tim sojevima replikacija traje čak i nakon izazivanja stresnog odgovora.

Radi toga je tada omjer *oriC/ter* slijedova u divljem tipu iznosio 2:1 čak i nakon obrade sa serin hidroksumatom? Mogući razlog jest to da *ter* slijedovi kromosoma ostaju sparni (što nije slučaj ako se divlji tip nalazi na mediju sa rifampicinom i cefaleksinom).



Slika 6. Broj označenih slijedova *oriC* i *ter* u stanicama divljeg tipa i mutantima *relA*

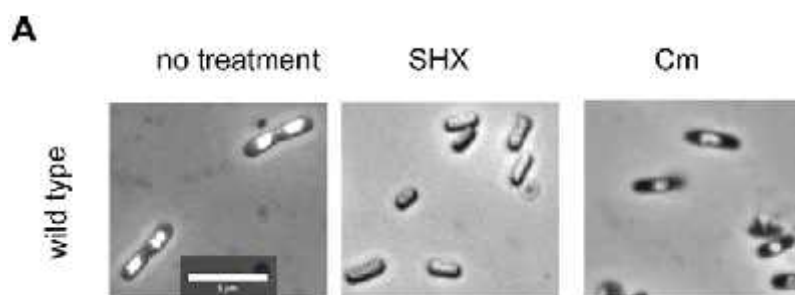


Slika 5. Slike dobivene fluorescentnim mikroskopom sa prikazom obilježenih slijedova *oriC* i *ter*, i njihov omjer

Zastoj ciklusa u stanicama divljeg tipa se odvija sa jednim dekonenziranim nukleoidom

Prije induciranja zastoja, u stanicama divljeg tipa vidljiva su 1 ili 2 nukleoida (korištena DAPI boja) na kojima se mogu uoiti po eci razdvajanja kromosoma (Slika 7.); ali nakon obrade sa serin hidrosamatom što inducira stresni odgovor i zastoj stani nog ciklusa, stanice sadrže samo jedan dekonenzirani nukleoid koji zauzima veliki volumen stanice. Ukoliko bi se stanice divljeg tipa tretirale kloramfenikolom (inhibitor translacije) bio bi vidljiv samo jedan kondenzirani nukleoid u središtu stanice.

Osim stanica divljeg tipa, promatrana je i morfologija nukleoida u sojevima *relA* (slika 8.) i *dnaA(Sx) seqA* (slika 9.).

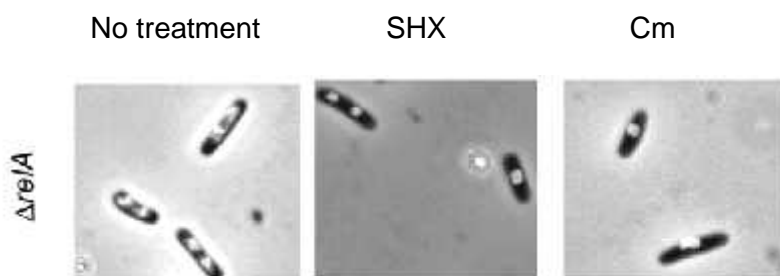


Slika 7. Nukleoidi u stanicama divljeg tipa

Slika s lijeve strane prikazuje neobra ene stanice divljeg tipa, u kojima se mogu uoiti 2 nukleoida.

Slika u sredini prikazuje stanice tretirane sa serin hidrosamatom, nukleoid zauzima ve inu stanice i citoplazma nije vidljiva.

Slika s desne strane prikazuje stanice tretirane kloramfenikolom, u kojima je jedan kondenzirani nukleoid.



Slika 8. Nukleoidi u *relA* stanicama

Vidljivo je kako nukleoid u stanicama tretiranim serin hidrosamatom izgleda kao u stanicama divljeg tipa tretiranim kloramfenikolom. Mogu e je kako ppGpp (koji *relA* soj ne može sintetizirati) ima neku ulogu u procesu dekonenzacije nukleoida, te uslijed njegova nedostatka nukleoid ostaje kondenziran.

dnaA(Sx) Δ seqA

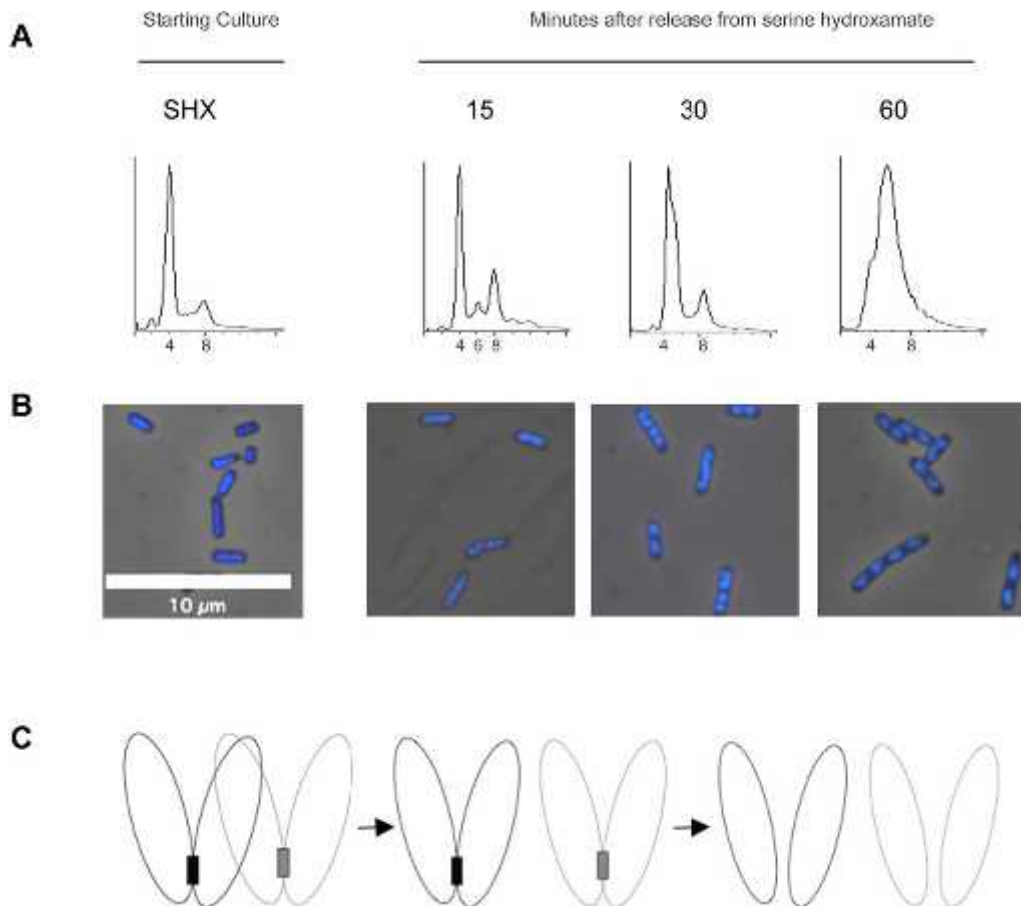


Slika 9. Morfologija nukleoida u soju dnaA(Sx) Δ seqA

U stanicama tretiranim serin hidrosamatom, nukleoid je dekondeziran i zauzima veliki volumen stanice, dok u netretiranim stanicama ostaje kondenziran.

Završetak zastoja

Nakon što su stanice provele 90 minuta u zastoju stani nog ciklusa, oprane su i stavljene u medij u kojem mogu nastaviti rasti. Koli ina DNA u njima je pra ena proto nom citometrijom i DAPI bojanjem (slika 10.), i ve 15 minuta nakon završetka zastoja vidljivo je razdvajanje nukleoida. Razdvajanje slijedi uzorak po kojem se prvo razdvajaju sestrinski kromosomi koji su sparni preko svojih ter slijedova, a nakon njih se razdvajaju preostala 2 para. Prema tome, replikacija i dioba se normalno nastavljaju prema planu koji je stanica zapo ela prije stresnog odgovora.



Slika 10. Završetak zastoja stani nog ciklusa

Slika A prikazuje koli inu DNA u stanicama dok traje zastoje - ve ina stanica ima 4N jer su im i replikacija i dioba onemogućene; zatim u intervalima nakon završetka zastoja vidljivo je kako se u stanicama koli ina DNA mijenja radi segregacije i diobe stanica.

Na slika B vidljive su stanice obojane DAPI bojom i promatrane proto nom citometrijom (plavom bojom je vidljiva DNA jer se DAPI veže na A-T bogate slijedove).

Slika C ilustrira pretpostavljeno na in razdvajanje kromosoma.

Inhibicija formiranja kolonija uslijed nakupljanja ppGpp je olakšana u mutantima Δdam i $\Delta seqA$

Divlji tip bakterija nije u mogućnosti formirati kolonije kada sadrže povećane koncentracije ppGpp, ali nije poznato je li nemogućnost formiranja kolonija posljedica stresnog odgovora i mogu li *dam* i *seqA* mutanti formirati kolonije čak i pod pojačanom proizvodnjom ppGpp. Kako bi se provjerila hipoteza, u divlji tip i mutante je unesen pALS13 plazmid induciran IPTG-om koji je u stanju kodirati za djelomični protein RelA'. Kao kontrola je poslužio drugi plazmid pALS14 čijom ekspresijom stanica proizvodi neaktivni RelA fragment.

Za razliku od divljeg tipa, koji nije mogao formirati kolonije, mutanti *seqA* i *dam* su zadržali sposobnost formiranja kolonija, vrlo vjerojatno zbog njihove nemogućnosti da samostalno izazovu sva obilježja zastoja staničnog ciklusa.

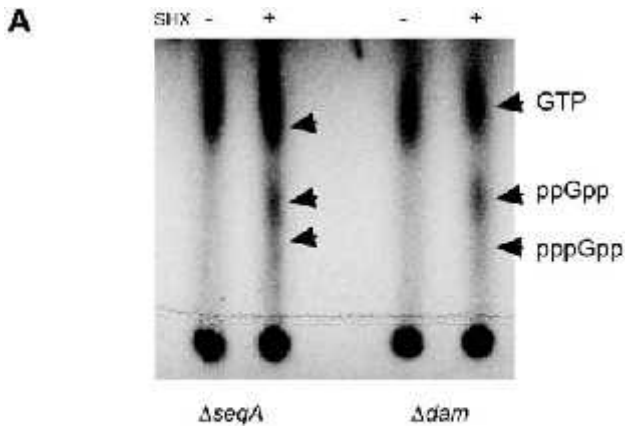
Sojevi $\Delta seqA$ i Δdam imaju normalnu kontrolu nad ostalim značajkama stresnog odgovora

Objašnjenje zašto *seqA* i *dam* nisu u mogućnosti zaustaviti stanični ciklus se nalazi u molekuli ppGpp - ili je proizvodnja ppGpp ili njena interakcija sa RNA polimerazom onesposobljena.

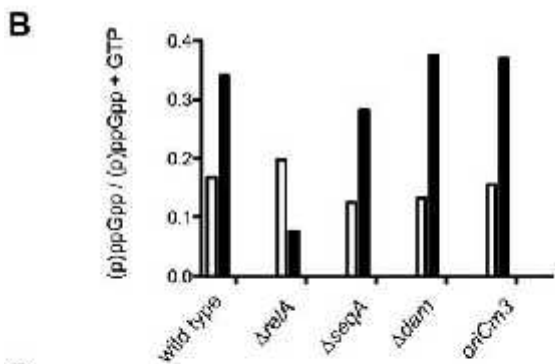
Tijekom stresnog odgovora, reduciraju se sinteza RNA i transport uridina. Kako bi se provjerila situacija u mutantima *seqA* i *dam*, u stanicama su korišteni ^{32}P koji se ugrađuje u ppGpp i [^3H]-uridin koji se prenosi u stanicu. Stanice divljeg tipa u kojima je induciran stresni odgovor pokazuju smanjenje radioaktivno obilježene rRNA (zbog manjka [^3H]-uridina), i povećanu proizvodnju ppGpp karakterističnu za iniciranje zastoja staničnog ciklusa. Iste rezultate su pokazivali mutanti *seqA* i *dam* što ukazuje da nemaju ograničenja u proizvodnji ppGpp niti regulaciji rRNA sinteze, nego specifično nisu u stanju pravilno odgovoriti na povećanu prisutnost ppGpp.

Kao kontrola, poslužio je mutant *relA* koji nije u stanju proizvoditi ppGpp i samim time neosjetljiv je na stresni odgovor u uvjetima oskudice.

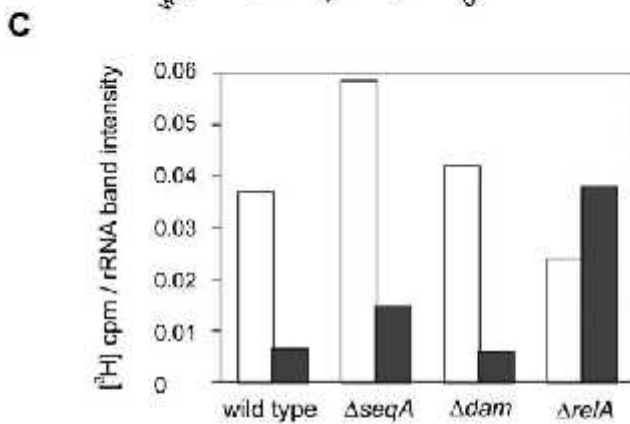
Slika 11. Sinteza ppGpp i označavanje rRNA



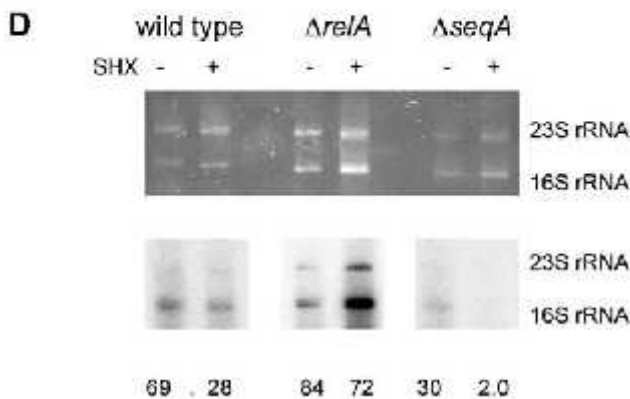
Slika A: nakon indukcije stresnog odgovora dodatkom serin hidroksumata u oba mutanta možemo uočiti nastanak ppGpp.



Slika B: koncentracija ppGpp u odnosu na početnu koncentraciju GTP-a u stanicama, prije tretiranja sa serin hidroksumatom i 10 minuta nakon tretiranja. Dolazi do porasta u divljem tipu i svim mutantima, osim *relA* koji nije u mogućnosti sintetizirati ppGpp.



Slika C: koliko puta je očitano [³H] u molekulama rRNA (izolirane elektroforezom) prije i nakon tretmana sa serin hidroksumatom. Zbog smanjenog unosa i redukcije u sintezi rRNA manje puta je očitano nakon što započne stresni odgovor.



Slika D: ugradnja ³²P_i u rRNA prije i nakon tretmana sa serin hidroksumatom. Jedino u mutantu *relA* razina prije i poslije tretmana je ostala slična, jer ostala dva soja reduciraju sintezu rRNA u uvjetima oskudice.

Zaključak

Za iniciranje stresnog odgovora koji bi doveo do kona nog zastoja stani nog ciklusa potreban je protein RelA, zaslužan za sintezu ppGpp. Nakon po etka zastoja blokira se inicijacija replikacije, no elongacija dovršava ukoliko je prethodno zapo ela. Po završetku replikacije kromosomi ostaju sparni pri svojim ter slijedovima, a razdvajaju se tek nakon što se stani ni ciklus može nastaviti.

Ve ina stanica ulazi u zastoj prije inicijacije replikacije te sadrže cijeli broj kromosoma, koji ovisi o mediju u kojem su stanice rasle; no postoje izuzeci kada stanice ulaze u zastoj nakon replikacije, ali prije razdvajanja kromosoma i diobe stanice.

Mutanti *seqA* i *dam* nisu u stanju kontrolirati zaustavljanje replikacije, unato pove anoj koncentraciji ppGpp, te stoga nastavljaju sa rastom. ak i stanice divljeg tipa mogu suzbiti utjecaj stresnog odgovora na zaustavljanje stani nog ciklusa ako do e do prekomjerne sinteze Dam metilaze što ukazuje na regulaciju pomo u proteina SeqA koji se veže na hemi-metilirane GATC slijedove. Smatra se kako SeqA i Dam isklju ivo kontroliraju stani ni ciklus, ali ne i ostale dijelove stresnog odgovora poput koncentracije ppGpp.

Literatura

Barker MM, Gaal T, Josaitis CA, Gourse RL (2001) Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and in vitro. *J Mol Biol* 305: 673-688.

Boye E, Blinkova A, Walker JR (2001) Defective initiation in an *Escherichia coli* *dnaA*(Cs,Sx) mutant. *Biochimie* 83: 25–32.

Ferullo DJ, Lovett ST (2008) The Stringent Response and Cell Cycle Arrest in *Escherichia coli*

Li Y, Sergueev K, Austin S (2002) The segregation of the *Escherichia coli* origin and terminus of replication. *Mol Microbiol* 46: 985–996.

Lu M, Campbell JL, Boye E, Kleckner N (1994) SeqA: A negative modulator of replication initiation in *E. coli*. *Cell* 77: 413–426.

Potrykus K, Cashel M (2008) (p)ppGpp: Still Magical? *Annu Rev Microbiol* 62: 35–51.

Schreiber G, Metzger S, Aizenman E, Roza S, Cashel M, et al. (1991) Overexpression of the *relA* gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 266: 3760–3767.

Tosa T, Pizer LI (1971) Biochemical bases for the antimetabolite action of Lserine hydroxamate. *J Bacteriol* 106: 972–982.

von Freiesleben U, Rasmussen KV, Schaechter M (1994) SeqA limits DnaA activity in replication from *oriC* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 14: 763–772.

Sažetak

Bakterijski "*stringent response*", uzrokovan nedostatkom hranjivih tvari, potiče gomilanje signalnih nukleotida ppGpp i pppGpp. Stanice divljeg tipa prolaze kroz zastoje ovisan o proteinu RelA nakon što ih se tretira serin hidrosamatom kako bi imale cijeli broj kromosoma u sebi i omjer ishodišta/terminacijskih slijedova 1. Stanje rasta prije nestašice hranjivih tvari određuje broj kromosoma u stanici nakon zastoja stani nog ciklusa; regije kromosoma u kojima se nalaze ishodišta replikacije su razdvojene, ali regije sa terminacijskim slijedovima su sparene.

Nukleoidi u takvim "zaustavljenim" bakterijama su nekondenzirani. Ukoliko se stanice tretiraju kloramfenikolom nukleoidi postaju vrlo kondenzirani, a tretiranjem rifampicinom i cefaleksinom kromosomi više nisu spareni kod terminacijskih slijedova. Stvaranje kolonija je inhibirano zbog nakupljanja ppGpp, osim u mutantima *seqA* i *dam*.

Završetak gladovanja dovodi do vrlo brze reorganizacije nukleoida, razdvajanja kromosoma i dovršavanja replikacije.

Osim nakupljanja ppGpp, metilacija DNA i vezanje SeqA su imbenici potrebni za pokretanje potpunog zastoja u stanici, čime se utjecalo na inicijaciju replikacije i segregaciju kromosoma.

Summary

The bacterial stringent response, triggered by nutritional deprivation, causes an accumulation of the signaling nucleotides ppGpp and pppGpp. Wild type cells undergo a RelA-dependent arrest after treatment with serin hydroxamate in order to contain an integer number of chromosomes and a replication origin/terminus ratio of 1. The growth rate prior to starvation determines the number of chromosomes after arrest; chromosomal regions corresponding to the origins of replication are segregated, while the termination regions remain colocalized.

Nucleoids of these arrested cells are decondensed. If treated with chloramphenicol, they become highly condensed, and treatment with rifampicin and cephalexin causes the chromosomes to segregate at their termination regions. Colony formation is inhibited due to ppGpp accumulation, except in *seqA* and *dam* mutants.

Release from starvation causes rapid nucleoid reorganization, chromosome segregation and replication resumption.

Accumulation of nucleotide ppGpp, DNA methylation and SeqA binding are all factors which contribute to initiating complete cell cycle arrest, which in turn affects replication initiation and chromosome segregation.