Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Mgr. Jana Goldová

Studium funkce Ser/Thr proteinkináz a fosfatáz *Pseudomonas aeruginosa*

Functional studies of Ser/Thr protein kinases and phosphatases of *Pseudomonas aeruginosa*

Dizertační práce

Praha, 2011

Tato dizertační práce byla vypracována v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky v Laboratoři buněčné signalizace pod odborným vedením RNDr. Pavla Brannyho, CSc. v období říjen 2003 - květen 2011.

Práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky (projekt číslo 204/08/0783), Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt číslo 161/2006/B-BIO/PřF), a nadace Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových, která poskytla finanční příspěvek na účast na konferenci „Xth Conference on *Pseudomonas*, 2005“ v Marseille ve Francii, 27.-31. srpna 2005.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 24.5.2011 .....

Mgr. Jana Goldová

Za odborné vedení práce bych chtěla poděkovat svému školiteli Pavlu Brannymu. Všem stávajícím a minulým kolegům z laboratoře bych chtěla poděkovat za jejich kamarádství, rady a morální podporu během celého postgraduálního studia. Stejně tak děkuji za podporu a pomoc i dalším kolegům z nejbližšího laboratorního okolí.

Děkuji Dr. T. Köhlerovi (University of Geneva) za poskytnutí divokého kmene *P. aeruginosa* PAO1, Dr. H. P. Schweizerovi (Colorado State University) za poskytnutí vektorů pEX18Ap, pFLP2, pPS858, pUC18-mini-Tn7T-LAC a pTNS2. Dr. V. Venturimu (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Trieste) děkuji za poskytnutí vektorů pMP220 a pRPO220B.

Ing. Hynkovi Strnadovi, PhD a RNDr. Robertovi Ivánkovi ze Servisní laboratoře funkční genomiky a bioinformatiky a Markovi Basslerovi děkuji za pomoc při zpracování dat z microarrays.

Mírovi a rodičům chci poděkovat za jejich neutuchající podporu během mého dlouhého studia a za trpělivost s mojí osobou zejména v posledních měsících.

Zvláštní poděkování patří Járovi Cimrmanovi, neboť mi bylo útěchou v nesnázích, že i takový velikán byl pionýrem slepých uliček a často jsem vzpomněla na jeho poučku, že vyfukováním tabákového kouře do vody zlato nevznikne.

Abstrakt

Reverzibilní fosforylace proteinů je považována za univerzální mechanizmus v intracelulární komunikaci všech živých organizmů. Tento proces, katalyzovaný proteinkinázami a fosfatázami, umožňuje přeložit extracelulární signály do odpovídající buněčné odpovědi a umožňuje tak adaptaci na změny podmínek v prostředí. V posledních letech byla objevena celá řada Ser/Thr proteinkináz a fosfatáz eukaryotního typu u bakterií, jejich přesná funkce a substráty však nejsou zatím příliš prostudovány.

Podmíněný lidský patogen *Pseudomonas aeruginosa* obsahuje ve svém chromozomu minimálně 5 genů kódujících předpokládané Ser/Thr proteinkinázy a fosfatázy eukaryotního typu. V první části této práce jsme se pokusili stanovit fyziologickou roli Ser/Thr proteinkinázy PpkA a fosfatázy PppA, které jsou součástí sekrečního systému typu VI H1-T6SS.

V kmeni *P. aeruginosa* PAO1 jsme připravili dvojitého delečního mutanta *ΔpppA-ppkA*. Fenotypová analýza prokázala, že v porovnání s divokým kmenem vykazuje mutantní kmen pomalejší růst v minimálním médiu a sníženou produkci pigmentu pyocyaninu. Mutant dále prokazoval významně sníženou odolnost k oxidativnímu stresu a naopak zvýšenou odolnost k hyperosmotickému stresu. V souladu s pozorovanou sníženou odolností k oxidativnímu stresu mutantní kmen hůře přežíval v baktericidním prostředí uvnitř myších makrofágů a také nebyl schopen navodit infekci v rostlinném modelu. Porovnání transkriptomů mutantního a divokého kmene odhalilo vliv delece genů *pppA-ppkA* na expresi genů odpovědi na oxidativní stres, genů regulovaných stacionárním σ-faktorem RpoS a genů regulovaných *quorum sensing* (QS) systémy. Transkriptomy mutanta a divokého kmene byly porovnány rovněž za podmínek oxidativního stresu. Tato analýza ukázala na změněný rozsah odpovědi k oxidativnímu stresu, která se projevovala deregulací exprese ve všech podskupinách genů odpovědi k oxidativnímu stresu. Kromě těchto genů jsme pozorovali změnu exprese genů pod kontrolou QS systémů *las*/*rhl* a genů Pho regulonu. Z dosažených výsledků vyvozujeme, že proteinkináza PpkA s fosfatázou PppA jsou globálními regulátory, které se kromě své funkce v sekrečním systému typu VI podílí také na regulaci stresové odpovědi a tak ovlivňují virulenci *P. aeruginosa*.

V druhé části této práce jsme se věnovali studiu interakcí Ser/Thr proteinkinázy Stk1 s fosfatázou Stp1 a jejich předpokládaným substrátovým proteinem Fha2. Tyto proteiny jsou součástí sekrečního systému typu VI H2-T6SS.

Připravili jsme rekombinantní protein Fha2 a potvrdili jeho fosforylaci proteinkinázou Stk1 *in vitro*. Imunodetekcí s protilátkou proti fosforylovanému threoninu jsme dále zjistili, že protein Fha2 je kinázou Stk1 fosforylován na threoninu. Určit přesné místo fosforylace proteinu Fha2 pomocí cílené mutageneze pravděpodobných cílových aminokyselin se nám nepodařilo. Dále jsme studovali efekt fosforylace fosfatázy Stp1 na její aktivitu. Místně specifická mutageneze identifikovaného fosforylovaného threoninu 90 neprokázala vliv na fosfatázovou aktivitu Stp1 vůči svému substrátu, kináze Stk1. V *in vitro* kinázové reakci jsme nepozorovali fosforylaci fosfatázy Stp1 kinázou Stk1 na threoninu.

Abstract

Reversible protein phosphorylation is considered the universal language for intracellular communication in all living organisms. This process, catalysed by protein kinases and phosphatases, enables the translation of extracellular signals into cellular responses and also allows for adaptation to a constantly changing environment. In recent years, a number of bacterial eukaryotic-type Ser/Thr protein kinases and phosphatases have been identified. However, their precise functions and substrates are not yet well defined.

The genome of opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* contains at least five genes encoding putative eukaryotic-type Ser/Thr protein kinases and phosphatases. In the first part of this study, we have attempted to establish the role of Ser/Thr protein kinase PpkA and phosphatase PppA, which belong to type VI secretion system H1-T6SS.

Double mutant strain Δ*pppA-ppkA* was prepared in *P. aeruginosa* PAO1 background. Phenotypic studies revealed that the mutant grew slower than the wild-type strain in minimal media and exhibited reduced secretion of pigment pyocyanin. In addition, the mutant had altered sensitivity to oxidative and hyperosmotic stress conditions. Consequently, mutant cells had an impaired ability to survive in murine macrophages and an attenuated virulence in the plant model of infection. Whole-genome transcriptome analysis revealed that *pppA-ppkA* deletion affects the expression of oxidative stress-responsive genes, stationary phase σ-factor RpoS-regulated genes as well as *quorum-sensing* regulons. The transcriptome of the *pppA-ppkA* mutant was also analysed under conditions of oxidative stress and showed an impaired response to the stress, manifested by a weaker induction of stress adaptation genes as well as the genes of the SOS regulon. In addition, expression of either quorum-sensing-dependent genes or RpoS-regulated genes and genes of Pho regulon was also affected. Our results suggest that in addition to its crucial role in controlling the activity of *P. aeruginosa* H1-T6SS at the post-translational level, the PppA-PpkA pair also affects the transcription of stress-responsive genes. Based on these data, it is likely that the reduced virulence of the mutant strain results from an impaired ability to survive in the host due to the limited response to stress conditions.

In the second part of this study, we focused on interactions of Ser/Thr protein kinase Stk1 with phosphatase Stp1 and their putative substrate protein Fha2. These proteins belong to the type VI secretion system H2-T6SS.

We prepared recombinant protein Fha2 and proved its phosphorylation by the Stk1 kinase *in vitro*. Immunodetection with anti-phospho-treonine antibody revealed further that Fha2 is phosphorylated by the Stk1 on threonine residue(s). However, our attempts to determine precise site of phosphorylation of Fha2 by the site directed mutagenesis of predicted target amino acid residues failed. We have also studied the effect of Stp1 phosphorylation on its activity. Site directed mutagenesis of previously identified phospho-threonine 90 did not affect phosphatase activity of Stp1. Furthermore, no phosphorylation of Stp1 by Stk1 in *in vitro* conditions was observed.

Obsah

1 ÚVOD 10

1.1 CÍLE PRÁCE 11

1.1.1 STUDIUM FUNKCE SER/THR PROTEINKINÁZY STK1 A FOSFATÁZY STP1 11

1.1.2 STUDIUM INTERAKCÍ PROTEINKINÁZY STK1 S FOSFATÁZOU STP1 A PROTEINEM FHA2 11

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED 12

2.1 FOSFORYLACE PROTEINŮ 12

2.1.1 FOSFORYLACE PROTEINŮ U EUKARYOT 12

2.1.1.1 Serin/threoninové a tyrozinové proteinkinázy 12

2.1.1.2 Histidinové proteinkinázy 14

2.1.2 FOSFORYLACE PROTEINŮ U PROKARYOT 15

2.1.2.1 Fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferázový systém 15

2.1.2.2 Dvousložkové systémy 17

2.1.2.3 Serin/threoninové a tyrozinové proteinkinázy 20

2.1.2.3.1 Bakteriální ATP-dependentní serin/threoninové a tyrozinové proteinkinázy 20

2.1.2.3.2 ATP-dependentní serin/threoninové a tyrosinové proteinkinázy eukaryotního typu 22

2.1.2.4 Fosfoproteinfosfatázy 23

2.1.2.4.1 Skupina fosfatáz PPP 23

2.1.2.4.2 Skupina fosfatáz PPM 24

2.1.2.4.3 Skupina fosfatáz PTP a LMW PTP 25

2.1.2.5 Ser/Thr/Tyr proteinkinázy a fosfatázy eukaryotního typu *P. aeruginosa* 26

2.1.2.5.1 Ser/Thr proteinkináza Stk1 a fosfatáza Stp1 26

2.1.2.5.2 Ser/Thr proteinkináza PpkA a fosfatáza PppA 27

2.1.2.5.3 Ser/Thr proteinkináza/fosfatáza kódovaná genem PA1782 28

2.2 *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* 28

2.2.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA 28

2.2.2 VIRULENČNÍ FAKTORY 29

2.2.3 SEKREČNÍ SYSTÉMY *P. AERUGINOSA* 32

2.2.3.1 Sekreční systém typu I 33

2.2.3.2 Sekreční systém typu II 34

2.2.3.3 Sekreční systém typu III 34

2.2.3.4 Sekreční systém typu V 35

2.2.3.5 Sekreční systém typu VI 35

2.2.4 REGULACE VIRULENCE MECHANIZMEM *QUORUM SENSING* 38
2.2.5 REGULACE VIRULENCE DVOUSLOŽKOVÝMI SYSTÉMY GACA/GACS, RETS A LADS 42
2.2.6 CYSTICKÁ FIBRÓZA A *P. AERUGINOSA* 43

3 MATERIÁL A METODY 45

3.1 MATERIÁL 45
3.1.1 BAKTERIÁLNÍ KMENY 45
3.1.2 VEKTORY 45
3.1.3 KULTIVAČNÍ PŮDY 47
3.1.4 CHEMIKÁLIE A ENZYMY 48
3.1.5 SOFTWARE 51
3.2 METODY – OBECNÁ ČÁST 52
3.2.1 KULTIVACE MIKROORGANIZMŮ 52
3.2.1.1 Kultivace *E. coli* 52
3.2.1.2 Kultivace *P. aeruginosa* 52
3.2.2 DNA MANIPULACE 52
3.2.2.1 Izolace plazmidové DNA *E. coli* alkalickou lyzí 52
3.2.2.2 Izolace plazmidové DNA *E. coli* pomocí komerční soupravy 53
3.2.2.3 Izolace chromozomální DNA *P. aeruginosa* 53
3.2.2.4 Minipreparace chromozomální DNA *P. aeruginosa* 53
3.2.2.5 Precipitace DNA isopropanolem 54
3.2.2.6 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami 54
3.2.2.7 Ligace molekul DNA 54
3.2.2.8 Transformace kompetentních buněk *E. coli* plazmidovou DNA 54
3.2.2.9 Transformace kompetentních buněk *P. aeruginosa* 55
3.2.2.10 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu 56
3.2.2.11 Polymerázová řetězová reakce (PCR) 56
3.2.2.12 Příprava značených DNA sond 57
3.2.2.13 Přenos DNA na nylonovou membránu (Southern blot) 57
3.2.2.14 Hybridizace DNA se značenou DNA sondou 57
3.2.2.15 Imunologická detekce s anti-Dig protilátkou 58
3.2.2.16 Cílená mutageneze s využitím komerční soupravy 58
3.2.3 MANIPULACE S PROTEINY 58
3.2.3.1 Exprese proteinů v *E. coli* 58
3.2.3.2 Izolace proteinů s histidinovou kotvou 59
3.2.3.3 Měření koncentrace proteinů 59

3.2.3.4 Elektroforetická analýza proteinů (SDS-PAGE) ... 59
3.2.3.5 Barvení proteinů v separačním gelu ... 60
3.2.3.6 Přenos proteinů na membránu (Western přenos) ... 60
3.2.3.7 Imunodetekce ... 60

3.3 METODY – STUDIUM DELEČNÍHO MUTANTA *ΔPPPA-PPKA* ... 62

3.3.1 OLIGONUKLEOTIDY ... 62
3.3.2 KONSTRUKCE DELEČNÍHO MUTANTA *ΔPPPA-PPKA* ... 64
3.3.3 KOMPLEMENTACE ... 65
3.3.4 PROMOTOROVÉ TRANSKRIPČNÍ FÚZE ... 66
3.3.5 IZOLACE RNA *P. AERUGINOSA* ... 67
3.3.6 AFFYMETRIX GENECHIP MICROARRAYS ... 68
3.3.7 ANALÝZA DAT ZÍSKANÝCH Z DNA MICROARRAYS ... 68
3.3.8 REVERZNÍ TRANSKRIPCE ... 69
3.3.9 KVANTITATIVNÍ PCR V REÁLNÉM ČASE (REAL-TIME PCR) ... 69
3.3.10 SLEDOVÁNÍ PRODUKCE A KVANTIFIKACE VIRULENČNÍCH FAKTORŮ ... 71
3.3.11 STRESOVÉ EXPERIMENTY *IN VITRO* ... 72
3.3.12 MĚŘENÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE (MIC) ... 73
3.3.13 STANOVENÍ PŘEŽÍVÁNÍ V MYŠÍCH MAKROFÁZÍCH (BAKTERICIDNÍ ZKOUŠKA) ... 73
3.3.14 ZKOUŠKA VIRULENCE V ROSTLINNÉM MODELU ... 74

3.4 METODY – STUDIUM INTERAKCÍ PROTEINKINÁZY STK1 S FOSFATÁZOU STP1 A PROTEINEM FHA2 ... 75

3.4.1 OLIGONUKLEOTIDY ... 75
3.4.2 KLONOVÁNÍ A EXPRESE GENU *FHA2* (PA1665) V *E. COLI* ... 75
3.4.3 CÍLENÁ MUTAGENEZE PROTEINU FHA2 ... 76
3.4.4 CÍLENÁ MUTAGENEZE FOSFATÁZY STP1 ... 76
3.4.5 KINÁZOVÁ REAKCE *IN VITRO* ... 77
3.4.6 FOSFATÁZOVÁ REAKCE *IN VITRO* ... 77

4 VÝSLEDKY ... 78

4.1 STANOVENÍ FUNKCE SER/THR PROTEINKINÁZY PPKA A FOSFATÁZY PPPA ... 78

4.1.1 ZÁKLADNÍ FENOTYPOVÁ ANALÝZA MUTANTA *ΔPPPA-PPKA* ... 79
4.1.2 ODOLNOST MUTANTA *ΔPPPA-PPKA* K STRESOVÝM PODMÍNKÁM ... 81
4.1.3 STANOVENÍ PŘEŽÍVÁNÍ KMENE *ΔPPPA-PPKA* V MYŠÍCH MAKROFÁZÍCH ... 82
4.1.4 STANOVENÍ CITLIVOSTI MUTANTA *ΔPPPA-PPKA* K ANTIBIOTIKŮM ... 82
4.1.5 TEST VIRULENCE *ΔPPPA-PPKA* V ROSTLINNÉM MODELU ... 83

4.1.6 TRANSKRIPČNÍ ANALÝZA MUTANTA *ΔPPPA-PPKA* ... 84
4.1.6.1 Geny regulonu RpoS ... 88
4.1.6.2 Geny regulované QS systémy ... 89
4.1.6.3 Geny odpovědi na oxidativní stres ... 89
4.1.7 GLOBÁLNÍ ANALÝZA TRANSKRIPTOMU ZA PODMÍNEK OXIDATIVNÍHO STRESU ... 91
4.1.7.1 Geny spojené s odpovědí na oxidativní stres ... 97
4.1.7.2 Geny regulované QS systémy *las*/*rhl* a stacionárním σ-faktorem RpoS ... 99
4.1.7.3 Geny Pho regulonu ... 99
4.1.8 STANOVENÍ OPERONU OBSAHUJÍCÍHO GENY *PPPA*, *PPKA* A PA0073 ... 100
4.1.9 ANALÝZA MOŽNÝCH PROMOTOROVÝCH OBLASTÍ PŘED GENY PA0077 (*TSSM1*), PA0076 A PA0073 ... 102
4.1.10 KOMPLEMENTACE MUTACE *ΔPPPA-PPKA* ... 103
4.2 STUDIUM INTERAKCÍ SER/THR PROTEINKINÁZY STK1 S FOSFATÁZOU STP1 A PROTEINEM FHA2 ... 106
4.2.1 ČÁSTEČNÁ CHARAKTERIZACE PROTEINKINÁZY STK1 A INTERAKCE S FOSFATÁZOU STP1 106
4.2.2 IDENTIFIKACE PROTEINU FHA2 JAKO SUBSTRÁTU KINÁZY STK1 ... 107
4.2.3 STANOVENÍ MÍSTA FOSFORYLACE PROTEINU FHA2 ... 108
4.2.4 STUDIUM VLIVU FOSFORYLACE FOSFATÁZY STP1 NA JEJÍ AKTIVITU ... 109

5 DISKUZE ... 113

5.1 STANOVENÍ FUNKCE SER/THR PROTEINKINÁZY PPKA A FOSFATÁZY PPPA ... 113
5.1.1 PPPA-PPKA OVLIVŇUJÍ RŮST NA GLYCEROLU ... 114
5.1.2 PPPA-PPKA SE ÚČASTNÍ REGULACE ODPOVĚDI BUŇKY NA VNĚJŠÍ STRESOVÉ PODMÍNKY 114
5.1.3 PPPA-PPKA OVLIVŇUJÍ VIRULENCI *P. AERUGINOSA* V ROSTLINNÉM MODELU ... 117
5.1.4 PROTEINKINÁZA PPKA S FOSFATÁZOU PPPA OVLIVŇUJÍ EXPRESI NĚKOLIKA REGULONŮ, ZEJMÉNA PAK GENY ODPOVĚDI NA OXIDATIVNÍ STRES ... 118
5.1.4.1 Srovnání transkriptomů za nestresových podmínek ... 118
5.1.4.2 Srovnání transkriptomů za podmínek oxidativního stresu ... 121
5.1.5 SHRNUTÍ ... 124
5.2 STUDIUM INTERAKCÍ SER/THR PROTEINKINÁZY STK1 S FOSFATÁZOU STP1 A PROTEINEM FHA2 ... 126
5.2.1 FHA2 JE SUBSTRÁTEM PROTEINKINÁZY STK1 ... 126
5.2.2 AKTIVITA FOSFATÁZY STP1 NENÍ OVLIVNĚNA MUTAGENEZÍ THREONINU 90 ... 127

6 ZÁVĚR ... 130

6.1 STANOVENÍ FUNKCE SER/THR PROTEINKINÁZY PPKA A FOSFATÁZY PPPA 130

6.2 STUDIUM INTERAKCÍ SER/THR PROTEINKINÁZY STK1 S FOSFATÁZOU STP1 A PROTEINEM FHA2 131

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 132

Seznam použitých zkratek

ABC	ATP binding cassette
ADP	adenosin-5´-difosfát
Amp	ampicilin
Asp	aspartát
ATP	adenosin-5´-trifosfát
bp	páry bazí
BSA	bovine serum albumine
BY	bacterial tyrosine (kinases)
cAMP	cyklický adenosin-5´-monofosfát
Cb^S	karbenicilin senzitivní
CF	cystická fibróza
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Cm	chloramfenikol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidy
EI, EII, EIII	enzymy účastnící se translokace sacharidů
FHA	forkhead associated (doména)
FRT	Flp recombinase target
GFP	green fluorescein protein
GGF	Gm^R-GFP FRT (kazeta)
Gm^R	gentamicin rezistentní
Gm^S	gentamicin senzitivní
GTPáza	guanosin-5´-trifosfát fosfohydroláza
H1-T6SS	Hcp secretion island 1- type 6 secretion system, dříve HSI-1
H2-T6SS	Hcp secretion island 2- type 6 secretion system, dříve HSI-2
H3-T6SS	Hcp secretion island 3- type 6 secretion system, dříve HSI-3
HHQ	2-heptyl-4-chinolon
His	histidin
HPr	histidine-containing protein
HPt	histidine containing phosphotransfer (domain)
HSL	homoserinlakton
IDH	isocitrátdehydrogenáza
IgG	imunoglobulin G
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
Kan	kanamycin
kb	kilobáze
kDa	kilodalton
LMW PTP	low molecular weight PTP
LPS	lipopolysacharid
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
NADH	redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid
OD_{600}	optická denzita při vlnové délce 600 nm
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEP	fosfoenolpyruvát
PPM	protein phosphatases M
PPP	protein phosphatases P
PQS	Pseudomonas quinolone signal (2-heptyl-3-hydroxy-4 chinolon)
pSer	fosforylovaný serin
pThr	fosforylovaný threonin

PTP	protein tyrosine phosphatases
PTS	fosfotransferázový systém
qRT-PCR	kvantitativní PCR v reálném čase
QS	quorum sensing
RT	reverzní transkripce
Sac^R	sacharóza rezistentní
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza s SDS
Ser	serin
SST1 (T1SS)	sekreční systém typu I
SST2 (T2SS)	sekreční systém typu II
SST3 (T3SS)	sekreční systém typu III
SST5 (T5SS)	sekreční systém typu V
SST6 (T6SS)	sekreční systém typu VI
STPK	Ser/Thr proteinkinázy eukaryotního typu
Tc	tetracyklin
Thr	threonin
Tn7	transpozón 7
Tyr	tyrosin
vWA	von Willebrand faktor typ A (doména)

1 Úvod

Proteiny jsou jednou z hlavních složek buňky. Tyto makromolekuly plní jednak funkci strukturní, jednak funkci katalytickou. Určité skupiny proteinů se podílejí na přenosu signálů uvnitř buňky. Jedním z hlavních mechanizmů přenosu signálu v buňce je reverzibilní fosforylace proteinů prostřednictvím enzymů proteinkináz a fosfatáz. Jejich působením může buňka reagovat jak na změny uvnitř sebe sama, tak i na změny vnějšího prostředí. Prostřednictvím fosfátové skupiny, která je přenášena ze specifické aminokyseliny proteinkinázy na substrátový protein, se signál může šířit buňkou.

Dříve se předpokládalo, že nejdůležitějším typem prokaryotních proteinkináz jsou proteinkinázy histidinové dvousložkových systémů, kdežto u eukaryot se vyskytují výhradně proteinkinázy serin/threoninové či tyrozinové. Dnes je již známo, že toto rozdělení neplatí a obě skupiny proteinkináz, stejně jako fosfatázy, jsou zastoupeny u obou říší. Díky tomuto všeobecnému zastoupení proteinkináz a fosfatáz mohou bakterie sloužit jako základní model pro pochopení klíčového regulačního mechanizmu, reversibilní fosforylace proteinů, která probíhá u všech organizmů.

Ser/Thr a Tyr proteinkinázy eukaryotního typu jsou dnes známy u celé řady prokaryotních organizmů. Uplatňují se zejména v procesech spojených s regulací růstu, odpovědí na stresové podmínky a v patogenezi, což potvrzuje univerzálnost fosforylace coby regulačního mechanizmu.

Pseudomonas aeruginosa je podmíněný patogen, který je jedním z nejčastějších původců nosokomiálních nákaz. Produkce a sekrece jejích virulenčních faktorů je řízena globálními regulačními mechanizmy. Sekrece virulenčních faktorů sekrečním systémem typu VI H1-T6SS je řízena postranslačně právě reverzibilní modifikací proteinu Fha1 proteinkinázou PpkA a fosfatázou PppA. Signál aktivující proteinkinázu PpkA je neznámý stejně jako její případné další substráty mimo sekreční systém typu VI. Studiem funkce proteinkinázy PpkA a fosfatázy PppA se zabývá tato dizertační práce.

Druhý funkční pár tvořený Ser/Thr proteinkinázou Stk1 a fosfatázou Stp1 je součástí dalšího sekrečního systému typu VI H2-T6SS. Jeho funkce i funkce proteinů Stk1 a Stp1 je zatím neznámá. Součástí tohoto sekrečního systému je také protein Fha2 homologní proteinu Fha1. Zaměřili jsme se na určení proteinu Fha2 coby substrátu proteinkinázy Stk1 a studium vlivu fosforylace fosfatázy Stp1 na její aktivitu.

1.1 Cíle práce

1.1.1 Studium funkce Ser/Thr proteinkinázy Stk1 a fosfatázy Stp1

První část předkládané práce se zaměřuje na pochopení úlohy proteinkinázy PpkA a fosfatázy PppA v buněčné regulaci. Byly stanoveny tyto cíle:

- Připravit kmen *P. aeruginosa* nesoucí neznačenou deleci genů *pppA-ppkA*
- Analyzovat fenotypový projev vytvořeného mutantního kmene
- Pomocí srovnání globálních transkriptomů mutantního kmene a rodičovského kmene se pokusit stanovit funkci proteinkinázy PpkA a fosfatázy PppA

1.1.2 Studium interakcí proteinkinázy Stk1 s fosfatázou Stp1 a proteinem Fha2

Druhá část této dizertační práce vychází částečně z dřívějších výsledků laboratoře a věnuje se studiu fosforylace proteinu Fha2, fosfatázy Stp1 a jejich interakcí s proteinkinázou Stk1. Byly stanoveny tyto cíle:

- Připravit rekombinantní protein Fha2 a stanovit, zda se jedná o substrát proteinkinázy Stk1
- Pomocí cílené mutageneze stanovit místo fosforylace proteinu Fha2
- Stanovit vliv fosforylace fosfatázy Stp1 na její aktivitu

2 Literární přehled

2.1 Fosforylace proteinů

Fosforylace proteinů je všeobecně považována za jeden ze základních mechanizmů regulace nejrůznějších buněčných procesů. Svou reverzibilitou umožňuje buňce dynamickým způsobem reagovat na změny uvnitř i v okolí. Proteinkinázy a fosfatázy, které katalyzují reverzibilní fosforylaci cílových systémů, jsou regulovány nejrůznějšími extracelulárními a intracelulárními signály. Fosforylace jako kovalentní postranslační modifikace proteinů je využívána všemi živými organismy.

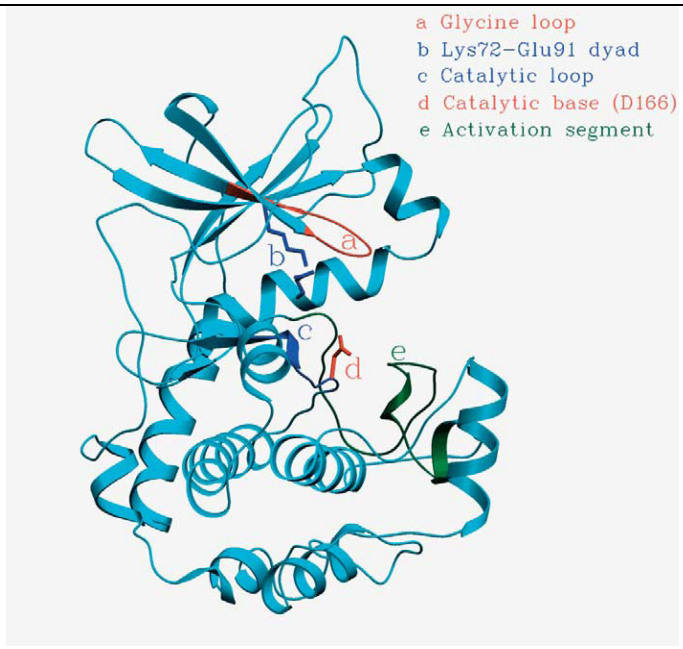
2.1.1 Fosforylace proteinů u eukaryot

2.1.1.1 Serin/threoninové a tyrozinové proteinkinázy

Hlavním typem eukaryotních proteinkináz jsou serin/threoninové (Ser/Thr) a tyrozinové (Tyr) proteinkinázy, které pomocí γ-fosfátu ATP nebo GTP generují fosfátové monoestery s využitím hydroxylových skupin proteinu v postranním řetězci Ser, Thr nebo Tyr jako akceptorů fosfátové skupiny (61).

Eukaryotní proteinkinázy tvoří rozlehlou nadrodinu proteinů, které jsou příbuzné svými homologními kinázovými (katalytickými) doménami. Kinázová doména má tři základní funkce: 1) vazbu a orientaci fosfátového donoru, ATP nebo GTP, v komplexu s dvojmocným kationtem, obvykle Mn^{2+} nebo Mn^{2+}; 2) vazbu a orientaci proteinového substrátu; 3) přenos γ-fosfátu z ATP (nebo GTP) na akceptorový hydroxylový zbytek (Ser, Thr nebo Tyr) proteinového substrátu.

Kinázová doména sestávající průměrně z 280 aminokyselin je členěna do 12 subdomén a celkově vytváří dvojlaločnou strukturu. N-koncový lalok je tvořen subdoménami I až IV a je primárně zodpovědný za vazbu a orientaci nukleotidu. C-terminální lalok je tvořen subdoménami VIa až XI a je zodpovědný za vazbu proteinového/peptidového substrátu a zahájení přenosu fosfátové skupiny. Subdoména V spojuje oba laloky. Hluboký zářez mezi oběma laloky je rozpoznáván jako místo katalýzy (obr.2.1.1).



Obr. 2.1.1: **3D struktura katalytické domény Ser/Thr nebo Tyr kinázy s klíčovými funkčními elementy.** Pro vazbu nukleotidu na N-koncový nukleotid-vazebný lalok je nezbytný glycin v pozici 3 sekvence Gly-X-Gly-X-X-Gly-X-Val subdomény I (**a Glycine loop).** Konzervovaný glutamát subdomény III váže lysin subdomény II **(b Lys72-Glu91 dyad)** a tím stabilizuje jeho interakci s ATP. Sekvence Asp-X4-Asn subdomény VIb tvoří katalytickou smyčku **(c Catalytic loop).** Aspartát je katalytickou aminokyselinou **(d Catalytic base).** Řada proteinkináz je aktivována fosforylací aminokyselinových zbytků v subdoméně VIII, která spolu se subdoménou VII tvoří takzvaný aktivační segment **(e Activation segment**). Převzato z Krupa *et al.*, 2004 (88)**.**

Pro vazbu nukleotidu na N-koncový nukleotid-vazebný lalok je nezbytný glycin v pozici 3 a vysoce konzervovaný alifatický hydrofobní, případně hydroxylový nebo thiolový zbytek na konci konzervované sekvence Gly-X-Gly-X-X-Gly-X-Val subdomény I (obr. 2.1.1 – **a** Glycine loop). Další důležitou aminokyselinou je absolutně konzervovaný lysin subdomény II, který je esenciální pro maximální enzymovou aktivitu a napomáhá také při vazbě ATP. Konzervovaný glutamát subdomény III váže lysin subdomény II (obr. 2.1.1 – **b** Lys72-Glu91 dyad) a tím stabilizuje jeho interakci s ATP (159).

Subdoména V napomáhá vazbě ATP tvorbou vodíkových můstků s jeho adeninovým nebo ribózovým cyklem.

Konzervované sekvence subdomén VIb a VII zahrnují aminokyselinové zbytky, které se podílí přímo na katalytické aktivitě. Sekvence Asp-X4-Asn subdomény VIb tvoří katalytickou smyčku (obr. 2.1.1 – **c** Catalytic loop). Aspartát je katalytickou aminokyselinou (obr. 2.1.1 – **d** Catalytic base), která přijímá proton od atakované hydroxylové skupiny substrátu během přenosu fosfátové skupiny. Asparagin stabilizuje katalytickou smyčku prostřednictvím vodíkových vazeb s aspartátem a váže ionty Mg^{2+}

interagující s α- a γ-fosfátem ATP. Konzervovaný aspartátový zbytek subdomény VII je součástí tripletu Asp-Phe-Gly a podílí se také na vazbě Mg^{2+} iontů. Na rozdíl od asparaginu subdomény VI se ale jedná o Mg^{2+} ionty interagující s β- a γ-fosfátem ATP, čímž napomáhá přenosu γ-fosfátu (61). Glutamát v subdoméně VIII, který je součástí konzervované sekvence Ala-Pro-Glu, vytváří můstky s konzervovaným argininem subdomény XI, čímž pomáhá podpořit strukturální integritu protein/peptid vazebného laloku (159). Řada proteinkináz je aktivována fosforylací aminokyselinových zbytků v subdoméně VIII, která spolu se subdoménou VII tvoří takzvaný aktivační segment (obr. 2.1.1. – **e** Activation segment). Fosforylace Ser/Thr v aktivačním segmentu slouží jako nukleační centrum neutralizující shluk pozitivně nabitých aminokyselin v katalytickém místě. Tyto elektrostatické interakce jsou klíčové pro orientaci DFG tripletu subdomény VII a ostatních katalytických a substrát vazebných zbytků a vedou k usnadnění fosfotransferu (88).

Dalšími vysoce konzervovanými aminokyselinami eukaryotních proteinkináz jsou aspartát subdomény IX a arginin subdomény XI. Aspartát v subdoméně IX vytváří vodíkové můstky s amidovou páteří proteinu a stabilizuje tak konformaci katalytické smyčky obsahující subdoménu VIb (61).

2.1.1.2 Histidinové proteinkinázy

Proteinkinázy fosforylující substrát na histidinovém zbytku tvoří u eukaryot menšinovou skupinu.

U rostlin a volně žijících primitivních organismů jako jsou kvasinky, houby a prvoci byly objeveny zejména takzvané hybridní kinázy složené z kinázové a regulátorové domény. Tyto hybridní kinázy jsou homologní bakteriálním dvousložkovým systémům tvořeným histidinovou kinázou a regulačním proteinem (189).

Fosforylace proteinů na histidinu u obratlovců je zprostředkována zřejmě pomocí kinázy nukleosiddifosfátu (NDPK – nucleoside diphosphate kinase), doposud jediné známé histidinové kinázy u savců (85).

2.1.2 Fosforylace proteinů u prokaryot

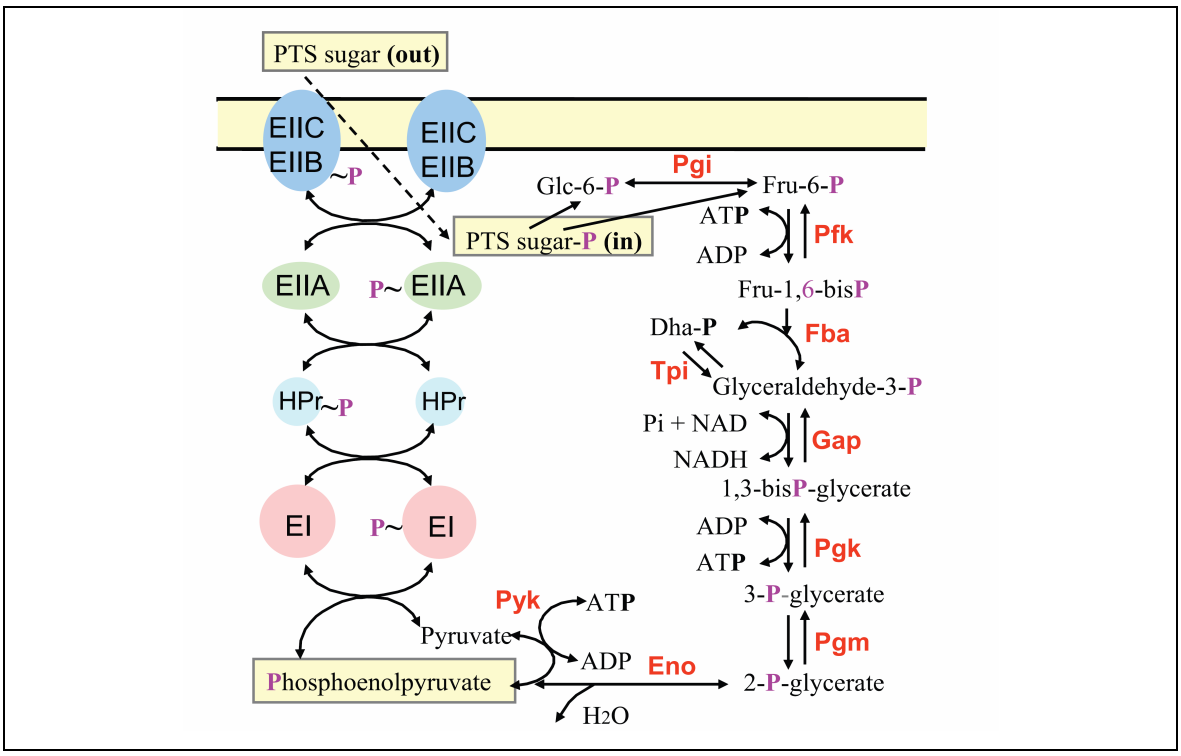
Přestože fosforylace proteinů byla dlouhou dobu považována za výhradně eukaryotní způsob postranslační modifikace, dnes je jasné, že tento proces probíhá ve všech živých organismech. Prokaryotní organismy jsou dokonce schopné využívat více fosforylačních systémů než organismy eukaryotní. Jsou to:

1. Fosfoenolpyruvát (PEP)-dependentní fosfotransferázový systém
2. Dvousložkové systémy
3. Serin/treoninové a tyrozinové proteinkinázy

2.1.2.1 Fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferázový systém

V tomto systému je postupná fosforylace proteinů fosfotransferázového komplexu zakončena fosforylací a přenosem cukru do bakteriální buňky. Jedná se o takzvanou skupinovou translokaci (147).

Základní stavba fosfoenolpyruvát (PEP)-dependentního fosfotransferázového systému (PTS) je podobná u všech studovaných bakteriálních druhů. PTS je tvořen dvojicí cytoplazmatických proteinů, enzymem I (EI) a HPr, které jsou společné pro všechny PTS systémy a enzymovým komplexem II (EII), který je naopak specifický pro daný typ sacharidu. Bakterie obvykle obsahují mnoho různých EII. Proteinový komplex EII může být tvořen jak jednotlivými proteiny tak i jedním multidoménovým proteinem. Skládá se ze dvou integrálních membránových domén C a D a dvou hydrofilních domén A a B, které společně zprostředkovávají přenos cukru do buňky a jeho fosforylaci (34). Fosfátová skupina PEP je přenesena pomocí EI na protein HPr. EII katalyzuje přenos fosfátové skupiny z HPr na transportovaný cukr. Fosforylovaný cukr se stává aktivovaným substrátem pro další metabolické dráhy (obr. 2.1.2). Proteiny EI, HPr, EIIA a B jsou fosforylovány převážně na histidinových zbytcích. Protein HPr může být fosforylován také na serinu.



Obr. 2.1.2: Transport a fosforylace cukrů systémem PTS a jejich vstup do glykolýzy. Cukry jsou transportovány do buňky a souběžně fosforylovány PTS, což umožňuje jejich vstup do glykolýzy na úrovni glokózo-6-fosfátu nebo fruktózo-6-fosfátu. Dva fosfoenolpyruváty (PEP) obvykle vznikají při glykolýze, jeden z nich je použit pro transport a počáteční fosforylaci cukru. Fosforylační stav proteinů PTS záleží tedy jak na koncentraci extracelulárního cukru, tak na poměru PEP a pyruvátu. Použité zkratky: Pgi, fosfoglukózoizomeráza; Pfk, fosfofruktokináza; Fba, fructózo-1,6-bifosfátaldoláza; Tpi, triózofosfátizomeráza; Gap, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza; Pgk, fosfoglycerátkináza; Pgm, fosfoglycerátmutáza; Eno, enoláza; Pyk, pyruvátkináza. Převzato z Deutscher *et al.*, 2006 (34).

Reverzibilní fosforylace jednotlivých složek PTS systému hraje důležitou roli v regulaci buněčného metabolismu. Fosforylační stav složek PTS systému je regulován v závislosti na energetickém stavu buňky a koncentraci metabolitů (ATP, fosforylovaný cukr a/nebo anorganický fosfát) (34). Systém regulace PTS a procesy ovlivňované PTS se liší u různých skupin bakterií.

U gramnegativních enterobakterií PTS reguluje prostřednictvím aktivity adenylátcyklázy katabolickou represi, aktivitu glycerolkinázy a různých cukerných permeáz, účastní se částečně také regulace chemotaxe za cukry transportovanými PTS. Hlavní regulační funkci má v těchto PTS $EIIA^{Glc}$. Import glukózy a dalších cukrů transportovaných PTS systémem vede k defosforylaci složek PTS. Defosforylovaný $EIIA^{Glc}$ inhibuje permeázy a další katabolické enzymy pro cukry, které nejsou transportovány PTS a glycerolkinázu. Tím je zabráněno indukci genů pro transport a metabolismus těchto cukrů. Celý proces se nazývá vyloučení induktoru (inducer exclusion). V nepřítomnosti glukózy se zvyšuje množství PEP v buňce a $EIIA^{Glc}$ je ve

fosforylovaném stavu (P- EIIA^{Glc}). P- EIIA^{Glc} aktivuje adenylátcyklázu, dochází k syntéze cAMP, které se váže na globální regulátor Crp a je tak umožněna exprese genů regulovaných vazbou regulátoru Crp (34). Tím je zrušen efekt katabolické represe.

U grampozitivních bakterií s nízkým obsahem GC bází PTS reguluje aktivitu různých katabolických enzymů a cukerných permeáz (147). Hlavním regulačním proteinem je zde HPr, který je fosforylován PEP na histidinovém zbytku, ale může být fosforylován v přítomnosti ATP a HPr kinázy/fosforylázy na serinovém zbytku (125). Existují tedy čtyři formy HPr: defosforylovaný HPr, HPr fosforylovaný na histidinu (P-His-HPr), HPr fosforylovaný na serinu (P-Ser-HPr) a HPr fosforylovaný na obou zbytcích (P-His-Ser-HPr). Rychlý metabolismus různých cukrů ovlivňuje aktivitu HPr kinázy/fosforylázy a proteinu EI. HPr kináza/fosforyláza reaguje na změny koncentrací ATP, anorganického fosfátu, pyrofosfátu a meziproduktu glykolýzy fruktózo-1,6-bisfosfátu (FBP). EI reaguje na změny ve fosfotransferové aktivitě PTS a na změny poměru koncentrací PEP k pyruvátu. EI a HPr kináza/fosforyláza ovlivňují koncentraci jednotlivých forem proteinu HPr, které regulují uhlíkový metabolismus pomocí protein-proteinových interakcí (HPr a P-Ser-HPr) nebo pomocí fosforylace proteinů mimo PTS (P-His-HPr) (34). Příjem glukózy nebo jiného rychle metabolizovatelného PTS cukru vede k defosforylaci složek PTS a k zvýšení koncentrace FBP. Vysoká koncentrace FBP stimuluje kinázovou aktivitu HPr kinázy/fosforylázy a tím vznik P-Ser-HPr. Fosforylace HPr na serinovém zbytku snižuje rychlost fosforylace HPr na histidinovém zbytku prostřednictvím PEP a EI až stokrát. P-Ser-HPr tvoří komplex s represorem CcpA a v tomto komplexu se váží na operátor *cre* na DNA a vyvolávají buď katalytickou represi nebo aktivaci exprese daných genů (125). V nepřítomnosti glukózy se hromadí anorganický fosfát, který stimuluje defosforylaci P-Ser-HPr HPr kinázou/fosforylázou za vzniku pyrofosfátu. Defosforylovaný Hpr může být efektivně fosforylován EI v přítomnosti PEP na histidinu a v této formě je aktivní v PTS (34).

HPr kináza/fosforyláza se u některých bakterií účastní také regulace virulence (34).

2.1.2.2 Dvousložkové systémy

Dvousložkové systémy jsou považovány za hlavní způsob regulace buněčných dějů u prokaryot. Skládají se zpravidla ze dvou proteinů: senzorové kinázy a regulačního proteinu. V odpovědi na vstupní signál se senzorová kináza monitorující parametry

vnějšího prostředí autofosforyluje na histidinovém zbytku za účasti ATP. Poté je fosfátová skupina přenesena na aspartátový zbytek regulačního proteinu. Fosforylace regulátoru ovlivňuje jeho aktivitu, která v konečném důsledku vede k metabolickým změnám uvnitř buňky, vzniká adaptivní odpověď (17).

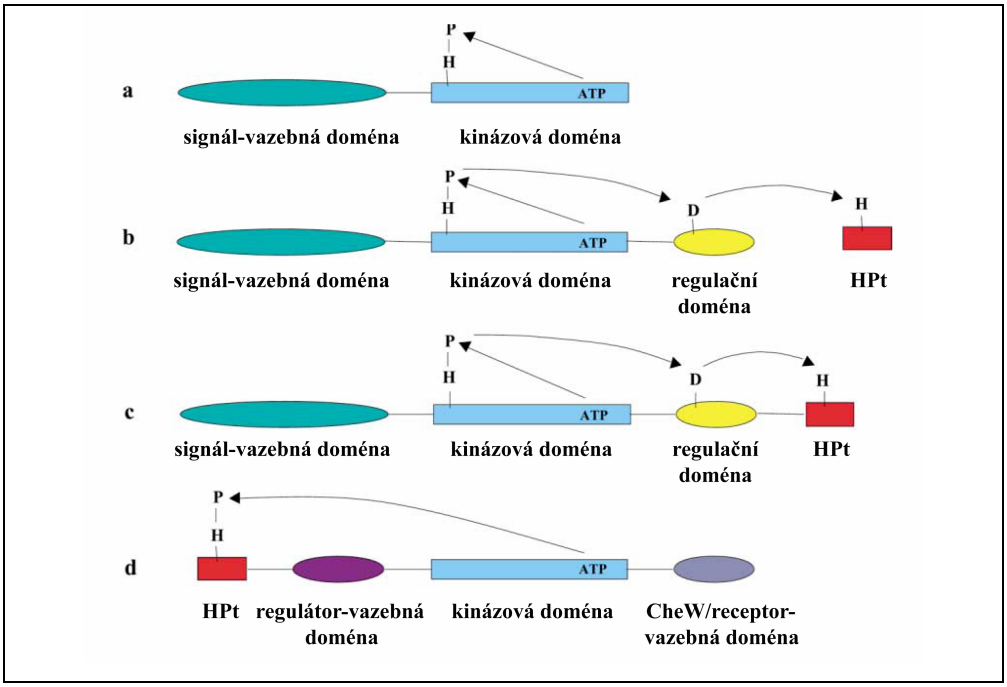
U mechanizmů jako je chemotaxe, interaguje senzorová kináza s různými receptory a buňka tak může prostřednictvím jednoho systému „vnímat“ celou řadu látek. K dalším procesům řízeným dvousložkovým systémem patří např. fixace dusíku, nodulace, sporulace, virulence, osmoregulace, reakce na světlo, elektrické a magnetické pole, teplotu a odpověď na stresové podmínky.

Senzorová kináza je zpravidla lokalizována v cytoplazmatické membráně a funguje jako homodimer. Existují dvě třídy senzorových kináz, které se liší organizací jednotlivých domén (44).

Do první třídy patří klasické histidinové kinázy tvořené zpravidla variabilní N-koncovou signál-vazebnou doménou, která může mít více než 500 aminokyselin, a konzervovanou C-koncovou kinázovou doménou, která obsahuje konzervovaný histidinový zbytek. Tato doména má délku zhruba 350 aminokyselinových zbytků a je zodpovědná za přenos signálu na regulační protein (166) (obr. 2.1.3 A).

Speciální podskupinu tvoří hybridní kinázy, které obsahují více fosfodonorových a fosfoakceptorových míst a probíhá u nich vícekrokový přenos fosfátové skupiny. Zpravidla jsou hybridní kinázy tvořeny dvěma N-koncovými transmembránovými regiony následovanými kinázovou doménou, doménou příbuznou regulační doméně regulátoru obsahující konzervovaný aspartátový zbytek a histidin obsahující fosfotransferovou doménou (HPt doménou). Funkcí HPt domény, která může být i samostatným proteinem, je přenos fosfátu na aspartátový zbytek regulátoru (44) (obr. 2.1.3 B, C).

Druhou třídu tvoří histidinové senzorové kinázy specializované na chemotaxi. Typickým příkladem je kináza CheA *E. coli*. Od první třídy se liší tím, že konzervovaný histidinový zbytek podléhající autofosforylaci je v N-koncové části proteinu. C-koncová oblast se účastní regulace kinázové aktivity pomocí vazby na transmembránové receptory a protein CheW (18,117) (obr. 2.1.3 D).



Obr. 2.1.3: Struktura senzorových kináz. Histidinové kinázy jsou děleny do dvou základních tříd. Do první třídy patří jak klasické histidinové kinázy tvořené zpravidla variabilní N-koncovou signál-vazebnou doménou a konzervovanou C-koncovou kinázovou doménou (**A**), tak hybridní kinázy s větším počtem domén (**B**, **C**). Do druhé třídy se řadí histidinové kinázy specializované na chemotaxi (**D**), jejichž aktivita je regulována vazbou na membránové receptory. Převzato z Foussard *et al.*, 2001 (44).

Regulační protein je lokalizován v cytoplazmě a skládá se z jedné až tří domén. Vždy obsahuje konzervovanou N-koncovou doménu o velikosti zhruba 125 aminokyselin, která nese konzervovaný aspartátový zbytek. Velký počet regulačních proteinů se skládá pouze z této domény, ale většina obsahuje ještě další C-koncové výstupní domény. Většina regulátorů jsou transkripční faktory s DNA vazebnou doménou. Regulační protein se proto může vázat na promotorovou oblast cílových genů a negativně nebo pozitivně regulovat jejich transkripci (121).

Senzorové kinázy regulují fosforylační stav regulátorů dvěma způsoby. Kinázy mají autofosforylační aktivitu, která vede k fosforylaci histidinového zbytku za účasti ATP. Autofosforylace je reverzibilní, fosfohistidin slouží jako vysokoenergetický meziprodukt pro přenos fosfátové skupiny na aspartátový zbytek regulačního proteinu. Některé senzorové kinázy mají také fosfatázovou aktivitu a mohou tak defosforylovat regulační proteiny. Tímto způsobem je zřejmě urychlována defosforylace vazebných regulačních proteinů, které samy mají defosforylační aktivitu. Fosfatázová aktivita senzorových kináz je ATP-dependentní proces, přičemž ATP zde působí jako kofaktor (131).

Regulační proteiny katalyzují přenos fosfátu ze senzorové kinázy na svůj aspartátový zbytek. V některých případech může být donorem fosfátové skupiny i malá molekula jako

acetylfosfát nebo fosforamidát. Regulační proteiny také katalyzují hydrolytické štěpení své fosfátové skupiny s poločasem několika sekund až mnoha minut. Doba, po kterou je regulační protein ve fosforylovaném stavu, je zásadní pro jeho signalizační funkci (44).

2.1.2.3 Serin/threoninové a tyrozinové proteinkinázy

2.1.2.3.1 Bakteriální ATP-dependentní serin/threoninové a tyrozinové proteinkinázy

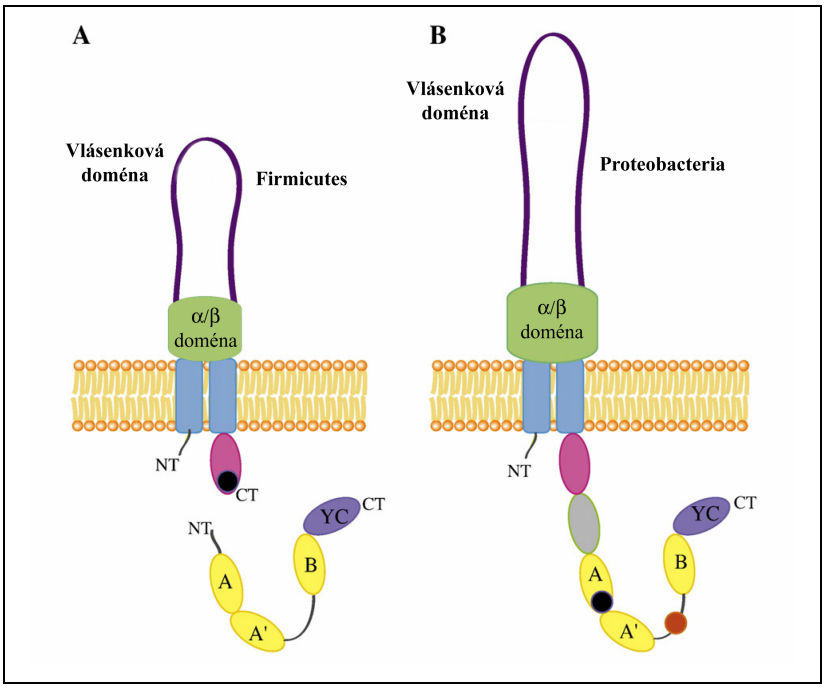
Bakteriální ATP-dependentní proteinkinázy fosforylují serinové, threoninové a tyrozinové zbytky proteinového substrátu. Na rozdíl od eukaryotních ATP-dependentních proteinkináz, které jsou allostericky regulovány druhými posly, hlavně pak cAMP, jsou tyto prokaryotní kinázy regulovány jinými buněčnými metabolity (147).

Do této skupiny patří např. kináza/fosfatáza isocitrátdehydrogenázy *E. coli* kódovaná genem *aceK*, která je nejdéle známou prokaryotní proteinkinázou. Fosforylací/defosforylací serinového zbytku isocitrátdehydrogenázy (IDH) reguluje průběh Krebsova cyklu v závislosti na zdroji uhlíku. Rostou-li bakterie na bohatém zdroji uhlíku, jako je glukóza, IDH je defosforylována a je plně aktivní v Krebsově cyklu, tzn. přeměňuje isocitrát na 2-oxoglutarát. Pokud bakterie mají k dispozici pouze méně vhodný zdroj uhlíku, jako je acetát nebo mastné kyseliny, dochází k fosforylaci IDH a indukuje se syntéza enzymů glyoxylátové spojky. Vlivem fosforylace klesá prudce aktivita IDH a isocitrát je štěpen za katalýzy isocitrátlyázou na glyoxylát a sukcinát. Tato dráha umožňuje vznik energie a čtyřuhlíkatých intermediátů pro další biosyntetické dráhy, aniž by docházelo ke ztrátám uhlíku v podobě CO_2. (92).

Další kinázou patřící do této skupiny je HPr kináza/fosforyláza grampozitivních bakterií, která fosforyluje protein HPr fosfotransferázového systému na serinu (viz kapitola 2.1.2.1 – Fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferázový systém).

Bakteriální tyrozinové proteinkinázy jsou zcela nepříbuzné tyrozinovým proteinkinázám eukaryotního typu. Velké množství těchto enzymů je podobné ATP-vazebným proteinům se kterými sdílí přítomnost Walker motivů A a B. Tento typ tyrozinových proteinkináz je označována jako BY-kinázy (Bacterial tyrosine-kinases) (56). Jedná se o transmembránové proteiny s externí vlásenkovou doménou a intracelulární katalytickou doménou obsahující esenciální Walker motivy A a B. Na C konci proteinu se nachází sekvence bohatá na tyrozin nazývaná tyrozinový klastr (YC), která může

obsahovat až 7 fosforylovatelných tyrozinových zbytků. U většiny proteobakterií jsou BY-kinázy tvořeny jedním polypeptidovým řetězcem na rozdíl od bakterií ze skupiny Firmicutes, kde jsou BY-kinázy tvořeny dvěma interagujícími polypeptidovými řetězci (58) (obr. 2.1.4).



Obr. 2.1.4: Organizace bakteriálních tyrozinových BY-kináz. A) Firmicutes – BY-kinázy jsou tvořeny dvěma samostatnými polypeptidovými řetězci. Cytoplazmatický protein je samostatně neaktivní, pro aktivaci je nutná vazba transmembránového proteinu. **B) Proteobacteria** - cytoplazmatické domény a externí doména tvoří jediný transmembránový protein lokalizovaný ve vnitřní membráně. Přejato z Grangeasse *et al.*, 2010 (58).

BY-kinázy se podílí na regulaci syntézy extracelulárních polysacharidů. Autofosforylační stav BY-kináz, regulovaný nízkomolekulárními fosfotyrozinovými fosfatázami (LMW-PTPs, viz kapitola 2.1.2.4.3) nebo histidinovými fosfatázami, ovlivňuje množství, délku a vlastnosti produkovaného polysacharidu. Exopolysacharidy jsou důležité virulenční faktory některých bakterií a je známo, že BY-kináza CpsD *Streptococcus pneumoniae* má přímý vliv na virulenci této bakterie (116).

2.1.2.3.2 ATP-dependentní serin/threoninové a tyrosinové proteinkinázy eukaryotního typu

Dlouhou dobu se předpokládalo, že hlavními typy bakteriálních proteinkináz jsou proteinkinázy dvousložkového a fosfotransferázového systému. V roce 1991 byla u bakterie *Myxococcus xanthus* objevena první Ser/Thr proteinkináza eukaryotního typu, Pkn1, která se autofosforyluje na serinu a threoninu a hraje roli ve vývojovém cyklu této bakterie (123). S přibývajícím množstvím kompletně sekvenovaných prokaryotních genomů byla na základě sekvenční homologie nalezena celá řada proteinkináz a fosfatáz eukaryotního typu jak u eubakterií tak archebakterií (159).

Z porovnání homologních sekvencí Ser/Thr proteinkináz eukaryotního typu (STPK) bylo zjištěno, že bakterie kódující geny pro tyto proteinkinázy kódují i příslušné fosfatázy. U velkého počtu těchto kináz i fosfatáz byla zachována většina typických konzervovaných zbytků jejich eukaryotních protějšků. U STPK bylo více změn zaznamenáno pouze v subdoméně I nukleotid-vazebné domény, ale jejich vlivem nedochází k porušení katalytické funkce. Největší odchylky byly nalezeny u archebakterií a to zvláště v C-koncové oblasti katalytické domény, v subdoménách IX a X (159).

Významné množství bakteriálních STPK obsahuje transmembránové segmenty, které se jen zřídka vyskytují u eukaryotních proteinkináz. Tyto kinázy zřejmě fungují jako receptorové kinázy a předpokládá se, že interagují s extracelulárními ligandy (89). Funkci receptorové kinázy má například proteinkináza PknB *Mycobacterium tuberculosis* a zřejmě také proteinkináza PpkA *Pseudomonas aeruginosa*. U těchto dvou enzymů byl prokázán i mechanizmus aktivace, kdy po vazbě malé molekuly následuje dimerizace a autofosforylace kinázové domény (72,104).

Nedávná analýza 626 bakteriální genomů odhalila přítomnost STPK u téměř dvou třetin sekvenovaných kmenů, s největším počtem těchto enzymů u mnohobuněčných zástupců skupin Proteobacteria (Myxococcales), Actinobacteria, Cyanobacteria, Chloroflexi, Acidobacteria a Planctomycetes (*Myxococcus xanthus* - 99 STPK, myxobakterie *Sorangium cellulosum* So ce56 – 317 STPK). Velký počet STPK u těchto bakterií zřejmě souvisí se složitou regulací jejich buněčných cyklů s různými vývojovými stádii (134).

2.1.2.4 Fosfoproteinfosfatázy

Nezbytnými složkami fosforylačních systémů jsou fosfoproteinfosfatázy, které působí proti akci proteinkináz. Defosforylace je nezbytnou součástí přenosu signálů v buňce.

Fosfohistidinové a fosfoaspartátové zbytky jsou relativně rychle spontánně hydrolyzovány (161) a není proto nezbytně nutná přítomnost specifických proteinfosfatáz. Naopak, fosforylované serinové, threoninové a tyrozinové zbytky nejsou labilní a k defosforylaci je nezbytná přítomnost fosfatáz (133). S objevem proteinkináz eukaryotního typu u prokaryot byly rovněž identifikovány příslušné fosfatázy, které sdílejí sekvenční a funkční homologii s eukaryotními enzymy. Jsou zde zastoupeny všechny čtyři hlavní skupiny serin/ threonin/tyrozin specifických fosfatáz:

1. Serin/threoninové fosfatázy - skupina PPP (protein phosphatases P)
   - skupina PPM (protein phosphatases M)
2. Tyrosinové fosfatázy - skupina PTP (protein tyrosine phosphatases)
   - skupina LMW PTP (low molecular weight PTP)

2.1.2.4.1 Skupina fosfatáz PPP

Skupina serin/threoninových fosfatáz PPP se dělí na fosfoproteinfosfatázy typu PP1 a PP2A, které jsou specificky inhibovány různými typy přírodních toxinů, a fosfoproteinfosfatázy typu PP2B. Jejich aktivita je závislá na iontech Ca^{2+} a jsou jen velmi slabě inhibovány toxiny působícími proti skupině fosfatáz PP1 a PP2A. Serin/threoninové fosfatázy skupiny PPP jsou metaloenzymy, které mají v centru katalytického místa dva dvojmocné ionty kovu. Jsou to ionty Mn^{2+} a Fe^{2+} pro fosfatázy PP1 a PP2A, nebo ionty Zn^{2+} a Fe^{2+} pro fosfatázy PP2B. Katalytická doména obsahuje konzervované motivy I, II a III. Součástí dvoujaderného metalového centra jsou také dvě molekuly vody, které udržují strukturu katalytického centra a účastní se nukleofilního ataku atomu fosforu fosfátové skupiny (7). Kromě fosfoserinu a fosfothreoninu mohou PPP fosfatázy defosforylovat také fosfohistidinové a fosfotyrozinové zbytky (6).

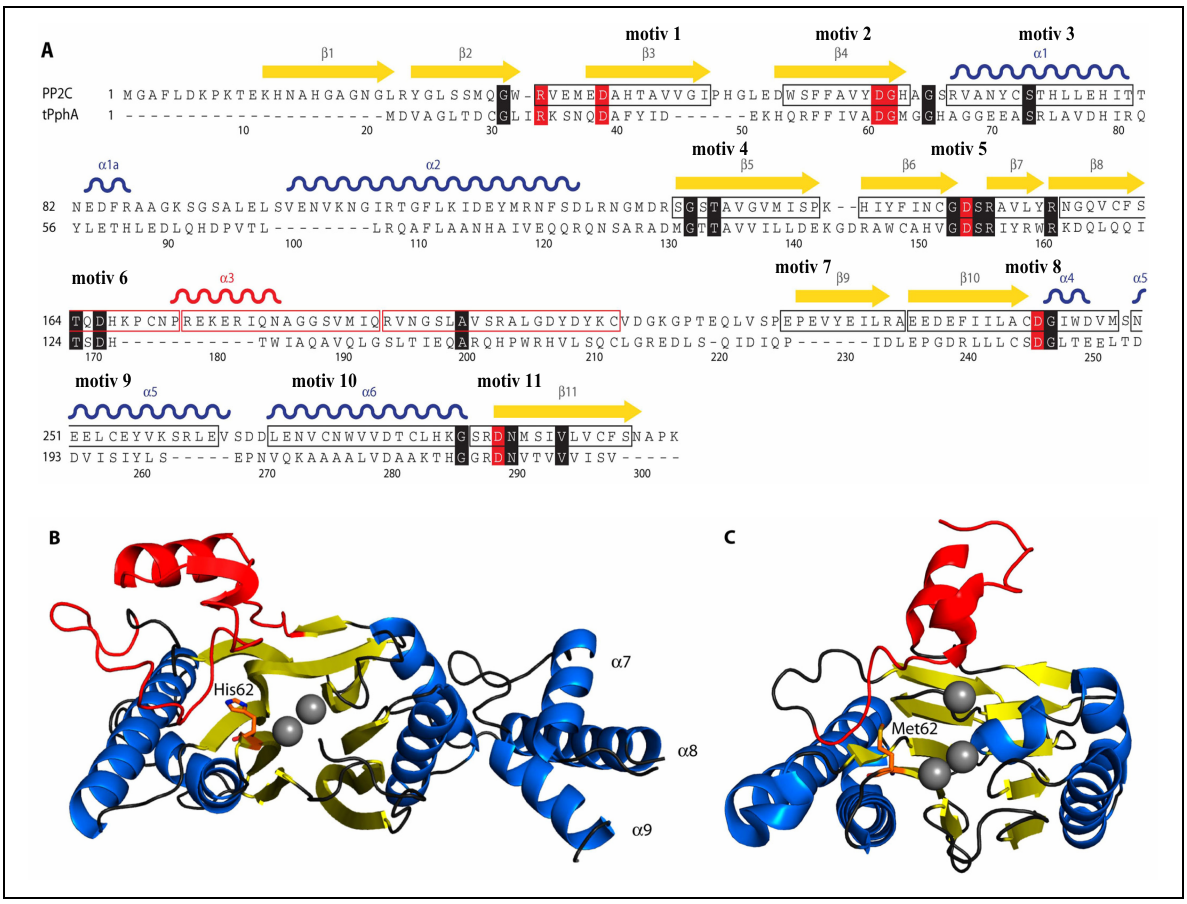
PPP fosfatázy jsou nejčetnější skupinou fosfatáz u eukaryot, u prokaryot jsou zastoupeny jak u eubakterií tak archebakterií, nicméně velmi malé množství těchto proteinů bylo charakterizováno. U *E. coli* byly objeveny PPP fosfatázy PrpA a PrpB, které

se vyznačují absolutní shodou konzervovaných zbytků s eukaryotními fosfatázami. Tyto enzymy se podílí na signalizačních dějích aktivovaných chybným složením proteinů v periplazmě a vnější membráně buňky (113). Analogy těchto fosfatáz se dále nacházejí například u *H. influenzae* (159), *B. subtilis* (76), *Microcystis aeruginosa* (158) nebo *Myxococcus xanthus* (49).

2.1.2.4.2 Skupina fosfatáz PPM

Primární sekvence fosfoproteinfosfatáz skupiny PPM se zcela liší od sekvence fosfatáz skupiny PPP, přestože konečná struktura těchto proteinů je velmi podobná (7). Eukaryotní fosfatázy PPM se skládají z katalytické fosfatázové N-koncové domény a C-koncové domény tvořené helixy. N-koncová doména obsahuje katalytické místo tvořené u eukaryot dvěma ionty kovu, nejčastěji Mn^{2+} nebo Mg^{2+}, a šesti molekulami vody. Molekuly vody zde mají stejnou funkci jako u fosfatáz skupiny PPP. Katalytická doména PPM fosfatáz obsahuje 11 konzervovaných motivů s osmi absolutně konzervovanými aminokyselinovými zbytky. Jsou to aspartáty motivů 1 a 2, threonin motivu 4, glyciny motivů 5 a 6, AspGly sekvence motivu 8 a aspartát motivu 11 (159) (obr. 2.1.5 A). Katalytická doména PPM fosfatáz u prokaryot je strukturálně téměř identická s lidskou fosfatázou PP2C, která je typickým zástupcem těchto fosfatáz. Existují tři klíčové rozdíly: 1) bakteriální enzymy obsahují tři ionty kovu v katalytickém místě, 2) v katalytickém místě chybí histidin motivu 2, který se u PP2C jako kyselina účastní štěpení vazby mezi fosforem a kyslíkem, 3) nejvýraznější rozdíl ve struktuře obou skupin je v takzvané „flap“ doméně, která je u prokaryot posunuta dále od aktivního místa. Tato doména slouží jako mobilní element, který může usnadňovat vazbu substrátu a jeho přeměnu (133,160) (obr. 2.1.5 B, C).

Bakteriální PPM fosfatázy se dělí do dvou skupin na základě přítomnosti motivů 5a, 5b. Mezi fosfatázy s chybějícími motivy 5a a 5b patří fosfatázy RsbU, RsbX a SpoIIE *B. subtilis*, které defosforylují proteinové substráty na fosfoserinu po stimulaci dvojmocným kationtem kovu (3). RsbU a RsbX se podílejí se na regulaci aktivity transkripčních faktorů v odpovědi na energetický stres (24), SpoIIE je sporulačně specifická fosfatáza (38).



Obr. 2.1.5: Struktura Ser/Thr fosfatáz. A) Primární sekvence katalytických domén lidské fosfatázy PP2C a fosfatázy PphA *Thermosynechococcus elongatus.* Konzervované aminokyseliny jsou znázorněny tučně. Červeně jsou znázorněny aminokyseliny účastnící se vazby iontu kovu. Konzervované motivy 1 až 11 jsou zvýrazněny v boxech. **B) Trojrozměrná struktura lidské PP2C.** β-listy jsou znázorněny žlutě, α-šroubovice modře, nepravidelná smyčka (flap doména) červeně. 2 hořečnaté ionty jsou zakresleny šedě, His 62 fungující jako hlavní kyselina je oranžově. C-koncová doména α7 - α9 je charakteristická pro lidskou PP2C a u prokaryotních enzymů chybí. **C) Trojrozměrná struktura PphA *Thermosynechococcus elongatus*.** Tři hořečnaté ionty jsou znázorněny šedě, Met 62 je na místě His62. Převzato z Pereira *et al.*, 2011 (133).

Do druhé skupiny patří například fosfatáza PhpP *Streptococcus pneumoniae*, která jako svůj substrát defosforyluje autofosforylovanou vazebnou proteinkinázu StkP (127), která se účastní regulace buněčného dělení (126). Dalším příkladem může být fosfatáza PprC *B. subtilis*, která defosforyluje řadu proteinů regulujících translaci (2).

2.1.2.4.3 Skupina fosfatáz PTP a LMW PTP

PTP skupina zahrnuje jak tyrozin specifické fosfatázy, tak i fosfatázy s duální specifitou, které defosforylují všechny tři typy hydroxylových aminokyselinových zbytků. Fosfatázy LMW PTP jsou nízkomolekulární tyrozinové fosfatázy nepříbuzné fosfatázám

PTP, během evoluce se však u nich vyvinul stejný katalytický mechanizmus i geometrie aktivního místa.

Obě skupiny jsou zastoupeny u prokaryot, patří sem bifunkční fosfatáza IphP *Nostoc commune* (138) či fosfatázy skupiny PTP YopH *Yersinia pseudotuberculosis* a SptP *Salmonella typhimurium*. YopH a SptP jsou patogenním mikroorganizmem exportovány do cílových buněk makroorganizmu a v hostiteli působí potlačení jeho signalizační sítě. Fosfatázová aktivita těchto enzymů je nezbytná pro virulenci těchto patogenů (73,176). YopH je kódována extrachromozomálně, SptP a IphP chromozomálně.

Ze skupiny fosfatáz LMW PTP byly nejdříve charakterizovány fosfatáza PtpA *Streptomyces coelicolor* a fosfatáza Ptp *Acinetobacter johnsonii*, které hydrolyzují fosfotyrozinové zbytky proteinového substrátu (57,102). U proteobakterií jsou fosfatázy LMW PTP obvykle kódovány geny sousedícími s geny pro BY-kinázy (viz kapitola 2.1.2.3.1 - Bakteriální ATP-dependentní serin/threoninové a tyrosinové proteinkinázy). Účinně defosforylují tyto autokinázy a regulují tak jejich biologickou funkci (57). Naproti tomu u skupiny Firmicutes jsou LMW PTP fosfatázy kódovány náhodně v genomu a nedefosforylují BY-kinázy těchto bakterií. Tuto funkci zastává nově identifikovaný typ fosfotyrozinových fosfatáz z rodiny PHP (histidinol phosphate phosphoesterases), které byly zatím nalezeny pouze u skupiny Firmicutes. PHP fosfatázy jsou zde opět kódovány geny sousedícími s BY-kinázami (56).

2.1.2.5 Ser/Thr/Tyr proteinkinázy a fosfatázy eukaryotního typu *P. aeruginosa*

Na základě sekvenční homologie byly u *P. aeruginosa* nalezeny dvě klasické serin/threoninové proteinkinázy a jejich příslušné fosfoproteinfosfatázy. Gen PA1782 kóduje další protein tvořený N-koncovou fosfatázovou doménou (typ PPM) a C-koncovou proteinkinázovou doménou (Lněnička P., nepublikované výsledky).

2.1.2.5.1 Ser/Thr proteinkináza Stk1 a fosfatáza Stp1

Stk1 je serin/threoninová proteinkináza o molekulové hmotnosti 39 kDa a délce 329 aminokyselin. Stk1 se autofosforyluje přednostně na threoninovém zbytku, méně pak na zbytku serinovém. Autofosforylace se účastní, stejně jako u ostatních Ser/Thr proteinkináz,

konzervovaný lyzinový zbytek subdomény II uvnitř katalytické domény. Stk1 je kromě jiného schopna fosforylovat histon H1 (122).

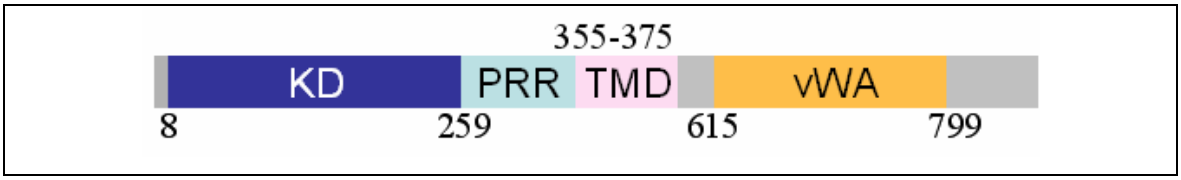
Gen *stk1* sdílí na svém počátku čtyřnukleotidový přesah s koncem genu *stp1*, který kóduje Ser/Thr fosfatázu Stp1. Tato fosfatáza o molekulové hmotnosti 27 kDa patří do skupiny PPM fosfatáz a její aktivita je závislá na přítomnosti iontů Mn^{2+}, inhibována je NaF nebo EDTA ve vyšších koncentracích (122).

Geny *stp1* a *stk1* jsou součástí lokusu kódujícího sekreční systém typu VI nazvaný H2-T6SS (dříve HSI-II) (97) (viz kapitola 2.2.3.5 - Sekreční systém typu VI).

2.1.2.5.2 Ser/Thr proteinkináza PpkA a fosfatáza PppA

PpkA je Ser/Thr proteinkináza sestávající z 1032 aminokyselin (110 kDa). N-koncová část proteinu je tvořena katalytickou kinázovou doménou, která je s C-koncovou částí spojena oblastí bohatou na prolin a transmembránovou doménou. C-koncová doména lokalizovaná v periplazmě sdílí homologii s doménami von Willebrand faktor typ A (vWA) (obr. 2.1.6). Tento typ domén je znám hlavně u eukaryot, kde se účastní vazby glykoproteinů a receptorů růstových faktorů (185). Doména vWA proteinkinázy PpkA zřejmě funguje jako receptorová doména pro zatím neidentifikovanou signální molekulu, po jejímž navázání dojde k dimerizaci kinázové domény, její autofosforylaci a tím aktivaci signální dráhy. Oblast bohatá na prolin může hrát roli ve vazbě proteinů jako jsou substráty, regulátory nebo kofaktory (187).

S genem pro proteinkinázu PpkA sousedí gen kódující fosfatázu PppA. PppA fosfatáza je protein o molekulové hmotnosti 26 kDa a na základě sekvenční homologie je řazen do skupiny fosfatáz PPM. Biochemická charakterizace proteinu potvrdila toto zařazení (172).



Obr. 2.1.6: Schematické znázornění jednotlivých domén Ser/Thr proteinkinázy PpkA. N-koncová cytoplazmatická kinázová doména (KD) je s periplazmatickou C-koncovou doménou von Willebrand faktor typ A (vWA) spojena doménou bohatou na prolin (PPP) a transmembránovou doménou (TMD).

Geny *pppA*, *ppkA* jsou součástí lokusu kódujícího složky sekrečního systém typu VI nazvaného H1-T6SS (dříve HSI-I) a oba proteiny jsou nezbytné pro regulaci sekrece tímto systém (120) (viz kapitola 2.2.3.5 - Sekreční systém typu VI).

2.1.2.5.3 Ser/Thr proteinkináza/fosfatáza kódovaná genem PA1782

Na základě sekvenční homologie s katalytickou doménou eukaryotních proteinkináz byl identifikován gen PA1782. Kromě C-koncové proteinkinázové domény protein obsahuje i N-koncovou fosfatázovou doménu, která odpovídá Ser/Thr fosfatázám skupiny PPM. Gen se nachází v predikovaném operonu s genem pro nitrátový transporter a sousedí s dalšími geny pro příjem a metabolismus dusíkatých látek. Analýza promotorové sekvence predikovaného operonu programem PromScan (http://molbiol-tools.ca/promscan/) odhalila přítomnost konsensus sekvence pro vazbu alternativního sigma faktoru σ^{54} (Lněnička P., nepublikované výsledky). Tento alternativní sigma faktor kontroluje expresi genů souvisejících s metabolismem dusíku, s odpovědí na různé typy stresů a podmínek limitujících růst (22,43). Je tedy možné, že funkce kinázy/fosfatázy souvisí s regulací metabolismu dusíku.

2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

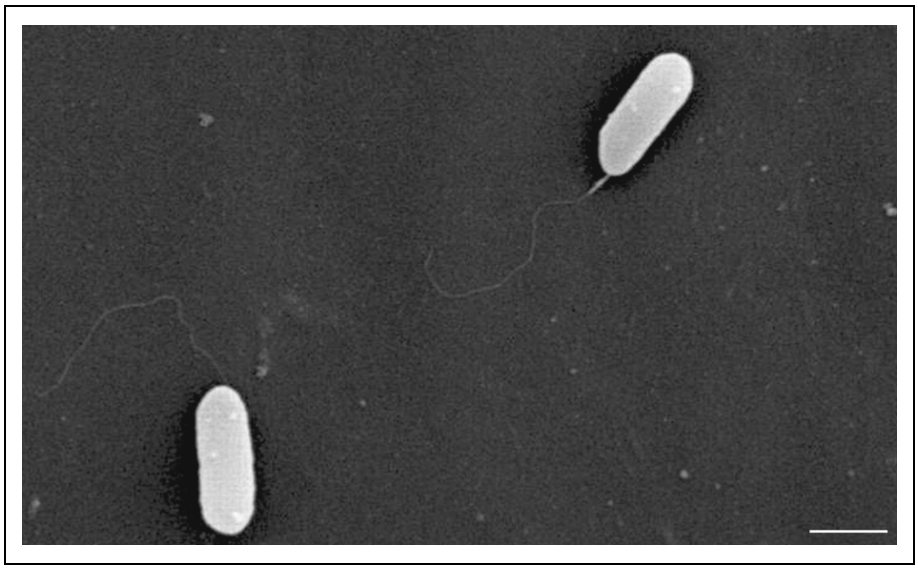
2.2.1 Obecná charakteristika

Pseudomonas aeruginosa je gramnegativní aerobní tyčinka patřící do kmene Proteobacteria, třídy Gammaproteobacteria, řád Pseudomonadales, čeleď Pseudomonadaceae.

P. aeruginosa se vyskytuje jako volně žijící planktonická jednobuněčná forma nebo vytváří mnohobuněčný biofilm přisedlý na různých površích či substrátech. Volně žijící bakterie se pohybuje pomocí jednoho polárního bičíku. *P. aeruginosa* patří mezi chemoorganotrofní bakterie a je schopna využívat velké množství organických látek pro svůj růst a množit se v rozmezí teplot 10ºC - 42°C.

P. aeruginosa byla izolována z odpadních vod, z půdy, ze stolice domácích zvířat i lidí, působí také jako rostlinný patogen. *P. aeruginosa* je podmíněný lidský patogen, který je velmi častou příčinou nosokomiálních nákaz. U hostitelů s oslabeným imunitním

systémem kolonizuje sliznice převážně respiračního traktu a močových cest. Vyskytuje se zvláště na jednotkách intenzivní péče, resuscitačních odděleních, novorozeneckých odděleních, často se také objevuje u pacientů s rozsáhlými popáleninami, množí se například i v roztocích na uchovávání kontaktních čoček (9). Je častým původcem chronického zánětu středního ucha (21). Infekce dýchacích cest *P. aeruginosa* je zvláště obávanou komplikací u pacientů trpících cystickou fibrosou (CF).



Obr. 2.2.1: Elektronmikroskopický snímek *P. aeruginosa*. Měřítko udává velikost 1 μm. Převzato z Tsang *et al.*, 2003 (171).

2.2.2 Virulenční faktory

P. aeruginosa disponuje řadou produktů, které se uplatňují v patogenezi. Jsou to jednak faktory vázané na buňku - stěnový lipopolysacharid, exopolysacharid alginát obalující bakterie rostoucí v biofilmu, pilí a bičíky. Tvorba biofilmu je typická pro chronické infekce. Produkty uvolňovanými bakterií do svého okolí či přímo do buněk hostitele jsou enzymy, toxiny a pigmenty. Tyto faktory se účastní akutní fáze infekce.

Stěnový lipopolysacharid (LPS), neboli endotoxin, je klíčovým virulenčním faktorem *P. aeruginosa*. Je nezbytný pro plnou virulenci v akutní fázi infekce, interaguje s imunitním systémem hostitele (komplement) a je také příčinou septického šoku vyvolávaného u hostitele (136). Septický šok je obávanou komplikací infekcí způsobených gramnegativními bakteriemi.

Alginát je exopolysacharid, který funguje jako adhezin usnadňující kolonizaci a invazi do cílových tkání a chrání bakterii před obrannými mechanismy hostitele, jako je opsonizace, účinky komplementu nebo fagocytóza. Bakterie žijící v biofilmu obaleném alginátem prokazují také vlivem alginátu zvýšenou odolnost vůči antibiotikům a dezinfekčním prostředkům (54,68).

Pilí jsou hlavními strukturami zodpovědnými za adherenci, jsou nezbytné pro speciální pohyb po vlhkých površích zvaný twitching (škubání, mrskání) a pro vznik biofilmu (110). **Bičíky**, které primárně slouží k pohybu, fungují také jako adheziny s afinitou k epiteliálním buňkám (84).

Ve formě **biofilmu** je *P. aeruginosa* izolována ze sputa pacientů trpících CF, u kterých je jedním z nejčastějších původců chronických plicních infekcí. Biofilm je bakteriální komunita přisedlá k podkladu obalená vrstvou exopolysacharidové matrix, kterou si sama vytváří. Vývoj maturovaného biofilmu probíhá v několika krocích. Po přisednutí na podklad se buňky množí a vytvářejí na tomto povrchu vrstvu. Jednotlivé bakterie pak pomocí pilí typu IV vykazují speciální pohyb twitching, jehož výsledkem je vznik mikrokolonií. Mikrokolonie poté diferencují a vzniká maturovaný biofilm. Maturace biofilmu je závislá na regulaci *quorum sensing* systémem *las*, mutanti v genu *lasI* nejsou schopni přejít ze stadia mikrokolonií do stadia maturovaného biofilmu (viz kapitola 2.2.4 - Regulace virulence mechanizmem quorum sensing). Biofilm je nakonec stabilizován vrstvou extracelulární matrix tvořené exopolysacharidem alginátem, proteiny a extracelulární DNA. Tato DNA je uvolňována z buněk po autolyzi řízené *quorum sensing* systémem PQS (viz kapitola 2.2.4), je nezbytná pro vznik biofilmu a zřejmě vyvolává zánětlivou odpověď v hostitelském organismu (184). Bakterie žijící v biofilmu jsou vysoce rezistentní k antibiotikům a dezinfekčním prostředkům.

Exotoxin A (toxA) katalyzuje, podobně jako difterický toxin, ADP-ribosylaci a tím inaktivaci elongačního faktoru 2. To vede k inhibici proteosyntézy a buněčné smrti. Exotoxin A je zodpovědný za lokální poškození tkáně a následně za bakteriální invazi (190).

Exoenzymy S, T, U a Y jsou toxiny aktivně injikované sekrečním systémem typu III přímo do hostitelských buněk. ExoS a ExoT jsou blízce příbuzné enzymy s duální aktivitou, jejichž N-koncová doména má funkci proteinu aktivujícího GTPázy (GTPase activating protein) cílenou na GTPázy Rho a C-koncová doména má ADP ribosylační aktivitu vůči dalším proteinům. ExoU má fosfolipázovou aktivitu způsobující rychlou

nekrózu mnoha typů buněk a ExoY je adenylátcykláza. Podle kombinace toxinů se kmeny dělí na cytotoxické, tzn. kódující *exoU*, *exoT*, někdy také *exoY* (např. kmen PA14) a na kmeny invazivní, kódující *exoS*, *exoT* a často *exoY* (např. kmeny PAO1, PAK) (191). Tyto kombinace toxinů představují dostatečný mechanismus pro poškození slizniční bariéry hostitele a inhibici mnoha složek přirozené imunitní odpovědi a umožňují efektivní šíření bakterie v těle hostitele.

Fosfolipáza C a **rhamnolipidy** vykazují hemolytickou aktivitu. Působí synergicky při degradaci lipidů a lecitinu, čímž umožňují invazi bakterie do tkáně. Rhamnolipidy, glykolipidy obsahující rhamnózu, působí jako biodetergent, protože ztekucují fosfolipidy v plicní tkáni a činí je tak přístupnější pro štěpení fosfolipázou C. Rhamnolipidy také inhibují mukociliární transport a funkci řasinek lidského respiračního epitelu (1). Fosfolipáza C je sekretována do mimobuněčného prostoru sekrečním systémem typu II, kromě degradace fosfolipidů se účastní interakcí s hostitelským imunitním systémem a potlačuje respirační vzplanutí neutrofilů (170).

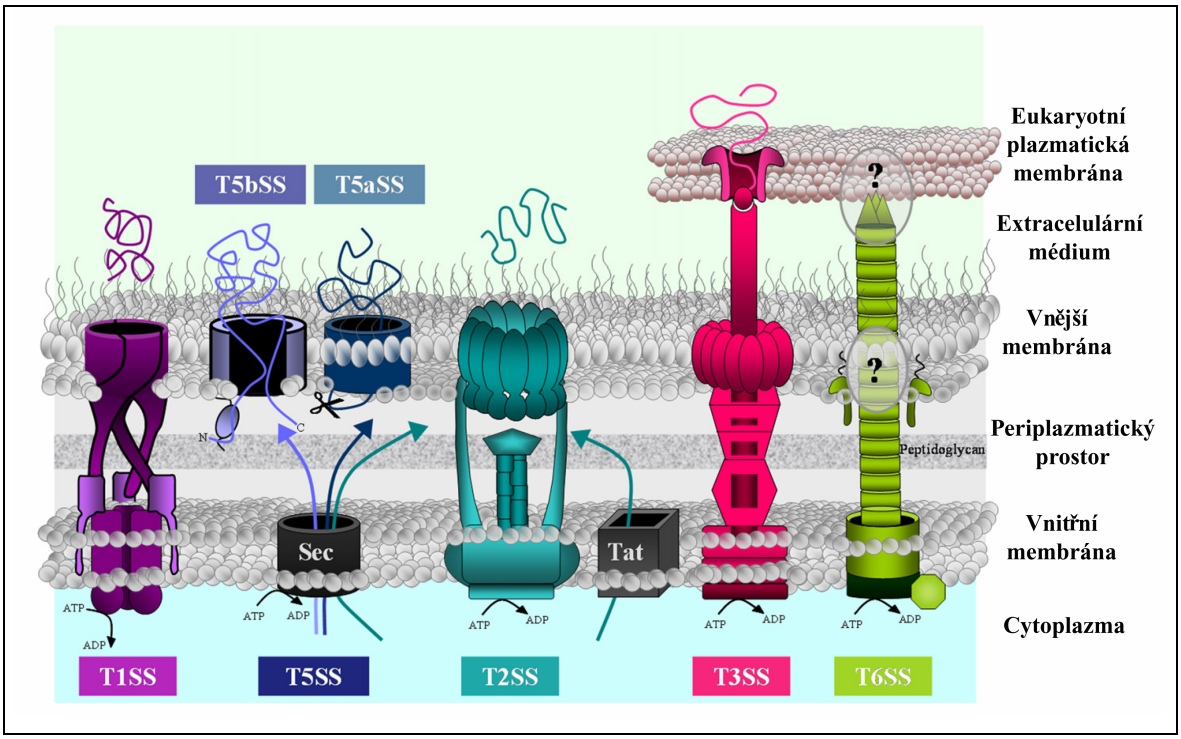
Dalšími virulenčními faktory jsou **proteázy**, které hrají hlavní roli v akutní fázi infekce. Patří sem **elastáza LasB**, **proteázy LasA** a **alkalické proteázy**. Destrukce elastinu je hlavním znakem akutní fáze infekce vyvolané *P. aeruginosa*. Elastin je hlavní složkou plicní tkáně a je zodpovědný za rozpínání a kontrakci plic. Kromě toho je důležitou součástí krevních destiček, u kterých zodpovídá za pružnost. Elastolytická aktivita ničí plicní tkáň a způsobuje plicní krvácení. Elastáza LasB je velmi účinná zinková metaloproteáza s výraznou proteolytickou aktivitou vůči elastinu a kaseinu. Elastáza LasB degraduje kromě elastinu a kaseinu i fibrin a kolagen. Může inaktivovat také lidský imunoglubulin G a A, lysozym, složky komplementu a některé inhibitory proteáz chránících plicní tkáň. Proteáza LasA je serinová proteáza působící synergicky s elastázou LasB při degradaci elastinu a usnadňuje jeho štěpení dalšími proteázami (55). Alkalická proteáza AprA štěpí fibrin a je sekretována sekrečním systémem typu I. Patogenní roli hraje při infekcích oka, ale podílí se zřejmě i na poškozování plicní tkáně (84). Degraduje složky komplementu, cytokiny a chemokiny (94).

P. aeruginosa produkuje dva základní **pigmenty**, modrozelený **pyocyanin** (metylhydrofenazin) a žlutozelený fluorescentní pigment **pyoverdin**. Pyoverdin je hojně produkován v prostředí s nízkým obsahem železa a podílí se jako siderofor na metabolismu železa. Funguje také jako signální molekula, která ovlivňuje nejen svoji vlastní produkci, ale i produkci exotoxinu A a endoproteasy PrpL (91). **Pyocyanin** má výrazný antibiotický

účinek proti grampozitivním i některým gramnegativním bakteriím a toxicky působí také na savčí buňky. V přítomnosti oxidovatelného substrátu je bakterií redukován na bezbarvý leukopyocyanin. Neenzymaticky může být redukován prostřednictvím NADH. Takto redukovaný pigment může dále redukovat O_2 nebo Fe^{3+}. Toxický účinek pyocyaninu spočívá právě v generování reaktivních kyslíkových meziproduktů: superoxidu a peroxidu (62). Pyocyanin se uplatňuje také jako inhibitor mitochondriálních enzymů, zpomaluje pohyb řasinek což vede k nedostatečnému očišťování a poškození plicního epitelu (93).

2.2.3 Sekreční systémy *P. aeruginosa*

Bakterie se během infekce musejí vyrovnat s nepříznivými podmínkami v těle hostitele, kde je zásadní získat nezbytné živiny a účinně bojovat s hostitelským imunitním systém. Většina těchto procesů je vykonávána proteiny, které jsou řízeně uvolňovány bakteriemi. Tyto proteiny mohou zůstávat vázané na bakteriální povrch, mohou být sekretovány do extracelulárního prostředí nebo přímo injikované do cytosolu hostitelských buněk. Sekrece proteinů probíhá pomocí několika typů sekrečních systémů, u *P. aeruginosa* se jedná o sekreční systémy typu I, II, III, V a VI (obr. 2.2.2). Exoproteiny sekretované systémy II a V jsou nejprve přeneseny drahou Sec nebo Tat do periplazmatického prostoru a až následně příslušným sekrečním systémem sekretovány z buňky. Proteiny jsou k drahám Sec a Tat naváděny štěpitelnou N-koncovou signální sekvencí. Sekreční dráhou Sec jsou přenášeny nesbalené proteiny zatímco dráhou Tat již sbalené (177).



Obr. 2.2.2:Schématické znázornění jednotlivých typů sekrečních systémů identifikovaných u *P. aeruginosa* PAO1. Transport proteinů přes bakteriální buněčnou stěnu se dělí na Sec nezávislé a Sec/Tat závislé dráhy. Proteiny sekretované sekrečním systémem typu II (T2SS) a typu V (T5SS) jsou nejprve transportovány do periplazmy pomocí Sac nebo Tat systému a teprve poté sekretovány ven z buňky pomocí příslušného sekrečního systému. Exoproteiny sekretované sekrečnímy systémy typu I (T1SS), typu III (T3SS) a typu VI (T6SS) jsou sekretovány svým příslušným systémem přímo z cytoplazmy. Převzato z Bleves *et al.*, 2010 (14).

2.2.3.1 Sekreční systém typu I

Sekreční systém typu I (SST1) je jedním z nejjednodušších sekrečních systémů, skládá se z proteinu ve vnější membráně, ABC (ATP-binding cassette) transportéru ve vnitřní membráně, který dodává energii k transportu, a adaptorového proteinu spojujícího obě složky. Substráty SST1 jsou k sekrečnímu aparátu směrovány neštěpitelným C-koncovým sekrečním signálem. Proteiny jsou transportovány v nesbaleném stavu a při interakci signální sekvence s nukleotid vazebnou doménou ABC transportéru dochází ke konformační změně umožňující štěpení ATP a transport substrátu přes kanál ve vnější membráně (70).

Příkladem sekretovaného proteinu je alkalická proteáza AprA (viz kapitola 2.2.2 - Virulenční faktory). Další SST1 se účastní příjmu železa, sekretovaný protein HasAp vyvazuje hem z hemoglobinu (179).

2.2.3.2 Sekreční systém typu II

Sekreční systém typu II (SST2) umožňuje transport velkých multimerních proteinů, které jsou již v periplazmě ve sbaleném stavu, přes vnější membránu. SST2 se skládá z 11-16 proteinů a sdílí homologii se systémem skládajícím pilí typu IV. Je tvořen bazální komplexem ve vnitřní membráně, který obsahuje ATPázu, dále velkým kanálem ve vnější membráně, a třetí složkou, kterou je pseudopilus tvořený majoritním pseudopilinem a ukončený minoritním pseudopilinem. Pseudopilus, jehož sestavení je řízeno ATPázou z bazálního komplexu, funguje zřejmě jako píst, který vytlačuje exoproteiny skrz sekreční kanál ven z buňky (37). Proteiny sekretované SST2 jsou do periplazmy exportovány sekreční dráhou Sec nebo Tat.

Sekrečním systémem Xcp je sekretována řada exoproteinů různých aktivit. Patří sem proteolytické enzymy jako je elastáza LasB, proteáza LasA, aminopeptidáza PaAP nebo proteáza PrpL. Dále je SST2 sekretována řada lipáz včetně fosfolipázy C, alkalické fosfatázy PhoA a LapA a chitin vazebný protein CbpD, který funguje jako adhezin (14). Exotoxin A je jediný nitrobuněčný toxin sekretovaný tímto systémem do extracelulárního prostoru, odkud se samostatně transportuje do buněk hostitele, kde provádí ADP-ribosylaci elongačního faktoru 2 (viz kapitola 2.2.2 - Virulenční faktory).

Druhý identifikovaný SST2 Hxc je funkční pouze za podmínek limitace fosfátem.

2.2.3.3 Sekreční systém typu III

Sekreční systém typu III (SST3) umožňuje injikovat sekretované toxiny přímo do cytoplazmy hostitelských buněk. SST3 je strukturou složek příbuzný se systémem skládajícím bičík (obr. 2.2.2 – T3SS). Exoproteiny jsou k sekrečnímu aparátu naváděny neštěpitelnou N-koncovou signální sekvencí (30). Efektory SST3 jsou již výše zmiňované exoenzymy S, T, U a Y.

Geny SST3 jsou pod kontrolou transkripčního aktivátoru ExsA. Transkripce genů SST3 je aktivována při nízkých koncentracích Ca^{2+} v okolním prostředí nebo při kontaktu s hostitelskými buňkami. Za nevhodných podmínek je ExsA inhibován složitým systémem interakcí jednotlivých anti-aktivátorů (173). Kromě této přímé regulace je SST3 pod kontrolou globálního regulačního mechanizmu zahrnujícího biosyntézu cAMP (191),

dvousložkového systému Rets/LadS/Gac-Rsm (viz kapitola 2.2.5 - Regulace virulence dvousložkovými systémy GacA/GacS, RetS a LadS) (174) a řady stresových faktorů (192).

2.2.3.4 Sekreční systém typu V

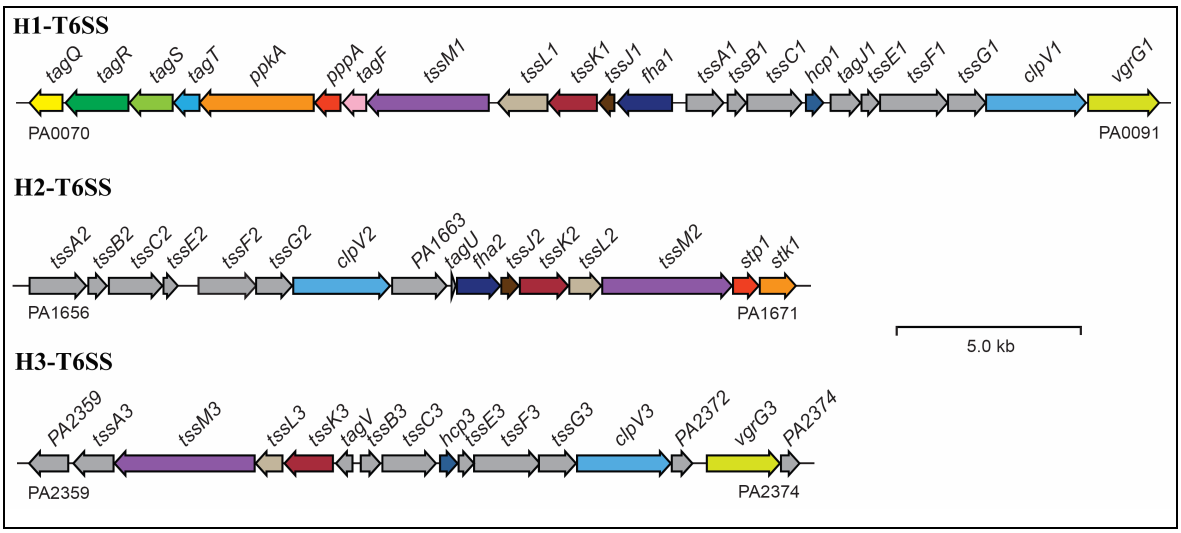
Sekreční systém typu V (SST5) je velmi jednoduchý sekreční systém umožňující sekreci velkých proteinů spojených s adhezí a virulencí přes bakteriální membránu. Sekrece je dvoukroková, proteiny jsou přes vnitřní membránu přenášeny drahou Sec a dále specifickým kanálem přes vnější membránu. Exoproteiny zůstávají vázané na buněčný povrch nebo jsou po proteolytickém štěpení uvolňovány do extracelulárního prostředí.

Existují dva typy SST5, jedním jsou autotransportéry, obsahující signální peptid na N konci následovaný doménou s katalytickou funkcí proteinu a C-koncovou doménou, která po zanoření do vnější membrány plní funkci póru. Signální peptid je po přenosu přes vnitřní membránu odštěpen a C-koncová doména po zanoření do vnější membrány přenese katalytickou doménu na povrch buňky. Katalytická doména může být následně odštěpena do extracelulárního média (32). Druhý typ se liší tím, že katalytická doména a doména tvořící pór jsou samostatné proteiny.

2.2.3.5 Sekreční systém typu VI

Sekreční systém typu VI (SST6) byl objeven v nedávné době a je široce rozšířen u gramnegativních bakterií. Protože se sekreční systém typu VI úzce dotýká tématu této dizertační práce, bude zde popsán detailněji.

Genom *P. aeruginosa* obsahuje tři lokusy kódující složky SST6, které byly nazvány H1-T6SS (Hcp secretion island 1- type 6 secretion system, dříve HSI-1), H2-T6SS (dříve HSI-II) a H3-T6SS (dříve HSI-III). Každý lokus obsahuje zhruba 15-20 genů (obr. 2.2.3). Exprese jednotlivých SST6 je regulována odlišnými způsoby.

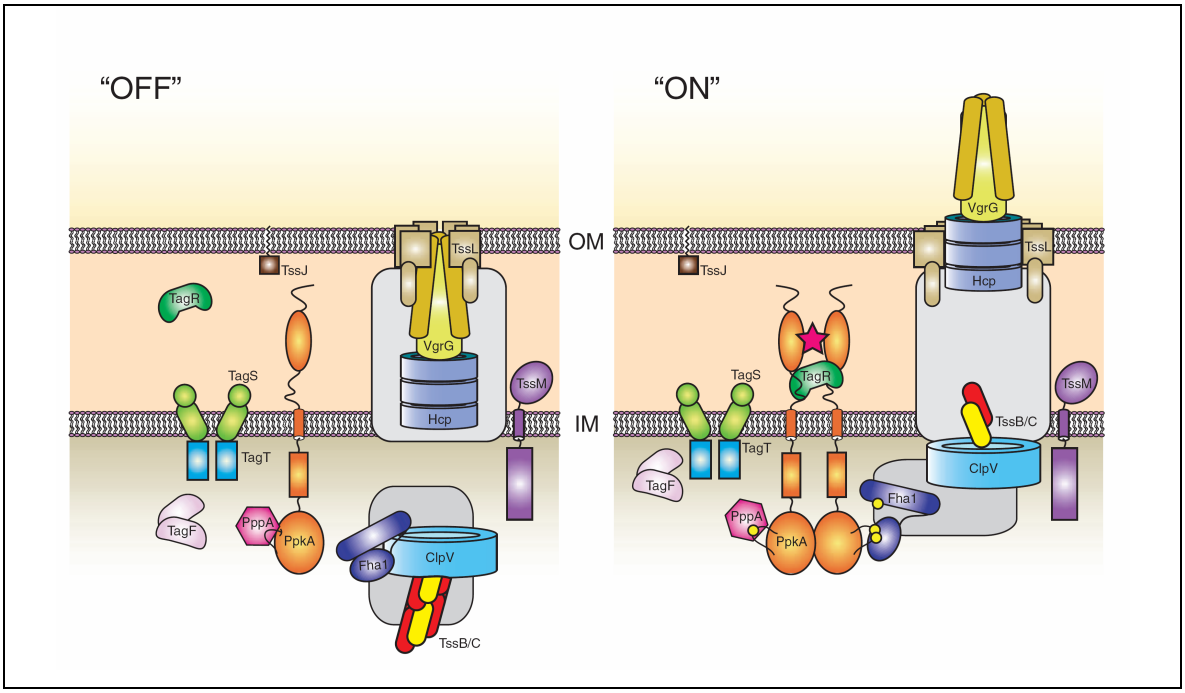


Obr. 2.2.3: Přehled genů jednotlivých sekrečních systémů typu VI *P. aeruginosa*. Nejvíce prostudován je systém H1-T6SS. Převzato z Hsu *et al.*, 2009 (72).

Prozatím byl nejvíce prostudován systém H1-T6SS. Systém H1-T6SS je kódován geny PA0070-PA0091. Celý lokus je transkripčně regulován globálními regulátory virulence RetS a LadS a postranslačně reverzibilní fosforylací proteinu Fha1 Ser/Thr kinázou PpkA a fosfatázou PppA (120). RetS a LadS jsou hybridní senzorové kinázy, které recipročně regulují produkci a sekreci virulenčních faktorů. RetS je aktivátorem produkce virulenčních faktorů nezbytných pro akutní infekci hostitele, jako jsou sekreční systém typu III (SST3) a jím sekretované toxiny, dále SST2 nebo pilí typu IV. RetS reprimuje expresi genů H1-T6SS a dalších genů, jejichž exprese je stejně jako u H1-T6SS aktivována regulátorem LadS. LadS je aktivátorem produkce virulenčních determinant nezbytných pro chronickou infekci, jako je exopolysacharid alginát obalující biofilm. LadS reprimuje expresi genů pozitivně regulovaných RetS (52).

Ser/Thr proteinkináza PpkA a fosfatáza PppA jsou spolu s proteinem Fha1 nekonzervovanými složkami SST6, které se nicméně poměrně často vyskytují v SST6 jiných bakterií (120). Předpokládá se, že periplazmatická doména kinázy PpkA má senzorovou funkci. V přítomnosti signálu dojde pravděpodobně k dimerizaci kinázové domény PpkA a následné autofosforylaci na Thr 156 nebo Thr 161 v kinázové doméně. Fosforylovaný Thr je specificky rozpoznáván proteiny obsahujícími doménu FHA. Protein Fha1 obsahuje N-koncovou doménu FHA a C-koncovou doménu bohatou na prolin, jejíž funkce je neznámá (120). Po interakci Fha1 s fosforylovanou PpkA dochází k fosforylaci Fha1 na Thr 362 mimo doménu FHA. Hladina fosforylovaného Fha1 je kritická pro aktivaci sekrece. Cytoplazmatická a transmembránová doména kinázy PpkA mají zřejmě i strukturní roli v lokalizaci jednotlivých složek SST6 v daném místě v membráně. Na

základě výsledků kolokalizačních experimentů se předpokládá, že protein Fha1 se nachází v komplexu s ATPázou ClpV1 a případně dalšími složkami H1-T6SS (obr. 2.2.4).



Obr. 2.2.4: Model organizace a aktivace sekrečního systému H1-T66S. Proteiny jsou zbarveny vzhledem k ORF na obrázku 2.2.3. V klidovém stavu ("OFF") je proteinkináza **PpkA** zřejmě udržována v defosforylovaném stavu působením fosfatázy **PppA**. Sekreční systém je aktivován ("ON") dosud neznámým **signálem**, který se pravděpodobně váže na periplazmatickou doménu kinázy **PpkA** a za účasti proteinu **TagR** dochází k dimerizaci kinázy a autofosforylaci. Po ní následuje vazba a fosforylace proteinu **Fha1**, který je zřejmě v komplexu s ATPázou **ClpV1** a dalšími proteiny SST6. Vazbou **Fha1** s **PpkA** dojde k lokalizaci **ClpV1** komplexu v místě složení SST6 a po fosforylaci **Fha1** k aktivaci **ClpV1**, která zřejmě dodává energii k přenosu sekretovaných proteinů **Hcp1** a **VgrG1**. Proteiny Hcp1 a VgrG1 sdílejí strukturně-funkční příbuznost s proteiny tvořícími ocásek bakteriofága T4, který penetruje membránu hostitelských buněk a jsou jím přeneseny virové proteiny a nukleové kyseliny. Protein TssM (dříve IcmF1) je nezbytný pro účinné skládání systému. Proteiny TssB/C, TagF, TagS, TagT a TssJ jsou umístěny na základě podobnosti s různými systémy. Místa fosforylace jsou znázorněna žlutými kolečky, hvězdička znázorňuje předpokládaný signál, který iniciuje aktivaci sekrečního systému. Převzato z Hsu *et al.*, 2009 (72).

Fosforylace proteinu Fha1 kinázou PpkA vázanou v membráně navede pravděpodobně tento komplex do kontaktu s membránově vázanými a periplazmatickými složkami H1-T6SS (72). Fosfatáza PppA se na regulaci sekrece podílí defosforylací fosforylovaného Fha1 a zřejmě i defosforylací kinázové domény PpkA (72,120). ATPáza ClpV1 patří do rodiny AAA+ ATPáz, které se pravděpodobně podílí na translokaci substrátů u mnoha bakteriálních sekrečních systémů. Její aktivita je nezbytná pro sekreci proteinu Hcp1 z periplazmatického do extracelulárního prostoru. Přítomnost Hcp1 je absolutně nezbytná pro skládání H1-T6SS.

Sekrečním systémem H1-T6SS jsou sekretovány tři typy proteinů, Hcp1, VgrG a Tse1-3. Hcp1 je malý protein tvořící hexamery, jehož funkcí je pravděpodobně tvorba

nanotubulů na bakteriálním povrchu. Těmito nanotubuly jsou pak zřejmě transportovány efektorové proteiny H1-T6SS (5). VgrG proteiny jsou tvořeny dvěma doménami příbuznými proteinům tvořící ocásek bakteriofágů (95). Proteiny VgrG zřejmě tvoří trimerní komplexy, které by mohly fungovat stejně jako bakteriofágové zařízení na penetraci membrán a mohly by umožňovat průchod proteinů nebo makromolekulárních komplexů. Proteiny VgrG specificky sekretované H1-T6SS jsou Vgr1a a VgrG1c. Sekrece obou závisí stejně jako u proteinu Hcp1 na aktivitě ATPázy ClpV1. Alespoň jeden z proteinů VgrG musí být přítomen, aby docházelo k sekreci Hcp1 (60). Aktivita ClpV1 a přítomnost proteinů Hcp1 a VgrG1 je nezbytná pro sekreci proteinů Tse1-3 (60,71). Protein Tse2 byl identifikován jako toxin, který je součástí toxin-imunitního systému. Tento systém je tvořen toxinem Tse2 a proteinem Tsi2, který chrání buňku před účinkem toxinu. Bylo zjištěno, že toxin Tse2 je sekrečním systémem H1-T6SS transportován specificky do bakteriálních buněk, u kterých způsobuje výrazné zpomalení růstu. K přenosu Tse2 je nezbytný těsný kontakt donorové a recipientní buňky, protože k přenosu dochází pouze na pevném médiu. Na eukaryotní buňky měl Tse2 vliv pouze pokud byl exprimován uvnitř těchto buněk, k přenosu Tse2 do eukaryotních buněk však pravděpodobně nedochází (71).

Lokus sekrečního systému H2-T6SS také obsahuje geny pro Ser/Thr proteinkinázu Stk1, fosfatázu Stp1 a gen PA1665, který kóduje protein obsahující doménu FHA nazvaný Fha2. Tento sekreční systém je pozitivně regulován *quorum sensing* regulátory LasR a PqsR (MvfR). PqsE, klíčová složka regulonu PqsR, je nezbytný pro expresi sekrečního systému H3-T6SS. H2 a H3 hrají důležitou roli v patogenezi ve zvířecích a rostlinných modelech (97).

2.2.4 Regulace virulence mechanizmem *quorum sensing*

P. aeruginosa kontroluje produkci mnoha svých virulenčních faktorů mechanizmem, který monitoruje buněčnou hustotu a umožňuje komunikaci mezi bakteriemi. Tento mechanizmus se nazývá *quorum sensing* (QS) a byl popsán u mnoha gramnegativních i grampozitivních bakterií.

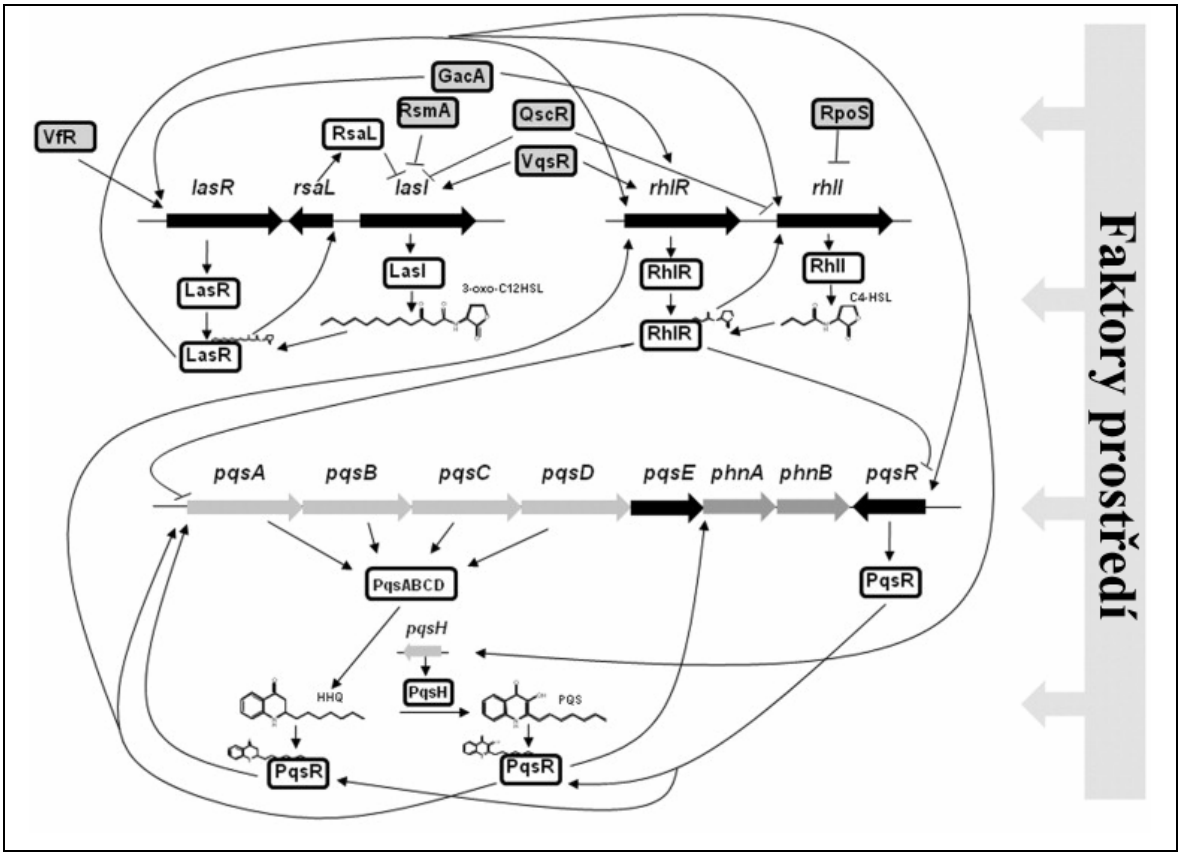
Mezibuněčná komunikace probíhá prostřednictvím malých signálních molekul zvaných autoinduktory, s jejichž pomocí může bakterie regulovat buněčné procesy vzhledem k hustotě celé populace (33). U gramnegativních bakterií je autoinduktorem

malá molekula neproteinové povahy, která většinou volně difunduje přes membránu buňky. Celý mechanizmus QS spočívá v tom, že jednotlivé bakterie uvolňují do prostředí pouze malé množství autoinduktoru, které nemůže být buňkou detekováno. V okamžiku kdy bakteriální populace dosáhne dostatečné hustoty, dosáhne i množství autoinduktoru své prahové hodnoty, naváže se na transkripční regulátor, což vede k aktivaci či represi exprese cílových genů. Bakterie je tak schopna vnímat kritické množství biomasy (8).

U *P. aeruginosa* je QS zprostředkován dvěma chemicky rozdílnými typy signálních molekul, N-acylhomoserinlaktony (153) a 4-chinolony (36). N-acylhomoserinlaktony jsou autoinduktory dvou QS systémů typu Lux, *las* a *rhl*, které jsou hierarchicky organizované a regulují přibližně 10% genů *P. aeruginosa* (153). Nadřazeným systémem je systém *las*, jehož součástí je syntáza LasI, která konstitutivně produkuje autoinduktor 3-oxo-C12-homoserinlakton (HSL). S rostoucí hustotou bakteriální populace je dosaženo kritického množství autoinduktoru. Transkripční regulátor LasR obsahuje C-koncovou DNA vazebnou doménu a N-koncovou acyl-HSL vazebnou doménu, na kterou se váže acyl-HSL po dosažení prahové koncentrace. Komplex LasR s navázaným 3-oxo-C12-HSL reguluje po vazbě na DNA expresi řady genů (186), včetně genu pro syntázu LasI, čímž vzniká pozitivní autoregulační smyčka. Hladina 3-oxo-C12-HSL je udržována relativně konstantní působením represoru RsaL, který se váže na obousměrný promotor genů *lasI* a *rsaL*, čímž blokuje transkripci obou genů. Represor RsaL také reprimuje některé geny pod kontrolou QS systému *las*, čímž se podílí na regulaci genů QS regulonu jak přímo tak nepřímo (144). Systém *las* reguluje expresi mnoha virulenčních faktorů, mezi které patří například proteáza LasA a elastáza LasB, exotoxin A, alkalická proteáza AprA, geny *xcpP* a *xcpR* kódující proteiny sekreční dráhy typu II.

Pod kontrolou LasR/3-oxo-C12-HSL jsou i geny druhého QS systému *rhl*, *rhlR* a *rhlI*. Syntáza RhlI produkuje C4-HSL. Komplex RhlR/C4-HSL reguluje expresi operonu *rhlAB* řídícího syntézu rhamnolipidů fungujících jako hemolyzíny. Rhamnolipidy jsou nezbytné také pro speciální typ pohybu bakterií po vlhkých površích zvaný swarming. Produkce rhamnolipidů je nezbytná i pro tvorbu biofilmu (165). Systém *rhl* je dále nezbytný pro plnou aktivaci elastáz, alkalické proteázy, hydrogencyanidu a pyocyaninu. Stejně jako LasR, také RhlR pozitivně reguluje expresi *rhlI* a tím i množství C4-HSL. Pod kontrolou systému *rhl* je také gen *rpoS* kódující sigma faktor RpoS, který reguluje expresi mnoha transkripčních faktorů řídících odpověď na stresové podmínky ve stacionární fázi

růstu buňky. Exprese řady genů je do různé míry regulována jak QS systémy tak RpoS (154).



Obr. 2.2.5: Schématické znázornění regulační sítě QS systémů *P. aeruginosa*. QS reguluje řadu virulenčních faktorů, sekundárních metabolitů, pohyb swarming a vývoj biofilmu. Regulátor **LasR**, který je regulován globálními regulátory **Vfr** a **GacA**, aktivuje expresi ***lasI*** a tím produkci **3-oxo-C12-HSL**. Negativní regulátor **RsaL** působí proti akci komplexu **LasR/3-oxo-C12-HSL** a tím udržuje optimální hladinu autoinduktoru **3-oxo-C12-HSL**. **RsaL** se také váže na promotory cílových genů QS systému ***las***. Komplex **LasR/3-oxo-C12-HSL** pozitivně kontroluje expresi mnoha genů včetně QS systému ***rhl*** a systému **PQS**. Systém **PQS** je systémy HSL regulován na úrovni ***pqsR*** a ***pqsH***, které kódují regulátor **PqsR** a monooxygenázu **PqsH**. **PqsR** využívá signální molekuly **PQS** a **HHQ** jako koinduktory, **PQS** vzniká z **HHQ** pomocí **PqsH**. Hierarchické uspořádání systémů ***las*** a ***rhl*** je závislé na růstových podmínkách a aktivita HSL QS systémů je dále regulována globálními regulátory **QscR** a **VqsR** homologními regulátorovým proteinům QS systému *las* a *rhl*, dále riboregulátorem **RsmA** a stacionárním sigma faktorem **RpoS**. Syntéza **HHQ** je závislá na produktech genů ***pqsABCD*** a ***phnAB***, **PQS** vyžaduje navíc produkt genu ***pqsH***. **RhlR/C4-HSL** negativně reguluje ***pqsA*** a ***pqsR***. Funkce **PqsE** není zcela jasná, je nicméně nezbytný pro produkci virulenčních faktorů jako je **pyocyanin** nebo **H3-T6SS**. Šipky značí pozitivní regulaci, T-úsečky negativní regulaci. Převzato z Williams and Cámara, 2009 (186).

P. aeruginosa kóduje další dva homology transkripčních regulátorů typu LuxR, QscR a VqsR, které nejsou asociované s žádnou syntázou HSL. QscR je regulátorem řady QS genů, působí jak aktivačně, tak represivně (96). Regulátor VqsR pozitivně ovlivňuje transkripci genu *lasI* a gen *vqsR* je regulován LasR/3-oxo-C12-HSL (99).

Druhá skupina autoinduktorů QS jsou 4-chinolony. Tato skupina zahrnuje více než 50 různých sloučenin včetně nejaktivnější signální molekuly 2-heptyl-3-hydroxy-4

chinolonu nazývaného Pseudomonas quinolone signal (PQS) (36). Transkripce operonu *pqsABCDE* nezbytného pro syntézu PQS a dalších 4-chinolonů je kontrolována regulátorem PqsR (MvfR), který je regulován LasR/3-oxo-C12-HSL (35). Pro syntézu PQS z prekurzoru 2-heptyl-4-chinolonu (HHQ), který také funguje jako autoinduktor, je nezbytná monooxygenáza PqsH. Exprese genu *pqsH* je rovněž regulována LasR/3-oxo-C12-HSL (48). Naopak RhlR/C4HSL negativně reguluje *pqsR* a *pqsA*. Jak PQS tak HHQ fungují jako koinduktory vazby PqsR na promotorové sekvence cílových genů. Biosyntéza chinolonů je tedy autoregulována PqsR/HHQ/PQS komplexy a systémem *las* a reprimována systémem *rhl*. Pro plnou expresi cílových genů je zřejmě nezbytná přítomnost obou autoinduktorů PQS systému. Protein PqsE se neúčastní syntézy PQS, ale je nezbytný pro plnou produkci virulenčních faktorů regulovaných PQS systémem jako je elastáza LasB, pyocyanin nebo lektin A (36) a také pro expresi genů sekrečního systému H3-T6SS (97).

QS je regulován celou řadou faktorů, jejich přehled je uveden v tabulce 2.1.

Tab. 2.1: Souhrn hlavních regulátorů modulujících QS *P. aeruginosa*

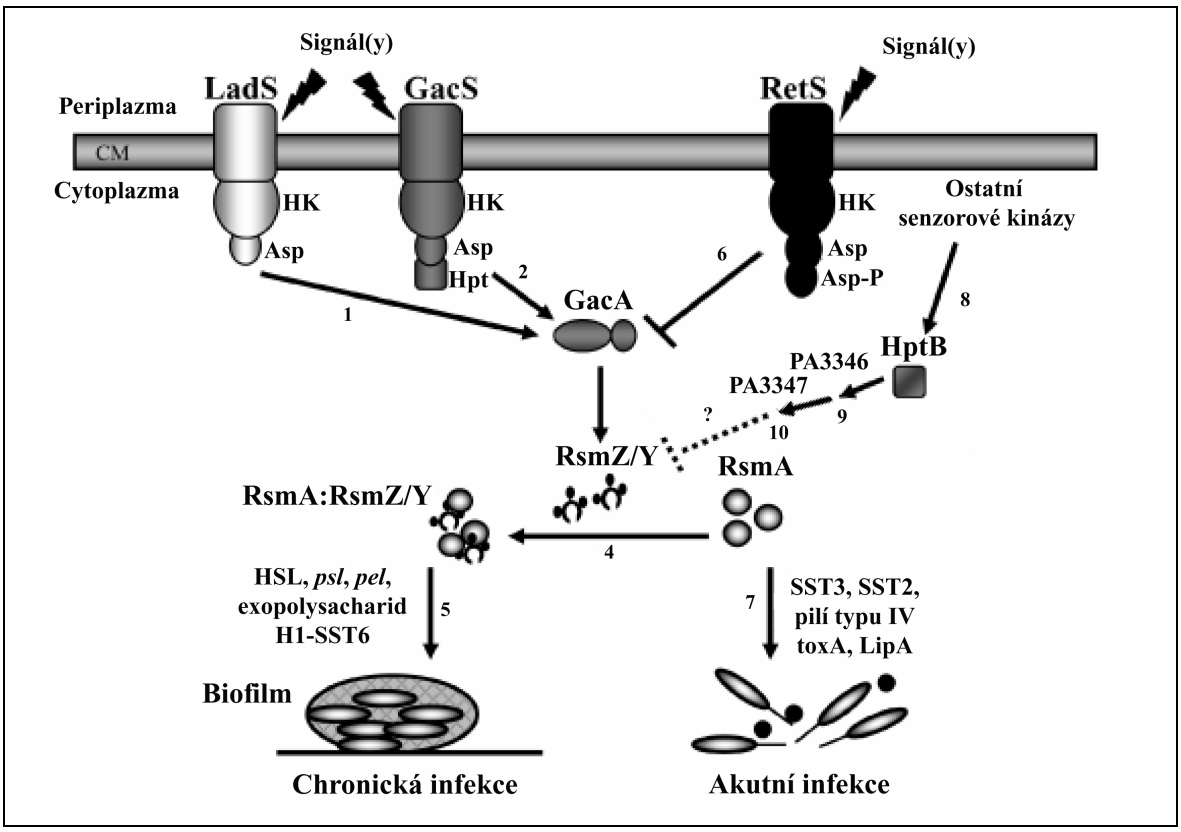
Název	Popis	Regulace	Ovlivněný projev
VfR	receptorový protein cAMP	pozitivně reguluje expresi *lasR*	exotoxin A, proteázy
RsaL	represor QS	reprimuje *lasI*	elastáza, pyocyanin, hydrogencyanid
RpoS	stacionární sigma faktor	negativně reguluje expresi *rhlI*	lektin, elastáza, pyocyanin, swarming
RpoN	alternativní sigma faktor 54	negativně reguluje *lasRI*, *rhlI*, může i pozitivně regulovat *rhlI*	elastáza, rhamnolipidy, hydrogencyanid
MvaT	HNS-like transkripční regulátor	reguluje QS v závislosti na růstové fázi	lektin, elastáza, pyocyanin, swarming, biofilm, MexEF-OprN pumpy antibiotik
VqsM	transkripční regulátor	pozitivně reguluje expresi *lasI* a *rhlI*	proteáza, elastáza, swimming a swarming
RsmA	postranskripční regulátor	negativně reguluje expresi *lasI* a *rhlI*	proteáza, pyocyanin, lektin, hydrogencyanid, swarming
DksA	transkripční regulátor	negativně reguluje expresi *rhlI*	elastáza, rhamnolipidy
GacA	globální aktivátor	pozitivně reguluje expresi *lasR* a *rhlR*	pyocyanin. lipáza, hydrogencyanid
PhoB	regulátorový protein dvousložkového systému	stimuluje rhlR za podmínek limitace fosfátem	pyocyanin
PmpR	protein s neznámou funkcí	reprimuje expresi *pqsR*, *pqsA*, *pqsH* a *rhlR*	phenaziny, pyocyanin
PtxR	transkripční regulátor	negativně reguluje *pqsA-E* a *rhlI* a pozitivně *lasI*	pyocyanin, exotoxin A, rhamnolipidy
PPK1	polyfosfátkináza	pozitivně kontroluje produkci HSL	elastáza, rhamnolipidy, biofilm
AlgR	transkripční regulátor	váže promotor *rhlI* a v biofilmu reprimuje jeho expresi	maturace biofilmu, rhamnolipidy

Převzato z Williams and Cámara, 2009 (186)

2.2.5 Regulace virulence dvousložkovými systémy GacA/GacS, RetS a LadS

Globálním regulátorem virulence u *P. aeruginosa* je GacA, regulační protein dvousložkového systému GacA/GacS. Regulátor GacA přímo kontroluje expresi dvou malých RNA RsmY a RsmZ, které se vážou na translační represor RsmA, čímž blokují jeho funkci (20). RsmA negativně reguluje produkci signální molekuly QS systému *rhl*, C4-HSL, a s ním souvisejících virulenčních faktorů jako je pyocyanin, hydrogencyanid, elastáza nebo lektin. V neposlední řadě je působením RsmA negativně regulován také H1-T6SS. RsmA/RsmZ komplex naopak pozitivně reguluje produkci lipázy, rhamnolipidů a pohyb swarming (65). Exprese RsmZ je kontrolována také hybridními senzorovými kinázami RetS a LadS, které interagují se signální drahou GacA/GacS. Exprese RsmZ je pozitivně regulována signální drahou kinázy LadS (174). RetS ovlivňuje expresi RsmZ negativně tvorbou heterodimeru s kinázou GacS, čímž znemožňuje aktivaci GacA (53).

Hybridní senzorové kinázy RetS a LadS regulují recipročně expresi genů nezbytných pro chronické infekce a akutní infekce (obr. 2.2.6). RetS působí jako aktivátor genů akutní infekce (SST3, SST2, H1-T6SS, lipáza, exotoxin A, pilí typu IV) a represor genů chronické infekce (C4-HSL, geny *pel* a *psl* pro syntézu alginátu). Působení LadS je opačné (15). RetS regulon se značně překrývá s regulonem proteinu HptB, který patří mezi histidin obsahující fosfotransferové moduly hybridních dvousložkových systémů (viz kapitola 2.1.2.2 - Dvousložkové systémy). Jeho funkcí je přenos fosfátové skupiny na regulační protein dvousložkového systému kódovaný genem PA3346. Tento regulátor obsahuje na C-konci fosfatázovou doménu typu PPM, která specificky defosforyluje produkt genu PA3347, pravděpodobný anti-anti-σ faktor. Signalizace přes HptB kontroluje pouze expresi RsmY, nikoli RsmZ. Signální dráha vedoucí od HptB je závislá na aktivitě regulátoru GacA, způsob interakce je však zatím nejasný (15).



Obr. 2.2.6: Model působení RetS a LadS na regulační síť GacA-Rsm u *P. aeruginosa*. Signály aktivující RetS blokují aktivaci GacA vazbou RetS na GacS. To vede k represi genů pro malé RNA RsmZ/Y (krok 6), uvolnění RsmA a indukci produkce virulenčních faktorů akutní infekce (krok7) a represi biofilmu. Naopak, signály aktivující GacS a LadS vedou k fosforylaci GacA (krok 1 a 2) a tím zvýšení hladiny nekódujících malých RNA RsmZ/Y (krok 3), které vážou a tak blokují RsmA (krok 4). Pokles hladiny volného RsmA vede k zvýšení exprese genů pro exopolysacharidovou matrix biofilmu, geny *pel* a *psl*, a tím k tvorbě biofilmu, a dále k aktivaci exprese genů sekrečního systému H1-T6SS. (krok 5). To vede současně k represi genů akutní infekce. Neznámé signály aktivují další senzorové kinázy, které mohou fosforylovat protein HptB a iniciovat tak signální dráhu (krok 9 a 10) vedoucí k represi malé RNA RsmY (krok 10) a tak k represi biofilmu a aktivaci swarmingu. Převzato z Gooderham *et al.*, 2008 (52) a upraveno dle Bordi *et al.*, 2010 (15).

2.2.6 Cystická fibróza a *P. aeruginosa*

Cystická fibróza je nejčastější autozomální recesivní genetická porucha bílé populace, která postihuje přibližně jedno z 2 500 narozených dětí (145). V důsledku mutace genu pro regulátor transmembránové vodivosti (CFTR - cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), který se nachází na sedmém chromozomu, dochází k poruše výměny chloridových a sodných iontů mezi vnitřním a vnějším prostředím buňky i mezi buňkou a jejími organelami (137). Výsledkem je abnormálně hustý hlen, tvořící se zejména v dýchacích cestách a slinivce břišní. Tento hustý hlen je živnou půdou pro bakterie, nejčastěji *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus* nebo

Haemophylus influenzae, kterých se organismus při CF nedokáže účinně zbavit. Předpokládá se, že je narušena očišťovací funkce řasinek, nicméně tuto domněnku se zatím nepodařilo experimentálně potvrdit *in vivo* (16). Současné studie naznačují, že hlavním důvodem bakteriálních infekcí CF pacientů je nerovnováha mezi prozánětlivými a protizánětlivými cytokiny v dýchacích cestách. Buňky s nefunkčním CFTR sekretují vyšší množství zánětlivých cytokinů v případě infekce *P. aeruginosa* (16,28).

Nemocní CF trpí opakovanými a chronickými infekcemi dýchacích cest, trvalým kašlem a případně dušností. Destrukce plicní tkáně chronickými záněty je nejčastější příčinou úmrtí pacientů trpících CF. Ve slinivce břišní ucpává hustý hlen vývody, jimiž za normálních okolností přicházejí do střev trávicí enzymy. U mužů se CF může projevit také neplodností (145).

Kvůli vysoké rezistenci k antibiotikům je *P. aeruginosa* u těchto nemocných obávaným patogenem. Její odolnost zvyšuje schopnost tvořit biofilm, v jehož formě je ze sputa nemocných CF často izolována. Matrix obalující biofilm dále zvyšuje zahleněnost dýchacích cest. Infekce způsobená *P. aeruginosa* je kvůli odolnosti této bakterie velmi obtížně léčitelná (69).

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Bakteriální kmeny

Pseudomonas aeruginosa, divoký typ PAO1 (laboratorní sbírka, Thilo Köhler, University of Geneva) byl použit jako výchozí kmen pro přípravu mutantních kmenů.

Escherichia coli XL1-Blue (Stratagene): F′::Tn*10* *proA*$^{+}$*B*$^{+}$ *lacI*^{q} Δ*(lacZM15/ recA1endA1 gyrA96* (Nal^{r}) *thi hsdR17 (*r_k^- m_k^+*)supE44 relA1 lac*

Escherichia coli JM 109 (Promega): (*endA*1 *recA*1 *gyrA*96 *thi hsdR*17 (r_K-,m_K+) *relA*1 *supE*44 Δ(*lac-proAB*) [F' *traD*36 *proAB lacI*^{q}*Z*ΔM15]) byly použity jako recipientní kmeny pro transformaci plazmidovou DNA.

Escherichia coli BL21(DE3) (Novagen): (F$^-$, *omp*T, *hsdS*$_{B,}$ (r_B^-, m_B^-), *dcm*, *gal*, λ(DE3)) byl použit pro nadprodukci proteinů, kmen nese profág O s genem pro T7 polymerázu.

Escherichia coli BL21(DE3) (pET42*stk1*) (172) kmen exprimující na N konci epitopem (histidinová kotva (6x His)) značenou proteinkinázu Stk1. Kmen byl používán pro nadprodukci a následnou izolaci Stk1-His.

Escherichia coli BL21(DE3) (pET28*stp1*) (172) kmen exprimující na C konci epitopem (histidinová kotva (6x His)) značenou fosfatázu Stp1. Kmen byl používán pro nadprodukci a následnou izolaci Stp1-His.

3.1.2 Vektory

pEX18Ap (5842 bp, (66)) je sebevražedný vektor pro *P. aeruginosa* se syntetickým polylinkerem, ampicilinovou rezistencí, *lacZα* a genem *sacB*, který umožňuje segregaci skutečných mutantů od merodiploidů na mediu s 5% sacharózou. Vektor slouží ke klonování a přenosu DNA fragmentů a je použitelný pro široké spektrum bakterií (bhr vektor - broad host range). Vektor byl použit pro přípravu konstruktu pro mutagenezi *P. aeruginosa* alelickou výměnou. Vektor poskytl Dr. H. P. Schweizer.

pPS858 (4,54 Kbp, (66)) je vektor s ampicilinovou rezistencí nesoucí kazetu Gm^R-GFP FRT (FRT - Flp recombinase target), která obsahuje dvě FRT místa rozeznávaná s vysokou frekvencí rekombinázou Flp, gen pro gentamicinovou rezistenci a gen *gfp* (green fluorescent protein). Vektor slouží k izolaci kazety Gm^R-GFP FRT. Vektor poskytl Dr. H. P. Schweizer.

pFLP2 (9,29 Kbp, (66)) je bhr vektor s genem kódujícím rekombinázu Flp, genem *sacB* ze *S. cerevisiae* a ampicilinovou rezistencí. Byl použit k expresi rekombinázy Flp v *P. aeruginosa*. Vektor poskytl Dr. H. P. Schweizer.

pMP220 (10,5 Kbp, (87)) je tzv. promoter probe vektor nesoucí syntetický polylinker, gen *lacZ*α bez vlastního promotoru a tetracyklinovou rezistenci. Vektor sloužil ke konstrukci transkripčních fúzí předpokládaných promotorových oblastí s reportérovým genem *lacZ*α bez vlastního promotoru. Vektor poskytl Dr. V. Venturi.

pRPO220B (87) je vektor pMP220 nesoucí 920 bp dlouhou funkční promotorovou oblast genu *rpoS*. Plazmid poskytl Dr. V. Venturi.

pUC18-mini-Tn7T-LAC (5,82 Kbp, (26)) je vektor s ampicilinovou rezistencí nesoucí mini-Tn7T-Gm segment s gentamicinovou rezistencí a *lacIq*-P*tac* expresní kazetou. Umožňuje klonování, přenos DNA fragmentů a jejich rekombinaci do jedinečného *att*Tn7 místa v blízkosti genu *glmS* na chromozomu *P. aeruginosa* a dále řízenou expresi vložených genů. Vektor byl použit na konstrukci komplementačního plazmidu nesoucího geny *pppA-ppkA*. Vektor poskytl Dr. H. P. Schweizer.

pTNS2 (9,62 Kbp, (26)) je pomocný vektor pro integraci expresní kazety vektoru pUC18-mini-Tn7T-LAC, nese geny podjednotek transpozázy TnsABCD a ampicilinovou rezistenci. Vektor poskytl Dr. H. P. Schweizer.

pET28b (5,37 kbp; Novagen) je komerční expresní vektor s kanamycinovou rezistencí. Exprese proteinů je pod kontrolou *T7lac* promotoru. pET28 umožňuje fúzi N-terminálního nebo C-terminálního konce cílového proteinu s histidinovou kotvou (6x His).

3.1.3 Kultivační půdy

Množství jednotlivých složek jsou vždy vztažena na 1 l půdy. Pevné půdy byly připraveny přidáním 15 g agaru na 1 l média. Selektivní půdy byly připraveny přidáním příslušného antibiotika na konečnou koncentraci:

pro *E. coli*		pro *P. aeruginosa*	
ampicilin	20 μg/ml	karbenicilin	250 μg/ml
gentamicin	20 μg/ml	gentamicin	100 μg/ml
tetracyklin	10 μg/ml	tetracyklin	100 μg/ml
kanamycin	50 μg/ml		

P. aeruginosa je přirozeně rezistentní na ampicilin, proto se místo něho používá karbenicilin.

Půdy pro kultivaci *E. coli*:

Půda LB: trypton 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g; pH 7,0

Půda SOB: trypton 20 g, yeast extract 5 g, NaCl 0,58 g, KCl 0,186 g, po sterilizaci přidáno: 1 M $MgCl_2$ 10 ml, 1 M $MgSO_4$ 10 ml

Půdy pro kultivaci *P. aeruginosa*

Minimální médium M9:	Na_2HPO_4 6 g, KH_2PO_4 3 g, NaCl 0,5 g, NH_4Cl 1 g; pH 7,4, po sterilizaci přidáno na výslednou koncentraci: 2% glukóza, 2 mM $MgSO_4$. Pro srovnání růstu na glycerolu, byl místo glukózy přidám 2% glycerol
Půda s elastinem:	Nutrient broth 8 g, po sterilizaci přidán elastin 3,2 g; pH 7,5
Půda s kaseinem:	Bacto-beef 4 g, beef extract 2 g, peptone from casein 2 g, $CaCl_2 \cdot H_2O$ 0,2 g, citronan draselný-monohydrát 0,35 g, Na_2HPO_4 0,105 g, KH_2PO_4 0,035 g, NaCl 5 g, po sterilizaci přidán kasein 3,5 g; pH 7
KING agar B base:	proteose peptone 20 g, $K_3PO_4 \cdot 3H_2O$ 1,8 g, $MgSO_4$ 1,5 g, glycerol 10 g/l; pH 7,1
Pseudomonas P agar:	peptone 20 g, $MgCl_2$ 1,4 g, K_2SO_4 10 g, glycerol 10 ml; pH 7,2

SW blue plates: minimální médium M8: Na_2HPO_4 6 g, KH_2PO_4 3 g, NaCl 0,5 g; pH 7,4; po sterilizaci přidáno na výslednou koncentraci: 0,2% glycerol, 2 mM $MgSO_4$, 5 mM KNO_3, 0,0005% methylene blue, 0,02% CTAB, roztok stopových prvků 200 μl/100 ml

roztok stopových prvků: zásobní roztoky (v 1N HCl):

1 M $FeSO_4$, 1 M $MnCl_2$, 1 M $CoCl_2$, 1 M $CaCl_2$, 100 mM $CuCl_2$, 100 mM $ZnSO_4$; 500 μl z každého zásobního roztoku do 50 ml H_2O, sterilizace filtrací

Swarm agar: M8 medium, 0,5% agar, po sterilizaci přidáno na finální koncentraci: 0,2% glukosa, 2 mM $MgSO_4$, roztok stopových prvků 200 μl/100 ml, 0,05% aminokyselina (histidin nebo glutamát)

3.1.4 Chemikálie a enzymy

Chemikálie

chemikálie	**firma**	**zkratka**
β- merkaptoethanol	Sigma	
2'-Deoxyadenosin -5'-trifosfát	Promega	dATP
2'-Deoxycytidin -5'-trifosfát	Promega	dCTP
2'-Deoxyguanosin -5'-trifosfát	Promega	dGTP
2'-Deoxythymidin -5'-trifosfát	Promega	dTTP
5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát	Boehringer	X-fosfát
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid	Sigma, Promega	X-gal
6x Loading Dye	Fermentas	
Agarosa LE Analytical Grade	Promega	
Akrylamid 4 x krystalický	Amersham	
Ampicilin	Sigma	Amp
Anti-digoxigenin alcaline phosphatase conjugate	Roche	anti-Dig-AP
Bacto-agar	Difco	
Bacto-beef	Difco	
Bacto-casitone	Difco	
Beef extrakt	Serva	
Blokační činidlo	Boehringer	
Bromfenolová modř	Sigma	
Cetylpyridinium chlorid	Sigma	
Cetyltrimethylamonium bromid	Sigma	CTAB
Coomassie blue R-250	Merck	
Digoxigenin-11-2´-deoxyuridin-5´-trifosfát	Roche	DIG-dUTP

Dimethylsulfoxid	Sigma	DMSO
Dithiotreitol	Promega	DTT
Dodecylsulfát sodný	Merck	SDS
Elastin	Sigma	
Ethidium bromid, p.a.	Sigma	EtBr
Fluorescein calibration dye	BIO-RAD	
GelRed™	Biotium	
Histidin	Sigma	His
Hovězí sérový albumin	Exbio	BSA
Chloramfenikol	USB	Cm
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside	Fluka, Sigma	IPTG
Kanamycin	Fluka	Kan
Karbazol	Fluka	
Kys. 1,4-piperazindiethan-sulfonová	Sigma	PIPES
Kys. ethylenaminotetraoctová, dvojsodná sůl, p.a.	Serva	EDTA
Kys. glutamová	Fluka	Glu
Kyselina algová z Macrocystis pyrifera	Sigma	
Lysozym	Boehringer	
N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N′-(2-ethanesulfonic acid) hemisodium salt	Sigma	HEPES-Na
N,N,N´,N´-tetramethylethylendiamin	Serva	TEMED
N,N´-methylenbisakrylamid 2 x kryst.	Serva	bisAA
Nitroblue tetrazolium salt	Boehringer	NBT
Nutrient broth	Difco	
o-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside	Sigma	ONPG
Pefloxacin (Abactal)	Lek	
Peptone from casein	Serva	
Peroxosíran amonný, p.a.	Lachema	APS
Polyoxyethylenesorbitan monolaurate	Sigma	Tween 20
Proteinasa K	Boehringer	
Proteose peptone	Difco	
Ribonukleasa A	Boehringer	Rnasa A
Tetracyklin	USB	Tc
Trimetoprim (Triprim)	Ratiopharms	
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Serva	Tris
Tryptone Peptone	Difco	
Tryptone	Oxoid	
Yeast extract	Oxoid	

Ostatní chemikálie byly běžně dostupné látky analytické čistoty.

Radiochemikálie

Adenosin-5 [γ-^{32}P]trifosfát	MP Radiobiochemicals	γ-^{32}P ATP

Enzymy modifikující DNA

alkalická fosfatáza	Amersham
Pfu Ultra polymeráza	Stratagene
restrikční endonukleázy	NEB

T4 DNA ligáza	Fermentas	
Taq-purple DNA polymeráza	Top-Bio	Taq pol.

Enzymy modifikující RNA

Improm II^{TM} reverzní transkriptáza	Promega

Protilátky

Myší monoklonální protilátka (IgG) proti histidinové kotvě konjugovaná s křenovou peroxidázou (Sigma)

Primární králičí polyklonální protilátka proti fosfothreoninu (Cell Signaling)

Sekundární protilátka proti králičím IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou (Sigma)

Komerční soupravy

Izolace plazmidové DNA *E. coli*	QIAprep®Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
Izolace DNA z agarózového gelu	Gel Extraction Spin Kit (QIAGEN)
Imunodetekce	Super Signal Chemiluminescent Substrate (Pierce)
Měření koncentrace proteinů	BCA Protein Assay Reagent (Pierce)
Izolace RNA	RNeasy Mini Kit (QIAGEN)
Přečištění RNA	RNase-Free DNase Set (QIAGEN)
Real-time PCR	SybrGreen JumpStart Taq Ready Mix (Sigma
Cílená mutageneze	QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)
Fosfatázová reakce	Serine/Threonine Phosphatase Assay System (Promega)

DNA standardy

DNA 1 kb ladder Plus	Fermentas
DNA 1 kb ladder (značený DIG-11-dUTP)	NEB
DNA 100 bp ladder	NEB

Proteinové standardy

Prestained Protein Marker Broad Range	NEB

3.1.5 Software

Na analýzu sekvencí, kontrolu sekvenačních dat a kontrolu sekvencí navrhovaných oligonukleotidů byla použita sestava programů Lasergene (Dnastar).

Na vyhodnocení výsledků Real-time PCR byl použit program iQ™5 Optical System Software Version 2.0.

Na porovnání proteinových sekvencí jsme použili program ClustalW2 (25) http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/

Na srovnávání krystalových struktur proteinů byl použit program SwissPdb viewer (59), http://www.expasy.org/spdbv/.

Analýza radioaktivně značených proteinů byla prováděna pomocí programu Aida 3.28.

3.2 Metody – obecná část

3.2.1 Kultivace mikroorganizmů

3.2.1.1 Kultivace *E. coli*

Kultury *E. coli* jsme kultivovali v LB médiu (za stálého třepání) nebo na LB agaru při 37ºC (pokud nebude uvedeno jinak). Pro selekci buněk nesoucích žádoucí plazmid jsme do média přidávali příslušné antibiotikum.

3.2.1.2 Kultivace *P. aeruginosa*

Kultury *P. aeruginosa* jsme kultivovali buď v LB médiu (za stálého třepání) nebo na LB agaru při 37ºC nebo v M9 médiu s glukózou (za stálého třepání), pokud nebude uvedeno jinak. Pro selekci buněk nesoucích žádoucí plazmid jsme do média přidávali příslušné antibiotikum.

3.2.2 DNA manipulace

3.2.2.1 Izolace plazmidové DNA *E. coli* alkalickou lyzí

Princip metody spočívá v denaturaci DNA alkalickým pH následované rychlou renaturací. Plazmidová ccc-forma DNA (covalently close circle) renaturuje rychle, kdežto chromozomální DNA a proteiny jsou vysráženy s SDS, který poté tvoří komplex s draslíkem a je odstraněn centrifugací.

Izolovanou bakteriální kolonií jsme inokulovali 2 ml LB media s příslušným antibiotikem a kultivovali přes noc ve 37ºC. 1,5 ml bakteriální suspenze jsme centrifugovali 2 min při 13 000 **g** a buňky resuspendovali ve 100 μl roztoku GTE (50 mM glukóza; 25 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA). Přidali jsme 200 μl roztoku P2 (0,2 M NaOH; 1% SDS), šetrně promíchali a nechali inkubovat 5 min při pokojové teplotě. Poté jsme ke směsi přidali 150 μl 3 M roztoku acetátu draselného (pH 5,2), promíchali a inkubovali 10 min na ledu. Vzorek jsme 10 min centrifugovali (13 000 **g**), supernatant odsáli do nové zkumavky a plazmidovou DNA vysráželi stejným objemem isopropanolu (450 μl). Centrifugovali jsme 10 min (13 000 **g**), supernatant odsáli a vzniklou sraženinu plazmidové DNA promyli 200 μl 80% ethanolu. Plazmidovou DNA jsme vysušili a

rozpustili ve 20 µl pufru TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) s RNasou A (20 µg/ml, Promega).

3.2.2.2 Izolace plazmidové DNA *E. coli* pomocí komerční soupravy

Pro přípravu plazmidové DNA v dostatečné čistotě jsme používali komerční soupravu QIAprep®Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Při práci jsme dodržovali pokyny výrobce.

3.2.2.3 Izolace chromozomální DNA *P. aeruginosa*

Bakteriální kmen jsme očkovali na misku a inkubovali přes noc při 37ºC. Izolovanou kolonií jsme inokulovali 10 ml LB media a inkubovali opět přes noc při 37ºC. Prekulturou jsme inokulovali 50 ml LB media (37ºC) na OD_{600} = 0,05. Poté co kultura dosáhla počátku exponenciální fáze (OD_{600} = 0,5), jsme buňky centrifugovali (10 000 **g**, 10 min, 4ºC) a resuspendovali v 2,5 ml 25% glukosy, 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA; pH 8,0. Přidali jsme 2,5 ml stejného roztoku s lysozymem (2 mg/ml) a inkubovali 30 min na ledu. Poté jsme ke vzorku za pokojové teploty přidali 0,5 ml 10% SDS a jemně promíchali. Dále jsme ke směsi přidali 100 µl proteinasy K (2 mg/ml) a inkubovali ve vodní lázni 15 min při 56ºC. Lyzát jsme převedli do 50 ml baňky, zkumavky propláchli 5 ml TE a roztoky spojili dohromady, přidali 1,7 ml 5 M NaCl a dobře promíchali. Dále jsme ke vzorku přidali 1,3 ml CTAB/NaCl (10% CTAB v 0,7 M NaCl), promíchali a inkubovali 10 min při 65ºC. Provedli jsme extrakci proteinů 13 ml směsi fenol - chloroform. Vzorek jsme centrifugovali 20 min při 6 500 **g** při pokojové teplotě. Vodní fázi jsme odebrali do čisté zkumavky a znovu extrahovali stejným objemem směsi fenol - chloroform. Znovu jsme směs centrifugovali, odebrali vodní fázi a extrahovali ji stejným objemem chloroformu. DNA jsme vysráželi přidáním 0,6 objemu isopropanolu. Vlákna DNA jsme namotali na inokulační kličku, ponořili do 70% ethanolu, nechali oschnout na vzduchu a přes noc rozpouštěli v 0,5 ml TE.

3.2.2.4 Minipreparace chromozomální DNA *P. aeruginosa*

Přes noc narostlou kulturou *P. aeruginosa* jsme inokulovali 5 ml LB média na počáteční OD_{600} = 0,05 a nechali růst při 37ºC do OD_{600} = 0,5. Poté jsme odebrali 1,5 ml kultury a centrifugovali 2 min (13 000 **g**). Supernatant jsme odsáli a buňky resuspendovali v 567 µl TE, přidali 3 µl proteinasy K (20 mg/ml), dobře promíchali (nevortexovali) a inkubovali 60 min ve 37ºC. Po inkubaci jsme přidali 100 µl 5 M NaCl, promíchali a přidali

80 µl CTAB/NaCl. Vzorek jsme dobře promíchali a inkubovali 10 min při 65ºC a extrahovali 1 objemem (0,75 ml) chloroformu. Vzorek jsme centrifugovali 10 min (13 000 **g**) za pokojové teploty a supernatant převedli do nové zkumavky. K supernatantu jsme přidali 1 µl RNasy A (10 mg/ml) a inkubovali 10 min při pokojové teplotě. Následovala extrakce 1 objemem směsi fenol - chloroform a centrifugace 5 min (13 000 **g)**. Supernatant jsme opět převedli do nové zkumavky a extrahovali 1 objemem chloroformu, centrifugovali 5 min (13 000 **g**) a vodní fázi odebrali do nové zkumavky. DNA jsme vysráželi přidáním 1 objemu isopropanolu. Vzorek jsme promíchali převrácením zkumavky a následovala centrifugace 15 min (13 000 **g)**. DNA jsme promyli 0,5 ml 80% ethanolu. Vzorek jsme centrifugovali 5 min (13 000 **g**), odstranili ethanol, DNA vysušili a rozpustili v 50 µl pufru TE.

3.2.2.5 Precipitace DNA isopropanolem

Pro přečištění vzorku DNA jsme k roztoku DNA přidali 0,1 objemu 3 M acetátu sodného, pH 5,2 (vysoká iontová síla) a jeden objem isopropanolu. Roztok jsme promíchali (vortex) a centrifugovali 10 minut při 13 000 **g**. Supernatant jsme odsáli a sraženinu DNA promyli 200 µl 80% ethanolu. Po centrifugaci (5 min, 13 000 **g**) jsme vysráženou DNA vysušili ve vakuu a rozpustili v destilované vodě.

3.2.2.6 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Při štěpení DNA restrikčními enzymy jsme se řídili pokyny výrobce, používali originální pufry a zachovávali stanovené reakční podmínky. Pokud při štěpení dvěma různými enzymy nebylo možné použít stejný pufr, štěpili jsme DNA frakcionovaně a mezi dvěma restrikcemi DNA precipitovali isopropanolem.

3.2.2.7 Ligace molekul DNA

Ligace jsme prováděli v konečném objemu 20 µl s 1 U T4 DNA ligázy (Fermentas) a příslušným pufrem. Mezi vektorem a fragmentem DNA jsme dodržovali molární poměr 1:2. Ligační směs jsme inkubovali přes noc při pokojové teplotě.

3.2.2.8 Transformace kompetentních buněk *E. coli* plazmidovou DNA

Příprava kompetentních buněk *E. coli*

Kompetentní buňky jsme připravili modifikovanou metodou podle Inoue *et al*., (74). 100 ml půdy jsme inokulovali 0,4 ml bakteriální kultury ve stacionární fázi narostlé přes

noc a kultivovali při teplotě 20ºC za intenzivního třepání. Po dosažení OD_{600} = 0,6 jsme přerušili kultivaci a buňky inkubovali 10 min na ledu. Po centrifugaci (10 min, 2 500 **g**, 4ºC) jsme buňky resuspendovali ve 32 ml ledového pufru TB (10 mM PIPES; 15 mM $CaCl_2$; 250 mM KCl; sterilizace filtrací, poté přidáno $MnCl_2$; (výsledná koncentrace 55 mM); pH 6,7), suspenzi jsme inkubovali 10 min na ledu a centrifugovali za stejných podmínek. Po resuspendování buněk v 8 ml pufru TB jsme pomalu přidávali DMSO do konečné koncentrace 7% a po inkubaci 10 min na ledu jsme kompetentní buňky rozdělili na alikvoty a dlouhodobě uchovávali při –70ºC.

Příprava jednorázových kompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3)

Přes noc narostlou kulturou jsme inokulovali 2 ml LB média na OD_{600} = 0,05 a nechali růst v 37ºC do OD_{600} = 0,6. Během dalších kroků jsme kulturu udržovali na ledu. Po centrifugaci (3000 **g**, 10 minut) jsme resuspendovali peletu v 1 ml sterilního 100 mM $CaCl_2$. Následovala centrifugace (3000 **g**, 10 minut), resuspendování pelety v 1 ml 100 mM $CaCl_2$, opět centrifugace (3000 **g**, 10 minut) a resuspendování pelety v 100 µl 100 mM $CaCl_2$. Takto připravené kompetentní buňky jsme okamžitě transformovali.

Transformace buněk plazmidovou DNA

Metoda je založena na teplotním šoku, který usnadní průchod plazmidové DNA buněčnou stěnou bakterií.

Ke kompetentním buňkám rozmraženým a uchovávaným na ledu jsme přidali přibližně 100 ng plazmidové DNA nebo ligační směs, opatrně promíchali a inkubovali 30 min na ledu. Poté jsme provedli teplotní šok 45 s ve 42ºC a následné ochlazení 45 s na ledu. K suspenzi buněk jsme přidali 4 objemy LB média a kultivovali 1 hod ve 37ºC. Suspenzi jsme vyseli na misku s LB půdou obsahující příslušné antibiotikum. Pokud jsme prováděli modrobílou selekci, buňky jsme před výsevem na misky smíchali s IPTG (4 µl 1 M roztoku) a X-gal (40 µl roztoku 20 mg/ml v dimehylformamidu).

3.2.2.9 Transformace kompetentních buněk *P. aeruginosa*

Příprava elektrokompetentních buněk *P. aeruginosa*

30 ml LB media jsme inokulovali přes noc narostlou kulturou *P. aeruginosa* na OD_{600} = 0,05. Buňky jsme pěstovali za třepání ve 37ºC do OD_{600} = 0,5. Poté jsme buňky centrifugovali (10 000 **g**, pokojová teplota, 10 min) a resuspendovali ve 30 ml

elektroporačního SEB pufru (272 mM sacharóza; 1,4 mM NaH_2PO_4; 5,6 mM Na_2HPO_4 pH 7,4; 1 mM $MgCl_2$). Buňky jsme znovu centrifugovali 10 min a resuspendovali v 6 ml SEB pufru. Ještě jednou jsme buňky 10 min centrifugovali, resuspendovali ve 150 µl SEB pufru a nechali inkubovat 30 min za pokojové teploty.

Elektroporace buněk *P. aeruginosa*

Elektroporaci jsme prováděli na přístroji Gene pulser (BIO-RAD) za následujících podmínek: kapacitance 25 µF, odpor 200 Ω a napětí 8 kV/cm. Ke 40 µl buněk jsme přidali 1 µg DNA (rozpuštěné ve vodě). Směs buněk jsme ihned přenesli do elektroporační kyvety (Bio-Rad; 0,2 cm elektroda). Po elektrickém pulsu jsme ihned přidali 1 ml LB media, promíchali a přidali ke 2 ml LB media ve 125 ml baňce. Bakterie jsme kultivovali 2 hod ve 37ºC a posléze vyseli dvakrát 200 µl na misky s příslušným antibiotikem.

3.2.2.10 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu

Analytická DNA elektroforéza

Pro analýzu DNA jsme používali horizontální agarózovou elektroforézu v pufru TAE (40 mM Tris; 1 mM Na_2EDTA; pH 8,0). Hustota agarózového gelu závisela na velikosti dělených fragmentů a do gelu jsme přidávali interkalační činidlo ethidium bromid (0,5 µg/ml gelu) nebo GelRed (1 µl/ml gelu) pro zviditelnění DNA v UV záření. DNA vzorky jsme nanášeli rozpuštěné v pufru 6x Loading Dye Solution (0,09% BPB; 0,09% xylen cyanol FF; 60% glycerol; 60 mM EDTA). Fragmenty jsme separovali při napětí 5 V/cm a jejich velikost odečítali podle DNA standardu.

Preparativní DNA elektroforéza

Fragmenty separované v agarózovém gelu jsme izolovali pomocí komerční soupravy Gel Extraction Spin Kit (QIAGEN) dle návodu výrobce.

3.2.2.11 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Princip metody PCR spočívá v opakování tří po sobě jdoucích kroků s řízenými teplotními a časovými podmínkami. Cyklus je tvořen následujícími kroky: denaturace templátu, hybridizace oligonukleotidů k templátu a prodlužování DNA řetězce směrem od oligonukleotidů (elongace). Pro správnou termodynamiku hybridizace oligonukleotidů na DNA a pro zabránění vzniku nespecifických produktů je nutné zvolit vhodnou teplotu (T_m= 4 x (G+C) + 2 x (A+T)).

Oligonukleotidy jsme navrhovali a kontrolovali pomocí programu Primer design a Primer select (Lasergene). K amplifikaci genů *P. aeruginosa* jsme používali Pfu Ultra polymerázu (Stratagene), která vykazuje nižší procento inkorporace chybných nukleotidů; pro kontrolní PCR reakce pak Taq-purple DNA plymerázu (Top-Bio). Při navrhování složení PCR reakce a programu amplifikace jsme se řídili pokyny výrobce.

3.2.2.12 Příprava značených DNA sond

DNA sondy jsme připravovali reakcí PCR. Pro značení sondy jsme použili 1 U *Taq* polymerázy. Reakční směs (50 µl) dále obsahovala 200 µM dATP, dCTP, dGTP, 130 µM dTTP, 70 µM Dig-dUTP a 50 pmol příslušných oligonukleotidů. Ostatní složky i reakční podmínky byly stejné jako u běžné amplifikační reakce.

3.2.2.13 Přenos DNA na nylonovou membránu (Southern blot)

Chromozomální DNA určenou pro následný přenos na membránu jsme nejprve přes noc štěpili příslušnými restrikčními endonukleázami. Po rozdělení chromozomální DNA na agarózovém gelu jsme pomocí vakuového přístroje (Hybaid) přenesli DNA na nylonovou membránu Hybond-N^+ (Amersham).

Při přenosu DNA na membránu jsme gel promývali 2x 15 min denaturačním roztokem (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl), 2x 10 min neutralizačním roztokem (3 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5) a 75 min roztokem 20x SSC (300 M citrát sodný; 3 M NaCl; pH 7,0). Po skončení přenosu DNA jsme membránu osušili a DNA fixovali 3 min UV světlem.

3.2.2.14 Hybridizace DNA se značenou DNA sondou

Pro ověření vytvořené deleční mutace a komplementace jsme využili metodu hybridizace se značenou DNA sondou. Používali jsme DNA sondy značené Dig-dUTP a postupovali jsme podle manuálu DIG nucleic acid detection kit (Boehringer).

Nylonovou membránu s fixovanou DNA jsme inkubovali přes noc v hybridizační peci (Hybaid) při 68ºC v hybridizačním roztoku (5 x SSC; 1% (w/v) blokovací činidlo (Boehringer Mannheim); 0,1% (w/v) N-lauroylsarcosine; 0,02% (w/v) SDS) s denaturovanou sondou (80ºC 10 min, prudké ochlazení na ledu). Množství sondy se pohybovalo mezi 10 až 100 ng/ml hybridizačního roztoku. Membránu jsme po inkubaci promyli 2x 5 min v roztoku 2x SSC, 0,1% SDS při pokojové teplotě a poté 2x 15 min v roztoku 0,1x SSC, 0,1% SDS při 68ºC a provedli imunologickou detekci.

3.2.2.15 Imunologická detekce s anti-Dig protilátkou

Všechny kroky probíhaly za pokojové teploty. Nylonovou membránu jsme nejprve promyli 1 min v pufru 1 (0,1 M kys. maleinová; 0,15 M NaCl; pH 7.5) s 0,3% Tween 20 a následně inkubovali 30 min v pufru 2 (blokační činidlo rozpuštěné 1:10 v pufru 1). Poté jsme membránu inkubovali 30 min v pufru 2 s anti-digoxigenin-Ap konjugátem v poměru 1:5 000. Nenavázanou protilátku jsme odstranili promytím 2x 15 min pufrem 1. Nakonec jsme membránu promyli 2 min pufrem 3 (100 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 50 mM $MgCl_2$; pH 9,5) a inkubovali ve tmě s barevným substrátem (45 μl NBT a 35 μl X-fosfátu v 10 ml pufru 3) do zabarvení. Po inkubaci jsme membránu opláchli TE pufrem (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0) a vodou a usušili.

3.2.2.16 Cílená mutageneze s využitím komerční soupravy

Pro přípravu rekombinantních proteinů se záměnou aminokyselin jsme využili komerční soupravu QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Princip této rychlé metody spočívá v amplifikaci obou vláken plazmidu za použití oligonukleotidů s požadovanou záměnou, následovanou destrukcí mateřského templátu pomocí restrikční endonukleázy DpnI, která rozpoznává pouze metylované sekvence 5´- Gm6ATC-3´. DNA opracovaná DpnI je použita k transformaci buněk *E. coli* JM109. Sekvence vytvořených plazmidů byla ověřena sekvenováním.

3.2.3 Manipulace s proteiny

3.2.3.1 Exprese proteinů v *E. coli*

Buňky *E. coli* BL21(DE3) obsahující rekombinantní expresní vektory (pET) jsme kultivovali v LB médiu za stálého třepání při 30°C do dosažení OD_{600} = 0,6. Ke kultuře jsme přidali IPTG do konečné koncentrace 1 mM. Dále byly kultury pěstovány buď ve 30°C (exprese Stk1) po dobu 3 hodin nebo v 18°C 24 hodin (ostatní proteiny, pro zvýšení podílu rozpustných forem proteinů). Po kultivaci byly buňky odstředěny (5 min, 6 000 **g**), resuspendovány v Tris pufru (50 mM Tris, pH 7,5) a opětovně centrifugovány a případně zamraženy v -20°C. Poté jsme buňky resuspendovali v 1-3 ml lyzovacího pufru (50 mM NaH_2PO_4; 500 mM NaCl; 10 mM imidazol; pH 8,0), přidali inhibitory proteas (Sigma) a dezintegrovali na přístroji French Pressure cell press (SLM Aminco). Nerozbité buňky a

buněčné stěny jsme odstranili centrifugací (5 min, 5 000 **g**). Proteinový lyzát jsme následně rozdělili na rozpustnou a nerozpustnou frakci centrifugaci při 13 000 **g** 15 min, po níž se v peletě nachází nerozpustné inkluze a zbytky buněčných stěn. Proteiny jsme izolovali za nativních podmínek z rozpustné frakce, tedy ze supernatantu.

3.2.3.2 Izolace proteinů s histidinovou kotvou

Pro izolaci proteinů fúzovaných s histidinovou kotvou jsme používali imobilizované afinitní chromatografie za použití nosiče (rezinu) asociovaného s kobaltem (TALON^{TM} Metal Affinity Resin, Clontech - pro Stk1 a Stp1 a její mutované formy) nebo s niklem (Ni-NTA Agarose, Qiagen - pro protein Fha2 a jeho mutované formy). Jejím principem je vazba polyhistidinového konce nadprodukovaného proteinu na kationt Co^{2+} nebo Ni^{2+} chelatačního činidla ukotveného k polymeru. Izolace probíhala za nedenaturujících podmínek. Rozpustnou frakci jsme přidali do zkumavky s rezinem a promíchávali otáčením 1 hodinu ve 4°C. Poté jsme vzorek přenesli do průtokové kolony a nechali usadit 30 min na ledu. Vzorky jsme poté promyli 5krát 5 ml promývacího pufru (50 mM NaH_2PO_4; 500 mM NaCl; 20 mM imidazol; pH 8,0). Protein jsme z rezinu uvolnili přidáním 3krát 0,5 ml elučního pufru (50 mM NaH_2PO_4; 500 mM NaCl; 250 mM imidazol; pH 8,0) nebo Tris elučního pufru (20 mM Tris-HCl; 500 mM NaCl; 150 mM imidazol; pH 7,5) pro fosfatázu Stp1 a její deriváty. Vzorek jsme dialyzovali přes noc při 4°C proti roztoku 25 mM Tris, pH 7,5; NaCl 100 mM.

3.2.3.3 Měření koncentrace proteinů

Množství proteinů jsme stanovovali podle Smith *et al*., (163) pomocí komerční soupravy (BCA Protein Assay Reagent). Postupovali jsme podle pokynů výrobce a jako standard pro vytvoření kalibrační křivky jsme použili ředící řadu zásobního roztoku BSA (2 mg/ml).

3.2.3.4 Elektroforetická analýza proteinů (SDS-PAGE)

K analýze proteinů jsme využívali vertikální SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézu (SDS-PAGE). Analyzovaný vzorek jsme před nanesením inkubovali s SDS vzorkovým pufrem (0,125 M Tris, pH 6.8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% β-merkaptoethanol; 0,02% bromfenolová modř) 3 minuty při 100°C. Elektroforéza probíhala v SDS elektrodovém pufru (25 mM Tris; 200 mM glycin; 0,1% SDS) při 50 mA. Používali jsme 12% separační gel a 4% zaostřovací gel.

Tab. 3.1 Složení gelů na SDS-PAGE

	12% separační gel	4% zaostřovací gel
30% akrylamid+1% bisakrylamid	5,6 ml	530 µl
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	3,5 ml	-
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	-	1 ml
10% SDS	140 µl	40 µl
voda	4,7 ml	2,6 ml
TEMED	14 µl	5 µl
10% APS	140 µl	40 µl

3.2.3.5 Barvení proteinů v separačním gelu

Proteiny v gelu jsme barvili 30 minut barvícím roztokem Coomassie blue (45% methanol, 10% kyselina octová, 0,1% Coomassie blue R-250) a gel odbarvili promýváním v odbarvovacím roztoku (20% methanol, 10% kyselina octová).

3.2.3.6 Přenos proteinů na membránu (Western přenos)

Proteiny rozdělené pomocí SDS-PAGE byly přeneseny na PVDF (polyvinylidenfluoride) membránu Immobilon-P (Millipore) pomocí přístroje The Panther Semi-Dry Electroblotter (Owl Scientific). Při sestavování aparatury jsme se řídili pokyny výrobce. Přenos probíhal přes noc v přenosovém pufru (39 mM glycin; 48 mM Tris; 0,0375% SDS; 20% methanol) za podmínek stanovených výrobcem (0,8 A/cm^2 membrány).

3.2.3.7 Imunodetekce

Imunodetekce s protilátkou proti histidinové kotvě

Pro imunodetekci epitopem značených proteinů jsme použili monoklonální myší protilátku proti histidinové kotvě konjugovanou s křenovou peroxidázou (Sigma). PVDF membránu s imobilizovanými proteiny jsme opláchli roztokem TBS-T (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,05% Tween-20; pH 7,6) a 30 min inkubovali v pufru TBS-T s 5% BSA při pokojové teplotě (vysycení membrány v místech, kde nebyly přítomny proteiny). Poté jsme membránu inkubovali 2 hodiny s protilátkou za pokojové teploty (protilátka byla naředěna 10 000 x v pufru TBS-T). Nenavázanou protilátku jsme odmyli promytím 3 x 10 minut pufrem TBS-T. Po promytí membrány jsme provedli detekci pomocí komerční soupravy Super Signal Chemiluminescent Substrate (Pierce) podle pokynů výrobce.

Imunodetekce s protilátkou proti fosforylovanému threoninu

Pro imunodetekci proteinů fosforylovaných na threoninu jsme použili primární králičí polyklonální protilátku proti fosfothreoninu (Cell Signaling) a sekundární protilátku proti králičím IgG konjugovanou s křenovou peroxidázou (Cell Signaling).

Od předchozího postupu se imunodetekce lišila následovně: Membránu jsme inkubovali s primární protilátkou přes noc ve 4°C (protilátka byla naředěna 2000 x v pufru TBS-T). Nenavázanou protilátku jsme odmyli promytím 3 x 10 minut pufrem TBS-T a následovala 1 hodinová inkubace membrány se sekundární protilátkou (ředěna 2000 x v pufru TBS-T). Po promytí membrány 3 x 10 minut pufrem TBS-T jsme provedli detekci shodným způsobem.

3.3 Metody – Studium delečního mutanta *ΔpppA-ppkA*

3.3.1 Oligonukleotidy

Pro každý oligonukleotid je v tabulce 3.2 uveden jeho název, sekvence, případně přítomnost restrikčního místa (podtrženo v sekvenci). Oligonukleotidy jsou seřazeny podle konkrétního použití. Čísla použitá pro strukturu operonu odpovídají číslování reakcí v textu. Pro Real-time PCR jsou uvedeny také názvy odpovídajících genů. Všechny oligonukleotidy byly syntetizovány firmou VBC-GENOMICS (Vídeň).

Tab. 3.2: Seznam použitých oligonukleotidů při studiu mutanta *ΔpppA-ppkA*

Oligonukleotid	Sekvence 5´→3´ (restrikční místo je podtrženo)	Endonukleáza
Delece		
PPPA01F	CGCTCTAGAAGCGCCTTCAACCCCTTCAA	*Xba*I
PAK02R	GTTGGCTGGATCCATCCTGTAGTAGCTGACTGAGTT	*Bam*HI
PAK03F	AGGATGGATCCAGCCAACTGGGTCCGGTTC	*Bam*HI
PPKA4R	CGTGGTACCGATGTCCTCGGCACGGTAG	*Kpn*I
Gm-up	5′-TGG AGC AGC AAC GAT GTT AC-3′	
Gm-down	5′-TGT TAG GTG GCG GTA CTT GG-3′	
Komplementace		
PPPAinfpUCF	ATTCGATCATGCATGAGCTCGCGCCAGCCACTGGT	*SacI*
PPKAinfpUCR	CAAGGCCTTCGCGAGGTACCCTGGGGCCGACGATG	*KpnI*
Promotorové fúze		
pro77F2	GAAGATCTCGACCGCCTTTCGCAATACC	*BglII*
pro77R	GCTCTAGAGTCCGGCGCGCTGACCT	*XbaI*
pro76F	GAAGATCTGAGCTCAAGCCGGTGACCAT	*BglII*
pro76R	GCTCTAGAGCCGTAGAAACCGACGCTGT	*XbaI*
pro73F	GAAGATCTCGACCGTGACCTGACCAACC	*BglII*
PPKAcom2RXbaI	GCTCTAGATGCGGGCGACCTCGTGCAG	*XbaI*
FRTFBglII+	GTGCCCAACTCAGATCTAGCTACTACAGG	*BglII*
PPKAcom2RPstI	AACTGCAGTGCGGGCGACCTCGTCCAG	*PstI*
Struktura operonu		
1. PPKA01F	CGCTCTAGACCCAACTCAGTCAGCTACTA	
PPPA04R	CTCGAATTCGTCCTTGGCCAGCAACTG	
2. PA0074trF	GACCGTGACCTGACCAACC	
PPKA6R	GAATCATCTCGACGCTCAG	
3. PA0074trF	GACCGTGACCTGACCAACC	
PA0073rtR	CCGGTTTCTTGTCCAGCT	
4. PA0073rtF	TCGAGTTCCTCGATGTGC	
PPKA6R	GAATCATCTCGACGCTCAG	
5. PA0073startF	ATGATCCTGCGCCTGCAC	
PA0073stopR	TCAGCCAACTTCCTCGAG	
6. PPKA5F	GGTTCGAACAGGTCGAGA	
PPKA02R	CGACAGTGGATCCATTTCGATGTCGAATCCCGGAAG	
7. PPPA01F	CGCTCTAGAAGCGCCTTCAACCCCTTCAA	
PPKA02R	CGACAGTGGATCCATTTCGATGTCGAATCCCGGAAG	
8. PA0077F	GCACCGTGGACAAGCTCAAG	
PPKA02R	CGACAGTGGATCCATTTCGATGTCGAATCCCGGAAG	

9. PA0078F	GACCGCCTTTCGCAATACCT	
PA0077R	GCGGGAAGCCGTAGACCAG	
Real-time PCR	**Sekvence 5´→3´**	**Gen**
PA1LF	TATCTACAATCCGGGCGATG	PA2570 (*pa1l*)
PA1LR	GACCAGCGCACCACAAAA	
PPRBF	CCGCCGACTACTACCAGAAA	PA4296 (*pprB*)
PPRBR	CGTGGCTCAGGCTCAACT	
PRPLF	TCTACAACACCACCCAGTGC	PA4175 (*prpL*)
PRPLR	GGAGTGCGCTTGAGTTCC	
LASBF	TCGACATGAACAGCAGCAC	PA3724 (*lasB*)
LASBR	CCCGGTACAGTTTGAACACC	
RPOSF	GAACGGGTGACTTCGGTAGA	PA3622 (*rpoS*)
RPOSR	GATGCTTTCGCTGAGATCGT	
PQSAF	CAATACACCTCGGGTTCCAC	PA0996 (*pqsA*)
PQSAR	AATCGAATACAGCCGGTCTC	
PHNAF	GGCCTATCGCCAGTTGTG	PA1001 (*phnA*)
PHNAR	GACTCTCCGCGTCGTACTTC	
CYOAF	GCTGGACTGGAAGTGGTTGT	PA1317 (*cyoA*)
CYOAR	GAATCCGAGGTGATCTGGAA	
CYSBF	GACTGCTGGAGGACGAACTG	PA1745 (*cysB*)
CYSBR	GCGATCTGCTTGATGCTCTC	
4139F	GTCGATGTGGTCAAGGTGTC	PA4139
4139R	AGTTGATGGATGGGGGTCAG	
PA1127F	AGCAACTATTCGCCGGAAC	PA1127
PA1127R	GTAGGCCAGCACGACGAT	
PA4764furF	GGTGCGTCACAACTTCGAT	PA4764 (*fur*)
PA4764furR	ATTTCCGCATCCATGAACTC	
PA4227PchRF	GGCTTTCGCAAGGTGTTC	PA4227 (*pchR*)
PA4227PchRR	GAGACATTCGCCTCTTCGTC	
PA2384F	CGTCAAACAGATGTTGAAGGAG	PA2384
PA2384R	CGTACCGGTTTCGGAGAG	
PA4471fagAF	CGAGAAAGCCTACAACCTCCT	PA4471 (*fagA*)
PA4471fagAR	GTCGCTGAAGTTCGCAGAG	
PA3617recAF	TGCCTGGTCATCTTCATCA	PA3617 (*recA*)
PA3617recAR	CTCGTCGCCTTCCTTCAC	
PA3007lexAF	GATCCTCGCCGAACAGAA	PA3007 (*lexA*)
PA3007lexAR	GCCGATGTCCTTCATGCT	
PA5360phoBF	CACTTCCGGCATCGAACT	PA5360 (*phoB*)
PA5360phoBR	CCCTGGATCTTGTTGTCCTC	
PA2165F	CCACGAAAGCATGGAGTTC	PA2165
PA2165R	CGTATTCCGGGGTAGTGATT	
PA0073rtF	TCGAGTTCCTCGATGTGC	PA0073
PA0073rtR	CCGGTTTCTTGTCCAGCT	
PA0072rtF	TACGTCTGCTGGGCTTCC	PA0072
PA0072rtR	GTTGTCGAACAGGTGGTTCA	
PA0074ppkAFrt	CGCAACAACACCGACAAG	PA0074 (*ppkA*)
PA0074ppkARrt	TGAACGAGTGGCTGGAGA	
PA0075pppAFrt	GGACCACAGCTACGTCCAG	PA0075 (*pppA*)
PA0075pppAR	GGCTTCCGACAGTTCCAG	

3.3.2 Konstrukce delečního mutanta *ΔpppA-ppkA*

Příprava plazmidového konstruktu pro deleci *pppA-ppkA*

Mutageneze pomocí crossover PCR (103) byla použita pro přípravu fragmentů DNA komplementárních k 5' konci genu *pppA* a 3' konci genu *ppkA* a jejich následnému spojení. V prvním kroku jsme s použitím oligonukleotidů PPPA01F a PAK02R amplifikovali fragment PCR1 dlouhý 800 bp odpovídající oblasti před genem *pppA* s krátkou počáteční sekvencí genu *pppA* a pomocí oligonukleotidů PAK03F, PPKA4R fragment PCR2 dlouhý 1035 bp odpovídající oblasti za genem *ppkA* s krátkou koncovou sekvencí genu *ppkA*. Oligonukleotidy PAK02R a PAK03F byly navrženy tak, že jejich přesahující 5' oblasti jsou k sobě navzájem komplementární a obsahují restrikční místo pro *BamHI*. V druhém kroku jsme oba vzniklé fragmenty použili jako templát v PCR reakci a spojili je pomocí oligonukleotidů PPPA01F a PPKA4R dohromady. Vzniklý fragment obsahuje počáteční sekvenci genu *pppA* a koncovou sekvenci genu *ppkA* spojené krátkou sekvencí. Oligonukleotidy byly navrženy tak, aby nedošlo k posunu čtecího rámce na konci genu *ppkA.*

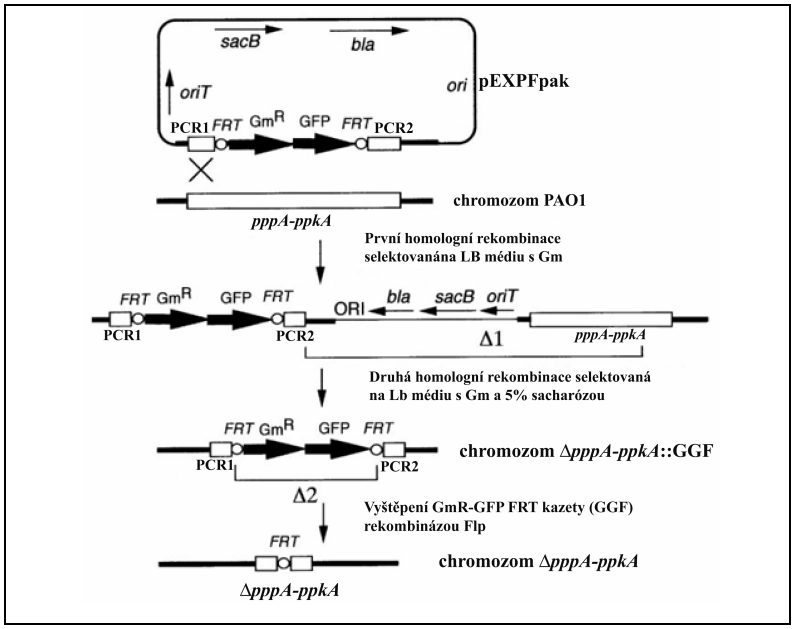
Fragment DNA vytvořený crossover PCR jsme klonovali pomocí restrikčních míst *XbaI* a *KpnI* do vektoru pEX18Ap. Celý systém (66) je navržen tak, že umožňuje vznik neznačených mutantů, jejichž chromozomální DNA nenese nadbytečnou cizorodou genetickou informaci v podobě selekčních genů. Pomocí restrikčního místa *BamHI* uvnitř PCR fragmentu byla do nově vzniklého vektoru vložena kazeta Gm^R-GFP FRT (GGF) o velikosti 1800 bp. Kazeta pochází z vektoru pPS858 a obsahuje gen pro gentamicinovou rezistenci a gen pro zelený fluorescenční protein GFP (Green fluorescent protein). Na okrajích kazety jsou FRT (Flp recombinase target) místa rozeznávaná s vysokou frekvencí rekombinázou Flp.

Příprava neznačené delece v chromozomu *P. aeruginosa*

Vytvořený plazmid pEXPF*pak* jsme elektroporovali do buněk *P. aeruginosa* PAO1 a buněčnou suspenzi jsme vyseli na LB plotny s gentamicinem. Po vnesení plazmidu do *P. aeruginosa* dojde k homologní rekombinaci mezi okolím deletovaných genů na chromozomu *P. aeruginosa* a homologní oblastí na plazmidu (schéma na obr. 3.3.1). Pro odstranění merodiploidů jsme jednotlivé kolonie přečárkovali na LB plotny s gentamicinem a 5% sacharózou. Pro merodiploidní klony obsahující plazmid s genem *sacB* je sacharóza toxická. Vyštěpení plazmidových sekvencí jsme ověřili přečárkováním

kolonií s fenotypem Gm^R, Sac^R paralelně na LB plotny s gentamicinem a LB plotny s karbenicilinem. Klony, u nichž došlo ke ztrátě plazmidové sekvence, na agaru s karbenicilinem neporostou. Získané klony *ΔpppA-ppkA*::GGF (Gm^R, Cb^S, Sac^R) jsme elektroporovali plazmidem pFLP2 nesoucím gen pro rekombinázu Flp, gen *sacB* a *bla*. Transformanty jsme vyseli na LB plotny s karbenicilinem. Rekombináza Flp katalyzuje vyštěpení kazety GGF, v genomu zůstávají pouze FRT místa.

Vyštěpení kazety z genomu kmene *ΔpppA-ppkA* jsme testovali přečárkováním kolonií paralelně na LB plotny a LB plotny s gentamicinem. Pro selekci klonů bez plazmidu pFLP2 jsme přečárkovali Gm^S kolonie na LB plotny s 5% sacharózou. Ztrátu plazmidu jsme ověřili přečárkováním Sac^R kolonií paralelně na LB plotny a LB plotny s karbenicilinem. Ztrátu plazmidu jsme ověřili izolací plazmidu a následnou elektroforetickou analýzou. Ztrátu GGF kazety jsme ověřili PCR s oligonukleotidy Gm-up a Gm-down komplementárními ke genu pro gentamicinovou rezistenci. Vznik deleční mutace jsme potvrdili PCR a analýzou pomocí Southernova přenosu.



Obr. 3.3.1: Schematické znázornění vzniku neznačené delece genů *pppA-ppkA*. Popis v textu. Převzato z Hoang *et al.*, (66) a upraveno.

3.3.3 Komplementace

Ke komplementaci jsme využili vektor pUC18-mini-Tn7T-LAC umožňující integraci mini-Tn7 kazety s *tac* promotorem a vnesenými geny do unikátního *att*Tn7 místa v chromozomu *P. aeruginosa* (26).

PCR reakcí s oligonukleotidy PPPAinfpUCF a PPKAinfpUCR jsme amplifikovali DNA fragment dlouhý 4,116 Kbp odpovídající genům *pppA-ppkA*. Pomocí restrikčních míst pro *SacI* a *KpnI* jsme PCR fragment klonovali do vektoru pUC18-mini-Tn7T-LAC. Vzniklý plazmid pUC18-mini-Tn7T-LACpak umožňující expresi genů *pppA-ppkA* z *tac* promotoru jsme elektroporovali do buněk *P. aeruginosa ΔpppA-ppkA* spolu s pomocným vektorem pTNS2 kódujícím podjednotky transpozázy TnsABCD. Inzerce segmentu mini-Tn7T-LACpak jsme ověřili PCR a gen pro gentamicinovou rezistenci vyštěpili rekombinázou Flp po elektroporaci plazmidu pFLP2 do buněk kmene Δ::tn7TLAC-Gm-pak. Selekce klonů Gm^S a selekce na ztrátu plazmidu pFlp2 probíhali stejně jako v předchozí kapitole. Stejně jsme postupovali i při přípravě kontrolních kmenů - modifikovaného divokého kmene PAO1::tn7TLAC a mutantního kmene Δ::tn7TLAC s vloženými prázdnými kazetami mini-Tn7T-LAC. Inzerce byly ověřeny PCR a analýzou pomocí Southernova přenosu.

3.3.4 Promotorové transkripční fúze

Příprava promotových fůzí

Z chromozomální DNA *P. aeruginosa* PAO1 a *ΔpppA-ppkA* jsme v PCR reakci amplifikovali příslušnými oligonukleotidy odpovídající promotorovou oblast. PCR fragment o uvedené délce jsme pomocí znázorněných restrikčních míst klonovali do vektoru pMP220 před gen *lacZα* pro β-galaktosidázu bez vlastního promotoru a získali odpovídající plazmidy s promotorovými fúzemi (vše přehledně uvedeno v tabulce 3.3).

Tab. 3.3: Klonování promotorových oblastí genů do vektoru pMP220

oligonukleotidy	promotorová oblast genu	délka v bp	endonukleáza	vzniklý plazmid
pro77F2/pro77R	PA0077	885	*BglII, XbaI*	pMP77
pro76F/pro76R	PA0076	398	*BglII, XbaI*	pMP76
pro73F/PPKAcom2RXbaI	PA0073	500	*BglII, XbaI*	pMP73
FRTFBglII+/PPKAcom2RPstI	ΔPA0073	239	*BglII, PstI*	pMPΔ73

Připravené plazmidy jsme elektroporovali do buněk divokého a mutantního kmene a transformanty selektovali na LB plotnách s tetracyklinem. Jako negativní kontrolu jsme použili divoký a mutantní kmen s vloženým vektorem pMP220, jako pozitivní kontrolu kmeny s plazmidem pRPO220B nesoucí funkční promotor genu *rpoS*. Kmeny jsme testovali na přítomnost funkčního promotoru měřením β-galaktosidázové aktivity.

Měření β-galaktosidázové aktivity

Bakteriálními kulturami rostlými přes noc v minimálním M9 médiu s tetracyklinem jsme očkovali 15 ml M9 média na počáteční OD_{600} = 0,05 a kultivovali v 37ºC do OD_{600} = 0,8. Odebrali jsme 30 μl kultury a ke zbývající kultuře přidali H_2O_2 ve finální koncentraci 10 mM a inkubovali 15 min. Po inkubaci jsme opět odebrali 30 μl kultury a změřili OD kultury. Odebrané vzorky jsme ihned pipetovali do předem připravených zkumavek, které obsahovaly 80 μl permeabilizačního roztoku (60 mM Na_2HPO_4; 40 mM NaH_2PO_4; 10 mM KCl; 1 mM $MgSO_4$; 0,3% β-merkaptoethanol; pH 7,0), 10 μl chloroformu a 5 μl 0,1% SDS a okamžitě promíchali (vortex). Vzorky jsme poté inkubovali 5 min ve 28ºC stejně jako substrátový roztok (ONPG 1mg/ml v roztoku 60 mM Na_2HPO_4; 40 mM NaH_2PO_4; pH 7,0). K vzorku jsme pak přidali 600 μl substrátového roztoku, promíchali a inkubovali v 28ºC do zežloutnutí (30-90 min). Poté jsme reakci zastavili přidáním 700 μl stopovacího roztoku (1 M Na_2CO_3), promíchali (vortex) a zapsali dobu trvání reakce. Vzorky jsme centrifugovali 5 minut při 13 000 **g**, supernatant odebrali a měřili OD při 420 nm a 550 nm.

Aktivitu β-galaktosidázy v Millerových jednotkách jsme spočítali podle následujícího vzorce:

$$1000\frac{OD_{420}-(1,75\cdot OD_{550})}{OD_{600}\cdot \text{objem vzorku (ml)}\cdot \text{čas reakce (min)}}$$

3.3.5 Izolace RNA *P. aeruginosa*

Všechny kmeny *P. aeruginosa* (PAO1, *ΔpppA-ppkA*, komplementační kmeny) byly pěstovány v minimálním médiu M9 s glukózou do OD_{600} = 0,8. V případě sledování vlivu oxidativního stresu byl ke kulturám po dosažení OD_{600} = 0,8 přidán H_2O_2 na konečnou koncentraci 10 mM po dobu 15 minut. Výchozí množství kultury pro izolace RNA bylo 4 ml.

Z každého kmene byly vždy izolovány tři nezávislé replikáty celkové RNA pomocí komerční soupravy RNeasy Mini Kit (QIAGEN) s degradací DNA pomocí RNase-Free DNase Set (QIAGEN). Postupovali jsme vždy podle návodu výrobce (RNAprotect® Bacteria Reagent Handbook, Qiagen). DNA byla degradována ještě dodatečně po izolaci RNA pomocí RNase-Free DNase Set a přečištěna pomocí RNeasy Mini Kit. Izolovaná RNA byla uchovávána v -80ºC.

Koncentraci RNA jsme určili měřením absorbance při 260 nm. Měřením poměru absorbancí OD_{260}/OD_{280} jsme dále ověřili i čistotu izolované RNA. Kvalitu izolované RNA

jsme analyzovali elektroforézou v 1,5% agarózovém gelu: 5 µg RNA jsme rozpustili ve vzorkovém pufru (50 mM EDTA; 2% sarkosyl; 60% glycerol; 0,05% bromfenolová modř) a separovali při napětí 5 V/cm. Kvalitu RNA (míru degradace) jsme posuzovali podle ribozomálních 23S a 16S-rRNA.

3.3.6 Affymetrix GeneChip microarrays

Pro srovnání transkriptomů *P. aeruginosa* jsme použili komerční genové čipy firmy Affymetrix (Pseudomonas GeneChip). Od každého kmene a podmínek byly použity vždy dva nezávislé replikáty celkové RNA. Pro každý vzorek bylo vždy 10 µg celkové RNA použito na syntézu cDNA, fragmentaci a značení podle protokolu Affymetrix GeneChip *P. aeruginosa* Genome Array Expression Analysis (Affymetrix). Stručně, náhodné hexamerní oligonukleotidy (konečná koncentrace 25 ng/µl, Invitrogen) byly přidány k celkové RNA spolu s *in vitro* syntetizovanými kontrolními transkripty *Bacillus subtilis*, jak je popsáno v protokolu Affymetrix GeneChip *P. aeruginosa* Genome Array Expression Analysis. cDNA byla syntetizována pomocí Superscript II (finální koncentrace 25 U/µl, Invitrogen) podle návodu výrobce za následujících podmínek: 25°C 10 min, 37°C 60 min, 42°C 60 min a 70°C for 10 min. RNA byla odstraněna inkubací s NaOH a následnou neutralizací. cDNA byla přečištěna pomocí soupravy GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix) a byla vymyta 12 µl pufru EB. cDNA byla fragmentována DNázou I (0,6 U na µg cDNA, Amersham) ve 37°C 10 min a poté koncově značena biotin-ddUTP pomocí GeneChip® DNA Labelling Reagent (Affymetrix) v 37°C po dobu 60 min. Správná fragmentace cDNA a biotinové značení byly ověřeny zkouškou posunu pohyblivosti v gelu (gel mobility shift assay) provedenou s NeutrAvadinem (Pierce) následovanou elektroforézou v 4-20% Tris-Borate gelu a následným barvením DNA SYBR gold (Invitrogen). Vzorky fragmentované značené cDNA byly hybridizovány na array a skenovány na skeneru Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G.

3.3.7 Analýza dat získaných z DNA microarrays

Hrubá data (soubory CEL) byla importována do statistického programu R (140) a normalizována pomocí metody GCRMA (75). Normalizovaná data byla testována na rozdíly v expresi pomocí t-testu (moderated t-test, limma package (164), the Bioconductor repository (50)). Hodnoty raw P value byly korigovány pomocí Benjamini & Hochberg

metody (11). Data z DNA microarrays byla uložena do databáze ArrayExpress s přístupovým kódem E-MEXP-3117.

3.3.8 Reverzní transkripce

cDNA byla amplifikována z templátu RNA pomocí reverzní transkriptázy ImProm-II™ (Promega) dle pokynů výrobce. 1 μg celkové RNA jsme smíchali s 0,5 μg náhodných oligonukleotidů (Random Primers, Invitrogen), doplnili vodou do 5 μl, inkubovali 5 min při 70ºC a poté ochladili 5 min na ledu. K reakční směsi jsme přidali 4 μl 5x koncentrovaného reakčního pufru, 2,4 μl 25 mM $MgCl_2$, 1 μl 10 mM dNTP, 1 μl RNaseOUT (1u/μl, Invitrogen), 1 μl ImProm-II™ reverzní transkriptázy a vodou doplnili do 20 μl. Hybridizace oligonukleotidů probíhala 5 min při 25ºC, následovala reverzní transkripce 1 hod při 42ºC a reakce byla ukončena inkubací při 70ºC 15 min. Jako negativní kontrola sloužila totožná reakce bez přidané reverzní transkriptázy.

K ověření čistoty (nepřítomnosti kontaminující DNA) použité RNA a testu oligonukleotidů pro následnou Real-time PCR jsme provedli kontrolní PCR reakci. Reakci z reverzní transkripce obsahující cDNA i kontrolní reakci bez reverzní transkriptázy jsme shodně ředili tak, aby jsme získali 15 ng/μl cDNA. 1 μl ředěné reakční směsi obsahující cDNA nebo 1 μl reakční směsi z reakce bez přidané reverzní transkriptázy jsme smíchali s 1 x *Taq* pufrem bez $MgCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 0,2 mM mixem dNTP, 0,5 μM oligonukleotidy a 1U *Taq* polymerázy. Počáteční denaturace probíhala 3 min při 95ºC. V následujících 40 cyklech došlo k amplifikaci cDNA (denaturace 95ºC 30 vteřin, hybridizace oligonukleotidů při 60ºC 25 vteřin, elongace při 72ºC 25 vteřin). Závěrečná elongace probíhala 5 min při 72ºC.

3.3.9 Kvantitativní PCR v reálném čase (Real-time PCR)

Metodu kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR) jsme použili jednak k ověření dat získaných analýzou transkriptomu a dále k ověření vlivu komplementace delece genů *pppA-ppkA* na expresi vybraných genů. Experimenty jsme provedli ve speciálním termocykleru iCycler® thermal cycler s iQ5 Real-time PCR detekčním systémem, Bio-Rad.

K ověření dat získaných analýzou transkriptomu jsme pro reverzní transkripci použili stejné RNA, které jsme izolovali z kultur divokého kmene a mutanta pro účely analýzy transkriptomu spolu s třetími replikáty izolovaných vzorků RNA.

Oligonukleotidy na qRT-PCR jsme pro vybrané geny navrhli pomocí internetové aplikace Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) a programu Primer select (Lasergene). Důležitá kritéria byla: (i) teplota tání mezi 58-60°C, (ii) délka mezi 18 – 30 bp a (iii) maximální velikost PCR produktů 100 – 150 bp. Seznam použitých oligonukleotidů, včetně jejich sekvencí je uveden v kapitole 3.3.1 Oligonukleotidy, tabulka 3.2.

Ke kvantitativnímu stanovení exprese vybraných genů *P. aeruginosa* jsme použili komerční soupravu SybrGreen JumpStart Taq Ready Mix (Sigma), která obsahovala (a) PCR mix složený z fluorescenční barvy SybrGreen I, DNA polymerázy, deoxyribonukleotidů a reakčního pufru. Do této PCR reakční směsi jsme již pouze přidali 0,2 µl fluorescein calibration dye (BIO-RAD), příslušnou cDNA (15 ng) a odpovídající oligonukleotidy v konečné koncentraci 0,5 µM. Celkový objem PCR reakce byl 20 µl. Amplifikace DNA probíhala podle následujícího protokolu: (i) počáteční denaturace 95°C, 3 min; (ii) tříkroková sestava složená z denaturace 95°C 30 s, připojení primerů 60°C 25 s a prodlužování řetězce 72°C 25 s, celkem 40 opakování a (iii) závěrečná analýza teplot tání produktů: 95°C 1 min, 55°C 30 s a 95°C 30 s.

Pro každý templát byla PCR reakce pro testovaný gen provedena v triplikátech. Negativní kontrola (PCR reakce bez předchozí reverzní transkripce) byla pro každý gen provedena v duplikátech. Referenční fluorescein umožnil normalizovat fluktuace fluorescence, které nebyly spojeny s vlastní PCR amplifikací (rozdíly v celkových objemech, množství cDNA nebo účinnosti PCR). Specifitu PCR produktů jsme na závěr ověřili analýzou disociačních křivek (teplot tání). Získaná data jsme analyzovali pomocí software iQ™5 Optical System Software Version 2.0.

Změny exprese jsme vyhodnotili metodou relativní kvantifikace, která umožňuje zjistit, zda a jak moc se liší hladina exprese sledovaného genu v mutantním versus divokém kmeni. Jako referenční gen, jehož úroveň exprese je neměnná během celého životního cyklu a shodná u divokého kmene a mutantů za všech testovaných podmínek, jsme vybrali gen *proC* (PA0393) kódující pyrrolin-5-karboxylátreduktázu, která se účastní metabolismu prolinu. Tento gen byl vybrán jako jeden z nejvhodnějších ve studii autorů Savli *et al*., (151). Použití referenčního genu pro normalizaci získaných dat umožnilo sjednotit množství cDNA vnesené do PCR reakce pro všechny testované vzorky. Poměrnou expresi vybraných genů jsme stanovili podle Pfaffla (135). Výsledky vyjadřují, kolikrát je exprese genu v mutantním kmeni zvýšena nebo snížena vzhledem k expresi téhož genu v divokém kmeni.

3.3.10 Sledování produkce a kvantifikace virulenčních faktorů

Produkce virulenčních faktorů na specifických pevných půdách

Produkce virulenčních faktorů na pevných půdách byla srovnávána po inokulaci 1 kolonie divokého kmene a mutanta v podobě dlouhé čáry na 1 misku (degradace elastinu – půda s elastinem, degradace kaseinu – půda s kaseinem, produkce pyoverdinu – KING agar B base, produkce pyocyaninu – Pseudomonas P agar, produkce hemolyzinů – komerční krevní agar). SW blue agar pro produkci rhamnolipidů jsme inokulovali 1 kolonií ve formě malého kolečka uprostřed misky, pro každý kmen na zvláštní misku. Swarm agar pro test pohybu swarming jsme inokulovali vpichem párátka do středu misky, pro každý kmen zvláštní misku. Swarming jsme testovali na médiu s histidinem a na médiu s glutamátem. Inokulované misky byly inkubovány následovně: půda s elastinem, půda s kaseinem – 72 h, 37ºC; KING agar B base – 72 h, 22ºC; Pseudomonas P agar – 7 dní, 37ºC; SW blue agar - 22ºC, do vytvoření zóny; swarm agar – 24 h, 37ºC; krevní agar – 24 h, 37ºC.

Kvantifikace alginátu

Izolaci alginátu jsme prováděli podle Ma *et al*., (106), produkci jsme testovali na LB agaru. Kultury narostlé přes noc v LB médiu jsme ředili na OD_{600}= 0,1 a 150 μl vyseli na LB plotny. Po 48 hodinách jsme z misek buňky seškrabali v 5 ml 0,85% NaCl a ještě jednou opláchli 5 ml. Oplachy jsme spojili a řádně promíchali (vortexovali). Vzorky byly centrifugovány při 12 000 **g** 30 min, supernatant byl odebrán stranou a pelety znovu promyty 5 ml 0,85% NaCl. Následovala znovu centrifugace (12 000 **g** 30 min), supernatant byl spojen se supernatantem z předchozího kroku a bakteriální pelety byly vysušeny pro stanovení hmotnosti. K supernatantu bylo přidáno 10 ml 2% cetylpyridinium chloridu (Sigma) a vysrážený alginát byl centrifugován při 12 000 **g** 10 min. Vzniklá peleta alginátu byla rozpuštěna v 10 ml 1 M NaCl a alginát byl srážen přidáním 1 V ledového (-20ºC) isopropanolu 2 hod v -20ºC. Následovala centrifugace 12 000 **g,** 10 min při 4ºC, isopropanol jsme odsáli a peletu vysušili. Alginát jsme rozpustili v 2 ml 0,85% NaCl.

Množství alginátu jsme stanovovali Karbazolovou metodou dle May *et al*., (111): 70 μl alginátu jsme pipetovali na povrch 600 μl ledového roztoku BK (100 mM K_3BO_3 v H_2SO_4), krátce promíchali a udržovali na ledu. K vzorkům jsme pipetovali 20 μl 0,1% roztoku karbazolu (0,1% karbazol v EtOH), promíchali a ihned znovu chladili na ledu. Poté jsme směs inkubovali 30 min v 55ºC pro vyvinutí barevné reakce. Měřili jsme

absorbanci při 530 nm a množství alginátu vztáhli ke kalibrační křivce kyseliny algové (0 – 100 μg/ml) z *Macrocystis pyrifera* (Sigma).

Kvantifikace pyocyaninu

Pigment pyocyanin jsme izolovali a kvantifikovali dle Gallagher a Manoil (47). Kultury narostlé přes noc v LB médiu při 37ºC jsme ředili na OD_{600}= 0,1 a 150 μl vyseli na LB plotny o průměru 5,5 cm obsahující 8 ml LB agaru. Kultury jsme nechali růst 24, 48 a 72 h. V daný čas jsme agar s narostlou kulturou rozkrájeli, přemístili do skleněných zkumavek a pyocyanin extrahovali 3 hodiny ve 4 ml chloroformu za mírného třepání. Extrahovaný pyocyanin jsme slili do nové zkumavky a přidali jsme 1 ml 0,2 M HCl. Pyocyanin jsme extrahovali do HCl protřepáním, vzorky jsme centrifugovali při 9 000 **g**, 10 min a koncentrace pyocyaninu byla stanovena měřením absorbance při 520 nm (extinkční koeficient pyocyaninu $Є1^{1\%}$ = 17,072; koncentrace pyocyaninu c = OD_{520}/Є·d; d = 1 cm; c = OD/17,072). Koncentrace pyocyaninu byla vztažena k bakteriální sušině, pro kterou byly buňky sklizeny z paralelních ploten ve stanovených časech.

3.3.11 Stresové experimenty *in vitro*

Citlivost k oxidativnímu stresu

Bakteriální kultury rostlé přes noc v LB médiu při 37ºC byly ředěny v LB médiu na OD_{600} = 0,01 (10^7 CFU/ml). K takto ředěným kulturám byl přidán H_2O_2 na finální koncentraci 1 mM, 10 mM, 25 mM, 30 mM, 40 mM a 50 mM a buňky byly inkubovány za třepání v 37ºC po dobu 1 hodiny. Alikvoty kultur byly v triplikátech vysety na LB plotny před a po působení stresu pro stanovení počtu přeživších bakterií a výsledky byly vyjádřeny v procentech přežití.

Citlivost k osmotickému stresu

Bakteriální kultury rostlé přes noc v LB médiu při 37ºC byly ředěny v LB médiu na OD_{600} = 0,01 (10^7 CFU/ml). K ředěným kulturám byl přidán NaCl na finální koncentraci 1,3 M, 1,6 M, a 2 M a kultury byly inkubovány za třepání v 37ºC po dobu 16 hodin. Alikvoty kultur před a po působení stresu byly vysety v triplikátech na LB plotny pro stanovení přeživších bakterií a výsledky byly vyjádřeny v procentech přežívání.

3.3.12 Měření minimální inhibiční koncentrace (MIC)

Antibiotické gradientové plotny

Antibiotické gradientové plotny jsme použili pro první odhad rezistence testovaných kmenů k daným antibiotikům.

Na Petriho misku 12x12cm jsme nanesli 50 ml LB média s daným antibiotikem a nechali šikmo ztuhnout tak, že na horním okraji misky je vrstva média téměř nulová. Ztuhlou vrstvu s antibiotikem jsme převrstvili 50 ml LB média a nechali ztuhnout již vodorovně. Misku s médiem jsme vysušili, obrátili dnem vzhůru a antibiotikum nechali 3 hodiny difundovat. Antibiotika byla použita v následujících koncentracích: chloramfenikol 0 – 400 μg/ml, karbenicilin 0 – 150 μg/ml, pefloxacin 0 – 2 μg/ml, tetracyklin 0 – 25 μg/ml a trimetoprim 0 – 100 μg/ml. Bakteriální kmeny jsme napěstovali v LB mediu do OD_{600} = 0,2 - 0,3 a vatovým tampónem nanesli na misku po směru gradientu (vždy ve 4 vrstvách). Takto naočkovanou misku jsme inkubovali do druhého dne v 37ºC a porovnali jednotlivé nárůsty.

Stanovení MIC

Pro měření MIC jsme použili metody měření profilu populační analýzy dle Filipe a Tomasz (42). 10 ml média LB jsme inokulovali kulturou *P. aeruginosa* a nechali růst do OD_{600} = 0,2 - 0,3. Kulturu jsme naředili v tomtéž médiu a ředění 10^{-5} a 10^{-6} jsme vyseli na plotny s příslušnou koncentrací antibiotika. Karbenicilin jsme používali nejprve v koncentraci 30; 40; 50; 60; 70 a 80 μg/ml, po zjištění rozdílu mezi divokým kmenem a mutantem jsme pro divoký kmen použili koncentrace 27; 30; 33; 36; 39 a 42 μg/ml a pro mutanta 70; 73; 76; 79; 82 a 85 μg/ml. Chloramfenikol jsme použili nejprve v koncentraci 0; 10; 20; 30; 40; 50 a 60 μg/ml. Po zjištění rozdílů mezi oběma kmeny jsme použili koncentrace pro divoký kmen 20; 22,5; 25; 27,5 a 30 μg/ml a pro mutanta 50; 52,5; 55; 57,5 a 60 μg/ml. Plotny jsme kultivovali 18 - 20 hod ve 37°C a sledovali bakteriální nárůst. Minimální inhibiční koncentrace byla stanovena jako první koncentrace antibiotika, na které již bakteriální kultura nenarostla.

3.3.13 Stanovení přežívání v myších makrofázích (baktericidní zkouška)

Myší makrofágy J774 jsme kultivovali v D-MEM médiu (Dulbecco´s modified Eagle´s medium, ÚMG AV ČR) s 0,2% glukózou, 5 mM glutaminem a 5% fetálním

hovězím sérem (Sigma) v atmosféře s 5% CO_2 při 37ºC. Kultury *P. aeruginosa* byly kultivovány do OD_{600} = 1,5 v LB médiu, centrifugovány (5 min, 5000 **g**) a resuspendovány v PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ 8,1 mM; KH_2PO_4 1,7 mM; pH 7,4) na OD_{600} = 0,4. $5x10^7$ makrofágových buněk bylo inkubováno s $5x10^7$ CFU *P. aeruginosa* 30 minut v 37ºC. Extracelulární bakterie byly odstraněny třemi promytími 10 ml HBSS (Hank´s buffered saline solution - HEPES-Na 10 mM; NaCl 140 mM; KCl 5 mM; $CaCl_2$ 2 mM; $MgCl_2$ 3 mM; pH 7,4; po sterilizaci filtrací přidána glukóza na konečnou koncentraci 1%) při 1500 **g**, 5 min. Paralelní vzorky pro stanovení počátečního množství fagocytovaných bakterií byly promyty stejným způsobem, pouze pufr HBSS obsahoval Gm (400 μg/ml) a posléze byly lyzovány v 5 ml ledové vody a počet bakterií stanoven vysetím na LB plotny. Makrofágy s fagocytovanými bakteriemi byly poté inkubovány na miskách v D-MEM médiu s Gm (400 μg/ml). Po hodinové inkubaci byly makrofágy sklizeny, centrifugovány 2 minuty při 14 000 **g** a lyzovány v 5 ml ledové vody (vortex třikrát 1 minuta, poté 15 min na ledu). Přeživší bakterie byly stanoveny vysetím lyzátů na LB plotny.

3.3.14 Zkouška virulence v rostlinném modelu

2 ml stacionárních kultur rostlých v LB médiu byly centrifugovány 5 min při 6 000 **g**, buňky byly promyty 10 mM $MgSO_4$ a ředěny na OD_{600} = 0,01 (10^7 CFU/ml) v 10 mM $MgSO_4$. Listy římského salátu (*Lactuca sativa* var. *romana*) jsme omyli v 0,1% roztoku Sava a umístili do Petriho misek o průměru 15 cm s připraveným Whatmanovým filtrem nasáklým 10 mM $MgSO_4$. Do žebra listu jsme inokulovali pipetmanem 10 μl z každé kultury. Misky s naočkovanými listy jsme inkubovali při 28ºC po dobu 5 dní a každý den monitorovali.

3.4 Metody – studium interakcí proteinkinázy Stk1 s fosfatázou Stp1 a proteinem Fha2

3.4.1 Oligonukleotidy

Pro každý oligonukleotid je v tabulce 3.4 uveden jeho název, sekvence, případně přítomnost restrikčního místa (podtrženo v sekvenci). Oligonukleotidy jsou seřazeny podle konkrétního použití. U oligonukleotidů pro záměny aminokyselin jsou barevně zvýrazněny změněné kodóny. Všechny oligonukleotidy byly syntetizovány firmou VBC-GENOMICS (Vídeň).

Tab. 3.4: Oligonukleotidy použité při studiu interakcí proteinů Stk1, Stp1 a Fha2

Oligonukleotid	Sekvence 5´→3´ (restrikční místo je podtrženo)	
Fha2 exprese		**endonukleáza**
PA1665F(58)	GGGAATTCCATATGGAACTGGTATTGGAAATG	*NdeI*
PA1665NR(64)	CCCAAGCTTTCATCCTTGGTGCTCGGTGTA	*HindIII*
Fha2 mutageneze		**poznámka**
Fha2(260A)F	GAACTGCGCCTGTCGCTGGCCACATTGCGCGATACCG	Ser 260 → Ala
Fha2(260A)R	CGGTATCGCGCAATGTGGCCAGCGACAGGCGCAGTTC	
Fha2(261A)F	GAACTGCGCCTGTCGCTGAGCGCATTGCGCGATACCG	Thr 261 → Ala
Fha2(261A)R	CGGTATCGCGCAATGCGCTCAGCGACAGGCGCAGTTC	
Fha2(AA)F	GAACTGCGCCTGTCGCTGGCCGCATTGCGCGATACCG	Ser 260, Thr 261
Fha2(AA)R	CGGTATCGCGCAATGCGGCCAGCGACAGGCGCAGTTC	→Ala, Ala
Stp1 mutageneze		
StpAlaF	CTGGGCGAGGAACTCGCCCTCAGCGCCGAAC	Thr 90 → Ala
StpAlaR	GTTCGGCGCTGAGGGCGAGTTCCTCGCCCAG	
StpAspF	CTGGGCGAGGAACTCGACCTCAGCGCCGAAC	Thr 90 → Asp
StpAspR	GTTCGGCGCTGAGGTCGAGTTCCTCGCCCAG	

3.4.2 Klonování a exprese genu *fha2* (PA1665) v *E. coli*

Gen *fha2* byl amplifikován PCR pomocí oligonukleotidů PA1665F(58) a PA1665NR(64) z chromozomální DNA *P. aeruginosa*. DNA fragment o velikosti 1200 bp jsme pomocí restrikčních míst *NdeI* a *HindIII* klonovali do expresního vektoru pET28b pod inducibilní T7 promotor tak, že na N konci byla k proteinu připojena histidinová kotva (6 x His). Tato kotva umožňuje izolaci proteinu pomocí afinitní chromatografie. Sekvence amplifikačního produktu byla ověřena sekvenováním. Výsledný vektor pET28Fha2 jsme transformovali do *E. coli* BL21 (DE3). Produkci proteinu Fha2 po indukci IPTG jsme testovali při 30ºC a 18ºC. Rozpustný protein jsme ve větším poměru získali při 18ºC, veškerá další produkce proteinu Fha2 byla proto prováděna již v 18ºC. Protein Fha2 jsme

izolovali z 200 ml kultury. Stejné podmínky platily i pro mutované verze proteinu. Proteiny jsme identifikovali pomocí imunodetekce s protilátkou proti histidinové kotvě.

3.4.3 Cílená mutageneze proteinu Fha2

Pro určení místa fosforylace proteinu Fha2 jsme pomocí cílené mutageneze připravili mutované formy proteinu se záměnou threoninu 261 za alanin, se záměnou serinu 260 za alanin a se záměnou obou aminokyselin za alaninové zbytky.

Pro přípravu rekombinantních proteinů se záměnou aminokyselin jsme využili komerční soupravu QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) a postupovali podle návodu výrobce. Pomocí oligonukleotidů Fha2(260A)F a Fha2(260A)R jsme zavedli mutaci do genu *fha*2 na plazmidu pET28Fha2, který jsme použili jako templát PCR reakce. Provedli jsme záměnu kodónu AGC pro serin za kodón GCC pro alanin. Nově vzniklý plazmid jsme nazvali pET28Fha260A.

Stejným způsobem jsme postupovali při záměně Thr 261. Templátem v PCR reakci byl plazmid pET28Fha2 a mutaci jsme vnesli použitím oligonukleotidů Fha2(261A)F a Fha2(261A)R. Zaměnili jsme kodón ACA pro threonin za kodón GCA pro alanin a získali jsme plazmid pET28Fha261A.

V případě dvojité záměny jsme jako templát využili plazmid pET28Fha261A a oligonukleotidy Fha2(AA)F a Fha2(AA)R. Výsledkem byl plazmid pET28Fha2AA.

Sekvence vytvořených plazmidů byla ověřena sekvenováním. Plazmidy byly transformovány do buněk *E. coli* BL21(DE3) pro produkci a izolaci mutovaných forem proteinu Fha2.

3.4.4 Cílená mutageneze fosfatázy Stp1

Pro studium vlivu fosforylace fosfatázy Stp1 na její aktivitu jsme pomocí cílené mutageneze připravili mutované formy proteinu se záměnou threoninu 90 za alanin a se záměnou za aspartát. Postupovali jsme shodně jako při přípravě mutovaných forem proteinu Fha2.

Jako templát jsme použili plazmid pET28Stp1 nesoucí gen pro fosfatázu Stp1, fúzovaný na svém N konci s histidinovou kotvou, připravený M. Urbanovou v rámci její diplomové práce (172). Záměnu kodónu ACC pro threonin 90 za kodón GCC pro alanin

jsme provedli pomocí oligonukleotidů StpAlaF a StpAlaR. Záměnu za kodón GAC pro aspartát jsme provedli pomocí oligonukleotidů StpAspF a StpAspR.

Správnost vzniklých plazmidů pET28StpAla a pET28StpAsp jsme ověřili sekvenováním. Plazmidy byly transformovány do buněk *E. coli* BL21(DE3) pro produkci a izolaci mutovaných forem proteinu Stp1. Fosfatáza Stp1 a mutované formy byly produkovány při 18ºC a výchozí množství kultur bylo 200 ml.

3.4.5 Kinázová reakce *in vitro*

Pro testování kinázové aktivity a fosforylace substrátů jsme používali 1 μg Stk1 a 1 μg příslušného substrátového proteinu. Kinázová reakce byla provedena podle Makino *et al.*, (109) a Janeček *et al.*, (77). Připravili jsme reakční směs (50 mM Tris; 50 mM NaCl; 10 mM $MgCl_2$; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT) a k ní přidali vzorek, který obsahoval 30 μg proteinů. K nosičovému ATP o výsledné koncentraci 10 μM jsme přidali 1μCi γ-^{32}P ATP. Přidáním ATP k reakční směsi jsme spustili kinázovou reakci, kterou jsme po inkubaci 30 min v 37°C ukončili přidáním 5 μl STOP pufru (0,125 M Tris, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% β- merkaptoethanol; 0,02% bromfenolová modř). Vzorky jsme povařili 10 min při 100°C a elektroforeticky rozdělili. Proteiny v gelu jsme obarvili, gel usušili a nechali exponovat na citlivou fólii (Fuji). Radioaktivní proteiny byly vizualizovány na přístroji Phosphoimager BAS 5000 (Fuji) a analyzovány pomocí programu Aida 3.28.

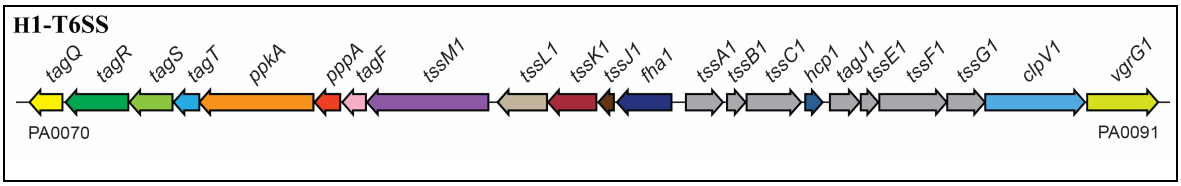
Pokud jsme prováděli neradioaktivní kinázovou reakci, bylo použito pouze 10 μM ATP bez radioaktivního značení. Vzorky jsme po elektroforetickém rozdělení přenesli na PVDF membránu a provedli imunodetekci s protilátkami proti fosforylovanému threoninu.

3.4.6 Fosfatázová reakce *in vitro*

Pro stanovení fosfatázové aktivity jsme používali komerční soupravu Serine/Threonine Phosphatase Assay System (Promega). Postupovali jsme podle pokynů výrobce. Optimální reakční pufr obsahoval 50 mM Tris, pH 7,5; 0,2 mM EDTA; 0,02% merkaptoethanol; 5 mM $MnCl_2$. Místo komerčního 0,1 mM fosfopeptidu (RRA(pT)VA), který je součástí soupravy, jsme používali 2 μg Stk1. Do reakční směsi jsme standardně přidávali 2 μg Stp1 a jejích derivátů. Fosfatázová reakce probíhala v 37°C 1 hodinu. Absorbanci vzorku·při 600 nm jsme měřili na spektrometru XFluor4Safir (Tecan).

4 Výsledky

4.1 Stanovení funkce Ser/Thr proteinkinázy PpkA a fosfatázy PppA



Obr. 4.1.1: Lokus DNA sekrečního systému typu VI H1-T6SS *P. aeruginosa* PAO1 kódujícího geny fosfatázy PppA a proteinkinázy PpkA. Převzato z Hsu *et al.*, 2009 (72)

Fosfatáza PppA a Ser/Thr proteinkináza PpkA jsou kódovány sousedícími geny v predikovaném operonu (www.pseudomonas.com, (167,188)) spolu s dalšími geny, které jsou součástí lokusu kódujícího sekreční systém typu VI, H1-T6SS (obr. 4.1.1). Sekreční systém typu VI u *P. aeruginosa* byl prvně popsán v roce 2006 (119) a funkce kinázy PpkA a fosfatázy PppA v postranslační regulaci sekrece tímto systémem v roce 2007 (120). Od tohoto okamžiku se studium sekrečních systémů typu VI stalo středem zájmu mnoha vědeckých skupin a bylo získáno velké množství informací, zvláště o funkci jednotlivých složek těchto systémů. Mechanizmus regulace sekrece prostřednictvím fosforylace není konzervovaný, nicméně Ser/Thr kinázy a fosfatázy jsou součástí SST6 i u dalších bakterií.

Studiem funkce proteinkinázy PpkA a fosfatázy PppA jsme se zabývali již v období před objevením jejich funkce v sekreci systémem typu VI a naším primárním cílem byla příprava delečních mutantů v genech *pppA* a *ppkA* a sledování jejich fenotypového projevu. Opakované problémy při přípravě mutantů v jednotlivých genech nás vedly k vytvoření dvojitého delečního mutanta *ΔpppA-ppkA*, který nám umožnil studium funkce těchto dvou funkčně těsně spjatých signalizačních proteinů. Naším dalším cílem bylo objasnění regulačních drah této signalizační dvojice na molekulární úrovni pomocí srovnání globálních transkriptomů divokého kmene *P. aeruginosa* PAO1 a mutanta *ΔpppA-ppkA* za definovaných podmínek.

4.1.1 Základní fenotypová analýza mutanta *ΔpppA-ppkA*

Již dříve se předpokládalo, že se proteinkináza PpkA účastní regulace virulence *P. aeruginosa* v modelu neutropenické myši, nicméně výsledky jednotlivých vědeckých skupin se rozcházely (118,180). Nejprve jsme proto u připraveného kmene *ΔpppA-ppkA* přikročili k testování produkce virulenčních faktorů v porovnání s divokým kmenem. Určovali jsme produkci elastázy LasB a proteázy LasA, hemolyzinů (hlavní hemolyzin je fosfolipáza A), rhamnolipidů, alginátu a pigmentů pyocyaninu a pyoverdinu na specifických pevných půdách. Dále jsme také sledovali schopnost pohybovat se pohybem typu swarming, který souvisí s produkcí rhamnolipidů.

Mutantní kmen vykazoval opožděnou produkci elastáz, pyocyaninu a rhamnolipidů (tab. 4.1). Produkci rhamnolipidů a pyocyaninu jsme sledovali na pevných médiích obsahujících jako zdroj uhlíku glycerol, na kterých kmen *ΔpppA-ppkA* vykazoval opožděný růst v porovnání s divokým kmenem.

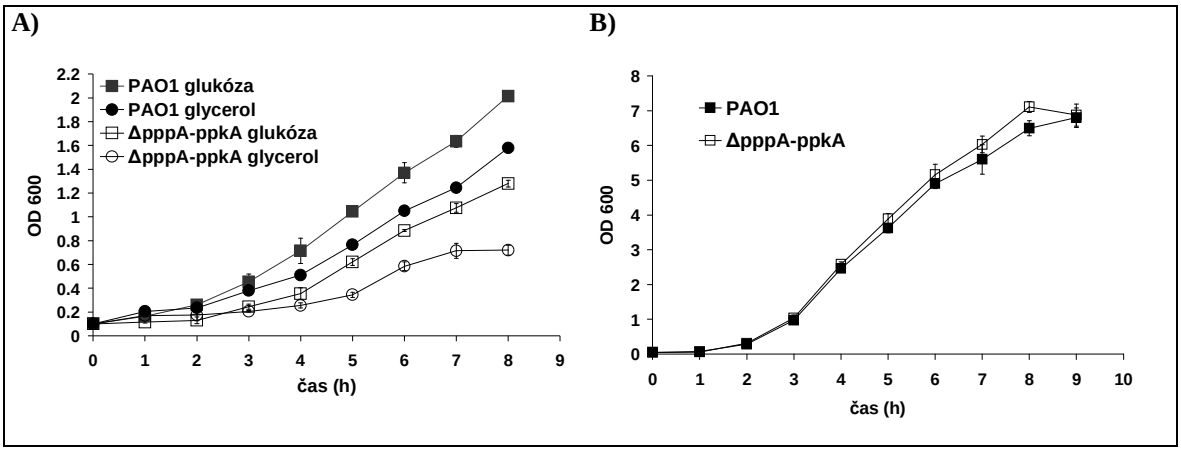
Tab. 4.1: Produkce virulenčních faktorů kmeny PAO1 a Δ*pppA-ppkA*

	Kmen	
Virulenční faktor	**PAO1**	**Δ*pppA-ppk*A**
LasA/LasB – degradace elastinu	+	+ (zpoždění 72 h)
LasA/LasB – degradace kaseinu	+	+
pyocyanin [a]	+	+ (zpoždění 72 h)
pyoverdin [a]	+	+
hemolyzíny (fosfolipáza C)	+	+
rhamnolipidy [b]	+	+ (zpoždění 168 h)
rhamnolipidy – swarming	+	+
alginát	+	+

+ virulenční faktor je produkován; **[a]** médium obsahuje glycerol; **[b]** minimální médium s glycerol jako jediným zdrojem uhlíku

Rozhodli jsme se proto stanovit růstové charakteristiky divokého a mutantního kmene v komplexním médiu LB a minimálním médiu M9, do kterého byla přidána glukóza nebo glycerol jako jediný zdroj uhlíku. Mutantní kmen rostoucí v minimálním médiu M9 s glukózou nebo glycerolem jako jedinými zdroji uhlíku prokazoval sníženou růstovou rychlost v porovnání s divokým kmenem. Vypočítaná doba zdvojení mutanta rostoucího v M9 s glukózou byla 100 minut, v M9 s glycerolem 120 minut, na rozdíl od 83 a 102

minut u kmene PAO1. Kmen *ΔpppA-ppkA* navíc v M9 s glycerolem dosahoval nižších konečných optických denzit než divoký kmen (obr. 4.1.2 A). V komplexním médiu se však růstové rychlosti obou kmenů neliší a doba zdvojení pro oba kmeny činí 34 minut (obr. 4.1.2 B). Při kultivaci v LB médiu jsme si nicméně u mutanta všimli snížené produkce modrozeleného pigmentu pyocyaninu. Množství produkovaného pyocyaninu bylo kvantifikováno a bylo zjištěno, že mutant produkuje po 72 hodinách až o 23% méně pyocyaninu a produkce se v porovnání s divokým kmenem PAO1 s časem snižuje (tab. 4.2).



Obr. 4.1.2: Růstová charakteristika kmene *P. aeruginosa* PAO1 a mutanta Δ*pppA-ppkA*. A) Růstové křivky v minimálním M9 médiu s glukózou nebo glycerolem jako jedinými zdroji uhlíku. B) Růstové křivky v komplexním LB médiu. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku výběru pro tři nezávislé experimenty.

Tab. 4.2:Produkce pyocyaninu kmenem PAO1 a Δ*pppA-ppk*A.

Kmen	Produkce pyocyaninu [a]		
	24 h	48 h	72 h
PAO1	1,00 (±0,073)	1,00 (±0,046)	1,00 (±0,086)
Δ*pppA-ppkA*	0,87 (±0,094)	0,81 (±0,084)*	0,77 (±0,011) *

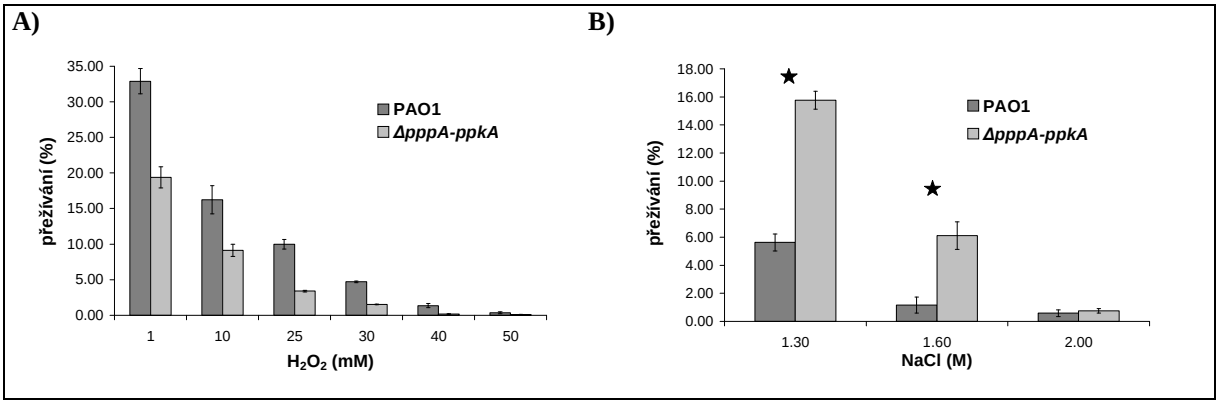
[a] Hodnoty jsou vyjádřeny v arbitrárních jednotkách normalizovaných na množství pyocyaninu v PAO1 a vyjadřují průměry ze tří nezávislých měření. Čísla v závorkách vyjadřují směrodatné odchylky výběrů. *Rozdíly mezi mutantem a divokým kmenem jsou statisticky významné ($P < 0,05$) v časech 48 a 72 h..

4.1.2 Odolnost mutanta *ΔpppA-ppkA* k stresovým podmínkám

Odolnost ke stresovým podmínkám jako je oxidativní, osmotický stres nebo nízké pH je důležitá vlastnost *P. aeruginosa* pro přežití jak v nejrůznějších přirozených podmínkách tak během infekce hostitele.

Rezistence k oxidativnímu stresu se uplatňuje vysokou měrou právě během infekce dýchacích cest pacientů trpících CF. Abychom stanovili schopnost kmene *ΔpppA-ppkA* vyrovnat se s oxidativním stresem, zkoumali jsme jeho schopnost přežívání za stresu indukovaného H_2O_2 v porovnání s kmenem PAO1. Citlivost stacionárních kultur k oxidativnímu stresu byla testována působením různých koncentrací H_2O_2 (1mM až 50 mM) přidaných ke kulturám po dobu jedné hodiny. Mutant *ΔpppA-ppkA* se projevoval výrazně sníženým přežíváním v porovnání s PAO1 již od 1 mM koncentrace peroxidu vodíku. Po hodině působení 1 mM H_2O_2 přežilo u mutanta 20% buněk na rozdíl od 35% u kmene PAO1 (obr. 4.1.3 A).

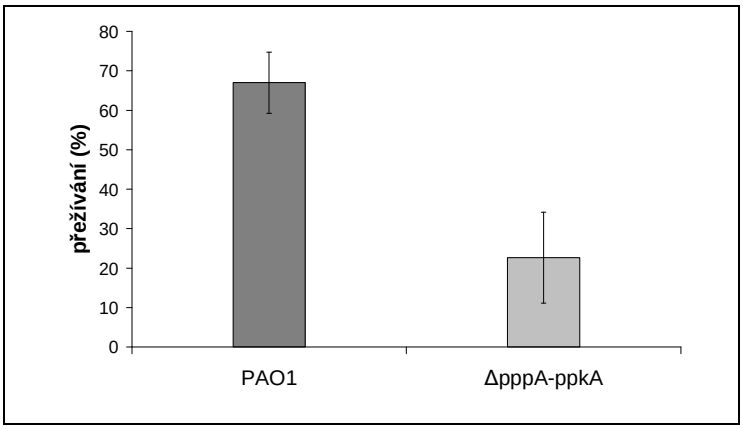
CF je charakterizována poruchou v transportu elektrolytů, jehož výsledkem je zvýšená hladina Na^+, Cl^- a Ca^{2+} iontů (13). Tekutiny respiračního traktu tedy představují prostředí s vysokou osmolaritou. Z tohoto důvodu jsme testovali schopnost růstu kmene *ΔpppA-ppkA* za osmotického stresu, kdy ke kulturám ve stacionární fázi byl přidán 1,3 až 2 M NaCl. Kmen *ΔpppA-ppkA* prokazoval významně zvýšenou odolnost k osmotickému stresu. Po 16 hodinách působení NaCl jsme pozorovali přibližně trojnásobný rozdíl v životaschopnosti mezi mutantem a rodičovským kmenem (obr 4.1.3 B).



Obr. 4.1.3: Přežíváni kmenů *P. aeruginosa* PAO1 a Δ*pppA-ppkA* za stresových podmínek. A) oxidativní stress s 1 až 50 mM H_2O_2 Rozdíly mezi mutantem a rodičovským kmenem jsou statisticky významné ($P< 0,05$)**. B) hyperosmotický stress s 1,3 až 2 M NaCl**. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly mezi mutantem a rodičovským kmenem ($P< 0,05$).
Hodnoty v obou grafech představují průměrné hodnoty z minimálně tří nezávislých opakování, chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku výběru.

4.1.3 Stanovení přežívání kmene *ΔpppA-ppkA* v myších makrofázích

Snížená odolnost vůči oxidativnímu stresu, opožděná produkce některých virulenčních faktorů spolu se sníženou růstovou rychlostí mutanta v M9 médiu nás vedla k měření citlivosti mutantního kmene k zabíjení makrofágy. Jak mutantní tak divoký kmen byly inkubovány s myšími makrofágy J774 *in vitro* a pohlcené bakterie byly izolovány z lyzovaných makrofágů a vysety pro stanovení množství přeživších bakteriálních buněk. Jak je vidět z obrázku 4.1.4, *ΔpppA-ppkA* mutant je mnohem citlivější k zabíjení makrofágy než rodičovský kmen. Mutantní kmen vykazoval významně sníženou schopnost přežití (22,6%) v porovnání s divokým typem (70%). Předpokládáme, že významně snížená odolnost k oxidativnímu stresu je hlavním činitelem v redukovaném přežívání mutanta v buněčném baktericidním systému, protože takové buňky mají nižší pravděpodobnost přežít podmínky uvnitř fagozomů makrofágů.



Obr. 4.1.4: Stanovení přežívání v makrofázích. Delece genů *pppA-ppkA* se projevila významně sníženou schopností přežití. V grafu jsou vyznačeny směrodatné odchylky výběru z 10 experimentů. Rozdíl mezi mutantem a rodičovským kmenem jsou statisticky významné (P <0,05).

4.1.4 Stanovení citlivosti mutanta *ΔpppA-ppkA* k antibiotikům

P. aeruginosa je jedním z hlavních původců nosokomiálních infekcí a je obávána kvůli své vysoké přirozené rezistenci k antibiotikům a své schopnosti vytvářet si širokospektrou rezistenci (86). Analyzovali jsme citlivost mutanta k různým třídám

antibiotik běžně používaných pro léčbu infekcí vyvolávaných *P. aeruginosa*. Jednalo se o antibiotika karbenicilin, pefloxacin, tetracyklin, trimethoprim a chloramfenikol, který je běžně používán pro testování rezistence. Mutantní kmen prokazoval více než dvakrát sníženou citlivost k chloramfenikolu a karbenicilinu ve srovnání s divokým kmenem (tab. 4.3). Pro ostatní testovaná antibiotika nebyly pozorovány žádné významné rozdíly.

Tab. 4.3: Minimální inhibiční koncentrace pro kmen PAO1 a mutanta Δ*pppA-ppk*A

Antibiotika	MIC (μg/ml) [a]	
	PAO1	Δ*ppp*A-*ppk*A
chloramfenikol	25	55
karbenicilin	35	75

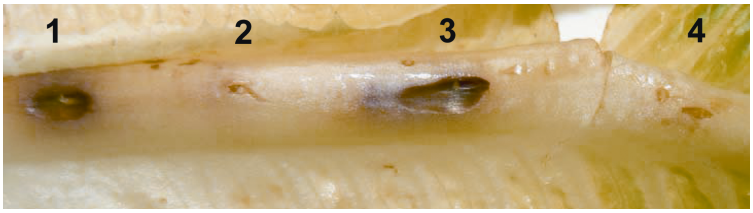
[a] Uvedená data pocházejí z reprezentativního experimentu celkem ze čtyř opakování.

Zvýšená odolnost k osmotickému stresu a k antibiotikům chloramfenikolu a karbenicilinu naznačuje, že pár PppA a PpkA by mohl ovlivňovat buněčné funkce spojené s membránovou permeabilitou a transportem. Této hypotéze by odpovídala také transmembránová lokalizace kinázy PpkA s pravděpodobně senzorovou doménou v periplazmě.

4.1.5 Test virulence *ΔpppA-ppk*A v rostlinném modelu

Skutečnost, že delece genů *pppA-ppkA* ovlivnila toleranci ke stresům a významně snížila přežívání mutanta v myších makrofázích, nastínila možnost, že by mohla být ovlivněna také schopnost mutanta vyvolat infekci. Pro stanovení efektu delece genů *pppA-ppkA* na virulenci *P. aeruginosa* jsme využili metodu modelu infekce salátového listu. Rostliny byly již dříve používány jako patogenezní model pro identifikaci virulenčních faktorů *P. aeruginosa* (143) a existuje řada dat ukazujících, že virulenční mechanizmy pro rostlinné a živočišné modely jsou konzervované (139,141,142).

Zkouška virulence odhalila významné rozdíly v manifestaci infekčních symptomů vyvolaných mutantem v porovnání s kmenem PAO1. Na rozdíl od kmene PAO1, který indukoval výrazné nekrotické léze tři dny po infekci, kmen *ΔpppA-ppkA* nezpůsoboval žádnou nekrózu rostlinné tkáně ani po prodloužené inkubační době (obr. 4.1.5).



Obr. 4.1.5: Zkouška infekce rostlinného modelu (salát římský) kmeny *P. aeruginosa* PAO1 (1, 3) a Δ*pppA-ppkA* (2, 4). Fotografie ukazuje reprezentativní vzorek středového žebra salátového listu 3 dny po infekci. Infekce PAO1 způsobovala nekrózu a maceraci tkáně na rozdíl od mutantního kmene.

Toto zjištění indikuje že proteinkináza PpkA a fosfatáza PppA se podílejí na regulaci buněčných funkcí důležitých pro virulenci v rostlinném modelu infekce.

4.1.6 Transkripční analýza mutanta *ΔpppA-ppkA*

Abychom určili genetickou podstatu pozorovaného fenotypu, provedli jsme porovnání globálních transkriptomů mutanta *ΔpppA-ppkA* s divokým kmenem PAO1. Ke srovnání jsme použili kultury pěstované v minimálním médiu M9 na přelomu exponenciální a časné stacionární fáze. Používali jsme komerční celogenomové microarray čipy pro *P. aeruginosa* od firmy Affymetrix (viz materiál a metody). Z 5570 predikovaných otevřených čtecích rámců bylo 83 genů významně odlišně regulováno (více než 1,7krát) s hladinou významnosti (*P* value) ≤ 0,05. V mutantním kmeni *ΔpppA-ppkA* byla v porovnání s divokým kmenem PAO1 zvýšena exprese 70 genů (1,7 až 12,7krát) a snížena exprese 13 genů (1,7 až 4krát). Abychom do analýzy zahrnuli všechny geny potencionálně regulované dvojicí PppA-PpkA, pracovali jsme i s geny s *P* value ≤ 0,2, které byly zároveň funkčně příbuzné genům významně odlišně regulovaným.

Ovlivněné geny byly na základě známých dat o jejich funkci a regulaci rozděleny do tří hlavních skupin tvořících následující regulony:

1. geny regulované stacionárním σ-faktorem RpoS (154) a/nebo QS systémy *las*/*rhl* (155,178)
2. geny regulované systémem PQS (19,35)
3. geny odpovědi na oxidativní stres (23,130,149)

Tab. 4.4: Geny *P. aeruginosa* ovlivněné v mutantovi *ΔpppA-ppkA* ve srovnání s divokým kmenem PAO1.

Gen (název)	změna exprese [a]	*P* value	Protein (Funkce-anglicky)[c]	Další regulátory
Geny regulované RpoS				
IG [b]	2,36	0,174	Intergenic region between PA0484 and PA0485, 517462-518083, (+) strand	
PA0044 (exoT) [b]	-2,13	0,113	exoenzyme T (Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate))	QS, TTSS
PA0122 [b]	2,47	0,070	CHP	QS
PA1048	2,80	0,037	Pr. outer membrane protein (Membrane proteins; Transport of small molecules)	
PA1119	1,95	0,021	Pr. outer membrane lipoprotein (Membrane proteins)	
PA1175 (napD)	1,88	0,021	NapD protein of periplasmic nitrate reductase (Energy metabolism)	QS
PA1216 [b]	2,32	0,053	HP	QS
PA1708 (popB)[b]	-2,08	0,070	translocator protein PopB (Protein secretion/export apparatus)	QS, TTSS
PA1709 (popD)	-1,82	0,004	translocator protein PopD (Protein secretion/export apparatus)	QS, TTSS
PA1939 [b]	2,32	0,063	HP	QS
PA2193 (hcnA) [b]	2,05	0,088	hydrogen cyanide synthase HcnA (Central intermediary metabolism)	QS
PA2204	1,87	0,014	Pr. binding protein component of ABC transporter (Transport of small molecules)	PQS
PA2223	2,76	0,021	HP	
PA2235	2,11	0,017	HP	
PA2303	1,80	0,035	HP	QS
PA2365	1,96	0,017	CHP	QS
PA2366	2,05	0,001	CHP	QS
PA2452	1,76	0,033	HP	
PA2570 (pa1L)	2,47	0,049	PA-I galactophilic lectin (Adaptation, protection; Motility & Attachment)	QS
PA2781	2,06	0,027	HP	
PA2939	4,49	0,018	Pr. aminopeptidase (Putative enzymes)	QS
PA3622 (rpoS)	3,86	0,030	sigma factor RpoS (Transcriptional regulators)	PQS
PA3841 (exoS) [b]	-2,01	0,188	exoenzyme S (Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate))	QS, TTSS
PA3848	1,93	0,020	HP	
PA4175 (prpL)	4,65	0,008	protease IV (Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate))	QS
PA4296 (pprB)	3,69	0,029	PprB two-component response regulator (Transcriptional regulators; Two-component regulatory systems; Antibiotic resistance and susceptibility)	QS
PA4299 (tadD) [b]	2,41	0,086	tadD Flp pilus assembly protein (Function Motility & Attachment)	PprB, QS
PA4306 (flp)	6,69	0,002	Flp Type IVb pilin (Motility & Attachment)	PprB, QS
PA4551 (pilV)	-2,09	0,008	type 4 fimbrial biogenesis protein PilV (Motility & Attachment)	
PA4761 (dnaK) [b]	-2,35	0,136	DnaK protein (Adaptation, protection; Chaperones & heat shock proteins; DNA replication, recombination, modification and repair)	PQS
PA4762 (grpE) [b]	-2,30	0,159	heat shock protein GrpE (DNA replication, recombination, modification and repair; Chaperones & heat shock proteins)	PQS
Geny regulované QS				
PA0572	3,27	0,049	HP	
PA0852 (cbpD) [b]	2,60	0,081	chitin-binding protein CbpD precursor (Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate))	
PA1874	2,02	0,048	HP	
PA1903 (phzE2) [b]	2,00	0,195	phenazine biosynthesis protein PhzE (Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate))	
PA1984 [b]	4,63	0,101	Pr. aldehyde dehydrogenase (Putative enzymes)	
PA2067	2,38	0,039	Pr. hydrolase (Putative enzymes)	
PA2068 [b]	2,31	0,101	Pr. MFS transporter (Membrane proteins; Transport of small molecules)	
PA2259 (ptxS) [b]	2,43	0,111	transcriptional regulator PtxS (Transcriptional regulators; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	
PA2321 [b]	4,59	0,095	gluconokinase (Carbon compound catabolism; Energy metabolism)	
PA2747 [b]	2,49	0,173	HP	
PA3369 [b]	2,39	0,088	HP (Membrane proteins)	
PA3724 (lasB)	2,23	0,037	elastase LasB (Translation, post-translational modification, degradation; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate))	PQS, RpoS
PA3904 [b]	2,28	0,113	HP	
PA3922	11,31	0,038	CHP	
PA3923 [b]	8,11	0,143	HP	
PA3924 [b]	2,37	0,130	Pr. medium-chain acyl-CoA ligase (Fatty acid and phospholipid metabolism)	
PA4129 [b]	2,82	0,196	HP	

Tab 4.4 pokračování

Gen (název)	exprese [a]	*P* value	Protein (Funkce-anglicky)[c]	Další regulátory
PA4130 [b]	4,98	0,089	Pr. sulfite or nitrite reductase (Central intermediary metabolism)	
PA4497	2,61	0,031	Pr. binding protein component of ABC transporter (Transport of small molecules)	
PA4773 [b]	-2,42	0,056	HP	
PA5220 [b]	2,36	0,056	HP	
PA5481	2,01	0,038	HP	
PA5482 [b]	3,85	0,121	HP (Membrane proteins)	
PQS regulon				
PA0200	5,10	0,048	HP	
PA0201	5,10	0,048	HP	
PA0996 (pqsA)	4,56	0,011	Pr. coenzyme A ligase (Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers)	
PA0997 (pqsB)	2,05	0,007	Homologous to beta-keto-acyl-acyl-carrier protein synthase (Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers)	
PA0998 (pqsC)	2,07	0,038	Homologous to beta-keto-acyl-acyl-carrier protein synthase (Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers)	
PA0999 (pqsD)	2,24	0,009	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III (Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers)	
PA1000 (pqsE)	2,50	0,016	Quinolone signal response protein (Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers)	
PA1001 (phnA) [b]	2,54	0,065	anthranilate synthase component I (Adaptation, protection)	
PA1002 (phnB) [b]	2,19	0,071	anthranilate synthase component II (Adaptation, protection; Amino acid biosynthesis and metabolism	
PA2331 [b]	2,76	0,087	HP (Membrane proteins)	
PA3520	2,31	0,020	HP	oxidative stress
PA4222 [b]	2,42	0,109	Pr. ATP-binding component of ABC transporter (Transport of small molecules)	oxidative stress
PA4228 (pchD) [b]	2,18	0,166	pyochelin biosynthesis protein PchD (Transport of small molecules; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate))	oxidative stress
PA4377	3,01	0,022	HP	
oxidativní stres				
primární metabolismus				
PA0106 (coxA) [b]	2,58	0,177	cytochrome c oxidase, subunit I (Energy metabolism)	RpoS, QS
PA0107 [b]	3,68	0,091	CHP (Energy metabolism)	RpoS, QS
PA0108 (coIII)	2,22	0,038	cytochrome c oxidase, transmembrabe helix, subunit III (Energy metabolism)	RpoS, QS
PA1317 (cyoA)	-3,08	0,013	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II (Energy metabolism)	QS
PA1318 (cyoB)	-2,79	0,009	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I (Energy metabolism)	QS
PA1319 (cyoC)	-2,39	0,043	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III (Energy metabolism)	QS
PA1320 (cyoD)	-2,27	0,041	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV (Energy metabolism)	QS
PA1321 (cyoE)	-3,86	0,037	cytochrome o ubiquinol oxidase protein CyoE (Energy metabolism)	QS
PA3186 (oprB) [b]	4,17	0,096	outer membrane porin OprB precursor (Transport of small molecules)	QS
PA3187 [b]	10,77	0,053	Pr. ATP-binding component of ABC transporter (Transport of small molecules)	QS
PA3190 [b]	2,70	0,115	Pr. binding protein component of ABC sugar transporter (Transport of small molecules)	QS
PA3195 (gapA) [b]	2,09	0,138	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Energy metabolism; Carbon compound catabolism)	QS
metabolismus síry				
PA0283 (sbp) [b]	4,89	0,061	sulfate-binding protein precursor, ABC transporter (Transport of small molecules)	
PA0284	10,61	0,038	HP	PQS
PA1493 (cysP)	4,73	0,004	sulfate-binding protein of ABC transporter (Transport of small molecules)	
PA1754 (cysB)	1,73	0,022	transcriptional regulator CysB (Amino acid biosynthesis and metabolism)	
PA1838 (cysI) [b]	2,80	0,051	sulfite reductase (Central intermediary metabolism)	
PA3441	2,76	0,027	Pr. molybdopterin-binding protein (Transport of small molecules)	
PA3445 [b]	5,65	0,110	CHP (probable taurine metabolism)	
PA3446 [b]	9,34	0,140	CHP (probable taurine metabolism)	
PA3450	8,46	0,047	Pr. antioxidant protein (Adaptation, protection) Probable Alkyl hydroperoxide reductase	
PA3935 (tauD)	1,81	0,037	taurine dioxygenase (Carbon compound catabolism)	RpoS

Tab 4.4 pokračování

Gen (název)	exprese [a]	*P* value	Protein (Funkce-anglicky)[c]	Další regulátory
PA3936 (tauC) [b]	2,92	0,080	Pr. permease of ABC taurine transporter (Membrane proteins; Transport of small molecules)	RpoS
PA3938 (tauA)	5,07	0,025	Pr. periplasmic taurine-binding protein precursor (Transport of small molecules)	RpoS
PA4442 (cysN) [b]	3,13	0,117	ATP sulfurylase GTP-binding subunit/APS kinase (Amino acid biosynthesis and metabolism; Central intermediary metabolism)	QS
PA4443 (cysD) [b]	4,86	0,051	ATP sulfurylase small subunit (Amino acid biosynthesis and metabolism; Central intermediary metabolism)	QS
ostatní				
PA0594 (surA)	2,03	0,036	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SurA (Adaptation, protection)	
PA1127 [b]	-2,94	0,061	Pr. oxidoreductase (Adaptation, protection; Putative enzymes)	
PA2572[b]	2,35	0,175	Pr. two-component response regulator (Transcriptional regulators; Two-component regulatory systems)	RpoS, QS
PA4238 (rpoA) [b]	2,02	0,168	DNA-directed RNA polymerase alpha chain (Transcription, RNA processing and degradation)	
PA4252 (rplX) [b]	2,27	0,071	50S ribosomal protein L24 (Translation, post-translational modification, degradation)	
PA4254 (rpsQ) [b]	2,91	0,057	30S ribosomal protein S17 (Translation, post-translational modification, degradation)	
PA4648	1,96	0,045	HP	RpoS, QS
nezařazené geny				
PA2323 [b]	5.18	0.064	Pr. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Carbon compound catabolism)	
PA3107 (metZ)	1.75	0.000	o-succinylhomoserine sulfhydrylase (Amino acid biosynthesis and metabolism)	
PA3141 (wbpM)	1.72	0.010	nucleotide sugar epimerase/dehydratase WbpM (Membrane proteins; Putative enzymes; Cell wall / LPS / capsule)	
PA3147 (wbpJ)	1.83	0.031	Pr. glycosyl transferase WbpJ (Putative enzymes; Cell wall / LPS / capsule)	
PA3931 [b]	5.92	0.060	CHP (Pr. outer membrane protein, lipoprotein)	
PA3932 [b]	3.63	0.069	Pr. transcriptional regulator (Transcriptional regulators)	
PA3940	2.57	0.021	Pr. DNA binding protein (DNA replication, recombination, modification and repair)	
PA4139	12.71	0.018	HP	
PA5348	4.52	0.043	Pr. DNA-binding protein (DNA replication, recombination, modification and repair)	

[a] Změna exprese představuje poměr hladin exprese v porovnání *P. aeruginosa* Δ*pppA-ppkA* vůči divokému kmeni PAO1, Mínus (-) značí sníženou expresi v kmeni Δ*pppA-ppkA*
[b] *P* value > 0,05
[c] HP – hypotetický protein, CHP- konzervovaný hypotetický protein, Pr. – pravděpodobný; IG – mezigenová oblast

Výsledky získané z microarrays byly ověřeny nezávislou metodou pomocí Real-time PCR (qRT-PCR). Kvantifikované transkripty genů PA2570 (*pa1L*), PA4296 (*pprB*), PA4175 (*prpL*), PA3724 (*lasB*), PA3622 (*rpoS*), PA0996 (*pqsA*), PA1001 (*phnA*), PA1317 (*cyoA*), PA1754 (*cysB*), PA1127 a PA4139 reprezentují charakteristické zástupce regulonů a rozdílné změny hladin mRNA. Průměrná data ze tří experimentálních opakování jsou uvedena v tabulce 4.5. V každém případě data získaná qRT-PCR velmi dobře korelovala s daty získanými metodou microarrays (koeficient determinace udávající závislost srovnávaných vzorků $R^2 = 0.9$).

Tab. 4.5: Porovnání hladin vybraných transkriptů *P. aeruginosa* získaných metodou microarrays a Real-time PCR.

Gen (název)	Změna hladin mRNA [a]	
	microarray	**qRT-PCR**
PA2570 (*pa1L*)	2,47	2,71 (± 0,45)
PA4296 (*pprB*)	3,69	3,71 (± 0,39)
PA4175 (*prpL*)	4,65	3,63 (± 0,38)
PA3724 (*lasB*)	2,23	2,98 (± 0,27)
PA3622 (*rpoS*)	3,86	4,4 (± 0,45)
PA0996 (*pqsA*)	4,56	2,74 (± 0,12)
PA1001 (*phnA*)	2,54	1,51 (± 0,19)
PA1317 (*cyoA*)	-3,08	-2,59 (± 0,08)
PA1754 *(cysB*)	1,73	2,75 (± 0,19)
PA1127	-2,94	-5,00 (± 0,04)
PA4139	12,71	13,3 (± 0,71)

[a] Změna hladin mRNA představuje poměr hladin exprese v porovnání *P. aeruginosa* Δ*pppA-ppkA* vůči divokému kmeni PAO1. Mínus (-) značí sníženou expresi v kmeni Δ*pppA-ppkA*

4.1.6.1 Geny regulonu RpoS

Naše studie odhalila zvýšenou expresi (4krát) genu RpoS, který kóduje stacionární σ-faktor RpoS a změny v expresi genů závislých na RpoS (154). Velké množství genů regulovaných RpoS bylo současně popsáno jako regulované QS systémy *las*/*rhl* (155,178).

Mezi geny spadajícími do tohoto regulonu, jejichž exprese byla v kmeni *ΔpppA-ppkA* snížena, patří geny kódující komponenty sekrečního systému typu III (SST3) včetně PA0044 (*exoT*), PA1708-9 (*popBD*), PA3841 (*exoS*) a dále gen PA4551 (*pilV*) související s produkcí pilí typu IV, který je regulován SST3 (183). Tato data odpovídají výsledkům studie autorů Hogardt *et al.*, (67), kteří pozorovali zvýšenou expresi *exoS* jak u mutanta v QS systému *rhl* tak mutanta *rpoS*.

Exprese genů virulenčních faktorů PA2570 (galaktofilní lektin PA-I), PA4175 (*prpL*, proteázy IV) a PA2193 (syntáza hydrogencyanidu HcnA) byla zvýšená. Zbývající geny regulonu RpoS byly zastoupeny hlavně geny kódujícími hypotetické proteiny s neznámou funkcí.

Gen PA4296 se zvýšenou expresí, který kóduje regulační protein PprB dvousložkového systému PprA/PprB, je regulován jak RpoS (154), tak QS systémy (155). Zvýšená exprese PprB vedla k zvýšení exprese genů PA4299 (*tadD*) a PA4306 (*flp*). Toto

zjištění se shoduje s výsledky studie autorů Bernard *et al.*, (12), kteří popsali, že PprB pozitivně reguluje expresi *tad* lokusu, který je zodpovědný za skládání pilí typu IVb.

4.1.6.2 Geny regulované QS systémy

Mezi geny se změněnou expresí v této kategorii, které nebyly zmíněny v předchozí kapitole jako regulované také RpoS, patří například gen pro chitin vazebný faktor CbpD, který slouží jako sekretovaný virulenční faktor (SST2), gen pro elastázu LasB nebo gen *ptxS*, který kóduje negativní regulátor exotoxinu A (29). Velké zvýšení exprese (11 a 8krát) jsme v kmeni *ΔpppA-ppkA* zaznamenali u genů pro hypotetické proteiny s neznámou funkcí, PA3922-23.

Geny pro biosyntézu autoinduktorů QS systému PQS tvoří skupinu 7 sousedících genů, jejichž exprese byla v mutantovi koordinovaně zvýšená 2,2 až 4,6krát. Tyto geny, tvořící dvě předpokládané transkripční jednotky, *pqsABCDE* a *phnAB*, jsou kontrolovány regulátorem biosyntézy PQS, proteinem PqsR (MvfR) (35). PqsR s navázanými signálními molekulami PQS nebo HHQ reguluje expresi dalších genů v této skupině (viz tab. 4.4).

4.1.6.3 Geny odpovědi na oxidativní stres

Geny kódující proteiny účastnící se odpovědi na oxidativní stres tvoří největší kategorii, která zároveň zahrnuje geny s největšími změnami relativní hladiny transkripce. Tyto geny byly identifikovány v souvislosti s působením peroxidu vodíku na *P. aeruginosa* v několika nezávislých transkripčních studiích (23,130,149). Řada těchto genů byla identifikována také jako regulované stacionárním σ-faktorem RpoS (154), pod kontrolou QS systémů *las/rhl* (155,178) nebo byla jejich exprese ovlivněna přidáním PQS ke kultuře *P. aeruginosa* (19). Překryv jednotlivých regulonů je znázorněn na obrázku 4.1.6.

Geny odpovědi na oxidativní stres bylo možno rozdělit do dvou hlavních kategorií a sice geny primárního metabolismu a metabolismu síry.

Geny primárního metabolismu regulované oxidativním stresem

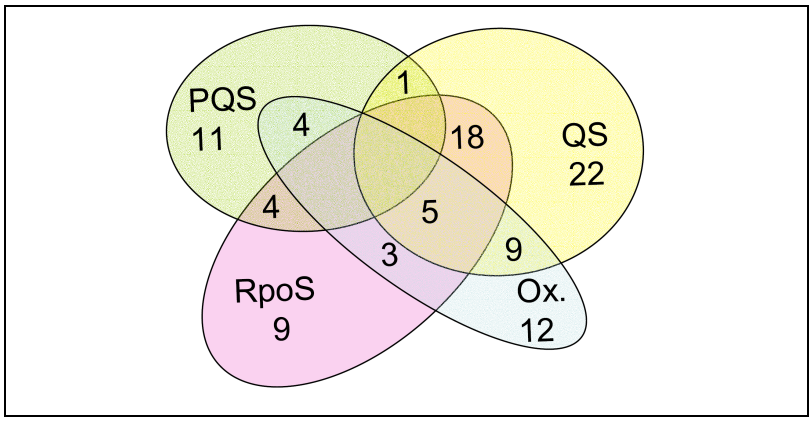
Reprimované geny byly reprezentovány operonem *cyoABCDE*, který kóduje cytochrom o ubichinol oxidázu, fungující jako hlavní terminální oxidáza elektrontransportního řetězce za vysoce aerobních podmínek (51). Naopak geny cytochrom

c oxidázového komplexu (*coxA*, PA0107, *coIII*), které představují hlavní aerobní respirační systém, jevily zvýšenou expresi.

Dále jsme pozorovali prudký nárůst v expresi genů lokusu kódujícího ABC transporter cukrů (geny PA3186 (*oprB*), 3187, 3190 a 3195 (*gap*A)).

Geny metabolismu síry regulované oxidativním stresem

Důležitým prvkem ovlivněným oxidativním stresem je síra, která tvoří nezbytnou součást FeS proteinů, které jsou obzvláště citlivé k oxidativnímu poškození (82). Řada genů souvisejících s metabolismem síry byla více exprimována v kmeni *ΔpppA-ppkA*, včetně genů sulfát vazebných proteinů Sbp a CysP, sulfitreduktázy CysI a ATP sulfurylázy CysND. Dále gen PA0284, sousedící s genem *sbp*, byl jedním z nejvíce exprimovaných genů v mutantním kmeni v naší studii (více než 10krát v porovnání s divokým kmenem). Pozorovali jsme také zvýšenou expresi genu *cysB*, který kóduje transkripční regulátor nezbytný pro růst na řadě organických sirných sloučenin a který reguluje geny metabolismu a transportu sirných látek (23,130). Zvýšenou expresi prokazovaly i geny pro metabolismus taurinu, *tauABCD*, které jsou pod kontrolou regulátoru CysB a další geny sirného metabolismu (PA3450-3441) (viz tabulka 4.4).



Obr. 4.1.6: Distribuce ovlivněných genů pod kontrolou jednotlivých regulonů (RpoS, QS systémů *las*/*rhl* a PQS a geny odpovědi na oxidativní stres) v kmeni Δ*pppA*-*ppkA*. Geny kontrolované dvěma, třemi nebo všemi čtyřmi regulátory jsou vyznačeny v příslušných průsečících. Ox. – geny odpovědi na oxidativní stres.

Ostatní geny s ovlivněnou expresí spadaly do různých funkčních kategorií jako je primární metabolismus, transport malých molekul, geny ribozomálních proteinů a hypotetické geny. Mezi nezařazené geny patří i gen PA4139, který byl v naší studii nejvíce indukován (12,7krát).

4.1.7 Globální analýza transkriptomu za podmínek oxidativního stresu

Výsledky analýzy transkriptomů kmene *ΔpppA-ppkA* v porovnání s PAO1 ukázaly, že značné množství genů účastnících se odpovědi na oxidativní stres bylo v mutantovi odlišně exprimováno. Současně tyto geny byly nejvíce odlišně exprimovanými geny v naší studii. Vzhledem k tomu, že také fenotypová analýza mutantního kmene odhalila jeho sníženou odolnost k oxidativnímu stresu vyvolanému peroxidem vodíku, rozhodli jsme se pro srovnání transkripčních profilů kmene *ΔpppA-ppkA* a PAO1 za podmínek oxidativního stresu.

Divoký a mutantní kmen byly pěstovány za stejných podmínek jako v předchozí analýze v M9 médiu do OD_{600}= 0,8. Po dosažení této optické denzity byl navozen subletální oxidativní stres přidáním H_2O_2 na konečnou koncentraci 10 mM a inkubací kultur po dobu 15 minut. Subletální podmínky byly ověřeny stanovením přežívání bakterií v těchto podmínkách vysetím inkubovaných buněk na plotny s LB médiem. Žádné významné rozdíly v přežívání mezi divokým kmenem PAO1 a *ΔpppA-ppkA* nebyly za těchto podmínek pozorovány.

Analýza transkriptomů PAO1 a mutantního kmene odhalila 261 významně odlišně regulovaných genů se změnou exprese minimálně 2krát a s *P* value ≤ 0,05 pro *t*-test. Pouze otevřené čtecí rámce, které byly vyhodnoceny jako přítomné v minimálně třech vzorcích ze čtyřech byly použity pro naši analýzu. V kmeni *ΔpppA-ppkA* bylo z 261 genů 131 genů se zvýšenou expresí (2 až 44,7krát) a 130 genů se sníženou expresí (2 až 7,7krát). Abychom postihli všechny geny potenciálně kontrolované dvojicí PppA-PpkA, zahrnuli jsme do analýzy také geny s *P* value ≤ 0,1, které byly zároveň funkčně příbuzné genům významně odlišně regulovaným.

K ověření transkriptomových dat pomocí qRT-PCR jsme vybrali zástupce ovlivněných genů (PA4764 (*fur*), PA4227 (*pchR*), PA2384, PA1317 (*cyoA*), PA4471 (*fagA*), PA3617 (*recA*), PA3007 (*lexA*), PA5360 (*phoB*), PA2165, PA0073, PA0072), kteří reprezentují charakteristické zástupce regulonů a rozdílné změny hladin mRNA. Jak je vidět z tabulky č. 4.6, data získaná pomocí Affymetrix Pseudomonas GeneChip arrays velmi dobře korelovala s výsledky qRT-PCR (koeficient determinace udávající závislost srovnávaných vzorků R^2 = 0,97).

Tab. 4.6: Porovnání hladin vybraných transkriptů *P. aeruginosa* získaných metodou microarrays a Real-time PCR.

Gen (název)	Změna hladin mRNA [a]	
	microarray	qRT-PCR
PA4764 (*fur*)	-2,44	-1,66 (± 0,04)
PA4227 (*pchR*)	2,47	1,60 (± 0,23)
PA2384	3,11	2,01 (± 0,15)
PA1317 (*cyoA*)	3,12	3,00 (± 0,27)
PA4471 (*fagA*)	13,62	7,51 (± 0,61)
PA3617 (*recA*)	-2,26	-1,54 (± 0,04)
PA3007 (*lexA*)	-2,02	-1,98 (± 0,02)
PA5360 (*phoB*)	-2,00	-1,82 (± 0,06)
PA2165	3,96	3,45 (± 0,4)
PA0073	44,76	29,55 (± 3,92)
PA0072	5,15	3,67 (± 0,7)

[a] Změna hladin mRNA představuje poměr hladin exprese v porovnání *P. aeruginosa* Δ*pppA-ppkA* vůči divokému kmeni PAO1. Mínus (-) značí sníženou expresi v kmeni Δ*pppA-ppkA*

Ovlivněné geny bylo možno rozdělit do několika funkčních kategorií (viz tabulka 4.7):

1. geny odpovědi na oxidativní stres.
2. geny QS/RpoS regulonu
3. geny Pho regulonu

Tab. 4.7: Geny *P. aeruginosa* ovlivněné v mutantovi *ΔpppA-ppkA* ve srovnání s divokým kmenem PAO1 za podmínek oxidativního stresu.

Gen (název)	Změna exprese [b]	*P* value	Protein (funkce - anglicky) [c]	Další regulátor	Normalizované signály genů [d]			
					Δ H_2O_2	Δ	PAO1 H_2O_2	PAO1
geny odpovědi na oxidativní stres								
SOS regulon								
PA0669	-2,85	0,027	Pr. DNA polymerase alpha chain (DNA replication, recombination, modification and repair; Putative enzymes)		4,4	3,5	5,9	3,7
PA0671	-3,58	0,000	HP		6,1	2,4	8,0	2,4
PA0911	2,81	0,010	HP		4,4	2,7	2,9	2,8
PA0922[a]	-2,39	0,055	HP		7,8	4,7	9,0	5,0
PA0923 (dinB)	-2,42	0,037	DNA damage inducible protein P (DNA replication, recombination, modification and repair; Adaptation, protection)		5,7	3,4	7,0	3,3
PA2288	-2,24	0,003	HP		8,7	3,2	9,9	3,7
PA3007 (lexA)	-2,02	0,023	repressor protein LexA (Adaptation, protection; Translation, post-translational modification, degradation)		8,0	4,8	9,1	5,0
PA3008	-2,26	0,010	HP		7,2	3,1	8,4	2,8
PA3617 (recA)	-2,26	0,020	RecA protein (DNA replication, recombination, modification and repair)		10,1	7,6	11,2	7,5

Tab 4.7 pokračování

Gen (název)	Změna exprese [b]	*P* value	Protein (funkce - anglicky) [c]	Další regulátor	Normalizované signály genů [d]			
					Δ H_2O_2	Δ	PAO1 H_2O_2	PAO1
ochranné buněčné mechanizmy								
PA0139 (ahpC)[a]	-1,91	0,090	alkyl hydroperoxide reductase subunit C (Adaptation, protection)		11,9	11,3	12,8	10,2
PA0140 (ahpF)	-2,73	0,044	alkyl hydroperoxide reductase subunit F (Adaptation, protection)		6,7	3,8	8,1	3,6
PA0848	-7,13	0,001	Pr. alkyl hydroperoxide reductase (Adaptation, protection; Putative enzymes)		4,9	2,5	7,7	2,8
PA2825	-3,08	0,001	Pr. transcriptional regulator (Two-component regulatory systems)		6,8	3,7	8,4	3,7
PA2826	-2,32	0,018	Pr. glutathione peroxidase (Adaptation, protection)		8,2	5,4	9,4	5,3
PA2868	-7,76	0,001	HP (Membrane proteins)		4,4	2,8	7,3	2,9
PA4236 (katA) [a]	-1,72	0,089	catalase (Adaptation, protection)		8,4	6,3	9,2	5,6
PA4400	-2,60	0,012	Pr. pyrophosphohydrolase (DNA replication, recombination, modification and repair)		3,2	3,0	4,5	2,9
PA4612 (ankB)	-2,79	0,042	CHP		3,7	2,4	5,2	2,5
PA1127	-3,07	0,032	Pr. oxidoreductase (Adaptation, protection; Putative enzymes)		6,0	6,5	7,6	8,3
PA3287	-6,70	0,001	CHP	RpoS	6,6	3,9	9,4	4,0
PA4468 (sodM)	3,36	0,015	superoxide dismutase (Adaptation, protection)		8,9	10,8	7,2	10,4
PA4469 (orfX)	9,73	0,001	HP		9,4	11,8	6,1	11,1
PA4470(fumC1)	7,86	0,002	fumarate hydratase (Energy metabolism)		8,8	11,3	5,8	10,5
PA4471 (fagA)	13,62	0,005	HP		9,5	10,7	5,8	10,3
syntéza pyocinů								
PA0614	3,60	0,009	HP		6,6	3,9	4,7	4,0
PA0617	4,79	0,002	Pr. bacteriophage protein		7,4	4,6	5,2	4,9
PA0618	3,05	0,027	Pr. bacteriophage protein (Related to phage, transposon, or plasmid)		7,1	5,0	5,5	5,1
PA0619	3,53	0,039	Pr. bacteriophage protein (Related to phage, transposon, or plasmid)		7,8	5,3	5,9	4,9
PA0620	2,51	0,035	Pr. bacteriophage protein (Related to phage, transposon, or plasmid)		6,7	4,9	5,4	4,8
PA0622	2,56	0,029	Pr. bacteriophage protein (Related to phage, transposon, or plasmid)		7,0	5,8	5,7	5,2
PA0623	3,44	0,042	Pr. bacteriophage protein (Related to phage, transposon, or plasmid)		8,4	6,5	6,6	5,9
PA0624	3,01	0,014	HP (Related to phage, transposon, or plasmid)		6,9	4,7	5,3	4,4
PA0625	3,02	0,009	HP (Related to phage, transposon, or plasmid)		5,5	4,2	3,9	4,0
PA0626 [a]	2,35	0,053	HP (Related to phage, transposon, or plasmid)		5,5	3,8	4,3	3,5
PA0627	3,03	0,006	CHP (Related to phage, transposon, or plasmid)		5,6	3,9	4,0	3,9
PA0628	3,97	0,004	CHP (Related to phage, transposon, or plasmid)		6,8	4,8	4,8	4,0
PA0629	3,62	0,046	CHP (Related to phage, transposon, or plasmid)		5,7	3,1	3,9	3,1
PA0630	3,88	0,034	HP (Related to phage, transposon, or plasmid)		6,8	4,7	4,8	4,0
PA0631	4,01	0,032	HP (Related to phage, transposon, or plasmid)		6,0	3,5	4,0	3,1
PA0632	2,95	0,001	HP (Related to phage, transposon, or plasmid)		4,0	2,4	2,5	2,4
PA0635	3,69	0,034	HP (Related to phage, transposon, or plasmid)		6,3	3,5	4,4	3,5
PA0636	4,46	0,004	HP (Related to phage, transposon, or plasmid)		7,4	5,3	5,2	4,8
PA0637	2,97	0,006	CHP (Related to phage, transposon, or plasmid)		5,1	3,1	3,5	2,9
PA0638	4,28	0,003	Pr. bacteriophage protein (Related to phage, transposon, or plasmid)		6,0	3,6	3,9	3,3
PA0639	4,28	0,022	CHP (Related to phage, transposon, or plasmid)		6,3	3,7	4,2	3,4
PA0640	3,42	0,003	Pr. bacteriophage protein (Related to phage, transposon, or plasmid)		4,3	2,3	2,6	2,3
PA0641	3,02	0,008	Pr. bacteriophage protein (Related to phage, transposon, or plasmid)		5,2	3,2	3,6	3,1
PA0643	2,07	0,011	HP (Related to phage, transposon, or plasmid)		3,7	2,5	2,7	2,4
PA0646	2,26	0,049	HP (Related to phage, transposon, or plasmid)		4,4	3,2	3,3	3,0
PA3142	-2,62	0,015	HP (Related to phage, transposon, or plasmid)		6,7	5,9	8,1	5,5
PA3143	-2,92	0,002	HP (Related to phage, transposon, or plasmid)		3,4	3,0	5,0	2,9

Tab 4.7 pokračování

Gen (název)	Změna exprese [b]	*P* value	Protein (funkce - anglicky) [c]	Další regulátor	Normalizované signály genů [d]			
					Δ H_2O_2	Δ	PAO1 H_2O_2	PAO1
metabolismus železa								
pyoverdin								
PA2381	4,72	0,023	HP		6,9	8,4	4,7	8,7
PA2384	3,11	0,006	transcriptional regulator		7,8	10,8	6,2	10,5
PA2398 (fpvA)[a]	1,84	0,082	ferripyoverdine receptor (Transport of small molecules)		3,7	9,2	2,8	7,9
PA2403	-2,96	0,032	HP (Membrane proteins)		3,7	5,9	5,2	5,8
PA2404	-2,19	0,019	HP (Membrane proteins)		6,3	8,2	7,4	7,9
PA2405	-2,14	0,023	HP		5,0	7,5	6,1	7,6
PA2409	-2,58	0,015	Pr. permease of ABC transporter (Membrane proteins; Transport of small molecules)		4,1	6,6	5,4	6,1
pyochelin								
PA4227 (pchR)[a]	2,47	0,098	transcriptional regulator PchR (Transcriptional regulators)		7,0	7,2	5,7	7,4
PA4228 (pchD)	6,12	0,029	pyochelin biosynthesis protein PchD (Transport of small molecules; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate))		8,4	10,9	5,7	9,8
PA4229 (pchC)	5,89	0,059	pyochelin biosynthetic protein PchC (Transport of small molecules; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate))		9,1	11,4	6,6	10,5
PA4230 (pchB)	6,08	0,038	salicylate biosynthesis protein PchB (Transport of small molecules; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate))		8,3	11,9	5,7	11,1
ostatní								
PA0471 (fiuR)[a]	2,50	0,055	Pr. transmembrane sensor (Membrane proteins; Transcriptional regulators; Two-component regulatory systems)		6,4	6,7	5,0	7,2
PA1300	3,86	0,028	Pr. sigma-70 factor, ECF subfamily (Transcriptional regulators)		6,4	7,0	4,5	7,3
PA4211	2,74	0,007	Pr. phenazine biosynthesis protein (Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate))		4,1	10,8	2,6	10,0
PA4570	5,46	0,011	HP Pr. negative regulator		9,2	11,9	6,7	11,8
PA4764 (fur)[a]	-2,44	0,086	ferric uptake regulation protein (Transcriptional regulators)		6,0	7,4	7,3	6,3
PA4895	-2,35	0,039	Pr. transmembrane sensor (Transcriptional regulators; Membrane proteins)		3,2	3,9	4,4	4,4
PA5505	2,27	0,017	Pr. TonB-dependent receptor (Membrane proteins; Transport of small molecules)		3,8	7,0	2,7	5,8
PA5531 (tonB)	2,25	0,043	TonB protein (Transport of small molecules)		9,2	9,6	8,1	9,6
Primární metabolismus								
PA0250	-4,17	0,001	CHP		5,7	5,4	7,8	5,6
PA1317 (cyoA)	3,12	0,026	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II (Energy metabolism)		7,1	8,3	5,5	9,7
PA1318 (cyoB)	2,24	0,032	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I (Energy metabolism)		4,4	5,8	3,2	7,3
PA1319 (cyoC)	3,10	0,026	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III (Energy metabolism)		5,2	6,1	3,6	7,4
PA1321 (cyoE)	2,21	0,040	cytochrome o ubiquinol oxidase protein CyoE (Energy metabolism)		5,7	5,7	4,6	7,5
PA2646 (nuoK)	2,24	0,043	NADH dehydrogenase I chain K (Energy metabolism)		4,9	5,4	3,7	5,5
PA5170 (arcD)	4,45	0,049	arginine/ornithine antiporter (Amino acid biosynthesis and metabolism; Membrane proteins; Transport of small molecules)		8,1	7,4	6,0	6,7
PA5171 (arcA)	2,67	0,019	arginine deiminase (Amino acid biosynthesis and metabolism)		7,6	9,0	6,2	8,5
PA5172 (arcB)	2,66	0,026	ornithine carbamoyltransferase, catabolic (Amino acid biosynthesis and metabolism)		7,3	8,8	5,9	8,5
PA0105 (coxB)	-2,38	0,048	cytochrome c oxidase, subunit II (Energy metabolism)		8,9	5,7	10,1	4,9
PA0108 (coIII)[a]	-1,89	0,062	cytochrome c oxidase, subunit III (Energy metabolism)		9,4	6,0	10,3	4,6
PA0603[a]	2,50	0,095	Pr. ATP-binding component of ABC transporter (Transport of small molecules)		7,9	4,8	6,5	4,1
PA0604	3,46	0,012	Pr. binding protein component of ABC transporter (Transport of small molecules)		5,0	2,7	3,2	2,5

Tab 4.7 pokračování

Gen (název)	Změna exprese [b]	*P* value	Protein (funkce - anglicky) [c]	Další regulátor	Normalizované signály genů [d]			
					Δ H_2O_2	Δ	PAO1 H_2O_2	PAO1
PA0605	2,83	0,003	Pr. permease of ABC transporter (Membrane proteins); Transport of small molecules)		5,6	3,0	4,1	3,0
PA2869	-3,36	0,000	HP		2,6	2,6	4,4	2,7
PA1756 (cysH)	-2,16	0,007	3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate reductase (Amino acid biosynthesis and metabolism)		4,0	5,3	5,1	4,5
PA2611 (cysG)	-2,02	0,008	siroheme synthase (Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers)		4,9	4,7	5,9	4,8
PA3441	7,35	0,006	Pr. molybdopterin-binding protein (Transport of small molecules)		9,5	7,2	6,6	5,6
PA3442 [a]	2,69	0,092	Pr. ATP-binding component of ABC transporter (Transport of small molecules)		7,5	6,4	6,0	5,1
Ostatní geny								
PA0942 [a]	-2,23	0,054	Pr. transcriptional regulator (Transcriptional regulators)		5,6	4,7	6,8	5,1
PA3237	-2,89	0,004	HP		3,9	2,4	5,5	2,5
PA4257 (rpsC) [a]	2,00	0,064	30S ribosomal protein S3 (Translation, post-translational modification, degradation)		6,9	10,2	5,9	9,4
PA0157 (triB)	2,28	0,001	Pr. RND efflux membrane fusion protein precursor (Transport of small molecules)		6,6	5,3	5,4	5,4
Geny regulované QS								
PA2134-92 locus								
PA2134	4,16	0,032	HP		8,7	5,6	6,6	5,7
PA2135	2,85	0,027	Pr. transporter (Membrane proteins; Transport of small molecules)		4,7	3,0	3,2	3,4
PA2136	3,01	0,004	HP		4,1	2,3	2,5	2,4
PA2139	6,55	0,001	HP		6,8	2,6	4,1	2,8
PA2140	3,74	0,018	Pr. metallothionein (Central intermediary metabolism)		6,8	3,0	4,9	3,4
PA2141	5,64	0,003	HP		6,9	2,8	4,4	2,8
PA2142	4,05	0,029	Pr. short-chain dehydrogenase (Putative enzymes)		7,7	3,9	5,7	4,3
PA2144 (glgP)	4,01	0,008	glycogen phosphorylase (Cell wall / LPS / capsule)		6,8	3,7	4,8	3,6
PA2148	4,37	0,016	CHP (Membrane proteins)		8,1	4,2	6,0	4,3
PA2149	6,01	0,011	HP		9,4	4,6	6,9	4,7
PA2150	5,76	0,000	CHP		5,5	2,4	2,9	2,4
PA2151	3,46	0,041	CHP		7,0	3,6	5,2	3,4
PA2156	2,40	0,001	CHP		3,6	2,4	2,4	2,4
PA2157	4,03	0,002	HP		6,2	3,4	4,2	3,8
PA2158	4,51	0,019	Pr. alcohol dehydrogenase (Zn-dependent) (Putative enzymes)		7,9	4,1	5,7	4,0
PA2159 [a]	2,89	0,062	CHP		5,9	3,2	4,4	3,7
PA2161 [a]	3,33	0,081	HP		5,1	4,3	3,4	4,2
PA2162	2,14	0,049	Pr. glycosyl hydrolase (Putative enzymes)		6,2	4,6	5,1	4,8
PA2163	2,79	0,023	HP		8,3	5,4	6,8	5,3
PA2164	4,66	0,026	Pr. glycosyl hydrolase (Putative enzymes)		9,6	5,7	7,4	5,1
PA2165	3,96	0,008	Pr. glycogen synthase (Energy metabolism)		10,3	5,5	8,3	5,3
PA2167	2,72	0,049	HP		6,5	3,0	5,1	2,5
PA2168	2,78	0,049	HP		8,0	4,6	6,5	4,3
PA2169 [a]	3,30	0,064	HP		7,4	4,5	5,7	5,0
PA2170 [a]	6,18	0,062	HP		7,9	4,4	5,3	4,0
PA2171 [a]	2,88	0,091	HP		8,2	4,3	6,6	3,8
PA2172 [a]	2,75	0,072	HP		8,0	4,0	6,6	4,4
PA2178	3,55	0,004	HP		6,6	3,3	4,8	3,9
PA2179	3,16	0,023	HP		5,7	2,5	4,1	2,7
PA2180	3,05	0,032	HP		8,3	4,2	6,6	4,2
PA2181	2,99	0,001	HP		5,3	2,6	3,7	2,8
PA2184	5,62	0,007	CHP		7,6	4,9	5,1	5,0
PA2187	3,01	0,038	HP		7,2	3,4	5,6	3,9
PA2188	2,14	0,032	Pr. alcohol dehydrogenase (Zn-dependent) (Putative enzymes)		4,2	2,8	3,1	2,8
PA2190 [a]	3,89	0,073	CHP		9,8	6,9	7,8	6,8
PA2192	2,72	0,020	CHP		5,4	2,9	4,0	3,0

Tab 4.7 pokračování

Gen (název)	Změna exprese [b]	*P* value	Protein (funkce - anglicky) [c]	Další regulátor	Normalizované signály genů [d]			
					Δ H_2O_2	Δ	PAO1 H_2O_2	PAO1
virulenční faktory regulované QS								
PA1246 (aprD) [a]	2,10	0,066	alkaline protease secretion protein AprD (Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate); Protein secretion/export apparatus)		6,4	8,0	5,4	8,1
PA1248 (aprF) [a]	2,05	0,072	alkaline protease secretion protein AprF (Protein secretion/export apparatus; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate))		6,4	6,8	5,4	6,6
PA1249 (aprA)	3,25	0,042	alkaline metalloproteinase precursor (Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	PhoB	6,6	8,3	4,9	7,2
PA2300 (chiC)	6,31	0,004	chitinase (Carbon compound catabolism)	RpoS	5,7	8,3	3,1	7,2
PA2570 (pa1L)	3,37	0,025	PA-I galactophilic lectin (Adaptation, protection; Motility & Attachment)	RpoS	6,6	5,8	4,8	4,8
PA3477 (rhlR) [a]	2,25	0,013	transcriptional regulator RhlR (Adaptation, protection; Transcriptional regulators)	RpoS	8,9	9,2	7,8	9,3
PA3724 (lasB)	2,37	0,042	elastase LasB (Translation, post-translational modification, degradation; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate))	PQS	6,0	8,4	4,7	6,6
PhoB regulon								
PA2364	-2,65	0,006	HP	RpoS	5,6	5,4	7,0	5,2
PA2560	-2,09	0,039	HP		5,1	3,8	6,2	3,0
PA2931 (cifR)	-2,05	0,008	transcriptional regulator (Transcriptional regulators)		5,4	3,6	6,5	4,2
PA3006 (psrA)	-2,31	0,049	transcriptional regulator PsrA (Transcriptional regulators)		5,1	4,4	6,3	5,1
PA3309	3,88	0,010	CHP		7,7	7,3	5,7	7,2
PA5360 (phoB)	-2,00	0,004	two-component response regulator PhoB (Transcriptional regulators; Two-component regulatory systems)		4,6	3,5	5,6	3,5
PA5365 (phoU)	-1,76	0,012	phosphate uptake regulatory protein PhoU (Membrane proteins; Transcriptional regulators)		6,1	4,1	6,9	4,1
PA5369 (pstS)	-2,03	0,049	phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein (Transport of small molecules)		8,3	5,2	9,3	5,3
PA0073-72								
PA0072	5,15	0,001	HP (Membrane proteins)		5,5	3,0	3,1	3,3
PA0073	44,76	0,001	Pr. ATP-binding component of ABC transporter (Transport of small molecules)		11,5	7,7	6,0	6,5
nezařazené geny								
PA1178 (oprH) [a]	-3,79	0,056	outer membrane protein H1 precursor (Adaptation, protection; Membrane proteins)	Mg^{2+} limitation	6,2	8,6	8,1	8,7
PA1179(phoP) [a]	-2,08	0,072	two-component response regulator PhoP (Transcriptional regulators); Two-component regulatory systems)	Mg^{2+} limitation	4,3	5,5	5,4	4,7
PA1180 (phoQ)	-2,96	0,000	two-component sensor PhoQ (Two-component regulatory systems)	Mg^{2+} limitation	4,8	4,7	6,3	4,8
PA4293 (pprA)	-2,04	0,031	Pr. two-component sensor (Two-component regulatory systems)		4,4	3,4	5,4	3,4
PA0120	-3,05	0,006	Pr. transcriptional regulator (Transcriptional regulators)		2,9	2,8	4,5	2,8
PA3757	-5,59	0,005	Pr. transcriptional regulator (Transcriptional regulators)		3,4	3,4	5,9	2,8
PA3758	-2,59	0,018	Pr. N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (Central intermediary metabolism)		4,3	4,1	5,6	3,7
PA2414	2,70	0,039	L-sorbosone dehydrogenase (Carbon compound catabolism)		6,2	5,2	4,8	4,5
PA2416 (treA)	3,31	0,025	periplasmic trehalase precursor (Carbon compound catabolism)		6,5	3,7	4,8	4,0
PA3431	13,62	0,010	CHP (Membrane proteins)		6,2	7,3	2,4	8,2
PA4139	13,54	0,044	HP		7,2	8,0	3,5	4,2

[a] *P* value > 0,05

[b] Změna exprese představuje poměr hladin exprese v porovnání *P. aeruginosa* Δ*pppA-ppkA* vůči divokému kmeni PAO1 za podmínek oxidativního stresu. Mínus (-) značí sníženou expresi v kmeni Δ*pppA-ppkA*

[c] HP – hypotetický protein, CHP - konzervovaný hypotetický protein, Pr. – pravděpodobný

[d] Průměr normalizovaných signálů genů ze dvou replikátů; Δ H_2O_2 / Δ - intenzita signálu mutantního kmene inkubovaného / neinkubovaného s 10 mM H_2O_2; PAO1 H_2O_2 / PAO1 – intenzita signálu divokého kmene PAO1 inkubovaného / neinkubovaného s 10 mM H_2O_2. Změna exprese se vypočítá dle vzorce: $2^{(\text{signál x} - \text{signál y})}$ x a y označují kmeny, které jsou mezi sebou porovnávány, např. $2^{(\text{signál Δ H2O2-signál PAO1 H2O2})}$.

4.1.7.1 Geny spojené s odpovědí na oxidativní stres

Podle našich očekávání většina ovlivněných genů spadala do kategorie odpovědi na oxidativní stres (23,130,149). Tyto geny mohou být dále rozděleny na geny adaptivní stresové odpovědi (geny SOS regulonu, geny související s ochrannými buněčnými mechanizmy, geny pyocinů), dále na geny související s metabolismem železa a geny primárního metabolismu.

SOS regulon

Poškození DNA způsobené hydroxylovými radikály indukuje expresi genu *lexA*, represoru SOS regulonu, a genu *recA*. RecA stimuluje štěpení LexA a umožňuje expresi genů SOS regulonu. Exprese genů SOS regulonu, včetně genů *lexA* a *recA* a dále genů pro inhibitory buněčného dělení PA3008 a PA0671 nebo gen PA0923 (*dinB*), kódující poškozením indukovaný protein P, byla v mutantním kmeni méně zvýšena než v kmeni PAO1 v porovnání s nestresovými podmínkami (viz tab. 4.7).

Geny související s ochrannými buněčnými mechanizmy

Tato skupina genů byla zastoupena především geny alkylhodroperoxidreduktáz *ahpC*, *ahpF* a PA0848 či genem pro hlavní katalázu *katA*. Alkylhydroperoxidreduktázy jsou hlavní enzymy degradující jak endogenně tak exogenně působící peroxid vodíku (157). Expresní hladiny všech těchto genů byly významně méně indukovány v mutantním kmeni v porovnání s kmenem PAO1. Například relativní hladina transkripce alkylhydroperoxidreduktázy PA0848 byla zvýšena 5,2krát v mutantovi na rozdíl od divokého kmene, kde byl nárůst 29krát oproti nestresovým podmínkám. Exprese genů operonu *fagA-fumC-orfX-sodM* (PA4468-71), který se rovněž účastní obranných mechanizmů vůči oxidativnímu stresu, byla naopak méně snížena v kmeni *ΔpppA-ppkA* než v PAO1 v porovnání s nestresovou situací. Tento operon je ale pod kontrolou regulačního proteinu příjmu železa Fur (Ferric uptake regulation protein) a je tak indukován při nedostatku železa a reprimován při jeho nadbytku (63). Stejně jako tento operon měly i další geny regulované příjmem železa méně sníženou hladinu exprese v porovnání s divokým kmenem (viz níže – Geny metabolismu železa).

Geny pyocinů

Pozorovali jsme uniformě zvýšenou transkripční hladinou genů pro pyociny (PA0614-PA0646) v mutantním kmeni oproti kmeni PAO1. Pyociny typu F, R a S jsou bakteriociny *P. aeruginosa* a bylo prokázáno, že jejich produkce je indukována působením H_2O_2 (23,162).

Geny metabolismu železa

Odpověď na oxidativní stres je úzce spjata s homeostází železa. Jak bylo zjištěno ve studii publikované Chang *et al.*, (23), exprese genů regulovaných metabolismem Fe^{2+} je reprimována během oxidativního stresu působením regulátoru příjmu železa, proteinem Fur, aby bylo zabráněno dalšímu vzniku reaktivních hydroxylových radikálů z H_2O_2 ve Fentonově reakci. Souhlasně s tímto pozorováním byla zvýšena exprese genu *fur* v divokém kmeni, zatímco v kmeni *ΔpppA-ppkA* byla jeho exprese naopak snížena v porovnání s nestresovými podmínkami (viz tab. 4.7). Jako následek této deregulace byly geny účastnící se syntézy sideroforu pyochelinu, *pchDCB,* a regulátoru *pchR* méně reprimovány. Geny pro syntézu a regulaci sideroforu pyoverdinu jevily různorodou expresi, geny PA2403-4 a PA2409 byly více reprimované než v kmeni PAO1, zatímco geny PA2381, PA2384, kódující globální regulátor metabolismu Fe^{2+} a PA2398 (receptor ferripyoverdinu) byly méně reprimovány. Stejně tak byly méně reprimovány i geny tonB (receptor ferrisideroforu) a PA5505 (pravděpodobný TonB závislý receptor).

Geny primárního metabolismu

Stejně jako v naší předchozí transkripční studii byly ovlivněny geny pro terminální cytochromoxidázy respiračního řetězce. Pod vlivem oxidativního stresu došlo ke zvýšení exprese genů *coxB* a *coIII* cytochrom c oxidázového komplexu u mutanta i PAO1, nicméně konečné hladiny byly u mutanta nižší než u PAO1. Stejný trend platil i pro operon *cyoABCDE* kódující již dříve zmíněnou cytochrom o ubichinol oxidázu fungující za vysokých koncentrací kyslíku (128). Za oxidativního stresu jsou geny této oxidázy reprimovány jak v divokém tak mutantním kmeni, nicméně v mutantním kmeni s mnohem nižší účinností (tab. 4.7). Stejně tak exprese dalších genů energetického metabolismu (*nuoK*, *arcDAB*) byla méně reprimována v kmeni *ΔpppA-ppkA*.

4.1.7.2 Geny regulované QS systémy *las*/*rhl* a stacionárním σ-faktorem RpoS

Řada genů identifikovaných v naší studii byla již dříve nalezena jako regulované QS systémy *las*/*rhl* (155). Transkripční hladiny téměř všech genů této kategorie byly vyšší v mutantovi než v divokém kmeni. Většina ovlivněných genů spadala do velkého genového shluku obsahujícího geny PA2134-2192 (tab. 4.7), které byly dříve identifikovány jako regulované QS systémem *rhl* (155) a indukované působením buněk lidského respiračního epitelu na *P. aeruginosa* PAO1 (27). Za působení oxidativního stresu bylo celkem 36 genů z tohoto klastru zvýšeně exprimováno 2,1 až 6,5krát. Funkce 26-ti z 36-ti je označována jako hypotetická, neklasifikovaná, neznámá. Počítačově predikované operony PA2165-2160 a PA2151-2153 obsahují několik genů spojených se syntézou trehalózy a glykogenu. Gen PA2144 (*glgP*), který kóduje fosforylázu glykogenu, se zřejmě také účastní syntézy prekurzorů trehalózy.

Mezi dalšími ovlivněnými geny QS regulonu, které jsou často regulovány také RpoS, byly geny virulenčních faktorů jako je alkalická proteáza AprA a komponenty jejího sekrečního systému AprD a AprF, gen *chiC* pro chitinázu, gen *lasB* pro elastázu nebo gen *pa1L* kódující galaktofilní lektin. Zbytek genů regulovaných QS byly jak geny primárního metabolismu tak řada genů s hypotetickou funkcí.

4.1.7.3 Geny Pho regulonu

Několik genů souvisejících s příjmem fosfátu vykazovalo rozdílnou transkripci v mutantním kmeni za podmínek oxidativního stresu v porovnání s divokým kmenem. Geny *pstS* a *phoU* fosfát specifického transportního komplexu PstSCAB-PhoU, gen *phoB*, kódující hlavní dvousložkový regulační protein (115), a další geny Pho regulonu byly méně indukovány v mutantním kmeni než divokém kmeni. Exprese genů Pho regulonu, za podmínek limitace anorganickým fosfátem (P_i), je aktivována vazbou regulátoru PhoB na konsensus sekvenci PHO boxu v promotorech těchto genů (78). V souladu s tím jsme identifikovali několik dalších genů s predikovanými PHO boxy, tyto geny kódují transkripční regulátory PsrA (81) a CifR (107), alkalickou proteázu AprA a několik hypotetických proteinů (viz tab. 4.7).

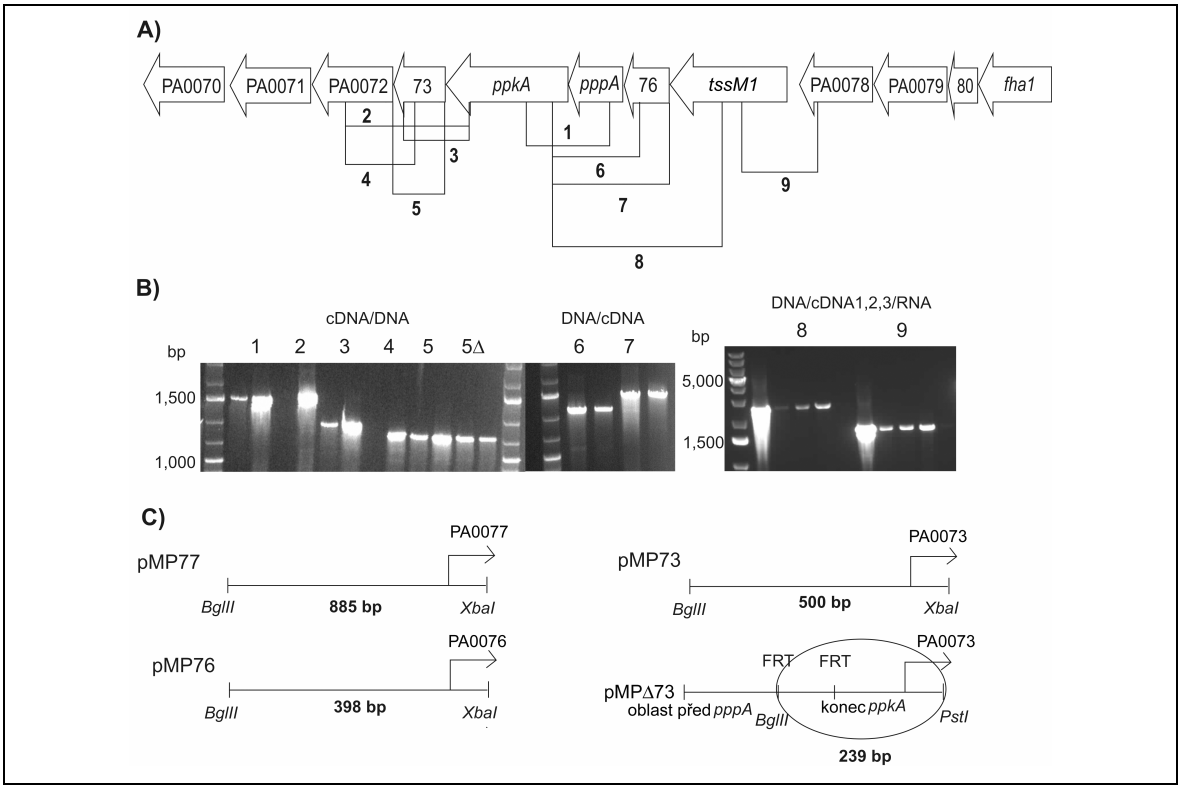
Ostatních geny kódovaly převážně hypotetické proteiny a dále geny primárního metabolismu. Kromě těchto genů, které nebylo možno přiřadit k žádné funkční skupině, jsme identifikovali v mutantním kmeni sníženou expresi sousedících genů *oprH*, *phoPQ*. Proteiny PhoPQ tvoří dvousložkový systém, který indukuje expresi proteinu vnější membrány OprH při nedostatku Mg^{2+} iontů v prostředí a účastní se regulace rezistence *P. aeruginosa* na polykationtová antibiotika typu polymixinu B (90). Dále jsme pozorovali sníženou expresi genu senzorové kinázy PprA dvousložkového systému PprA/PprB (181). V souvislosti s trehalózovými operony jsme mimo genový shluk PA2134-92 pozorovali zvýšenou expresi genu PA2416 (*treA*), který kóduje periplazmatický prekurzoz trehalázy a dále významně sníženou expresi (5,59krát) genu PA3757 pravděpodobného transkripčního regulátoru trehalózových operonů.

4.1.8 Stanovení operonu obsahujícího geny *pppA*, *ppkA* a PA0073

Globální analýza transkriptomů potvrdila deleci genů *pppA* a *ppkA*. Za podmínek oxidativního stresu jsme nicméně pozorovali významně zvýšenou expresi genů PA0073 a PA0072 následujících za genem *ppkA*. Gen PA0073 je součástí lokusu kódujícího sekreční systém typu 6 H1-T6SS a kóduje pravděpodobnou ATP vazebnou komponentu ABC transportéru. Jeho funkce v sekrečním systému zůstává neznámá, společně s genem PA0072 byl navržen transport lipoproteinů sekrečním systémem typu VI (72).

Abychom stanovili, zda jsou geny PA0073 a PA0072 kotranskribovány společně s geny *pppA* a *ppkA* nebo mají vlastní promotor, zkoumali jsme organizaci počítačově predikovaného operonu (DOOR databáze na www.pseudomonas.com) začínajícího genem PA0077 (*tssM1*) po gen PA0070. Testování transkripce lokusu PA0077 až PA0070 jsme prováděli pomocí překryvných PCR reakcí pokrývajících predikovaný operon (reakce číslovány 1-9, obr. 4.1.7 A). Porovnávali jsme vždy PCR fragmenty amplifikované na chromozomální DNA (pozitivní kontrola experimentu) a fragmenty amplifikované na cDNA získané reverzní transkripcí RNA kmene PAO1 nebo *ΔpppA-ppkA*. Samotná RNA sloužila jako kontrola čistoty vzorku. V kotranskribované oblasti jsme předpokládali vznik fragmentů o stejné velikosti jak na templátu DNA tak cDNA. Jak je patrno z obrázku 4.1.7 B, shodný produkt na DNA i cDNA jsme získali pro reakci *pppA-ppkA* (č. 1), *ppkA*-PA0073 (č. 3), PA0076-*pppA-ppkA* (č. 6), PA0076-*pppA-ppkA* (č. 7); PA0077-PA0076-

pppA-ppkA (č. 8) a PA0078-PA0077 (*tssM1*) (č. 9). Pozitivní vnitřní kontrola a současně kontrola exprese genu PA0073 v divokém kmeni a kmeni *ΔpppA-ppkA* jsou reakce 5 a 5Δ. Nepřítomnost produktu ve vzorcích s RNA kam nebyla přidána reverzní transkriptáza potvrzuje, že RNA nebyla kontaminována genomovou DNA (poslední sloupec vzorků č. 8 a 9). Na rozdíl od předchozích reakcí, v reakci č.2, *ppkA*-PA0073-PA0072, a reakci č.4, PA0073-PA0072, produkt vznikal pouze na chromozomální DNA a nikoli cDNA. Tento výsledek ukazuje, že gen PA0072 je pravděpodobně transkribován nezávisle na předchozích genech a gen PA0073 je posledním genem operonu. Na základě počítačové predikce operonu PA0077-70 a přítomnosti intergenové oblasti mezi geny PA0077 (*tssM1*) a PA0078 o velikosti 221 bp jsme předpokládali, že gen PA0077 (*tssM1*) je prvním genem operonu. Oproti našemu předpokladu vznikal PCR produkt č. 9 začínající 851 bp před startovacím kodónem genu *tssM1* jak na templátu DNA tak cDNA.



Obr. 4.1.7: Stanovení operonu obsahujícího geny *pppA*, *ppkA* a PA0073. A) Genetická organizace regionu genů PA0081 (*fha1*) až PA0070 a schéma stanovení operonu pomocí překryvných PCR reakcí (číslovaných 1-9). B) Transkripce genů v predikovaném operonu byla testována shora popsanými PCR reakcemi na templátech DNA, cDNA a RNA. Reakce 1-5 jsou v pořadí cDNA/DNA; reakce 6-7 jsou v pořadí DNA/cDNA; reakce 8-9 jsou v pořadí DNA/cDNA 1, 2, 3/RNA. RNA použitá pro vzorky 8-9 byla použita pro syntézu cDNA všech vzorků (1-9) a sloužila jako kontrola čistoty vzorku RNA. cDNA 2 a 3 jsou další dvě odlišné cDNA použité jako kontroly. Velikosti hlavních proužků DNA žebříčku v bp jsou uvedeny v levé části gelů. **C) Schematické uspořádání předpokládaných promotor obsahujících oblastí použitých pro konstrukci tzv. promoter probe plazmidů odvozených od vektoru pMP220**. Pro každou znázorněnou oblast jsou uvedena restrikční místa použitá pro její klonování do vektoru pMP220. Pouze zakroužkovaná oblast zbývající po deleci genů *pppA-ppkA* je součástí plazmidu pMPΔ73.

Na základě našich výsledků předpokládáme, že součástí operonu budou také geny PA0081 (*fha1*) až PA0078. Vzhledem k tomu, že geny předcházející *pppA-ppkA* nebyly dle výsledků transkriptomové studie ovlivněny, ve stanovení počátku operonu jsme dále nepokračovali.

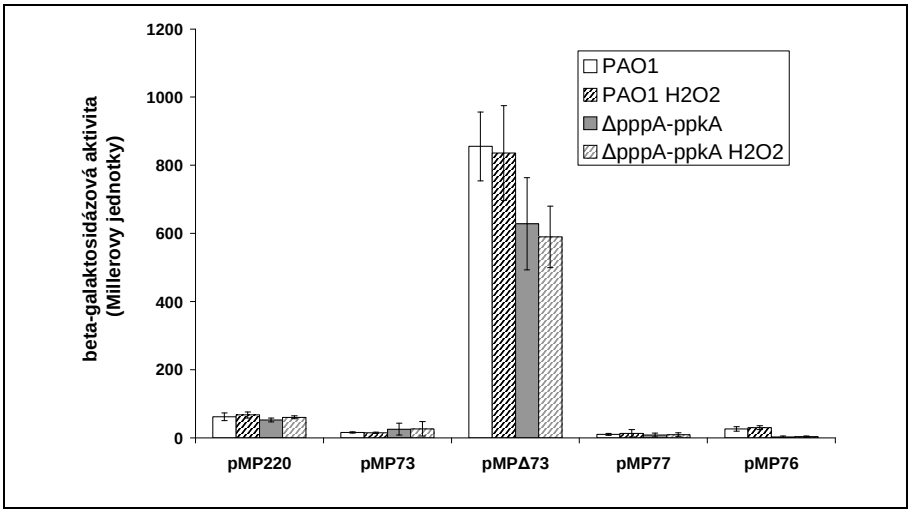
Na rozdíl od počítačové predikce operonu PA0077 (*tssM1*) - PA0070 jsme jako poslední gen operonu určili gen PA0073. Počátek operonu není zcela jasný, naše výsledky naznačily, že součástí by mohl být také gen PA0078. Protože je tento gen součástí počítačově predikovaného operonu PA0081 (*fha1*) – PA0078, je možné, že součástí operonu kódujícího geny *pppA-ppkA* jsou i tyto další geny.

4.1.9 Analýza možných promotorových oblastí před geny PA0077 (*tssM1*), PA0076 a PA0073

Hypotéza, že součástí operonu jsou také geny PA0081 (*fha1*)-PA0078, byl dále podpořen analýzou možných promotorových sekvencí před geny PA0077 (*tssM1*) a PA0076. Analyzovali jsme také možnou přítomnost alternativního promotoru genu PA0073. Předpokládané promotorové oblasti genů PA0077 (*tssM1*), 76, 73 a zbytkovou sekvenci po deleci lokusu *pppA-ppkA* v mutantním kmeni jsme klonovali do tzv. promoter probe vektoru pMP220 před gen *lacZ* bez vlastního promotoru. Takto jsme získali plazmidy pMP77, pMP76, pMP73 a pMPΔ73 (obr. 4.1.7 C) nesoucí transkripční fúze příslušné promotorové oblasti s genem *lacZ*. Tyto konstrukty byly vneseny do buněk kmenů PAO1 a *ΔpppA-ppkA* a byla u nich sledována β-galaktosidázová aktivita. Jako pozitivní kontrolu jsme použili kmeny PAO1 a *ΔpppA-ppkA* nesoucí plazmid pRPO220B s funkčním promotorem genu RpoS. Negativní kontrolu pak představoval prázdný vektor pMP220 (87). Všechny reportérové kmeny byly pěstovány v minimálním médiu M9 do OD_{600} = 0,8 a β-galaktosidázová aktivita byla měřena před inkubací a po inkubaci kultur s 10 mM H_2O_2. Nepozorovali jsme žádnou promotorovou aktivitu u kmenů nesoucích plazmidy pMP77, pMP76 a pMP73, které obsahují fúze sekvencí před geny PA0077, PA0076 a PA0073 divokého kmene s genem *lacZ*. Aktivita byla ale detekována v kmenech nesoucích plazmid pMPΔ73, obsahující oblast před mutantním genem PA0073.

Tyto výsledky potvrzují analýzu operonu, která naznačila, že gen *tssM1* nemá svůj vlastní promotor a je součástí většího operonu začínajícího pravděpodobně genem

PA0081 (*fha1*). Z výsledků dále vyplývá, že po deleci genů *pppA-ppkA* v mutantovi vznikla před genem PA0073 sekvence s promotorovou aktivitou. Tato sekvence obsahuje zbytkové úseky FRT míst po vyštěpení Gm^R-GFP FRT kazety z chromozomu delečního kmene (popsáno v kapitole Materiál a metody a na obr. 4.1.7 C). Nepozorovali jsme zvýšenou expresi po přidání H_2O_2 ke kulturám, jak bylo zjištěno v transkriptomové studii, β-galaktosidázová aktivita v kmeni nesoucím pMPΔ73 zůstávala téměř stejná před i po inkubaci s peroxidem vodíku (obr. 4.1.8). Z toho vyvozujeme, že zvýšená exprese genu PA0073 je artefakt způsobený s největší pravděpodobností vyštěpením Gm^R-GFP FRT kazety při přípravě mutanta *ΔpppA-ppkA*. Vzhledem k tomu, že se pravděpodobně jedná o poslední gen v operonu, neočekáváme žádný další polární efekt a vliv na fyziologii bakterie.



Obr. 4.1.8: β-galaktosidázová aktivita řízená promotorem fúzovaným s *lacZ*. Buňky nesoucí plazmid byly pěstovány do OD_{600} = 0,8 a β-galaktosidázová aktivita byla měřena před a po inkubaci s 10 mM H_2O_2. Všechna měření byla prováděna v triplikátech a v grafu jsou znázorněny průměry se směrodatnými odchylkami výběru. PAO1/ PAO1 H_2O_2 - aktivita divokého kmene nesoucího vyznačený plazmid před / po inkubaci s 10 mM H_2O_2; Δ*pppA-ppkA*/ Δ*pppA-ppkA* H_2O_2 – aktivita mutanta nesoucího vyznačený plazmid před / po inkubaci s 10 mM H_2O_2.

4.1.10 Komplementace mutace *ΔpppA-ppkA*

Vzhledem k tomu že PppA a PpkA jsou regulační proteiny, chtěli jsme zjistit, zda expresní hladiny důležitých genů identifikovaných v transkriptomových studiích byly vráceny k normálu komplementací mutace geny *pppA-ppkA* vloženými do neutrálního místa na chromozomu *P. aeruginosa ΔpppA-ppkA*. Pomocí mini-Tn7 vektoru pUC18-

mini-Tn7T-LAC s *tac* promotorem byly geny *pppA-ppkA* vloženy do chromozomu mutantního kmene, čímž vznikl kmen Δ::tn7TLACpak. Modifikovaný divoký kmen PAO1::tn7TLAC a mutantní kmen Δ::tn7TLAC s vloženou prázdnou kazetou mini-Tn7T-LAC byly použity jako kontroly (viz Materiál a metody).

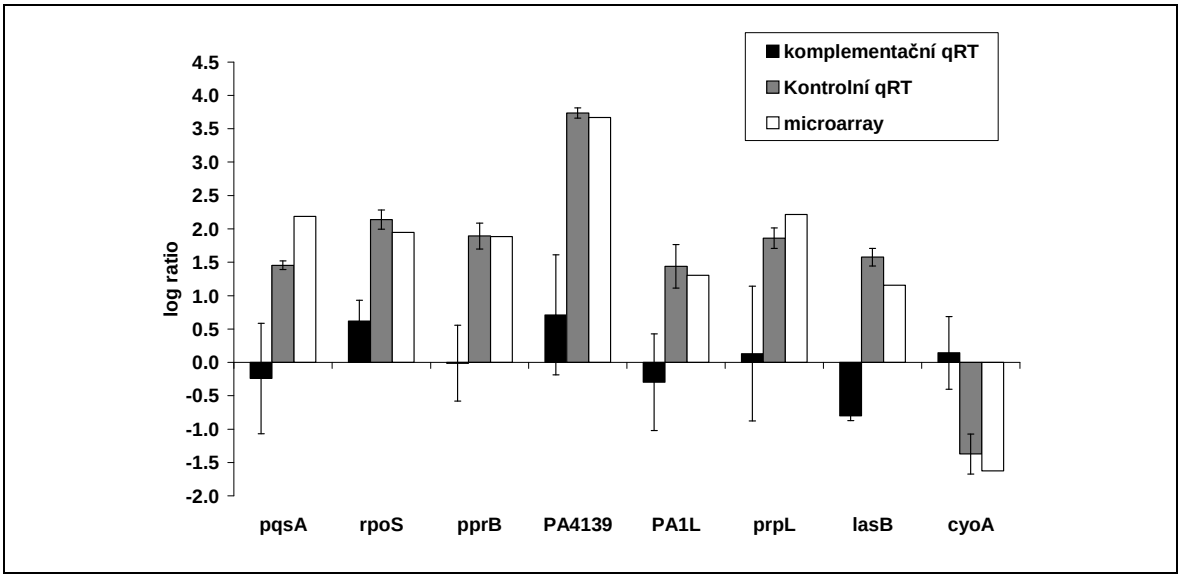
Nejprve jsme pomocí kvantitativní Real-time PCR analýzy porovnávali expresní hladiny genů *pppA*, *ppkA* a PA0073 v kmenech PAO1::tn7TLAC, Δ::tn7TLAC a Δ::tn7TLACpak neindukovaných a indukovaných 1 mM IPTG. Tři nezávislé replikáty celkové RNA z každého kmene byly izolovány z kultur pěstovaných v minimálním médiu M9 do OD_{600} = 0,8. Jak je vidět z tabulky 4.8, při indukci exprese 1 mM IPTG se exprese *pppA* a *ppkA* v kmeni Δ::tn7TLACpak zvýšila přibližně 30krát ve srovnání s kmenem PAO1::tn7TLAC. Hladina mRNA genu PA0073 byla zvýšena zhruba 4krát a prakticky nebyla ovlivněna hladinou exprese nebo přítomností genů *pppA-ppkA* (viz tabulka 4.8).

Tab. 4.8: Změna exprese genů *pppA*, *ppkA* a PA0073 v kmenech PAO1::tn7TLAC, Δ::tn7TLAC a Δ::tn7TLACpak.

Gen	Změna exprese [a]		
	Δ::tn7TLACpak + IPTG/ PAO1::tn7TLAC + IPTG	**Δ::tn7TLACpak/ PAO1::tn7TLAC**	**Δ::tn7TLAC/ PAO1::tn7TLAC**
pppA	27,49 ± 5,36	-1,32 ± 0,34[b]	x
ppkA	35,16 ± 6,76	1,59 ± 0,67[b]	x
PA0073	5,60 ± 1,62	4,66 ± 2,18	3,92 ± 0,48

Pro qRT-PCR analýzu jsou zobrazeny průměry ze tří biologických replikátů a směrodatné odchylky výběru; [a] Změna exprese představuje poměr expresních hladin v porovnání kmene Δ::tn7TLACpak nebo Δ::tn7TLAC s kmenem PAO1::tn7TLAC s indukcí nebo bez indukce 1mM IPTG; [b] Změna exprese není statisticky významně odlišná od PAO1::tn7TLAC (P > 0.05); Mínus (-) znamená sníženou expresi v delečním kmeni (Δ); + IPTG – indukce exprese 1 mM IPTG

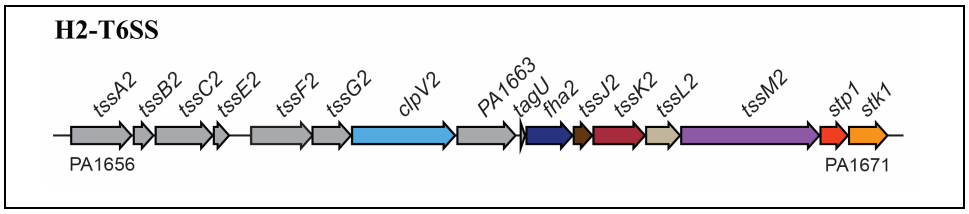
Zajímavé bylo zjištění, že geny *pppA-ppkA* byly exprimovány v kmeni Δ::tn7TLACpak i bez indukce IPTG a že transkripční hladiny obou genů byly srovnatelné s kmenem PAO1::tn7TLAC. Využili jsme této situace v následující kvantitativní Real-time PCR analýze s geny ovlivněnými v mutantovi *ΔpppA-ppkA* za nestresových podmínek. Výsledky ukázaly, že exprese všech vybraných genů v komplementovaném kmeni Δ::tn7TLACpak dosáhla přibližně hladin modifikovaného divokého kmene PAO1::tn7TLAC (log ratio -1 až +1 = rozdíl v expresi -2 až +2krát) (obr. 4.1.9).



Obr. 4.1.9: Změna exprese vybraných genů v komplementovaném kmeni Δ::tn7TLACpak ve srovnání s PAO1::tn7TLAC a srovnání mutant versus divoký kmen – výsledky z microarrays a kontrolní qRT-PCR. Log ratio udává logaritmus (o základu 2) poměru hladiny exprese genů mutanta a divokého typu. Je-li rozdíl v expresi genu mutanta a divokého kmene dvojnásobný, potom je exprese genu ovlivněna signifikantně (dvojnásobná změna exprese = log ratio ≥{-1;1}). Změna exprese genů v komplementovaném kmeni Δ::tn7TLACpak v porovnání s PAO1::tn7TLAC není signifikantní.
Pro qRT-PCR analýzu jsou zobrazeny průměry ze tří biologických replikátů a chybové úsečky značí směrodatné odchylky výběru.
Komplementační qRT – transkripční hladiny vyznačených genů v Δ::tn7TLACpak v porovnání s PAO1::tn7TLAC stanovené pomocí qRT-PCR; kontrolní qRT – transkripční hladiny vyznačených genů v mutantovi Δ*pppA-ppkA* ve srovnání s PAO1 stanovené qRT-PCR; microarray – transkripční hladiny vyznačených genů v mutantovi Δ*pppA-ppkA* ve srovnání s PAO1 stanovené metodou DNA microarray.

Tím jsme potvrdili roli proteinového páru PppA-PpkA v regulaci exprese těchto genů. Zároveň tyto výsledky prokázaly, že artificiální exprese genu PA0073 nemá vliv na expresi testovaných genů.

4.2 Studium interakcí Ser/Thr proteinkinázy Stk1 s fosfatázou Stp1 a proteinem Fha2



Obr. 4.2.1: Lokus DNA sekrečního systému typu VI H2-T6SS *P. aeruginosa* PAO1 kódujícího geny fosfatázy Stp1 a proteinkinázy Stk1. Převzato z Hsu *et al.*, 2009 (72).

Fosfatáza Stp1 a Ser/Thr proteinkináza Stk1 jsou kódovány posledními dvěma geny operonu, který je součástí lokusu sekrečního systému typu VI, H2-T6SS (obr. 4.2.1). Součástí počítačově predikovaného operonu je i gen PA1665 (*fha2*), který kóduje protein Fha2 obsahující doménu FHA. Sekreční systém H2 je pozitivně regulován *quorum sensing* regulátory LasR a PqsR a bylo zjištěno, že spolu se sekrečním systémem H3-T6SS hrají důležitou roli v patogenezi ve zvířecích a rostlinných modelech (97).

Tato část práce navazuje na část výsledků diplomové práce M. Urbanové (172) vypracované v rámci grantového projektu č. 161/2006 GAUK: „Analýza mutantů v genech pro Ser/Thr proteinkinasy a fosfoproteinfosfatasy *Pseudomonas aeruginosa*“, která se zabývala částečnou charakterizací proteinkinázy Stk1 a interakcí této kinázy s fosfatázou Stp1. Výsledky jsou stručně shrnuty v kapitole 4.2.1.

4.2.1 Částečná charakterizace proteinkinázy Stk1 a interakce s fosfatázou Stp1

Ser/Thr proteinkináza Stk1 a fosfatáza Stp1 byly již dříve částečně biochemicky charakterizovány (122), pro účely studia interakcí obou proteinů bylo však nutné charakterizaci doplnit. Byla ověřena autofosforylační aktivita Stk1 a dále bylo zjištěno, že Stk1 je aktivní v přítomnosti Mg^{2+} i Mn^{2+} iontů, což bylo důležité pro interakce s fosfatázou Stp1, která je funkční pouze v přítomnosti Mn^{2+} iontů.

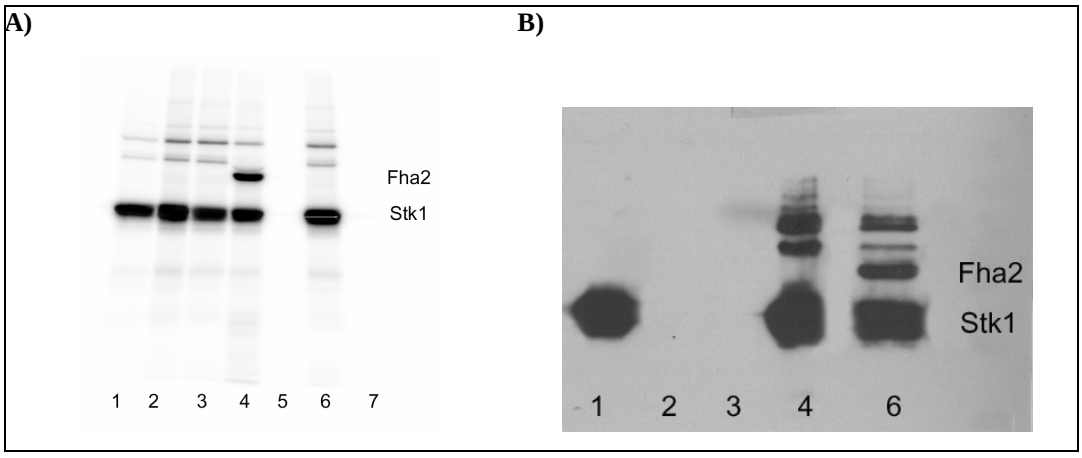
Při studiu interakcí kinázy Stk1 s fosfatázou Stp1 bylo pomocí radioaktivně značeného γ-^{32}P ATP zjištěno, že v kinázové reakci po přidání fosfatázy Stp1

k autofosforylované kináze Stk1 dochází k významnému snížení fosforylace kinázy Stk1 v čase. Z toho jasně vyplývá, že kináza Stk1 je *in vitro* substrátem fosfatázy Stp1 a že tyto dva proteiny zřejmě tvoří funkční pár (172).

4.2.2 Identifikace proteinu Fha2 jako substrátu kinázy Stk1

Jak již bylo zmíněno výše, lokus H2-T6SS kódující Ser/Thr kinázu Stk1 a fosfatázu Stp1 kóduje také gen PA1665 (*fha2*). Vzhledem k vysoké strukturní podobnosti se sekrečním systémem H1-T6SS, který také kóduje Ser/Thr kinázu, fosfatázu a protein Fha1, který je substrátem obou enzymů, rozhodli jsme se ověřit, zda je protein Fha2 substrátem proteinkinázy Stk1. Protein Fha2 stejně jako protein Fha1 sekrečního systému H1-T6SS obsahuje doménu FHA, interakce obou proteinů je proto vysoce pravděpodobná.

Připravili jsme expresní plazmid pET28Fha2 nesoucí gen *fha2* fúzovaný na svém N konci s histidinovou kotvou. Protein Fha2 jsme exprimovali v buňkách *E. coli* BL21(DE3) a izolovali pomocí afinitní chromatografie. Purifikovaný protein byl použit jako substrát v kinázové reakci s proteinkinázou Stk1. Z výsledku kinázové reakce s využitím značení proteinů pomocí radioaktivního γ-^{32}P ATP jasně vyplývá, že protein Fha2 je v *in vitro* podmínkách substrátem kinázy Stk1. Jako negativní kontrola byl použit protein BSA (obr. 4.2.2 A).



Obr. 4.2.2: Proteinkináza Stk1 fosforyluje Fha2 *in vitro.* Fha2 je fosforylován na threoninu. A) Kinázová reakce s γ-^{32}P ATP. 1. autofosforylace Stk1 5 min v 37ºC , 2. 30 min, 3. 60 min, 4. Stk1 + Fha2 30 min, 5. Fha2 30 min, 6. Stk1 + BSA 30 min, 7. BSA 30 min. **B) Imunodetekce pThr pomocí anti-pThr protilátky.** 1. Stk1 bez přidaného ATP 30 min v 37ºC, 2. Fha2 bez přidaného ATP 30 min, 3. Fha2 + ATP 30 min, 4. Stk1 + ATP 30 min, 6. Stk1 + Fha2 + ATP 30 min

Dále jsme provedli neradioaktivní kinázovou reakci, kdy jsme pomocí imunodetekce s protilátkami proti fosforylovaným threoninovým (pThr) a serinovým (pSer) zbytkům určili, že Fha2 je fosforylován na threoninu (obr 4.2.2 B). Z imunodetekce je rovněž zřejmé, že proteinkináza Stk1 je z buněk *E.coli* BL21(DE3) izolována již ve fosforylovaném stavu (obr. 4.2.2 B, reakce 1).

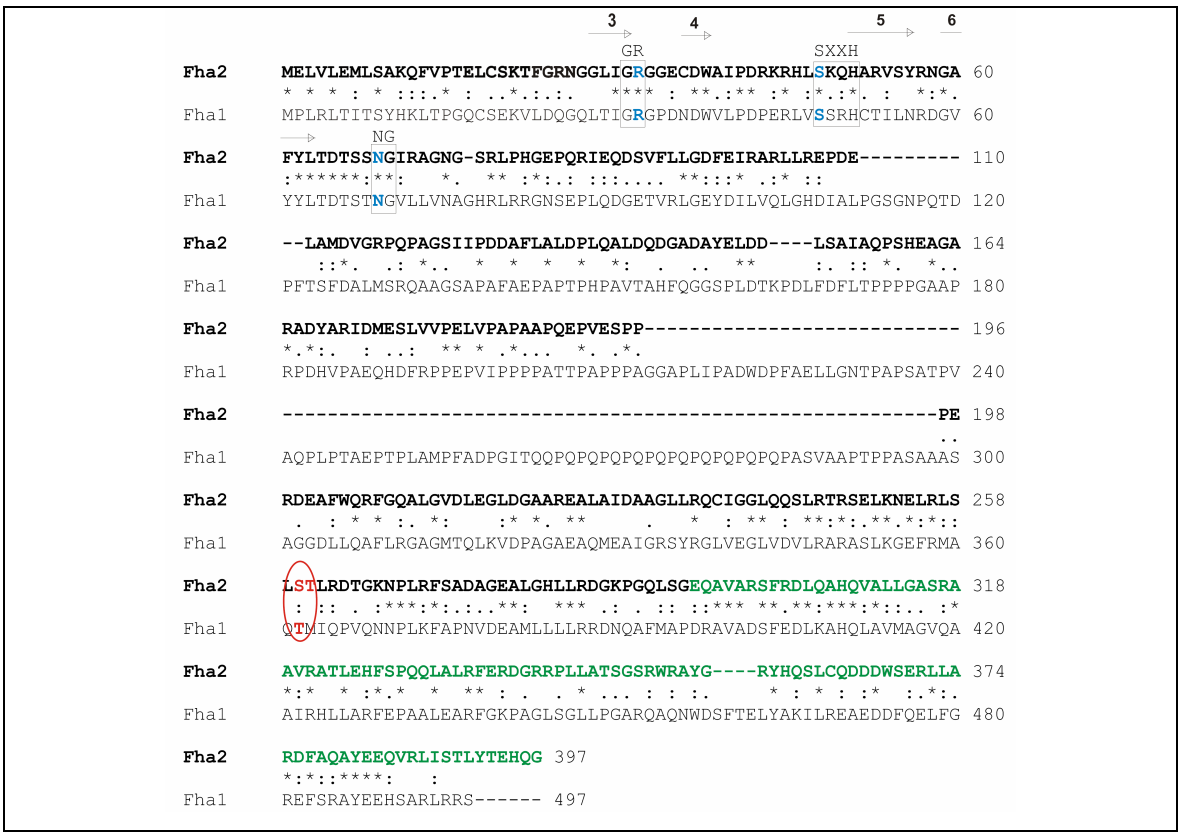
4.2.3 Stanovení místa fosforylace proteinu Fha2

Domény FHA (forkhead-associated) fungují jako jednotky rozpoznávající fosfoproteiny, které specificky váží peptidy obsahující fosforylovaný threonin (pThr) (132). Doména FHA vytváří sendvičovou strukturu složenou z 11 β-listů. Tři konzervované motivy jsou sekvence GR na konci β-listu 3, SXXH před β-listem 5 a NG před β-listem 7. Aminokyseliny, které se přímo účastní kontaktu s fosforylovanou aminokyselinou vazebného fosfoproteinu jsou Arg motivu GR, Ser motivu SXXH a Asn motivu NG (129) (Obr 4.2.3).

Protein Fha1 je fosforylován proteinkinázou PpkA na threoninu 362. Na základě porovnání homologních sekvencí proteinů Fha1 a Fha2 jsme jako místo fosforylace Fha2 kinázou Stk1 vytipovali Thr 261 (obr 4.2.3). Pomocí cílené mutageneze jsme připravili expresní plazmid pET28Fha261A nesoucí záměnu Thr261 za alanin a purifikovaný protein použili jako substrát v kinázové reakci s Stk1.

Při analýze fosfoproteomu *P. aeruginosa* Ravichandran *et al.*, (146) detekovali fosforylaci proteinu Fha2 na Ser 260, detekovaný fosfopeptid byl LSLpSTLR. Zdálo se tedy, že jsme vytipovali správné místo fosforylace, bylo však nutné odlišit, zda se jedná o serinový zbytek 260 nebo threoninový zbytek 261. Připravili jsme proto opět cílenou mutagenezí expresní plazmid nesoucí záměnu Ser 260 za Ala a plazmid nesoucí záměnu Ser 260, Thr 261 za alaninové zbytky. Plazmidy byly nazvány pET28Fha260A a pET28Fha2AA. Rekombinantní proteiny byly purifikovány a použity jako substrát v kinázové reakci s Stk1.

Z neznámých příčin se nám nepodařilo zopakovat fosforylaci proteinu Fha2 kinázou Stk1 ani jeho mutovaných forem. Z tohoto důvodu nebylo možné stanovit místo fosforylace tohoto proteinu.



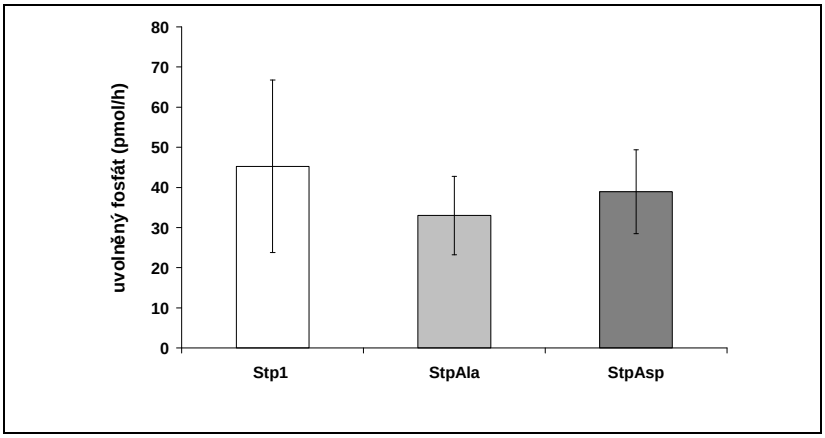
Obr. 4.2.3: Srovnání sekvencí proteinů Fha2 a Fha1. Na základě tohoto srovnání byl vytipován Thr 261 proteinu Fha2 jako možné místo fosforylace kinázou Stk1. Číslované šipky znázorňují β-listy 3 až 6 domén FHA proteinů Fha2 a Fha1, sekvence v rámečcích znázorňují konzervované motivy domén FHA a modře jsou zvýrazněny aminokyseliny (AK), které se přímo účastní kontaktu s fosforylovanou aminokyselinou vazebného fosfoproteinu. Doménu FHA proteinu Fha2 tvoří AK 1-106, Fha1 1-107. Červeně je zvýrazněn pThr 362 proteinu Fha1 a možný pThr 260, případně pSer 261 proteinu Fha2. Zeleně je zvýrazněna sekvence proteinu Fha2 homologní s doménami DUF1706. Tyto domény mají neznámou funkci a jsou součástí mnoha proteinů bakterií a kvasinek. (Sekvence byly porovnány v programu ClustalW2 (22), http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/).

4.2.4 Studium vlivu fosforylace fosfatázy Stp1 na její aktivitu

Analýza fosfoproteomu *P. aeruginosa* odhalila fosforylaci fosfatázy Stp1 na Thr 90 (146). Abychom ověřili, zda mutace Thr 90 povede ke změně aktivity fosfatázy, připravili jsme cílenou mutagenezí expresní plazmidy pET28StpAla a pET28StpAsp nesoucí záměnu Thr 90 za Ala nebo Asp. Záměna Thr 90 za fosfoablativní alaninový zbytek simuluje nefosforylovaný stav proteinu, záměna za fosfomimetický aspartátový zbytek simuluje naopak fosforylovaný stav (31,175).

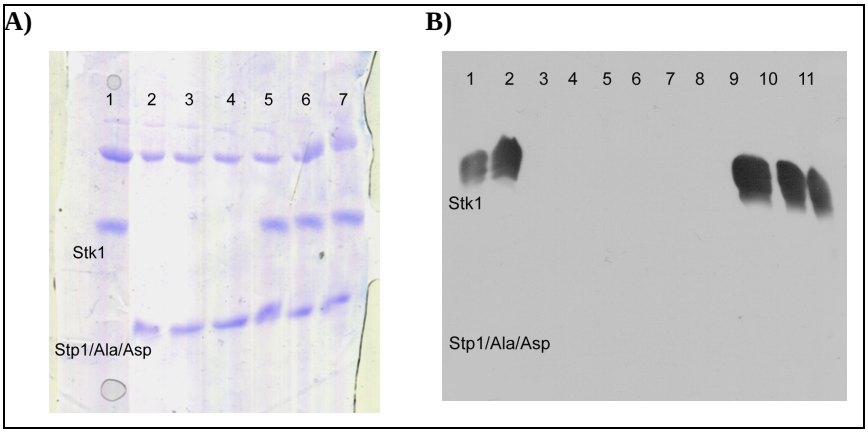
Testovali jsme fosfatázovou aktivitu mutovaných forem a porovnávali s nemutovaným proteinem Stp1. Fosfatázová reakce s komerčním fosfopeptidovým substrátem pro fosfatázy typu PPM (viz Materiál a metody) neprobíhala. Jako substrát

jsem proto použili autofosforylovanou kinázu Stk1, která byla již dříve prokázána jako substrát fosfatázy Stp1 (viz výše - kapitola 4.2.1 a (172)). Z našich výsledků vyplývá, že uvedené záměny Thr 90 fosfatázy Stp1 nemají vliv na fosfatázovou aktivitu proteinu (obr 4.2.4). Zároveň jsme odlišnou metodou znovu potvrdili, že proteinkináza Stk1 je substrátem fosfatázy Stp1 *in vitro*.



Obr. 4.2.4: Porovnání aktivit fosfatázy Stp1 a mutovanými variantami StpAla a StpAsp. V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty minimálně ze tří nezávislých experimentů. Chybové úsečky udávají směrodatné odchylku výběrů.

Nemutovaná i mutované verze Stp1 byly použity také jako substrát v kinázové reakci s kinázou Stk1 a fosforylace byla detekována imunodetekcí s protilátkou proti fosforylovanému threoninu. Fosforylaci fosfatázy Stp1 na threoninu kinázou Stk1 jsme však neprokázali (obr 4.2.5 B).



Obr. 4.2.5 Fosforylace fosfatázy Stp1 proteinkinázou Stk1. A) SDS PAGE. 1. Stk; 2. Stp1; StpAla; 3. StpAsp; 4. Stk1+Stp1; 5. Stk1+StpAla; 6. Stk1+StkAsp. **B) Imunodetekce pThr.** 1. Stk1-ATP; 2. Stk1+ATP; 3. Stp1-ATP; 4. Stp1+ATP; 5. StpAla-ATP; 6. StpAla+ATP; 7. StpAsp-ATP; 8. StpAsp+ATP, 9. Stk1+Stp1; 10. Stk1+StpAla; 11. Stk1+StpAsp

Provedli jsme srovnání sekvencí fosfatázy Stp1 s fosfatázami PstP *Mycobacterium tuberculosis*, MspP *Mycobacterium smegmatis* a STP *Streptococcus agalactiae* (obr. 4.2.6 A) a dostupných trojrozměrných struktur těchto tří fosfatáz (182) (obr 4.2.6 B). Ze srovnání 3-D struktur fosfatáz jsme odvodili, že threoninový zbytek 90 se nenachází v konzervované oblasti a je pravděpodobně situován na povrchu proteinu.

A)

```
PstP            --VTLVLRYAARSDRGLVRANNEDSVYAG-----ARLLALADGMGGHAAGEVASQLVIAALAH 59
MspP            -GMASVLSAATATDQGPVRENNQDACLAD-----GILYAVADGFG--ARGHHASATALKTLSA 55
Stp1            MQRTEPWRSAARTDRGKVRARNEDAFLDCPDRG---LWAVADGMGGHQAGDLASRMIVTSLAE 60
STP             -ARKKYMEISLLTDIGQRRSNNQDFINQFENKAGVPLIILADGMGGHRAGNIASEMTVTDLGS 62

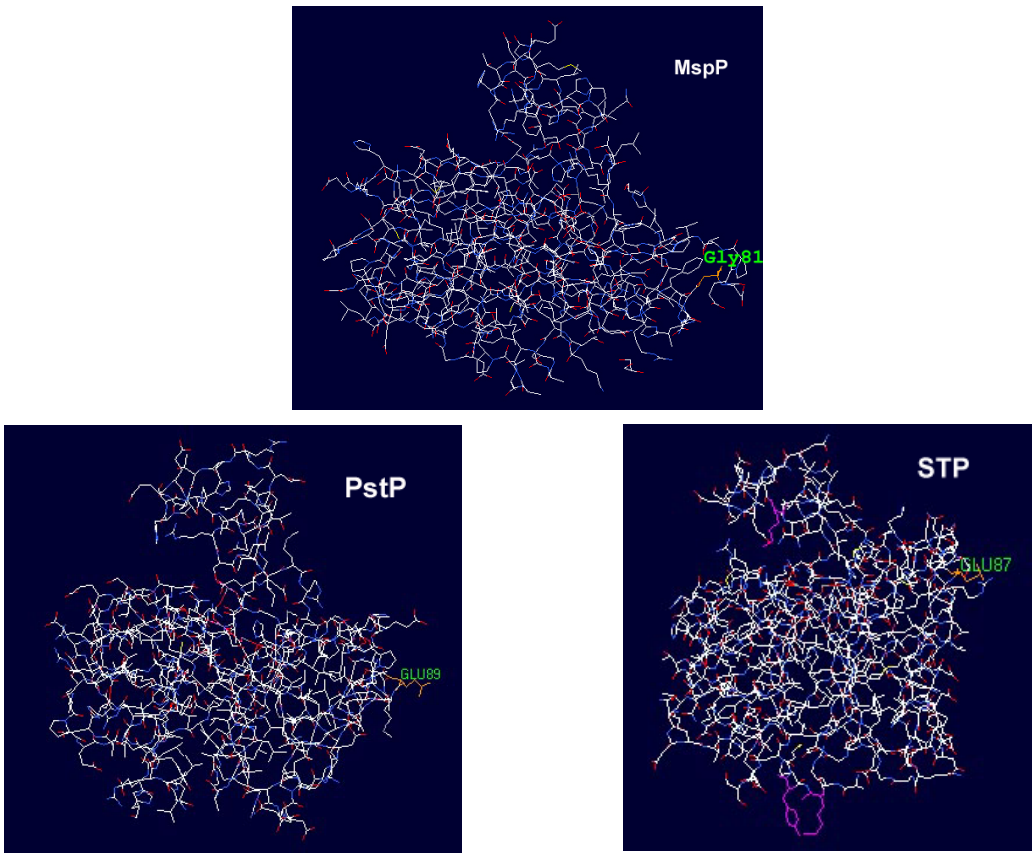
PstP            LDDDEPGGDLLAKLDAAVRAGNSAIAAQVEMEPDLEGMGTTLTAILFAGNRLG---LVHI 116
MspP            GFAAAPDRD---GLLEAVQQANLRVFELLGDEPTVSG--TTLTAVAVFEPGQGGPLVVNI 110
Stp1            LPARAGFDERLNAMRQCLHWLNRRLGEELTLSAERGDRIIGSTVVALVVEGSR-AACVWV 119
STP             DWAETDFSELSEIRDWMLVSIETENRKIYELGQSDDYKGMGTTIEAVAIVGDN-IIFAHV 121

PstP            GDSRGYLLRDGELTQITKDDTFVQTLVDEGRITPEEAHSHPQRSLIMRAL-TGHEVEPTL 175
MspP            GDSPLYRIRDGHMEQLTDDHSVAGELVRMGEITRHEARWHPQRHLLTRALGIGPHIGPDV 170
Stp1            GDSRCYLWRGQRLYQLSRDHSLLQRLVDERRMDIEQARAYPSARALTRAVGASEQLVLDV 179
STP             GDSRIGIVRQGEYHLLTSDHSLVNELVKAGQLTEEEAASHPQKNIITQSIGQANPVEPDL 181

PstP            TMREARAGDRYLLCSDGLSDPVSDETILEALQIPEVAESAHR-LIELALRGGGPDNVTVVV 235
MspP            FGIDCGPGDRLLISSDGLFAAADEALIVDAATSPDPQVAVRR-LVEVANDAGGSDNTTVVV 230
Stp1            LELEVHPGDVFLLCSDGLYEELSADALGRALSLASPQVAVER-LFDGALSGAARDNLTAVV 239
STP             GVHLLEEGDYLVVNSDGLTNMLSNADIATVLTQEKTLDDKNQDLITLANHRGGLDNITVAL 242

PstP            ADVVD 240
MspP            IDLG- 234
Stp1            IRQ—242
STP             VYVESEAV 250
```

B)



Obr. 4.2.6: Porovnání Ser/Thr fosfatáz MspP *Mycobacterium smegmatis*, PstP *M. tuberculosis*, Stp1 *P. aeruginosa* a STP *Streptococcus agalactiae*. A) Srovnání proteinových sekvencí. Žlutě jsou vyznačeny absolutně konzervované aminokyseliny (AK) fosfatáz rodiny PPM, tučně konzervované AK. Červeně jsou znázorněny AK na místě pThr fosfatázy Stp1. Sekvence byly porovnány v programu ClustalW2 (25) http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/ . **B) Modely krystalů fosfatáz MspP (PDB kód 2JFS), PstP (PDB kód 1TXO) a STP (PDB kód 2PK0) s vyznačenými AK odpovídajícími pThr 90 fosfatázy Stp1** (zpracováno programem SwissPdb viewer (59), http://www.expasy.org/spdbv/).

5 Diskuze

5.1 Stanovení funkce Ser/Thr proteinkinázy PpkA a fosfatázy PppA

Ser/Thr proteinkináza PpkA a fosfatáza PppA byly v nedávné době identifikovány jako nezbytné regulační složky sekrečního systému typu VI nazvaného H1-TSS6 (119,120). Reverzibilní modifikací proteinu Fha1 kontrolují přenos sekretovaných proteinů a extracelulárních složek sekrečního systému (proteinů Tse1-3, Hcp1 a VgrG1) z buňky (60,71). Proteinkináza PpkA navíc zřejmě funguje jako senzor extracelulárního signálu, po jehož vazbě na její periplazmatickou doménu dochází k dimerizaci a autofosforylaci kinázové domény a tím k aktivaci sekrečního systému. Fosfatáza PppA působí antagonisticky proti aktivitě kinázy PpkA defosforylací proteinu Fha1 a zřejmě i defosforylací kinázové domény kinázy PpkA (72). V loňském roce byl identifikován toxin Tse2, který je sekretován systémem H1-T6SS specificky do buněk bakterií v těsném kontaktu s *P. aeruginosa*, nikoliv do buněk eukaryotních (71). Je proto možné, že tento systém je primárně zaměřen antibakteriálně. Nicméně, protein Hcp1 byl při infekci *P. aeruginosa* opakovaně izolován ze sputa nemocných trpících cystickou fibrózou (119), z čehož je zřejmé, že se tento systém účastní virulence v eukaryotním hostiteli.

Cílem první části této práce bylo objasnit funkci proteinkinázy PpkA a fosfatázy PppA. Studiem funkce proteinkinázy PpkA a fosfatázy PppA jsme se zabývali již v období před objevením jejich funkce v sekreci systémem typu VI a naším záměrem bylo sledovat fenotypový projev mutantů v těchto genech. Připravili jsme dvojitého delečního mutanta *ΔpppA-ppkA*, který nám umožnil studium funkce těchto dvou funkčně těsně spjatých signalizačních proteinů. Studium mutanta v genech *pppA-ppkA* vedlo k několika důležitým zjištěním: delece genů *pppA-ppkA* (i) ovlivňuje schopnost mutanta růst v minimálním médiu M9, přestože růst v komplexním médiu není ovlivněn; (ii) vede ke změně citlivosti mutanta k oxidativnímu a osmotickému stresu a antibiotikům karbenicilinu a chloramfenikolu a snížené produkci pyocyaninu; (iii) snižuje schopnost mutanta přežívat v myších makrofázích a způsobuje atenuaci virulence v rostlinném modelu. (iv) Porovnání globálních transkriptomů divokého kmene *P. aeruginosa* PAO1 a mutanta *ΔpppA-ppkA*

dále odhalilo vliv dvojice PppA-PpkA na expresi genů odpovědi na oxidativní stres a geny dalších regulonů.

5.1.1 PppA-PpkA ovlivňují růst na glycerolu

Testováním produkce virulenčních faktorů na specifických pevných médiích jsme u mutantního kmene *ΔpppA-ppkA* zjistili opožděnou produkci některých faktorů převážně na médiích obsahujících glycerol. Nejvýznamnější rozdíl jsme zaznamenali u produkce rhamnolipidů na agaru SW Blue, který obsahuje jako jediný zdroj uhlíku glycerol. Následné charakterizace růstu divokého a mutantního kmene v minimálním médiu M9 s glukózou nebo glycerolem jako jedinými zdroji uhlíku prokázaly, že růstová rychlost mutanta je snížena v minimálním médiu ve srovnání s divokým kmenem PAO1 na obou zdrojích uhlíku. Kultury mutantního kmene v M9 s glycerolem navíc dosahovaly významně nižších konečných optických denzit ve stacionární fázi v porovnání s ostatními kulturami. Růst mutanta na komplexním médiu LB však zůstává v porovnání s kmenem PAO1 nezměněn, předpokládáme, že se jedná o přímý vliv glycerolu. Při srovnávání transkriptomů kmene PAO1 a *ΔpppA-ppkA* za nestresových podmínek jsme zaznamenali 1,7krát sníženou expresi genu *glpD* kódujícího glycerol-3-fosfátdehydrogenázu, což je druhý enzym v katabolismu glycerolu katalyzující přeměnu glycerol-3-P na dihydroxyaceton-P. Glycerol-3-P vzniká z glycerolu fosforylací glycerolkinázou (64). Ověření metodou Real-time PCR však již tuto změnu nepotvrdilo. Podstata tohoto jevu proto zůstává zatím neobjasněna.

5.1.2 PppA-PpkA se účastní regulace odpovědi buňky na vnější stresové podmínky

Proteinkináza PpkA je membránová kináza s periplazmatickou doménou typu von Willebrand faktor typ A. Tyto domény jsou součástí hlavně eukaryotních proteinů, kde se účastní proteinových interakcí (např. receptor-ligand) a jsou často součástí multiproteinových komplexů (185). Funkce těchto domén u prokaryot nebyly dosud prostudovány, ale předpokládá se, že u proteinkinázy PpkA plní senzorovou funkci. Signál aktivující kinázu PpkA není prozatím známý a není zřejmé, zda kináza reaguje přímo se

signálem (ligandem) nebo zprostředkovaně s dalšími proteiny, jejichž vazba na periplazmatickou doménu by vedla k aktivaci kinázy. Takovouto funkci má zřejmě protein TagR, který je lokalizován v periplazmě a delece genu *tagR* vede k významnému snížení fosforylace proteinu Fha1 (72). Proteinkináza PpkA by tak mohla sloužit jako senzor různých signálů z prostředí. V naší laboratoři byl prokázán vliv senzorové Ser/Thr proteinkinázy StkP *Streptococcus pneumoniae* na odolnost této bakterie ke stresům z prostředí (150). Chtěli jsme proto zjistit, zda podobný vliv bude mít také mutace genů *pppA-ppkA* a vystavili jsme proto mutanta *ΔpppA-ppkA* účinkům oxidativního, osmotického, teplotního a pH stresu.

Teplotní stres (40ºC) ani pH v rozsahu 5-9 neměly žádný efekt na přežívání mutanta ve srovnání s divokým kmenem PAO1 (výsledky nejsou uvedeny).

Oproti tomu výsledky experimentů s oxidativním stresem navozeným působením různých koncentrací peroxidu vodíku prokázaly, že mutantní kmen je významně citlivější k oxidativnímu stresu než divoký kmen. Rezistence k oxidativnímu stresu se přitom uplatňuje vysokou měrou právě během infekce dýchacích cest pacientů trpících CF i při interakcích s buňkami imunitního systému, zejména pak při respiračním vzplanutí fagocytů. Snížená odolnost mutanta k oxidativnímu stresu souhlasí i s výsledky z analýz transkriptomů, které ukazují na deregulaci genů odpovědi na oxidativní stres (viz dále).

Souhlasně s výsledky získanými z působení oxidativního stresu *in vitro* mutantní kmen výrazně méně přežíval v makrofázích v porovnání s kmenem PAO1. Domníváme se, že hlavním faktorem je právě nízká odolnost mutanta k oxidativnímu stresu, roli však může hrát i pozorovaná snížená produkce pigmentu pyocyaninu, který působí také jako oxidační činidlo na savčí buňky (62), nebo snížená zdatnost kmene *ΔpppA-ppkA* projevující se sníženou rychlostí růstu v minimálním médiu.

Jak již bylo zmíněno, CF je charakterizována poruchou v transportu elektrolytů, jehož výsledkem je zvýšená hladina Na^+, Cl^- a Ca^{2+} iontů (13). Respirační trakt pacientů CF tak představuje zároveň i prostředí s vysokou osmolaritou. Výsledky naší studie vlivu hyperosmotického stresu na přežívání mutanta ukázaly, že mutant je asi třikrát odolnější k hyperosmotickému stresu než rodičovský kmen PAO1. S odolností k osmotickému stresu by mohla souviset také zvýšená rezistence mutanta k antibiotikům karbenicilinu a chloramfenikolu. Karbenicilin je semisyntetické penicilinové antibiotikum inhibující syntézu buněčné stěny. Chloramfenikol inhibuje proteosyntézu vazbou na ribozóm, kde interferuje s tvorbou peptidových vazeb mezi aminokyselinami.

Je dobře známo, že většina kmenů *P. aeruginosa* dosahuje významné přirozené rezistence k široké škále antimikrobiálních látek, včetně většiny β-laktamů, tetracyklinů, chloramfenikolu a fluorochinolonům. Vnější membrána rodu *Pseudomonas* vykazuje velmi nízkou nespecifickou permeabilitu pro malé hydrofilní molekuly a tím přispívá do značné míry k rezistenci tohoto rodu (100,101). Vysoká přirozená rezistence *P. aeruginosa* je dána součinností nízké permeability membrány a funkcí několika různých pump čerpajících široké spektrum antibiotik ven z buňky (156).

Se zvýšenou rezistencí k osmotickému stresu by mohla souviset i uniformě zvýšená exprese genů lokusu PA2134-2192, kterou jsme pozorovali za podmínek oxidativního stresu. Tyto geny byly již dříve nalezeny pod kontrolou QS systému *rhl* (155) a indukované působením buněk lidského respiračního epitelu na *P. aeruginosa* PAO1 (27). Bohužel je známo velmi málo o funkci genů z tohoto genového shluku, funkce 26-ti z 36-ti je neznámá. Počítačově predikované operony PA2165-2160 a PA2151-2153 obsahují několik genů spojených se syntézou trehalózy a glykogenu. Trehalóza se akumuluje v buňkách mnoha bakterií jako osmoprotektans za podmínek vysoké osmolarity a hraje roli v ochraně proteinů a membrán před různými stresovými podmínkami (hyperosmotický stres, chladový, teplotní a oxidativní stres) (40). Nedávno bylo Freeman *et al.*, (45) prokázáno, že delece ortologních operonů *Pseudomonas syringae* pv. tomato eliminovala akumulaci trehalózy a omezila bakteriální růst za hyperosmotických podmínek. Další geny z tohoto lokusu, PA2146 a PA2152, byly také identifikovány jako vysoce indukované ve studii vlivu hyperosmotického stresu na *P. aeruginosa* (4). Tyto geny nebyly sice identifikovány v naší studii, nicméně ovlivněné geny s nimi blízce sousedí, případně jsou součástí stejného operonu (PA0051). Další gen PA2144 (*glgP*) kóduje fosforylázu glykogenu, která se také účastní syntézy prekurzorů trehalózy. Navíc jsme mimo genový shluk PA2134-92 pozorovali zvýšenou expresi genu PA2416 (*treA*), který kóduje periplazmatický prekurzoz trehalázy. Homolog TreA u *E.coli* je osmoticky inducibilní enzym nezbytný pro katabolismus trehalózy (168). Je proto možné, že zvýšená exprese biosyntetických genů trehalózy v mutantním kmeni souvisí se zvýšenou rezistencí mutantního kmene k osmotickému stresu. Zároveň jsme pozorovali v mutantovi 5,59krát sníženou expresi genu PA3757, který je na základě informací z databáze *Pseudomonas* Genome Database V2 (167,188) (www.pseudomonas.com) pravděpodobným represorem trehalózového operonu a je tedy možné, že jeho represe vede k indukci genů lokusu PA2134-92. Vzhledem k tomu, že se trehalóza účastní také ochrany proteinů a membrán

před působením oxidativního stresu, zvýšená exprese genů tohoto genového shluku naznačuje, že oxidativní stres působí na mutanta s vyšší intenzitou než na divoký kmen.

Gen PA4139 kódující protein s neznámou funkcí byl nejvíce indukovaným genem za nestresových podmínek (12,7krát) a jedním z nejvíce indukovaných za stresových podmínek (13,5krát) a byl také identifikován jako indukovaný ve studii vlivu osmotického stresu na *P. aeruginosa* (4). Tento gen se tedy zřejmě účastní odpovědi na osmotický stres. Je zajímavé, že exprese tohoto genu v mutantovi nebyla téměř ovlivněna oxidativním stresem v porovnání s nestresovými podmínkami a je tedy možné, že je přímo regulován kinázou PpkA a fosfatázou PppA.

5.1.3 PppA-PpkA ovlivňují virulenci *P. aeruginosa* v rostlinném modelu

Snížená nebo opožděná produkce některých virulenčních faktorů, snížená odolnost k oxidativnímu stresu a snížená schopnost mutanta přežívat v makrofázích nás vedla k myšlence, že může být ovlivněna také schopnost mutanta vyvolat infekci. Ke srovnání virulence rodičovského a mutantního kmene jsme zvolili rostlinný model salátového listu (salát římský - *Lactuca sativa var. romana*). Tento i další rostlinné modely jsou běžně používány pro zkoumání virulence *P. aeruginosa in vivo*. Bylo totiž prokázáno, že mechanismy virulence u rostlinných i živočišných modelů jsou konzervované (139,141,142). Naše domněnka se potvrdila, kmen *ΔpppA-ppkA* na rozdíl od rodičovského kmene PAO1 nebyl schopen vyvolat symptomy infekce charakterizované nekrózou rostlinné tkáně ani po prodloužené inkubaci. Tyto výsledky znamenají, že regulační pár PppA-PpkA ovlivňuje buněčné funkce důležité pro virulenci v rostlinném modelu infekce.

Pokusili jsme se prokázat vliv delece genů *pppA-ppkA* na virulenci *P. aeruginosa* také na modelu hlístice *Caenorhabditis elegans* (výsledky nejsou uvedeny). Pozorované rozdíly nebyly statisticky významné, nicméně jsme po 72 hodinách zaznamenali trend naznačující u mutantního kmene sníženou schopnost usmrtit *C. elegans*. Zabíjení *C. elegans* kmenem *P. aeruginosa* PAO1 má mnohem mírnější průběh (usmrcení v rámci dnů) než je tomu u vysoce virulentního kmene PA14 (usmrcení v rámci hodin), který je běžně používaný pro tyto studie (169) a rozdíl mezi mutantním a divokým kmenem tak mohl být částečně snížen vlivem nově se rodících hlístic.

5.1.4 Proteinkináza PpkA s fosfatázou PppA ovlivňují expresi několika regulonů, zejména pak geny odpovědi na oxidativní stres

Proteinkinázy eukaryotního typu ovlivňují u bakterií celou řadu buněčných procesů (nejnovější přehled z tohoto roku (133)). Např. proteinkináza StkP *S. pneumoniae* hraje důležitou úlohu v adaptaci buňky na stresové podmínky (150), v buněčném dělení (126), v kompetenci a patogenezi (39) a bylo identifikováno několik různých substrátů této proteinkinázy (126). Delece genů *pppA-ppkA* způsobila změny v rezistenci *P. aeruginosa* ke stresům z prostředí, k antibiotikům, vedla ke snížení produkce pyocyaninu a k opožděné produkci některých dalších virulenčních faktorů. Domnívali jsme se, že za vznikem tohoto fenotypu musí být globální změna v expresi genů mutantního kmene. K odhalení molekulární podstaty pozorovaných změn jsme proto použili analýzu transkriptomů mutantního a divokého kmene *P. aeruginosa* pomocí DNA čipů za nestresových podmínek a vzhledem k výsledkům tohoto srovnání také za podmínek oxidativního stresu.

5.1.4.1 Srovnání transkriptomů za nestresových podmínek

Srovnání transkriptomů mutanta *ΔpppA-ppkA* s divokým kmenem PAO1 v minimálním médiu M9 bez působení stresu odhalilo změněnou expresi genů, které bylo možno na základě známých dat o jejich funkci a/nebo regulaci rozdělit do tří hlavních skupin tvořících následující regulony: (i) geny regulované stacionárním σ-faktorem RpoS (154) a/nebo QS systémy *las*/*rhl* (153,178); (ii) geny regulované systémem PQS (19,35) a (iii) geny odpovědi na oxidativní stres (23,130,149).

RpoS regulon. Zvýšená exprese genu *rpoS* se projevila změnou exprese genů regulovaných stacionárním σ-faktorem RpoS. RpoS je regulátorem všeobecné odpovědi na teplotní a chladový šok, osmotický a oxidativní stres či odpovědi na nízké pH (80). Podílí se na regulaci některých virulenčních faktorů prostřednictvím QS systému. Exprese RpoS je do jisté míry regulována QS a RpoS sám mírně ovlivňuje expresi genů QS systémů *las* a *rhl* (154). Toto zjištění souhlasí s tím, že řada genů regulovaných RpoS byla současně popsána jako regulované QS systémy *las*/*rhl* (155,178).

V naší studii byla v mutantním kmeni negativně ovlivněna exprese genů sekrečního systému typu III a to jak komponent tohoto systému, tak sekretovaných toxinů ExoS a ExoT a dalších genů regulovaných SST3. Tato data odpovídají výsledkům studie autorů Hogardt *et al.*, (67), kteří pozorovali zvýšenou expresi *exoS* jak u mutanta v QS systému *rhl* tak mutanta *rpoS*. Exprese genů několika dalších virulenčních faktorů regulovaných RpoS byla naopak zvýšena. Zvýšená exprese genu PA4296 kódujícího regulační protein PprB vedla k zvýšení exprese genů lokusu *tad*, PA4299 (*tadD*) a PA4306 (*flp*). Toto zjištění se shoduje s výsledky studie autorů Bernard *et al.*, (12), kteří popsali, že PprB pozitivně reguluje expresi lokusu *tad*, který je zodpovědný za skládání pilí typu IVb. Pilí typu IVb jsou nezbytné pro adhezi k abiotickým povrchům a eukaryotním buňkám (12). Gen PprB je regulován také QS systémy *las* a *rhl* (155).

Geny regulované QS. Další ovlivněná funkční kategorie byla tvořena geny jejichž exprese je regulována QS systémy. Vzhledem k tomu, že jsme nepozorovali žádnou změnu v expresi klíčových genů QS systémů jako jsou geny *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*, je možné, že geny regulované QS mohou být nepřímo regulovány PppA-PpkA dvojicí přes RpoS nebo PQS.

Geny, které jsou přednostně regulované QS systémy *las*/*rhl* před stacionárním σ-faktorem RpoS, jsou například gen pro chitin vazebný faktor CbpD, který slouží jako sekretovaný virulenční faktor (SST2), gen pro elastázu LasB nebo gen *ptxS*, který kóduje negativní regulátor exotoxinu A (29). Exotoxin A je stejně jako CbpD a LasB sekretován sekrečním systémem typu II Xcp (14), exprese těchto genů spolu tedy zřejmě souvisí. Většina genů této kategorie kódovala hypotetické proteiny s neznámou funkcí, velké zvýšení exprese (11 a 8krát) jsme v mutantním kmeni zaznamenali u genů PA3922-23. Zvýšenou expresi jsme pozorovali téměř u všech genů této skupiny.

V kmeni *ΔpppA-ppkA* byla zvýšena také exprese genového shluku pro biosyntézu autoinduktorů QS systému PQS (2,2 až 4,6krát). Tyto geny, tvořící dvě předpokládané transkripční jednotky, *pqsABCDE* a *phnAB*, jsou pozitivně kontrolovány regulátorem biosyntézy PQS, proteinem PqsR (35). PqsR s navázaným PQS (nebo HHQ) reguluje expresi dalších genů, které byly identifikovány v naší studii. Některé geny z této skupiny byly identifikovány také ve studiích vlivu oxidativního stresu na *P. aeruginosa* (23,130,149), což souhlasí s pozorovanou indukcí některých genů odpovědi na oxidativní stres po přidání PQS ke kultuře *P. aeruginosa* (19). Vzhledem ke zvýšené expresi

biosyntetických genů PQS jsme izolovali PQS z divokého a mutantního kmene a množství porovnali TLC analýzou. Rozdíl v produkci PQS mezi divokým kmenem a mutantem jsme však nepozorovali (výsledky nejsou uvedeny). Je možné, že rozdíl v produkci PQS je příliš malý, a nelze ho proto touto semikvantitativní metodou zaznamenat.

Geny odpovědi na oxidativní stres. Největší kategorii genů a zároveň skupinu s největšími změnami v hladinách transkripce tvořily geny kódující proteiny odpovědi na oxidativní stres. Tyto geny byly identifikovány v souvislosti s působením peroxidu vodíku na *P. aeruginosa* v několika nezávislých transkripčních studiích (23,130,149). Řada těchto genů byla identifikována také jako regulované stacionárním σ-faktorem RpoS (154), pod kontrolou QS systémů *las/rhl* (155,178) nebo, jak již bylo uvedeno výše, byla jejich exprese ovlivněna přidáním PQS ke kultuře *P. aeruginosa* (19).

Geny odpovědi na oxidativní stres bylo možno rozdělit do dvou hlavních kategorií. První kategorii tvořily **geny primárního metabolismu.** Reprimován byl operon *cyoABCDE*, který kóduje cytochrom o ubichinol oxidázu, hlavní terminální oxidázu elektrontransportního řetězce za vysoce aerobních podmínek (51). Na druhou stranu, geny cytochrom c oxidázového komplexu (*coxA*, PA0107, *coIII*), které představují hlavní aerobní respirační systém, jevily zvýšenou expresi. Salunkhe *et al*., (149) prokázali, že operon *cyoABCDE* je vysoce exprimován během oxidativního stresu, zatímco geny *cox* jsou reprimovány. V naší studii byla regulace těchto dvou operonů zcela opačná, což může znamenatt, že se mutantní kmen není schopen optimálně vypořádat s oxidativním stresem a to i za podmínek, kdy rodičovský kmen žádné známky stresu nejeví. Této skutečnosti by odpovídala i pozorovaná snížená odolnost mutanta k působení peroxidu vodíku.

Pozorovali jsme také prudký nárůst v expresi genů lokusu kódujícího ABC transporter cukrů (geny PA3186 (*oprB*), PA3187, PA3190 a PA3195 (gapA)). Geny enzymů primárního metabolismu byly již dříve identifikovány jako nezbytné pro adaptivní odpověď na oxidativní stres, neboť jako vedlejší produkt jimi katalyzovaných reakcí vznikají kofaktory typu NADPH. Tyto kofaktory jsou nezbytné pro činnost glutathionreduktáz a alkylhydroperoxidreduktáz, které představují proteiny adaptivní odpovědi na oxidativní stres (105).

Geny metabolismu síry regulované oxidativním stresem tvořily druhou kategorii. Jak již bylo zmíněno, síra je důležitým prvkem, který tvoří nezbytnou součást FeS proteinů, které jsou obzvláště náchylné k oxidativnímu poškození (82). V souladu s touto

skutečností jsme v mutantovi pozorovali zvýšenou expresi mnoha genů souvisejících s metabolismem síry včetně genu *cysB*, který kóduje transkripční regulátor nezbytný pro růst na řadě organických sirných sloučenin. CysB reguluje geny metabolismu a transportu sirných látek (23,130), například operon *tauABCD* pro metabolismus taurinu. Tento operon byl v mutantovi také indukován, stejně jako další geny pro metabolismus sirných látek.

5.1.4.2 Srovnání transkriptomů za podmínek oxidativního stresu

Mutantní kmen vykazuje výrazně sníženou odolnost k působení oxidativního stresu a srovnání transkriptomů divokého kmene a mutanta za nestresových podmínek naznačilo, že mutantní kmen není schopen se adekvátně vyrovnat s oxidativním stresem v situaci, kdy divoký kmen nejeví známky oxidativního stresu. Zajímalo nás proto, k jakým změnám dochází u mutanta za podmínek oxidativního stresu a provedli jsme proto za těchto podmínek srovnání transkriptomů mutanta a divokého kmene PAO1.

Jak jsme očekávali, většina genů se změněnou expresí byla spojena s odpovědí na oxidativní stres (i); dále jsme pozorovali změnu exprese u genů QS/RpoS regulonu (ii); a genů Pho regulonu (iii).

Geny odpovědi na oxidativní stres. Geny zařazené do této skupiny odpovídaly svým rozložením expresním profilům již dříve publikovaných studií zabývajících se studiem odpovědi na oxidativní stres u *P. aeruginosa* (23,130,149). Na základě těchto studií jsme geny rozdělily do několika podskupin na : (i) geny adaptivní stresové odpovědi (geny SOS regulonu, geny související s ochrannými buněčnými mechanizmy, geny pyocinů); (ii) geny související s metabolismem železa a (iii) geny primárního metabolismu.

Exprese **genů SOS regulonu** včetně genů hlavních regulátorů LexA a RecA byla v mutantním kmeni méně zvýšena než v kmeni PAO1 v porovnání s nestresovými podmínkami. Stejně tak byly méně indukovány **geny související s ochrannými buněčnými mechanizmy**, zastoupené převážně alkylhydroperoxidreduktázami. Naopak exprese genů operonu *fagA-fumC1-orfX-sodM*, který je pod kontrolou regulátoru příjmu železa Fur, byla u mutanta méně snížena než u kmene PAO1 v porovnání s nestresovou situací. Gen *fumC1* kóduje fumarázu FumC1 odolnou k $O_2^{\cdot -}$ a gen *sodM* kóduje superoxiddismutázu závislou na Mn^{2+} (63). Stejně jako ostatní geny regulované Fur jsou

tyto geny za oxidativního stresu reprimovány (viz níže – geny metabolismu železa) (130), v mutantním kmeni ovšem v mnohem menší míře. **Geny bakteriocinů pyocinů** jsou indukovány činidly působícími poškození DNA s následnou aktivací proteinu RecA, který koreguluje aktivitu mnoha pyocinových genů (112). Pyociny způsobují buněčnou smrt prostřednictvím degradace DNA, inhibice syntézy lipidů a tvorbou pórů v membránách. Významně zvýšená exprese genů pyocinů PA0614-PA0646 v mutantovi v porovnání s divokým kmenem dále podporuje hypotézu o zvýšeném poškození mutanta oxidativním stresem. Dalším mechanizmem snižujícím pravděpodobnost poškození buněk během oxidativního stresu je represe **genů metabolismu Fe^{2+}** regulátorem příjmu železa Fur (23). Represí těchto genů je zabráněno vzniku reaktivních hydroxylových radikálů vznikajících z H_2O_2 působením Fe^{2+} ve Fentonově reakci. V souladu s touto skutečností jsme pozorovali zvýšenou expresi genu *fur* v divokém kmeni, v mutantovi byla exprese genu *fur* naopak snížena. S touto deregulací souvisí i pozorovaná deregulace ostatních genů metabolismu železa v mutantním kmeni v porovnání s kmenem PAO1. Stejně jako za nestresových podmínek byla ovlivněna také exprese genů terminálních cytochromoxidáz respiračního řetězce, které patří mezi **geny primárního metabolismu**. Exprese genů cytochrom c oxidázového komplexu byla u mutanta méně indukována a exprese ubichinol oxidázového operonu méně reprimována než u divokého kmene.

Lze tedy říci, že ve všech podskupinách genů účastnících se odpovědi na oxidativní stres dochází v mutantním kmeni k deregulaci ve srovnání s rodičovským kmenem PAO1 a je velmi pravděpodobné, že u mutanta dochází k většímu poškozování buněk reaktivními kyslíkovými a hydroxylovými radikály vznikajícími z H_2O_2. Tento závěr podporuje jak snížené přežíváním mutanta za různých koncentrací peroxidu vodíku, tak jeho snížené přežívání v baktericidním prostředí makrofágů.

Geny QS/RpoS regulonu. Na rozdíl od publikovaných studií vlivu oxidativního stresu na *P. aeruginosa* (23,130,149) jsme pozorovali také změnu exprese genů pod kontrolou QS systémů *las*/*rhl* a/nebo stacionárního σ-faktoru RpoS. V naší studii byl za podmínek oxidativního stresu u mutanta gen *rhlR* méně reprimován než u divokého kmene v porovnání s nestresovým stavem, s čímž zřejmě souvisí pozorovaná zvýšená exprese genů několika virulenčních faktorů. Pod kontrolou systému *rhl* byl již dříve identifikován také genový shluk PA2134-92, který by mohl souviset se syntézou trehalózy a který by

mohl být také zodpovědný za zvýšenou odolnost mutanta k osmotickému stresu (viz diskuze kapitola 5.1.2).

Geny Pho regulonu. V mutantním kmeni jsme také v porovnání s divokým kmenem zaznamenali sníženou indukci některých genů Pho regulonu, který souvisí s příjmem fosfátu. Exprese genů Pho regulonu, za podmínek limitace anorganickým fosfátem (P_i), je aktivována vazbou regulátoru PhoB na konsensus sekvenci PHO boxu v promotorech těchto genů (78). Geny *pstS* a *phoU* fosfát specifického transportního komplexu PstSCAB-PhoU byly méně indukovány stejně jako gen *phoB*. Snížená indukce genu *phoB* kódujícího regulační protein dvousložkového systému PhoB měla proto zřejmě za následek sníženou indukci dalších genů tohoto regulonu.

Geny Pho regulonu byly již dříve popsány jako indukované v *P. aeruginosa* PAO1 po vystavení působení buněk lidského respiračního epitelu (27,46). Jensen *et al*., (78) prokázali, že PhoB reguluje také expresi QS regulátoru RhlR a PHO boxy byly nalezeny v promotorech mnoha virulenčních faktorů a dalších genů. Kromě toho bylo zjištěno, že se protein PstS účastní nejen transportu fosfátu, ale také adherence k buňkám a disrupce integrity střevního epitelu (193). Tato zjištění znamenají, že přesná regulace příjmu fosfátu transportním/regulačním komplexem Pst/Pho v hostitelských tkáních může hrát nezanedbatelnou roli ve virulenci *P. aeruginosa*.

Přestože jsme za podmínek oxidativního stresu pozorovali také zvýšenou expresi genů PA0073 (*tagT1*) a PA0072 (*tagS1*) následujících za genem *ppkA* a identifikovali vznik umělého promotoru po deleci genů *pppA-ppkA*, komplementační analýza dokázala, že exprese vybraných genů se v komplementovaném mutantním kmeni navrátila na úroveň divokého kmene a že tedy není ovlivněna expresí genu PA0073. Analýza predikovaného operonu PA0077 (*tssM1*) - PA0070 (*tagQ1*) ukázala, že posledním genem operonu je s největší pravděpodobností právě gen PA0073 a nemělo by tak docházek ke změnám exprese dalších genů. Zároveň jsme ukázali, že transkripce operonu začíná zřejmě již před genem PA0078. Na základě počítačové predikce operonu PA0081 (*fha1*) – PA0078 (*tssL1*) předpokládáme, že součástí operonu by mohly být i tyto geny.

5.1.5 Shrnutí

Ser/Thr proteinkináza PpkA je transmembránová proteinkináza se senzorovou doménou v periplazmatickém prostoru. Signál aktivující kinázu je prozatím neznámý a je možné, že vzhledem k pravděpodobné interakci s vazebnými periplazmatickými proteiny jako je protein TagR se může jednat o více různých signálů. Nezbytnou regulační složkou signální dráhy je fosfatáza PppA defosforylující substráty kinázy a zřejmě i kinázu samotnou. Naše analýza transkripčních profilů mutanta *ΔpppA-ppkA* ukázala, že postranslační modifikace prozatím neidentifikovaných substrátů tohoto regulačního páru ovlivňuje expresi mnoha funkčně odlišných genů *P. aeruginosa*. Jejich exprese však není ovlivněna nahodile, ale ve většině případů lze geny zařadit do regulonů, jejichž exprese je regulována specifickými regulátory. Zároveň je možné, že tyto regulátory by mohly být potenciálními substráty kinázy PpkA a fosfatázy PppA. Mezi nejpočetnější a nejvíce ovlivněné geny patřily geny buněčné odpovědi na oxidativní stres. Exprese těchto genů byla zvýšená v mutantním kmeni již za nestresových podmínek, což vypovídá o snížené odolností k působení oxidativního stresu, v případě nestresových podmínek nejspíše reaktivních kyslíkových a hydroxylových zplodin metabolismu, a souhlasí s pozorovanou sníženou odolností ke škále koncentrací exogenně působícího peroxidu vodíku. Předpokládáme, že tato snížená odolnost je také hlavním faktorem ovlivňujícím přežívání mutantního kmene v buněčném baktericidním systému.

Za podmínek oxidativního stresu jsme pozorovali jasnou deregulaci všech skupin genů účastnících se odpovědi na oxidativní stres, což dále potvrzuje vliv proteinkinázy PpkA a fosfatázy PppA na tento typ buněčné odpovědi.

Pleiotropní efekt delece genů *pppA-ppkA* na buněčné funkce a fyziologii *P. aeruginosa* napovídá, že postranslační regulace sekrečního systému typu VI je zřejmě pouze jedním z molekulárních mechanizmů pod kontrolou páru PpkA-PppA. Tato situace není výjimečná, například senzorová Ser/Thr proteinkináza StkP bakterie *Streptococcus pneumoniae* stejně jako proteiny PpkA a PppA reguluje expresi celé řady genů, z nichž některé kódují proteiny důležité pro virulenci, proteiny odpovědi na vnější stresové podmínky nebo proteiny důležité pro navození stavu kompetence (150). StkP se také účastní regulace buněčného dělení (126). V případě StkP je aktivačním signálem zřejmě přítomnost volných peptidoglykanových podjednotek, které interagují s extracelulárními

PASTA doménami (z anglického Penicillin-binding protein And Ser/Thr kinase Associated domains) proteinkinázy (108).

Obě naše transkriptomové analýzy ukázaly, že delece genů *pppA-ppkA* ovlivňuje expresi genů pod kontrolou regulátorů RpoS a QS. Za podmínek oxidativního stresu byla navíc ovlivněna exprese genů lokusu PA2134-2192 a genů Pho regulonu, které byly již dříve identifikovány jako indukované kontaktem s epiteliemi lidského respiračního traktu. Genové produkty z lokusu PA2134-92 by se mohly také účastnit syntézy osmoprotektivní trehalózy a tak se podílet na pozorované zvýšené odolnosti mutanta k osmotickému stresu.

Domníváme se, že deregulace odpovědi k podmínkám prostředí jako je oxidativní stres a vliv na RpoS/QS regulon stejně jako na geny příjmu fosfátu by vedly ke sníženému přežívání mutanta v hostiteli a snížené virulenci kmene. Snížení životaschopnosti a virulence bylo potvrzeno zkouškou přežívání v myších makrofázích a rostlinném modelu infekce. Naše studie ukázala, že regulační pár PpkA-PppA se kromě své role v sekrečním systému H1-T6SS, zřejmě přímo či nepřímo podílí na regulaci stresové odpovědi a tak ovlivňuje virulenci *P. aeruginosa*.

Vzhledem k tomu, že geny pod kontrolou proteinů PppA-PpkA lze zařadit do regulonů, je možné, že regulátory těchto jednotlivých regulonů by mohly být potenciálními substráty kinázy PpkA a fosfatázy PppA. Analýza fosfoproteomu *P. aeruginosa* (146) identifikovala 35 proteinů fosforylovaných na serinových nebo threoninových zbytcích. Mezi těmito proteiny však nebyly námi identifikované regulátory ani produkty genů, jejichž exprese byla ovlivněna v mutantovi. Určení substrátů proteinkináz a fosfatáz v organismech, které mají více těchto signalizačních proteinů, je komplikované také vzhledem k poměrně velké promiskuitě a vzájemné zastupitelnosti Ser/Thr proteinkináz. Další komplikací v identifikaci substrátů a signálních drah je existence signálních kaskád, které se mnohdy větví do signálních sítí. Například u bakterie *B. subtillis* byla popsána dráha ve které Ser/Thr proteinkináza PrkD fosforyluje histidinovou kinázu dvousložkového systému DegS (79). Tato kináza fosforyluje regulační protein DegU, který reguluje expresi operonu kódujícího také gen pro tyrozinovou kinázu PtkA (83). Identifikace substrátů v takovýchto případech je pak možná například ve vícečetných mutantech v genech signálních systémů pomocí 2D elektroforézy s následnou hmotnostní spektrometrií. Stejným způsobem bychom mohli postupovat i v našem případě.

5.2 Studium interakcí Ser/Thr proteinkinázy Stk1 s fosfatázou Stp1 a proteinem Fha2

Fosfatáza Stp1 a Ser/Thr proteinkináza Stk1 jsou součástí sekrečního systému typu VI H2-T6SS spolu s protein Fha2 obsahující doménu FHA. Sekreční systém H2 je pozitivně regulován *quorum sensing* regulátory LasR a PqsR a bylo zjištěno, že spolu se sekrečním systémem H3-T6SS hrají důležitou roli v patogenezi ve zvířecích a rostlinných modelech (97). Organizace lokusu DNA kódujícího H2-T6SS je velmi podobná lokusu H1-T6SS, jehož součástí jsou kináza PpkA, fosfatáza PppA a jejich substrát Fha1. Lze předpokládat, že také mechanizmus funkce bude velmi podobný jako u systému H1-T6SS. Již dříve (v diplomové práci autorky) jsme se zabývali funkcí proteinkinázy Stk1 a fosfatázy Stp1 pomocí studia jednoduchých delečních mutantů a mutanta *stp1-stk1* (124). Nepozorovali jsme však změny ve fenotypech mutantů a proto jsme se později rozhodli věnovat studiu interakcí těchto proteinů.

Cílem druhé části této práce bylo tedy blíže charakterizovat interakce proteinkinázy Stk1, fosfatázy Stp1 a proteinu Fha2. Navazovali jsme přitom částečně i na výsledky diplomové práce M. Urbanové (172), která prokázala, že proteinkináza Stk1 je *in vitro* substrátem fosfatázy Stp1.

5.2.1 Fha2 je substrátem proteinkinázy Stk1

Proteiny nesoucí doménu FHA se často účastní přenosu signálu v procesech regulovaných Ser/Thr proteinkinázami a fosfatázami, neboť s vysokou specifitou interagují s proteiny fosforylovanými na threoninových zbytcích (132). V buňkách eukaryot i prokaryot se účastní řady různých procesů. U eukaryot jsou proteiny obsahující FHA domény konzervované od kvasinek po savce a účastní se regulace různých fází buněčného cyklu a vývoje (98). Proteiny s FHA doménami jsou běžně přítomny také u bakterií, jejich funkce nejsou však zatím příliš známé (129). Kromě proteinu Fha1 *P. aeruginosa* se např. protein GarA *Mycobacterium smegmatis* a *M. tuberculosis* účastní regulace produkce glykogenu (10,41), protein OdhI *Corynebacterium glutamicum* reguluje metabolismus glutamátu (152). Vzhledem k podobnosti sekrečních systémů typu VI H1 a H2

P. aeruginosa jsme předpokládali, že protein Fha2 je pravděpodobným substrátem proteinkinázy Stk1. Kinázová reakce *in* vitro s rekombinantními proteiny Stk1 a Fha2 tuto hypotézu potvrdila. Pomocí protilátek proti fosforylovanému threoninu jsme navíc určili, že protein Fha2 je kinázou Stk1 fosforylován na threoninu a že proteinkináza Stk1 izolována z buněk *E. coli* je již ve fosforylovaném stavu.

O proteinu Fha1 je známo, že je kinázou PpkA fosforylován na threoninu 362. Z porovnání sekvencí proteinů Fha1 a Fha2 jsme vyvodili, že protein Fha2 by mohl být fosforylován na threoninovém zbytku 261 a provedli za tím účelem záměnu Thr 261 za alanin. Naše volba byla částečně potvrzena výsledky z analýzy fosfoproteomu *P. aeruginosa* (146), kde byl identifikován fosforylovaný Ser 260. K rozlišení zbytků Ser 260 a Thr 261 jsme provedli další záměny, a to Ser 260 za Ala a také záměnu obou potenciálně fosforylovaných zbytků Ser260 a Thr 261 za alanin. Tuto záměnu jsme provedli, abychom mohli určit, zda k fosforylaci proteinu Fha2 nedochází na některém dalším aminokyselinovém zbytku. Z neznámých příčin se nám nepodařilo zopakovat fosforylaci proteinu Fha2 kinázou Stk1 v podmínkách *in vitro*, přestože v předchozích pokusech jsme opakovaně protein Fha2 fosforylovali. Z důvodu, že fosforylace proteinu Fha2 byla určena v analýze fosfoproteomu *P. aeruginosa* (146), že protein Fha2 obsahuje doménu FHA a gen *fha2* je v jednom operonu s genem pro proteinkinázu Stk1, předpokládáme, že námi pozorovaná fosforylace proteinu Fha2 není artefaktem a je pouze nutné znovu nalézt optimální podmínky reakce. Je také možné, že v průběhu používání kmene došlo ke vzniku spontánní mutace v genu Fha2 na plazmidu. Tuto možnost ověříme novým sekvenováním izolovaného plazmidu z expresního kmene. Dále vložíme geny pro kinázu Stk1 a Fha2 do vektoru pCDFDuet-1, který umožňuje koexpresi kinázy a jejího substrátu s příslušnými kotvami v *E.coli* a tím významně zvyšuje podíl fosforylovaných izoforem substrátu vůči nefosforylovaným izoformám (114). Navíc umožňuje studium interakcí obou proteinů *in vivo*, detekci fosforylace substrátu budeme provádět imunodetekcí proti fosforylovanému threoninu v lyzátech *E. coli*. Fosforylovaný Fha2 bychom pak také mohli snáze použít pro studium interakcí s fosfatázou Stp1.

5.2.2 Aktivita fosfatázy Stp1 není ovlivněna mutagenezí threoninu 90

Ravichandran *et al*., (146), v analýze fosfoproteomu *P. aeruginosa* detekovali celkem 3 peptidy obsahující fosforylovaný zbytek Thr 90 fosfatázy Stp1, jeho fosforylace

je tedy vysoce pravděpodobná. Jednalo se o fosfopeptidy LGEELpTLSAER, LGEELpTLSAERGDR a RLGEELpTLSAER. Fosforylace Ser/Thr fosfatáz byla doposud neznámá, teprve v dubnu letošního roku byla publikována první práce autorů Sajid *et al*., (148) dokazující, že PPM fosfatáza PstP *M. tuberculosis* je fosforylována Ser/Thr proteinkinázou PknA na Thr 137 a 174 a proteinkinázou PknB na Thr 137, 141, 174 a 290. Bylo také prokázáno, že fosforylace fosfatázy PstP zvyšuje její aktivitu.

V naší studii jsme zkoumali vliv záměny Thr 90 fosfatázy Stp1 za Ala, mimikující nefosforylovaný stav, a za Asp, mimikující fosforylovaný stav (31,175). Jako substrát fosfatázy Stp1 ve fosfatázové reakci jsme použili autofosforylovanou kinázu Stk1. Defosforylaci kinázy Stk1 fosfatázou Stp1 jsme prokázali odlišnou metodou než M. Urbanová ((172) a kapitola výsledky 4.2.1), čímž jsme opakovaně potvrdili interakci těchto dvou proteinů. Nezaznamenali jsme vliv záměny Thr 90 na schopnost fosfatázy Stp1 defosforylovat kinázu Stk1 ani jsme neprokázali fosforylaci fosfatázy Stp1 proteinkinázou Stk1 na threoninových zbytcích.

Z porovnání sekvencí fosfatázy Stp1 s fosfatázami PstP *M. tuberculosis*, MspP *M. smegmatis* a STP *S. agalactiae* a ze srovnání dostupných trojrozměrných struktur těchto tří fosfatáz jsme vyvodili, že Thr 90 se nenachází v konzervované oblasti a je pravděpodobně situován na povrchu proteinu (obr. 5.2.1). Je možné, že fosforylace fosfatázy Stp1 na Thr 90 by mohla hrát roli ve vazbě Stp1 s proteinem Fha2, který specificky rozpoznává pThr svou FHA doménou. Vzhledem k tomu, že protein Fha1 je substrátem fosfatázy PppA, je také protein Fha2 pravděpodobným substrátem fosfatázy Stp1 a jejich interakce tedy dává smysl.

Fosforylované threoninové zbytky fosfatázy PstP se nenachází ve všeobecně konzervovaných oblastech, bude se tedy zřejmě jednat o specializovanou regulaci mykobakterií při složité interakci jedné Ser/Thr fosfatázy se dvěma esenciálními Ser/Thr proteinkinázami (148).

A)

```
PstP            --VTLVLRYAARSDRGLVRANNEDSVYAG-----ARLLALADGMGGHAAGEVASQLVIAALAH 59
MspP            -GMASVLSAATATDQGPVRENNQDACLAD-----GILYAVADGFG--ARGHHASATALKTLSA 55
Stp1            MQRTEPWRSAARTDRGKVRARNEDAFLDCPDRG---LWAVADGMGGHQAGDLASRMIVTSLAE 60
STP             -ARKKYMEISLLTDIGQRRSNNQDFINQFENKAGVPLIILADGMGGHRAGNIASEMTVTDLGS 62

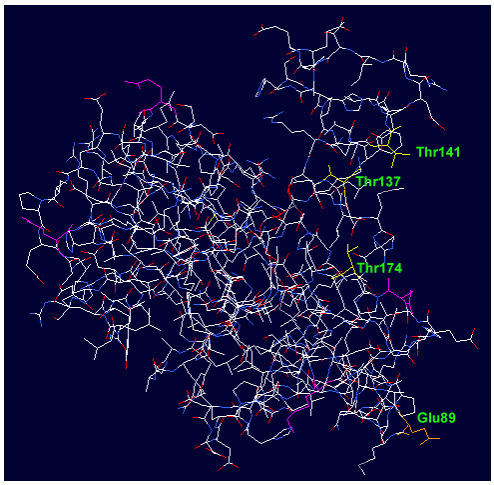
PstP            LDDDEPGGDLLAKLDAAVRAGNSAIAAQVEMEPDLEGMGTTLTAILFAGNRLG---LVHI 116
MspP            GFAAAPDRD---GLLEAVQQANLRVFELLGDEPTVSG--TTLTAVAVFEPGQGGPLVVNI 110
Stp1            LPARAGFDERLNAMRQCLHWLNRRLGEELTLSAERGDRIIGSTVVALVVEGSR-AACVWV 119
STP             DWAETDFSELSEIRDWMLVSIETENRKIYELGQSDDYKGMGTTIEAVAIVGDN-IIFAHV 121

PstP            GDSRGYLLRDGELTQITKDDTFVQTLVDEGRITPEEAHSHPQRSLIMRAL-TGHEVEPTL 175
MspP            GDSPLYRIRDGHMEQLTDDHSVAGELVRMGEITRHEARWHPQRHLLTRALGIGPHIGPDV 170
Stp1            GDSRCYLWRGQRLYQLSRDHSLLQRLVDERRMDIEQARAYPSARALTRAVGASEQLVLDV 179
STP             GDSRIGIVRQGEYHLLTSDHSLVNELVKAGQLTEEEAASHPQKNIITQSIGQANPVEPDL 181

PstP            TMREARAGDRYLLCSDGLSDPVSDETILEALQIPEVAESAHR-LIELALRGGGPDNVTVVV 235
MspP            FGIDCGPGDRLLISSDGLFAAADEALIVDAATSPDPQVAVRR-LVEVANDAGGSDNTTVVV 230
Stp1            LELEVHPGDVFLLCSDGLYEELSADALGRALSLASPQVAVER-LFDGALSGAARDNLTAVV 239
STP             GVHLLEEGDYLVVNSDGLTNMLSNADIATVLTQEKTLDDKNQDLITLANHRGGLDNITVAL 242

PstP            ADLEH 240
MspP            IDLG- 234
Stp1            IRQ—242
STP             VYVESEAV 250
```

B)



Obr. 5.2.1: Porovnání sekvencí Ser/Thr fosfatáz MspP *Mycobacterium smegmatis*, PstP *M. tuberculosis*, Stp1 *P. aeruginosa* a STP *Streptococcus agalactiae*. A) Srovnání proteinových sekvencí. Žlutě jsou vyznačeny absolutně konzervované aminokyseliny (AK) fosfatáz rodiny PPM, tučně konzervované AK. Červeně jsou znázorněny AK na místě pThr fosfatázy Stp1. Modře jsou zvýrazněny tři ze čtyř fosforylovaných Thr fosfatázy PstP – Thr 137, Thr 141 a Thr 174 (zbývající Thr 290 je mimo porovnávané sekvence). Sekvence byly porovnány v programu ClustalW2 (25) http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/ . **B) Model krystalu fosfatázy PstP (PDB kód 1TXO).** Žlutě jsou vyznačeny fosforylované threoniny 137, 141 a 174. Thr 290 není v modelu krystalu zahrnut. Oranžově je vyznačen glutamát 89 odpovídající pozici pThr 90 fosfatázy Stp1 (zpracováno programem SwissPdb viewer (59), http://www.expasy.org/spdbv/).

6 Závěr

6.1 Stanovení funkce Ser/Thr proteinkinázy PpkA a fosfatázy PppA

- Připravili jsme delečního mutanta *ΔpppA-ppkA*, který se projevoval sníženou růstovou rychlostí na minimálním médiu s glukózou a glycerolem, opožděnou produkcí některých virulenčních faktorů, výrazně zvýšenou citlivostí k oxidativnímu stresu a naopak zvýšenou odolností k osmotickému stresu. Mutantní kmen se dále projevoval sníženou schopností přežívání v baktericidním prostředí makrofágů a nebyl schopen vyvolat infekci v rostlinném modelu.
- Srovnáním globálního transkriptomu mutanta a divokého kmene za nestresových podmínek jsme zjistili, že mutantní kmen vykazuje deregulaci genů odpovědi na oxidativní stres. Delece genů *pppA-ppkA* dále ovlivnila zejména expresi genů regulovaných stacionárním σ-faktorem RpoS a QS systémy *las*/*rhl* a PQS.
- Srovnáním globálního transkriptomu mutanta a divokého kmene za podmínek oxidativního stresu jsme zjistili, že ve všech podskupinách genů odpovědi na oxidativní stres dochází k deregulaci, která souhlasí s pozorovanou sníženou odolností kmene *ΔpppA-ppkA* k oxidativnímu stresu. Dále jsme v delečním kmeni pozorovali zvýšenou expresi genů QS regulonu včetně lokusu PA2134-92. Tento genový shluk se pravděpodobně podílí na syntéze trehalózy a tím zvýšené odolnosti mutanta k osmotickému stresu. Identifikovali jsme také změnu exprese genů Pho regulonu, který je regulován příjmem anorganického fosfátu a ovlivňuje expresi řady virulenčních faktorů.

Z dosažených výsledků vyvozujeme, že proteinkináza PpkA s fosfatázou PppA jsou globálními regulátory, které se kromě své funkce v sekrečním systému typu VI podílí také na regulaci stresové odpovědi a tak ovlivňují virulenci *P. aeruginosa*.

6.2 Studium interakcí Ser/Thr proteinkinázy Stk1 s fosfatázou Stp1 a proteinem Fha2

- Připravili jsme rekombinantní protein Fha2 a v *in vitro* kinázové reakci s proteinkinázou Stk1 potvrdili, že se jedná o substrát této proteinkinázy
- Imunologickou detekcí s protilátkou proti fosfothreoninu jsme potvrdili, že protein Fha2 je fosforylován na threoninu.
- Nepodařilo se nám identifikovat místo fosforylace proteinu Fha2 pomocí mutovaných forem proteinu se záměnami serinu 260 za alanin a threoninu 261 za alanin. Použijeme nový systém koexprese kinázy a jejího substrátu v *E. coli* umožňující stanovení fosforylace *in vivo*.
- Cílenou mutagenezí jsme připravili mutované formy rekombinantní fosfatázy Stp1 se záměnami fosforylovaného threoninu 90 za fosfoablativní alaninový zbytek a fosfomimetický aspartátový zbytek a studovali vliv těchto záměn na aktivitu fosfatázy. Uvedené záměny neovlivnily defosforylaci substrátu - kinázy Stk1. Provedli jsme srovnání trojrozměrných struktur příbuzných fosfatáz, ze kterého vyplývá, že identifikovaný Thr 90 se sice nachází na povrchu proteinu, ale nejedná se o konzervovanou oblast porovnávaných proteinů. Kinázová reakce *in vitro* neprokázala fosforylaci fosfatázy Stp1 proteinkinázou Stk1.

Seznam použité literatury

1. **Abdel-Mawgoud, A. M., F. Lepine, and E. Deziel**. 2010. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. Appl. Microbiol. Biotechnol. **86**:1323-1336.

2. **Absalon, C., M. Obuchowski, E. Madec, D. Delattre, I. B. Holland, and S. J. Seror**. 2009. CpgA, EF-Tu and the stressosome protein YezB are substrates of the Ser/Thr kinase/phosphatase couple, PrkC/PrpC, in *Bacillus subtilis*. Microbiology **155**:932-943.

3. **Adler, E., A. Donella-Deana, F. Arigoni, L. A. Pinna, and P. Stragler**. 1997. Structural relationship between a bacterial developmental protein and eukaryotic PP2C protein phosphatases. Mol. Microbiol. **23**:57-62.

4. **Aspedon, A., K. Palmer, and M. Whiteley**. 2006. Microarray analysis of the osmotic stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **188**:2721-2725.

5. **Ballister, E. R., A. H. Lai, R. N. Zuckermann, Y. Cheng, and J. D. Mougous**. 2008. In vitro self-assembly of tailorable nanotubes from a simple protein building block. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **105**:3733-3738.

6. **Barford, D.** 1995. Protein phosphatases. Curr. Opin. Struct. Biol. **5**:728-734.

7. **Barford, D.** 1996. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. Trends Biochem. Sci. **21**:407-412.

8. **Bassler, B. L.** 2002. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. Cell **109**:421-4.

9. **Bednář, M., V. Fraňková, J. Schindler, A. Souček, and J. Vávra**. 1996. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Marvil, Praha, ČR.

10. **Belanger, A. E. and G. F. Hatfull**. 1999. Exponential-phase glycogen recycling is essential for growth of *Mycobacterium smegmatis*. J. Bacteriol. **181**:6670-6678.

11. **Benjamini, Y. and Y. Hochberg**. 1995. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society **57**:289-300.

12. **Bernard, C. S., C. Bordi, E. Termine, A. Filloux, and B. S. de**. 2009. Organization and PprB-dependent control of the *Pseudomonas aeruginosa tad* Locus, involved in Flp pilus biology. J. Bacteriol. **191**:1961-1973.

13. **Berry, A., J. D. DeVault, and A. M. Chakrabarty**. 1989. High osmolarity is a signal for enhanced algD transcription in mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. J. Bacteriol. **171**:2312-2317.

14. **Bleves, S., V. Viarre, R. Salacha, G. P. Michel, A. Filloux, and R. Voulhoux**. 2010. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. Int. J. Med. Microbiol. **300**:534-543.

15. **Bordi, C., M. C. Lamy, I. Ventre, E. Termine, A. Hachani, S. Fillet, B. Roche, S. Bleves, V. Mejean, A. Lazdunski, and A. Filloux**. 2010. Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Mol. Microbiol. **76**:1427-1443.

16. **Boucher, R. C.** 2007. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. Annu. Rev. Med. **58**:157-170.

17. **Bourret, R. B., K. A. Borkovich, and M. I. Simon**. 1991. Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. Annu. Rev. Biochem. **60**:401-441.

18. **Bourret, R. B., J. Davagnino, and M. I. Simon**. 1993. The carboxy-terminal portion of the CheA kinase mediates regulation of autophosphorylation by transducer and CheW. J. Bacteriol. **175**:2097-2101.

19. **Bredenbruch, F., R. Geffers, M. Nimtz, J. Buer, and S. Haussler**. 2006. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal (PQS) has an iron-chelating activity. Environ. Microbiol. **8**:1318-1329.

20. **Brencic, A. and S. Lory**. 2009. Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. Mol. Microbiol. **72**:612-632.

21. **Brook, I.** 2008. The role of anaerobic bacteria in chronic suppurative otitis media in children: implications for medical therapy. Anaerobe. **14**:297-300.

22. **Buck, M., M. T. Gallegos, D. J. Studholme, Y. Guo, and J. D. Gralla**. 2000. The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. J. Bacteriol. **182**:4129-4136.

23. **Chang, W., D. A. Small, F. Toghrol, and W. E. Bentley**. 2005. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* reveals induction of pyocin genes in response to hydrogen peroxide. BMC. Genomics **6**:115.

24. **Chen, C. C., M. D. Yudkin, and O. Delumeau**. 2004. Phosphorylation and RsbX-dependent dephosphorylation of RsbR in the RsbR-RsbS complex of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **186**:6830-6836.

25. **Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins, and J. D. Thompson**. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acids Res. **31**:3497-3500.

26. **Choi, K. H. and H. P. Schweizer**. 2006. mini-Tn7 insertion in bacteria with single *att*Tn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. Nat. Protoc. **1**:153-161.

27. **Chugani, S. and E. P. Greenberg**. 2007. The influence of human respiratory epithelia on *Pseudomonas aeruginosa* gene expression. Microb. Pathog. **42**:29-35.

28. **Coleman, F. T., S. Mueschenborn, G. Meluleni, C. Ray, V. J. Carey, S. O. Vargas, C. L. Cannon, F. M. Ausubel, and G. B. Pier**. 2003. Hypersusceptibility of cystic fibrosis mice to chronic *Pseudomonas aeruginosa* oropharyngeal colonization and lung infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **100**:1949-1954.

29. **Colmer, J. A. and A. N. Hamood**. 1998. Characterization of *ptxS*, a *Pseudomonas aeruginosa* gene which interferes with the effect of the exotoxin A positive regulatory gene, *ptxR*. Mol. Gen. Genet. **258**:250-259.

30. **Cornelis, G. R.** 2006. The type III secretion injectisome. Nat. Rev. Microbiol. **4**:811-825.

31. **Cottin, V., L. A. Van, and D. W. Riches**. 1999. Phosphorylation of tumor necrosis factor receptor CD120a (p55) by p42(mapk/erk2) induces changes in its subcellular localization. J. Biol. Chem. **274**:32975-32987.

32. **Dautin, N. and H. D. Bernstein**. 2007. Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. Annu. Rev. Microbiol. **61**:89-112.

33. **de Kievit, T. R. and B. H. Iglewski**. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. Infect. Immun. **68**:4839-4849.

34. **Deutscher, J., C. Francke, and P. W. Postma**. 2006. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **70**:939-1031.

35. **Deziel, E., S. Gopalan, A. P. Tampakaki, F. Lepine, K. E. Padfield, M. Saucier, G. Xiao, and L. G. Rahme**. 2005. The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. Mol. Microbiol. **55**:998-1014.

36. **Diggle, S. P., P. Cornelis, P. Williams, and M. Camara**. 2006. 4-quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives. Int. J. Med. Microbiol. **296**:83-91.

37. **Douzi, B., E. Durand, C. Bernard, S. Alphonse, C. Cambillau, A. Filloux, M. Tegoni, and R. Voulhoux**. 2009. The XcpV/GspI pseudopilin has a central role in the assembly of a quaternary complex within the T2SS pseudopilus. J. Biol. Chem. **284**:34580-34589.

38. **Duncan, L., S. Alper, F. Arigoni, R. Losick, and P. Stragier**. 1995. Activation of cell-specific transcription by a serine phosphatase at the site of asymmetric division. Science **270**:641-644.

39. **Echenique, J., A. Kadioglu, S. Romao, P. W. Andrew, and M. C. Trombe**. 2004. Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. **72**:2434-2437.

40. **Empadinhas, N. and M. S. da Costa**. 2008. Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. Int. Microbiol. **11**:151-161.

41. **England, P., A. Wehenkel, S. Martins, S. Hoos, G. ndre-Leroux, A. Villarino, and P. M. Alzari**. 2009. The FHA-containing protein GarA acts as a phosphorylation-dependent molecular switch in mycobacterial signaling. FEBS Lett. **583**:301-307.

42. **Filipe, S. R. and A. Tomasz**. 2000. Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall muropeptide branching genes. Proc Natl Acad Sci U S A **97**:4891-6.

43. **Fisher, M. A., D. Grimm, A. K. Henion, A. F. Elias, P. E. Stewart, P. A. Rosa, and F. C. Gherardini**. 2005. *Borrelia burgdorferi* sigma54 is required for mammalian infection and vector transmission but not for tick colonization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **102**:5162-5167.

44. **Foussard, M., S. Cabantous, J. Pedelacq, V. Guillet, S. Tranier, L. Mourey, C. Birck, and J. Samama**. 2001. The molecular puzzle of two-component signaling cascades. Microbes. Infect. **3**:417-424.

45. **Freeman, B. C., C. Chen, and G. A. Beattie**. 2010. Identification of the trehalose biosynthetic loci of *Pseudomonas syringae* and their contribution to fitness in the phyllosphere. Environ. Microbiol.

46. **Frisk, A., J. R. Schurr, G. Wang, D. C. Bertucci, L. Marrero, S. H. Hwang, D. J. Hassett, and M. J. Schurr**. 2004. Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* after interaction with human airway epithelial cells. Infect. Immun. **72**:5433-5438.

47. **Gallagher, L. A. and C. Manoil**. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. J Bacteriol **183**:6207-14.

48. **Gallagher, L. A., S. L. McKnight, M. S. Kuznetsova, E. C. Pesci, and C. Manoil**. 2002. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **184**:6472-6480.

49. **Garcia-Hernandez, R., A. Moraleda-Munoz, A. Castaneda-Garcia, J. Perez, and J. Munoz-Dorado**. 2009. *Myxococcus xanthus* Pph2 is a manganese-dependent protein phosphatase involved in energy metabolism. J. Biol. Chem. **284**:28720-28728.

50. **Gentleman, R. C., V. J. Carey, D. M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A. J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J. Y. Yang, and J. Zhang**. 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. Genome Biol. **5**:R80.

51. **Gohlke, U., A. Warne, and M. Saraste**. 1997. Projection structure of the cytochrome bo ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* at 6 A resolution. EMBO J. **16**:1181-1188.

52. **Gooderham, W. J. and R. E. Hancock**. 2009. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Rev. **33**:279-294.

53. **Goodman, A. L., M. Merighi, M. Hyodo, I. Ventre, A. Filloux, and S. Lory**. 2009. Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. Genes Dev. **23**:249-259.

54. **Govan, J. R. and V. Deretic**. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol. Rev. **60**:539-574.

55. **Grande, K. K., J. K. Gustin, E. Kessler, and D. E. Ohman**. 2007. Identification of critical residues in the propeptide of LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* involved in the formation of a stable mature protease. J. Bacteriol. **189**:3960-3968.

56. **Grangeasse, C., A. J. Cozzone, J. Deutscher, and I. Mijakovic**. 2007. Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. Trends Biochem. Sci. **32**:86-94.

57. **Grangeasse, C., P. Doublet, C. Vincent, E. Vaganay, M. Riberty, B. Duclos, and A. J. Cozzone**. 1998. Functional characterization of the low-molecular-mass phosphotyrosine-protein phosphatase of Acinetobacter johnsonii. J. Mol. Biol. **278**:339-347.

58. **Grangeasse, C., R. Terreux, and S. Nessler**. 2010. Bacterial tyrosine-kinases: structure-function analysis and therapeutic potential. Biochim. Biophys. Acta **1804**:628-634.

59. **Guex, N. and M. C. Peitsch**. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. Electrophoresis **18**:2714-2723.

60. **Hachani, A., N. S. Lossi, A. Hamilton, C. Jones, S. Bleves, D. besa-Jove, and A. Filloux**. 2011. Type VI secretion system in *Pseudomonas Aeruginosa*: secretion and multimerization of VgrG proteins. J. Biol. Chem.

61. **Hanks, S. K. and T. Hunter**. 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. FASEB J. **9**:576-596.

62. **Hassett, D. J., L. Charniga, K. Bean, D. E. Ohman, and M. S. Cohen**. 1992. Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. Infect. Immun. **60**:328-336.

63. **Hassett, D. J., M. L. Howell, U. A. Ochsner, M. L. Vasil, Z. Johnson, and G. E. Dean**. 1997. An operon containing *fumC* and *sodA* encoding fumarase C and manganese superoxide dismutase is controlled by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: *fur* mutants produce elevated alginate levels. J. Bacteriol. **179**:1452-1459.

64. **Heath, H. E. and E. T. Gaudy**. 1978. Relationship between catabolism of glycerol and metabolism of hexosephosphate derivatives by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **136**:638-646.

65. **Heurlier, K., F. Williams, S. Heeb, C. Dormond, G. Pessi, D. Singer, M. Camara, P. Williams, and D. Haas**. 2004. Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J. Bacteriol. **186**:2936-2945.

66. **Hoang, T. T., R. R. Karkhoff-Schweizer, A. J. Kutchma, and H. P. Schweizer**. 1998. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. Gene **212**:77-86.

67. **Hogardt, M., M. Roeder, A. M. Schreff, L. Eberl, and J. Heesemann**. 2004. Expression of *Pseudomonas aeruginosa exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS. Microbiology **150**:843-851.

68. **Hoiby, N., T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin, and O. Ciofu**. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int. J. Antimicrob. Agents **35**:322-332.

69. **Hoiby, N., O. Ciofu, and T. Bjarnsholt**. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. Future. Microbiol. **5**:1663-1674.

70. **Holland, I. B., L. Schmitt, and J. Young**. 2005. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). Mol. Membr. Biol. **22**:29-39.

71. **Hood, R. D., P. Singh, F. Hsu, T. Guvener, M. A. Carl, R. R. Trinidad, J. M. Silverman, B. B. Ohlson, K. G. Hicks, R. L. Plemel, M. Li, S. Schwarz, W. Y. Wang, A. J. Merz, D. R. Goodlett, and J. D. Mougous**. 2010. A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. Cell Host. Microbe **7**:25-37.

72. **Hsu, F., S. Schwarz, and J. D. Mougous**. 2009. TagR promotes PpkA-catalysed type VI secretion activation in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. **72**:1111-1125.

73. **Humphreys, D., P. J. Hume, and V. Koronakis**. 2009. The Salmonella effector SptP dephosphorylates host AAA+ ATPase VCP to promote development of its intracellular replicative niche. Cell Host. Microbe **5**:225-233.

74. **Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama**. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene **96**:23-28.

75. **Irizarry, R. A., B. M. Bolstad, F. Collin, L. M. Cope, B. Hobbs, and T. P. Speed**. 2003. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. Nucleic Acids Res. **31**:e15.

76. **Iwanicki, A., A. Herman-Antosiewicz, M. Pierechod, S. J. Seror, and M. Obuchowski**. 2002. PrpE, a PPP protein phosphatase from *Bacillus subtilis* with unusual substrate specificity. Biochem. J. **366**:929-936.

77. **Janecek, J., V. Moravec, Z. Dobrová, J. Janda, and J. Weiser**. 1995. Protein phosphorylation in submerged spores and vegetative mycelium of *Streptomyces granaticolor*. FEMS Microbiology Letters **133**:91-94.

78. **Jensen, V., D. Lons, C. Zaoui, F. Bredenbruch, A. Meissner, G. Dieterich, R. Munch, and S. Haussler**. 2006. RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the Pseudomonas quinolone signal via PhoB-dependent and -independent pathways. J. Bacteriol. **188**:8601-8606.

79. **Jers, C., A. Kobir, E. O. Sondergaard, P. R. Jensen, and I. Mijakovic**. 2011. *Bacillus subtilis* two-component system sensory kinase DegS is regulated by serine phosphorylation in its input domain. PLoS. One. **6**:e14653.

80. **Jorgensen, F., M. Bally, V. Chapon-Herve, G. Michel, A. Lazdunski, P. Williams, and G. S. Stewart**. 1999. RpoS-dependent stress tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology **145 (Pt 4)**:835-844.

81. **Kang, Y., V. V. Lunin, T. Skarina, A. Savchenko, M. J. Schurr, and T. T. Hoang**. 2009. The long-chain fatty acid sensor, PsrA, modulates the expression of *rpoS* and the type III secretion *exsCEBA* operon in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. **73**:120-136.

82. **Keyer, K. and J. A. Imlay**. 1997. Inactivation of dehydratase [4Fe-4S] clusters and disruption of iron homeostasis upon cell exposure to peroxynitrite. J. Biol. Chem. **272**:27652-27659.

83. **Kiley, T. B. and N. R. Stanley-Wall**. 2010. Post-translational control of *Bacillus subtilis* biofilm formation mediated by tyrosine phosphorylation. Mol. Microbiol. **78**:947-963.

84. **Kipnis, E., T. Sawa, and J. Wiener-Kronish**. 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Med. Mal Infect. **36**:78-91.

85. **Klumpp, S. and J. Krieglstein**. 2009. Reversible phosphorylation of histidine residues in proteins from vertebrates. Sci. Signal. **2**:e13.

86. **Kohler, T., C. Van Delden, L. K. Curty, M. M. Hamzehpour, and J. C. Pechere**. 2001. Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol **183**:5213-22.

87. **Kojic, M. and V. Venturi**. 2001. Regulation of *rpoS* gene expression in *Pseudomonas*: involvement of a TetR family regulator. J. Bacteriol. **183**:3712-3720.

88. **Krupa, A., G. Preethi, and N. Srinivasan**. 2004. Structural modes of stabilization of permissive phosphorylation sites in protein kinases: distinct strategies in Ser/Thr and Tyr kinases. J. Mol. Biol. **339**:1025-1039.

89. **Krupa, A. and N. Srinivasan**. 2005. Diversity in domain architectures of Ser/Thr kinases and their homologues in prokaryotes. BMC. Genomics **6**:129.

90. **Kwon, D. H. and C. D. Lu**. 2006. Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Antimicrob. Agents Chemother. **50**:1615-1622.

91. **Lamont, I. L., P. A. Beare, U. Ochsner, A. I. Vasil, and M. L. Vasil**. 2002. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **99**:7072-7077.

92. **Laporte, D. C., C. S. Stueland, and T. P. Ikeda**. 1989. Isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase. Biochimie **71**:1051-1057.

93. **Lau, G. W., D. J. Hassett, H. Ran, and F. Kong**. 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. Trends Mol. Med. **10**:599-606.

94. **Leidal, K. G., K. L. Munson, M. C. Johnson, and G. M. Denning**. 2003. Metalloproteases from *Pseudomonas aeruginosa* degrade human RANTES, MCP-1, and ENA-78. J. Interferon Cytokine Res. **23**:307-318.

95. **Leiman, P. G., M. Basler, U. A. Ramagopal, J. B. Bonanno, J. M. Sauder, S. Pukatzki, S. K. Burley, S. C. Almo, and J. J. Mekalanos**. 2009. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **106**:4154-4159.

96. **Lequette, Y., J. H. Lee, F. Ledgham, A. Lazdunski, and E. P. Greenberg**. 2006. A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. J. Bacteriol. **188**:3365-3370.

97. **Lesic, B., M. Starkey, J. He, R. Hazan, and L. G. Rahme**. 2009. Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. Microbiology **155**:2845-2855.

98. **Li, J., B. L. Williams, L. F. Haire, M. Goldberg, E. Wilker, D. Durocher, M. B. Yaffe, S. P. Jackson, and S. J. Smerdon**. 2002. Structural and functional versatility of the FHA domain in DNA-damage signaling by the tumor suppressor kinase Chk2. Mol. Cell **9**:1045-1054.

99. **Li, L. L., J. E. Malone, and B. H. Iglewski**. 2007. Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator VqsR. J. Bacteriol. **189**:4367-4374.

100. **Li, X. Z., D. M. Livermore, and H. Nikaido**. 1994. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. Antimicrob. Agents Chemother. **38**:1732-1741.

101. **Li, X. Z., D. Ma, D. M. Livermore, and H. Nikaido**. 1994. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **38**:1742-1752.

102. **Li, Y. and W. R. Strohl**. 1996. Cloning, purification, and properties of a phosphotyrosine protein phosphatase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Bacteriol. **178**:136-142.

103. **Link, A. J., D. Phillips, and G. M. Church**. 1997. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. J. Bacteriol. **179**:6228-6237.

104. **Lombana, T. N., N. Echols, M. C. Good, N. D. Thomsen, H. L. Ng, A. E. Greenstein, A. M. Falick, D. S. King, and T. Alber**. 2010. Allosteric Activation Mechanism of the *Mycobacterium tuberculosis* Receptor Ser/Thr Protein Kinase, PknB. Structure. **18**:1667-1677.

105. **Ma, J. F., P. W. Hager, M. L. Howell, P. V. Phibbs, and D. J. Hassett**. 1998. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa zwf* gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, an enzyme important in resistance to methyl viologen (paraquat). J. Bacteriol. **180**:1741-1749.

106. **Ma, S., U. Selvaraj, D. E. Ohman, R. Quarless, D. J. Hassett, and D. J. Wozniak**. 1998. Phosphorylation-independent activity of the response regulators AlgB and AlgR in promoting alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **180**:956-968.

107. **MacEachran, D. P., B. A. Stanton, and G. A. O'Toole**. 2008. Cif is negatively regulated by the TetR family repressor CifR. Infect. Immun. **76**:3197-3206.

108. **Maestro, B., L. Novakova, D. Hesek, M. Lee, E. Leyva, S. Mobashery, J. M. Sanz, and P. Branny**. 2011. Recognition of peptidoglycan and beta-lactam antibiotics by the extracellular domain of the Ser/Thr protein kinase StkP from *Streptococcus pneumoniae*. FEBS Lett. **585**:357-363.

109. **Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura, T. Kawamoto, M. Yamada, and A. Nakata**. 1989. Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. J. Mol. Biol. **210**:551-559.

110. **Mattick, J. S.** 2002. Type IV pili and twitching motility. Annu. Rev. Microbiol. **56**:289-314.

111. **May, T. B. and A. M. Chakrabarty**. 1994. Isolation and assay of *Pseudomonas aeruginosa* alginate. Methods Enzymol. **235**:295-304.

112. **Michel-Briand, Y. and C. Baysse**. 2002. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochimie **84**:499-510.

113. **Missiakas, D. and S. Raina**. 1997. Signal transduction pathways in response to protein misfolding in the extracytoplasmic compartments of **E. coli**: role of two new phosphoprotein phosphatases PrpA and PrpB. EMBO J. **16**:1670-1685.

114. **Molle, V., J. Leiba, I. Zanella-Cleon, M. Becchi, and L. Kremer**. 2010. An improved method to unravel phosphoacceptors in Ser/Thr protein kinase-phosphorylated substrates. Proteomics. **10**:3910-3915.

115. **Monds, R. D., M. W. Silby, and H. K. Mahanty**. 2001. Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. Mol. Microbiol. **42**:415-426.

116. **Morona, J. K., R. Morona, and J. C. Paton**. 2006. Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae* type 2 is required for invasive disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **103**:8505-8510.

117. **Morrison, T. B. and J. S. Parkinson**. 1997. A fragment liberated from the *Escherichia coli* CheA kinase that blocks stimulatory, but not inhibitory, chemoreceptor signaling. J. Bacteriol. **179**:5543-5550.

118. **Motley, S. T. and S. Lory**. 1999. Functional characterization of a serine/threonine protein kinase of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. **67**:5386-5394.

119. **Mougous, J. D., M. E. Cuff, S. Raunser, A. Shen, M. Zhou, C. A. Gifford, A. L. Goodman, G. Joachimiak, C. L. Ordonez, S. Lory, T. Walz, A. Joachimiak, and J. J. Mekalanos**. 2006. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. Science **312**:1526-30.

120. **Mougous, J. D., C. A. Gifford, T. L. Ramsdell, and J. J. Mekalanos**. 2007. Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. Nat Cell Biol **9**:797-803.

121. **Msadek T., Kunst F., and Rapoport G.** 1995. p. 447-471. *In* Hoch J.A. and Silhavy T. (ed.), Two-Component Signal Transduction. ASM Press, Washington D.C.

122. **Mukhopadhyay, S., V. Kapatral, W. Xu, and A. M. Chakrabarty**. 1999. Characterization of a Hank's type serine/threonine kinase and serine/threonine phosphoprotein phosphatase in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **181**:6615-6622.

123. **Munoz-Dorado, J., S. Inouye, and M. Inouye**. 1991. A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. Cell **67**:995-1006.

124. **Nedvědová, J.** 2003. Diplomová práce - Příprava delečních mutací genů signálního aparátu *Pseudomonas aeruginosa* a sledování fenotypového projevu.Univerzita Karlova v Praze, ČR.

125. **Nessler, S.** 2005. The bacterial HPr kinase/phosphorylase: a new type of Ser/Thr kinase as antimicrobial target. Biochim. Biophys. Acta **1754**:126-131.

126. **Novakova, L., S. Bezouskova, P. Pompach, P. Spidlova, L. Saskova, J. Weiser, and P. Branny**. 2010. Identification of multiple substrates of the StkP Ser/Thr protein kinase in *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. **192**:3629-3638.

127. **Novakova, L., L. Saskova, P. Pallova, J. Janecek, J. Novotna, A. Ulrych, J. Echenique, M. C. Trombe, and P. Branny**. 2005. Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. FEBS J. **272**:1243-1254.

128. **Ochsner, U. A., P. J. Wilderman, A. I. Vasil, and M. L. Vasil**. 2002. GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. Mol. Microbiol. **45**:1277-1287.

129. **Pallen, M., R. Chaudhuri, and A. Khan**. 2002. Bacterial FHA domains: neglected players in the phospho-threonine signalling game? Trends Microbiol. **10**:556-563.

130. **Palma, M., D. DeLuca, S. Worgall, and L. E. Quadri**. 2004. Transcriptome analysis of the response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. J. Bacteriol. **186**:248-252.

131. **Parkinson, J. S.** 1993. Signal transduction schemes of bacteria. Cell **73**:857-871.

132. **Pennell, S., S. Westcott, M. Ortiz-Lombardia, D. Patel, J. Li, T. J. Nott, D. Mohammed, R. S. Buxton, M. B. Yaffe, C. Verma, and S. J. Smerdon**. 2010. Structural and functional analysis of phosphothreonine-dependent FHA domain interactions. Structure. **18**:1587-1595.

133. **Pereira, S. F., L. Goss, and J. Dworkin**. 2011. Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **75**:192-212.

134. **Perez, J., A. Castaneda-Garcia, H. Jenke-Kodama, R. Muller, and J. Munoz-Dorado**. 2008. Eukaryotic-like protein kinases in the prokaryotes and the myxobacterial kinome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **105**:15950-15955.

135. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. **29**:e45.

136. **Pier, G. B.** 2007. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. Int. J. Med. Microbiol. **297**:277-295.

137. **Pilewski, J. M. and R. A. Frizzell**. 1995. How do cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations produce lung disease? Curr. Opin. Pulm. Med. **1**:435-443.

138. **Potts, M., H. Sun, K. Mockaitis, P. J. Kennelly, D. Reed, and N. K. Tonks**. 1993. A protein-tyrosine/serine phosphatase encoded by the genome of the cyanobacterium *Nostoc commune* UTEX 584. J. Biol. Chem. **268**:7632-7635.

139. **Prithiviraj, B., T. Weir, H. P. Bais, H. P. Schweizer, and J. M. Vivanco**. 2005. Plant models for animal pathogenesis. Cell Microbiol. **7**:315-324.

140. **R DEVELOPMENT CORE TEAM**. 2009. R: A Language and Environment for Statistical Computing. http://www. r-project. org .

141. **Rahme, L. G., F. M. Ausubel, H. Cao, E. Drenkard, B. C. Goumnerov, G. W. Lau, S. Mahajan-Miklos, J. Plotnikova, M. W. Tan, J. Tsongalis, C. L. Walendziewicz, and R. G. Tompkins**. 2000. Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A **97**:8815-21.

142. **Rahme, L. G., E. J. Stevens, S. F. Wolfort, J. Shao, R. G. Tompkins, and F. M. Ausubel**. 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. Science **268**:1899-902.

143. **Rahme, L. G., M. W. Tan, L. Le, S. M. Wong, R. G. Tompkins, S. B. Calderwood, and F. M. Ausubel**. 1997. Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A **94**:13245-50.

144. **Rampioni, G., M. Schuster, E. P. Greenberg, I. Bertani, M. Grasso, V. Venturi, E. Zennaro, and L. Leoni**. 2007. RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. **66**:1557-1565.

145. **Ratjen, F. and G. Doring**. 2003. Cystic fibrosis. Lancet **361**:681-689.

146. **Ravichandran, A., N. Sugiyama, M. Tomita, S. Swarup, and Y. Ishihama**. 2009. Ser/Thr/Tyr phosphoproteome analysis of pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas* species. Proteomics. **9**:2764-2775.

147. **Saier, M. H., Jr., L. F. Wu, and J. Reizer**. 1990. Regulation of bacterial physiological processes by three types of protein phosphorylating systems. Trends Biochem. Sci. **15**:391-395.

148. **Sajid, A., G. Arora, M. Gupta, S. Upadhyay, V. K. Nandicoori, and Y. Singh**. 2011. Phosphorylation of *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr phosphatase by PknA and PknB. PLoS. One. **6**:e17871.

149. **Salunkhe, P., T. Topfer, J. Buer, and B. Tummler**. 2005. Genome-wide transcriptional profiling of the steady-state response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. J Bacteriol **187**:2565-72.

150. **Saskova, L., L. Novakova, M. Basler, and P. Branny**. 2007. Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. **189**:4168-4179.

151. **Savli, H., A. Karadenizli, F. Kolayli, S. Gundes, U. Ozbek, and H. Vahaboglu**. 2003. Expression stability of six housekeeping genes: A proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. J. Med. Microbiol. **52**:403-408.

152. **Schultz, C., A. Niebisch, L. Gebel, and M. Bott**. 2007. Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG. Appl. Microbiol. Biotechnol. **76**:691-700.

153. **Schuster, M. and E. P. Greenberg**. 2006. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Med. Microbiol. **296**:73-81.

154. **Schuster, M., A. C. Hawkins, C. S. Harwood, and E. P. Greenberg**. 2004. The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. Mol Microbiol **51**:973-85.

155. **Schuster, M., C. P. Lostroh, T. Ogi, and E. P. Greenberg**. 2003. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. J. Bacteriol. **185**:2066-2079.

156. **Schweizer, H. P.** 2003. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. Genet. Mol. Res. **2**:48-62.

157. **Seaver, L. C. and J. A. Imlay**. 2001. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **183**:7173-7181.

158. **Shi, L. and W. W. Carmichael**. 1997. pp1-cyano2, a protein serine/threonine phosphatase 1 gene from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* UTEX 2063. Arch. Microbiol. **168**:528-531.

159. **Shi, L., M. Potts, and P. J. Kennelly**. 1998. The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. FEMS Microbiol. Rev. **22**:229-253.

160. **Shi, Y.** 2009. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. Cell **139**:468-484.

161. **Sickmann, A. and H. E. Meyer**. 2001. Phosphoamino acid analysis. Proteomics. **1**:200-206.

162. **Small, D. A., W. Chang, F. Toghrol, and W. E. Bentley**. 2007. Comparative global transcription analysis of sodium hypochlorite, peracetic acid, and hydrogen peroxide on *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **76**:1093-1105.

163. **Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk**. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. **150**:76-85.

164. **Smyth, G. K.** 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. Stat. Appl. Genet. Mol. Biol. **3**:Article3.

165. **Soberon-Chavez, G., F. Lepine, and E. Deziel**. 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **68**:718-725.

166. **Stock, A. M., V. L. Robinson, and P. N. Goudreau**. 2000. Two-component signal transduction. Annu. Rev. Biochem. **69**:183-215.

167. **Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrock-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson**. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature **406**:959-964.

168. **Strom, A. R. and I. Kaasen**. 1993. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. Mol. Microbiol. **8**:205-210.

169. **Tan, M. W., S. Mahajan-Miklos, and F. M. Ausubel**. 1999. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A **96**:715-20.

170. **Terada, L. S., K. A. Johansen, S. Nowbar, A. I. Vasil, and M. L. Vasil**. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. Infect. Immun. **67**:2371-2376.

171. **Tsang, K. W., P. Ng, P. L. Ho, S. Chan, G. Tipoe, R. Leung, J. Sun, J. C. Ho, M. S. Ip, and W. K. Lam**. 2003. Effects of erythromycin on *Pseudomonas aeruginosa* adherence to collagen and morphology in vitro. Eur. Respir. J. **21**:401-406.

172. **Urbanová, M.** 2007. Diplomová práce - Studium Ser/Thr proteinkináz a fosfoproteinfosfatáz *Pseudomonas aeruginosa*.Univerzita Karlova v Praze, ČR.

173. **Urbanowski, M. L., E. D. Brutinel, and T. L. Yahr**. 2007. Translocation of ExsE into Chinese hamster ovary cells is required for transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. Infect. Immun. **75**:4432-4439.

174. **Ventre, I., A. L. Goodman, I. Vallet-Gely, P. Vasseur, C. Soscia, S. Molin, S. Bleves, A. Lazdunski, S. Lory, and A. Filloux**. 2006. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **103**:171-176.

175. **Veyron-Churlet, R., V. Molle, R. C. Taylor, A. K. Brown, G. S. Besra, I. Zanella-Cleon, K. Futterer, and L. Kremer**. 2009. The *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III activity is inhibited by phosphorylation on a single threonine residue. J. Biol. Chem. **284**:6414-6424.

176. **Viboud, G. I. and J. B. Bliska**. 2005. Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. Annu. Rev. Microbiol. **59**:69-89.

177. **Voulhoux, R., G. Ball, B. Ize, M. L. Vasil, A. Lazdunski, L. F. Wu, and A. Filloux**. 2001. Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. EMBO J. **20**:6735-6741.

178. **Wagner, V. E., D. Bushnell, L. Passador, A. I. Brooks, and B. H. Iglewski**. 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. J. Bacteriol. **185**:2080-2095.

179. **Wandersman, C. and P. Delepelaire**. 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. Annu. Rev. Microbiol. **58**:611-647.

180. **Wang, J., C. Li, H. Yang, A. Mushegian, and S. Jin**. 1998. A novel serine/threonine protein kinase homologue of *Pseudomonas aeruginosa* is specifically inducible within the host infection site and is required for full virulence in neutropenic mice. J Bacteriol **180**:6764-8.

181. **Wang, Y., U. Ha, L. Zeng, and S. Jin**. 2003. Regulation of membrane permeability by a two-component regulatory system in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:95-101.

182. **Wehenkel, A., M. Bellinzoni, F. Schaeffer, A. Villarino, and P. M. Alzari**. 2007. Structural and binding studies of the three-metal center in two mycobacterial PPM Ser/Thr protein phosphatases. J. Mol. Biol. **374**:890-898.

183. **Whitchurch, C. B., S. A. Beatson, J. C. Comolli, T. Jakobsen, J. L. Sargent, J. J. Bertrand, J. West, M. Klausen, L. L. Waite, P. J. Kang, T. Tolker-Nielsen, J. S. Mattick, and J. N. Engel**. 2005.

Pseudomonas aeruginosa fimL regulates multiple virulence functions by intersecting with Vfr-modulated pathways. Mol. Microbiol. **55**:1357-1378.

184. **Whitchurch, C. B., T. Tolker-Nielsen, P. C. Ragas, and J. S. Mattick**. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. Science **295**:1487.

185. **Whittaker, C. A. and R. O. Hynes**. 2002. Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. Mol. Biol. Cell **13**:3369-3387.

186. **Williams, P. and M. Camara**. 2009. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. Curr. Opin. Microbiol. **12**:182-191.

187. **Williamson, M. P.** 1994. The structure and function of proline-rich regions in proteins. Biochem. J. **297 (Pt 2)**:249-260.

188. **Winsor, G. L., R. T. Van, R. Lo, B. Khaira, M. D. Whiteside, R. E. Hancock, and F. S. Brinkman**. 2009. Pseudomonas Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. Nucleic Acids Res. **37**:D483-D488.

189. **Wolanin, P. M., P. A. Thomason, and J. B. Stock**. 2002. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. Genome Biol. **3**:REVIEWS3013.

190. **Wolf, P. and U. Elsasser-Beile**. 2009. Pseudomonas exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. Int. J. Med. Microbiol. **299**:161-176.

191. **Wolfgang, M. C., B. R. Kulasekara, X. Liang, D. Boyd, K. Wu, Q. Yang, C. G. Miyada, and S. Lory**. 2003. Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **100**:8484-8489.

192. **Yahr, T. L. and M. C. Wolfgang**. 2006. Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. Mol. Microbiol. **62**:631-640.

193. **Zaborina, O., C. Holbrook, Y. Chen, J. Long, A. Zaborin, I. Morozova, H. Fernandez, Y. Wang, J. R. Turner, and J. C. Alverdy**. 2008. Structure-function aspects of PstS in multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS. Pathog. **4**:e43.