

Alarmonie

Bakterien unter Stress – die *stringent response*

WIELAND STEINCHEN, GERT BANGE
FACHBEREICH CHEMIE UND SYNMIKRO FORSCHUNGSZENTRUM,
UNIVERSITÄT MARBURG

The ability of microorganisms to cope with a large variety of environmental conditions is one of their most outstanding features. This review gives an overview over the metabolism and targets of ppGpp and pppGpp, the second messengers mediating resource allocation and adaptation to unfavourable conditions by triggering the ‘stringent response’.

DOI: 10.1007/s12268-020-1398-y
© Die Autoren 2020

■ Eines der herausragenden Merkmale von Mikroorganismen ist ihre Fähigkeit, unter einer Vielzahl sich kontinuierlich verändernden Umweltbedingungen zu überleben. Diese außergewöhnliche Toleranz von Mikroorganismen wird dabei durch einen Anpassungsmechanismus, die bakterielle Stressantwort oder auch *stringent response*, beeinflusst.

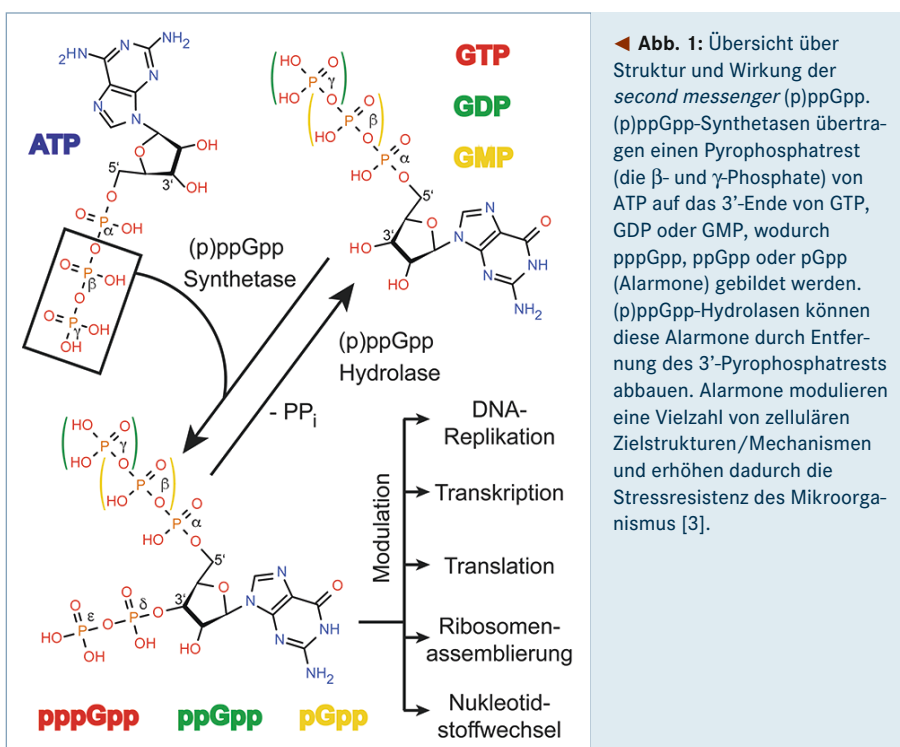
Zentrale Mediatoren der *stringent response* sind die *second messenger* ppGpp und pppGpp, gemeinsam oft auch als (p)ppGpp oder Alarmonie bezeichnet. Haupttrigger für die Bildung von Alarmonen ist die limitierte Verfügbarkeit von Aminosäuren [1]. Als weitere Stimuli wurden beispielsweise Glucosemangel, ein gestörtes Gleichgewicht im Fett-

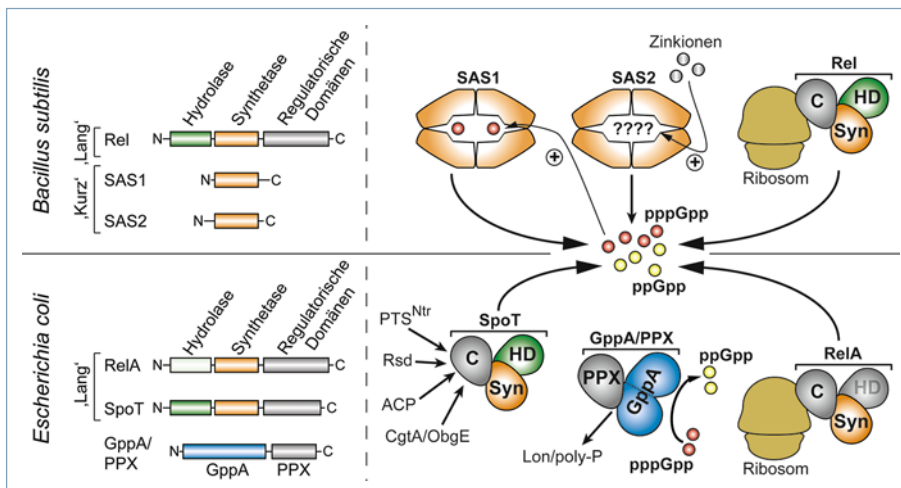
säurestoffwechsel, Eisenmangel sowie verschiedene auf die bakterielle Zellwand einwirkende Stressbedingungen beschrieben, darunter extreme pH-Werte, hohe Salinität oder der Einfluss von Antibiotika [2]. (p)ppGpp-Synthetasen übertragen einen Pyrophosphatrest vom Donorsubstrat Adenosintriphosphat (ATP) auf das 3'-Ende der Akzeptorsubstrate Guanosindiphosphat (GDP) oder Guanosintriphosphat (GTP) und bilden so ppGpp und pppGpp (Abb. 1). Auch ein vom Guanosinmonophosphat (GMP) abgeleitetes Molekül, pGpp, wurde beschrieben, wobei über dessen Funktion weit weniger bekannt ist als über (p)ppGpp [3]. Hydro-lasen bauen die Alarmonie ab, indem sie den 3'-Pyrophosphatrest unter Rückgewinnung von GDP (GTP) entfernen. (p)ppGpp moduliert – vorrangig im Sinne einer Inhibition – viele zelluläre Prozesse, insbesondere die DNA-Replikation, Transkription, Translation, Ribosomenbiogenese und den Nukleotidmetabolismus (Abb. 1).

Stoffwechsel von (p)ppGpp

Die für den Auf- und Abbau von (p)ppGpp verantwortlichen spezifischen Domänen finden sich in mehreren verschiedenartigen Enzymen. *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* stellen hinsichtlich ihrer (p)ppGpp-metabolischen Enzymausstattung zwei prototypische Systeme dar (Abb. 2): *E. coli* besitzt wie die meisten Proteobakterien RelA und SpoT sowie zusätzlich GppA, wohingegen in *B. subtilis* wie in den meisten Firmicutes Rel sowie SAS1 und SAS2 zu finden sind (Abb. 2).

„Lange“ RSH(*RelA/SpoT homolog*)-Proteine wie Rel, RelA und SpoT sind hochkonserviert in Bakterien und Chloroplasten [4]. Rel und SpoT sind bifunktional, während RelA aufgrund von Variationen essenzieller katalytischer Aminosäuren in der Hydrolase-Domäne lediglich Synthetase-Aktivität aufweist (Abb. 2). Die Domänen im C-terminalen Teil langer RSH-Proteine sind verantwortlich für die Interaktion mit verschiedenen Proteinen, wodurch die antagonistischen enzymatischen Aktivitäten reguliert werden. Rel und





▲ **Abb. 2:** Der (p)ppGpp-Stoffwechsel. Enzyme verschiedener Domänenarchitektur sind am (p)ppGpp-Metabolismus beteiligt. Die Modellorganismen *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* stellen hinsichtlich ihrer Enzymausstattung zwei Prototypen dar. Die Enzyme des (p)ppGpp-Metabolismus unterliegen verschiedenen Regulationen durch kleine Moleküle oder Proteine. Für die Stimulierung der Aktivität von SAS-Proteinen durch pppGpp oder Zinkionen ist deren homotetramere Topologie essenziell [7]. Die synthetisierende Aktivität von monomerem Rel und RelA wird durch Bindung des Proteins, vermittelt durch die im C-terminalen Proteinteil befindlichen regulatorischen Domänen, an blockierte Ribosomen angeregt. In Abwesenheit des Ribosoms dominiert hingegen die hydrolytische Aktivität von Rel [3]. Die antagonistischen Aktivitäten von SpoT werden durch Interaktion mit den Proteinen PTS^{Ntr}, Rsd, ACP und CgtA/ObgE reguliert [2]. Die GppA-Domäne konvertiert pppGpp zu ppGpp und ist an eine Polyphosphatase-Domäne (PPX) gekoppelt, wodurch die Aktivität der Protease Lon beeinflusst wird [8].

RelA werden durch Ribosomen, die durch das Vorhandensein von unbeladener tRNA in der A-Seite blockiert sind, rekrutiert und in ihrer (p)ppGpp-Synthetase-Aktivität stimuliert. Die Aktivität von SpoT wird durch Interaktion mit dem Acyl-Carrier-Protein, dem Anti- σ^{70} -Faktor Rsd, Komponenten des Stickstoff-Phosphotransferase-Systems (PTS^{Ntr}) oder der ribosomalen GTPase CgtA/ObgE beeinflusst [2]. Lange RSH-Proteine sind bisher schlecht strukturell charakterisiert: Die Struktur von SpoT wurde noch nicht aufgeklärt; von Rel/RelA-Proteinen liegen vier Strukturen vor, wobei drei von ribosomengebundenem RelA wenig Aufschluss über die Konformation der Hydrolase-/Synthetase-Domänen geben und die Struktur von freiem Rel hingegen nicht die C-terminalen regulatorischen Domänen enthält [2]. Aus diesem Grund sind die mechanistischen Details der Regulation langer RSH-Proteine noch kaum verstanden.

„Kurze“ RSH-Proteine (**Abb. 2**) bestehen ausschließlich aus der Hydrolase-Domäne (*small alarmone hydrolases*, SAH) oder der Synthetase-Domäne (*small alarmone synthetases*, SAS). SAH-Proteine sind deutlich seltener als lange RSH-Proteine [4]. Lediglich zwei SAH-Proteine, aus *Drosophila* und dem Menschen, wurden bisher strukturell charak-

terisiert. Beide Proteine sind der Hydrolase-Domäne von Rel höchst ähnlich und degradieren (p)ppGpp [3]. Da es bisher keinen Hinweis auf (p)ppGpp-synthetisierende Enzyme in Eukaryoten gibt, wird angenommen, dass NADPH das eigentliche Substrat der eukaryotischen SAH-Proteine darstellt und sie in der Regulation der Ferroptose beteiligt sind [5].

Es sei außerdem erwähnt, dass (p)ppGpp durch Enzyme aus der Gruppe der Nudix-Hydrolasen degradiert werden kann [6], wobei pGp, ein bisher gänzlich uncharakterisiertes Produkt, entsteht. Das Vorkommen der SAS-Proteine (**Abb. 2**) SAS1 (RelQ) und SAS2 (RelP) ist weitgehend auf die Firmicutes begrenzt. Sie bestehen lediglich aus der Synthetase-Domäne, bilden aber homotetramere Proteinkomplexe, die eine prominente Kavität in ihrem Zentrum besitzen [7]. Die Aktivität beider Proteine wird allosterisch stimuliert, im Falle von SAS1 durch in der Kavität gebundenes pppGpp selbst und im Falle von SAS2 durch Zinkionen über einen noch unbekanntem Mechanismus.

Das Protein GppA kann pppGpp durch Abspaltung eines Phosphates vom 5'-Ende zu ppGpp konvertieren. In manchen Organismen ist diese Funktion im GppA-Protein an eine Polyphosphatase-Domäne gekoppelt,

wodurch die Level an Polyphosphat und damit die Aktivität der Protease Lon (über die Bildung des aktiven Polyphosphat/Lon-Komplexes) mit der intrazellulären Konzentration von (p)ppGpp verknüpft sind [8].

Durch (p)ppGpp beeinflusste Zielproteine

Es gibt mehr als 30 validierte direkte Targets von (p)ppGpp [3, 6, 9, 10]. Aufgrund der Ähnlichkeit von (p)ppGpp mit seinen Vorläufermolekülen GDP und GTP (**Abb. 1**) stellen GTPasen eine große Gruppe von Zielproteinen dar. Diese nehmen sowohl an der Biogenese von Ribosomen (z. B. RbgA, HflX, RsgA, Era und EngA/Der) als auch an der Translation (z. B. IF2, EF-Tu, EF-G und RF3) teil. Die Bindung des (p)ppGpp an die GTPasen wird über den Guanosinteil sowie die am 5'-Ende befindlichen Phosphate vermittelt, wobei beide Alarmone mit vergleichbaren Affinitäten und kompetitiv zu GDP und GTP binden. Die inhibierende Wirkung der Alarmone beruht auf am 3'-Ende befindlichen Phosphatresten, die sterisch und aufgrund ihrer negativen Ladung die Bindung weiterer Faktoren, insbesondere ribosomaler Proteine, unterbinden. Weiterhin beeinflusst (p)ppGpp eine Vielzahl von Enzymen des Nukleotidmetabolismus, was zu einer Verringerung der intrazellulären GTP-Konzentration führt. Alarmone können hierbei kompetitiv (z. B. in GMK und HPRT) oder allosterisch (z. B. PpnN/YgdH und PurF) wirken. Hervorzuheben ist der Bindemodus des Alarmons im ppGpp/PurF-Komplex [9], wobei durch die hohe Flexibilität der 3'- und 5'-Phosphatreste des ppGpp diese in einer verlängerten Konformation vorliegen und die Interaktion mit verschiedenen Monomeren des homotetrameren Proteins ermöglichen. Die Interaktion von (p)ppGpp mit der Primase DnaG in deren aktiven Zentrum inhibiert die Replikation von DNA. Die Induktion der *stringent response* kann dadurch als eine Methode zur Synchronisation der Replikation angewandt werden [11].

Die *stringent response* ist weiterhin durch eine starke Verringerung an ribosomaler RNA (rRNA) gekennzeichnet [1]. In *E. coli* kann (p)ppGpp die RNA-Polymerase (RNAP) an zwei distinkten Stellen binden und allein oder gemeinsam mit dem Protein DksA die Aktivität von RNAP verringern. In *B. subtilis*, dessen RNAP nicht die aus *E. coli* bekannten Bindestellen für (p)ppGpp und auch kein DksA-Homolog besitzt, ist die Verringerung an rRNA wohl auf die Initiation der rRNA-

Promotoren mit GTP in Verbindung mit der verringerten Konzentration des Nukleotids während der *stringent response* (siehe oben) zurückzuführen [12]. Weitere Zielstrukturen sind LdcI, LdcC, SpeC und SpeF, die am Aminstoffwechsel beteiligt sind [10], sowie kürzlich entdeckte (p)ppGpp-abhängige Riboswitches [13].

Die Vielzahl an Zielproteinen mit ihren unterschiedlichen Affinitäten für (p)ppGpp legt dabei nahe, dass die *stringent response* nicht nach dem Alles-oder-nichts-Prinzip verläuft, sondern vielmehr eine fein abgestimmte Anpassung darstellt.

Alarmonen besitzen eine große Bedeutung in der Adaptation von Mikroorganismen an bestimmte Stressbedingungen und beeinflussen möglicherweise durch die Induktion von Antibiotika-persistenten Zellen den Verlauf von Infektionen. Eine Vielzahl von Studien belegt, dass niedrige Level von (p)ppGpp selbst ohne einen Stressstimulus bedeutsam für die bakterielle Physiologie sind. Die *stringent response* erscheint daher – zumal sie im Menschen fehlt – als ein mögliches Ziel für die zukünftige Entwicklung antibakterieller Wirkstoffe, wobei dieser Ansatz allerdings noch eingehender Prüfung bedarf. ■

Literatur

- [1] Cashel M (1969) The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. IV. Relevance of unusual phosphorylated compounds from amino acid-starved stringent strains. *J Biol Chem* 244:3133–3141
- [2] Ronneau S, Hallez R (2019) Make and break the alarmone: regulation of (p)ppGpp synthetase/hydrolase enzymes in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 43:389–400
- [3] Steinchen W, Bange G (2016) The magic dance of the alarmones (p)ppGpp. *Mol Microbiol* 101:531–544
- [4] Atkinson GC, Tenson T, Hauryliuk V (2011) The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PLoS One* 6:e23479
- [5] Ding C-KC, Rose J, Wu J et al. (2018) Mammalian stringent-like response mediated by the cytosolic NADPH phosphatase MESH1. *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/325266>
- [6] Zhang Y, Zbornikova E, Rejman D et al. (2018) Novel (p)ppGpp binding and metabolizing proteins of *Escherichia coli*. *mBio* 9:e02188-17
- [7] Steinchen W, Vogt MS, Altogether F et al. (2018) Structural and mechanistic divergence of the small (p)ppGpp synthetases RelP and RelQ. *Sci Rep* 8:2195
- [8] Kuroda A, Nomura K, Ohtomo R et al. (2001) Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science* 293:705–708
- [9] Wang B, Dai P, Ding D et al. (2019) Affinity-based capture and identification of protein effectors of the growth regulator ppGpp. *Nat Chem Biol* 15:141–150
- [10] Kanjee U, Ogata K, Houry WA (2012) Direct binding targets of the stringent response alarmone (p)ppGpp. *Mol Microbiol* 85:1029–1043
- [11] Ferullo DJ, Cooper DL, Moore HR et al. (2009) Cell cycle synchronization of *Escherichia coli* using the stringent response, with fluorescence labeling assays for DNA content and replication. *Methods* 48:8–13
- [12] Gourse RL, Chen AY, Gopalakrishnan S et al. (2018) Transcriptional responses to ppGpp and DksA. *Annu Rev Microbiol* 72:163–184
- [13] Sherlock ME, Sudarsan N, Breaker RR (2018) Riboswitches for the alarmone ppGpp expand the collection of RNA-based signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 115:6052–6057

Funding: Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Wieland Steinchen
Prof. Dr. Gert Bange
Fachbereich Chemie
Zentrum für Synthetische Mikrobiologie (SYNMIKRO)
Philipps-Universität Marburg
Hans-Meerwein-Straße 6
D-35043 Marburg
wieland.steinchen@synmikro.uni-marburg.de
gert.bange@synmikro.uni-marburg.de
www.bangelab.org

AUTOREN



Wieland Steinchen

2007–2013 Pharmaziestudium an der Universität Jena. 2017 Promotion bei Prof. Dr. G. Bange an der Universität Marburg, seitdem wissenschaftlicher Mitarbeiter am DFG-geförderten „Marburger Gerätezentrum für Interaktion, Dynamik und Struktur biomolekularer Komplexe“.



Gert Bange

1997–2002 Biochemiestudium an der Universität Halle/Saale. 2003–2007 Promotion und Postdoc bei Prof. Dr. I. Sinning am Biochemiezentrum (BZH) der Universität Heidelberg. 2013–2018 unabhängige Arbeitsgruppe am Zentrum für Synthetische Mikrobiologie (SYNMIKRO) und am Fachbereich Chemie der Universität Marburg. Seit 2018 Professor für Biochemie am Fachbereich Chemie und seit 2019 stellvertretender geschäftsführender Direktor des Forschungszentrums SYNMIKRO, Universität Marburg.