

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Tomáš Beneš

Přehled nukleotidových sekundárních posílů u bakterií
Survey of bacterial nucleotide-based second messengers

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Pavel Branny, CSc.

Praha, 2022

Prohlášení:

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

V Praze, 28. 4. 2022

Podpis

Chtěl bych poděkovat RNDr. Pavlu Brannému, CSc. za vedení práce, jeho rady a ochotu. Můj dík si zasluhuje i Jan Keil za užitečné připomínky.

Abstrakt

Druží poslové jsou malé molekuly, které jsou součástí jednoho ze základních typů buněčné signalizace. Jejich funkcí je přenášet signály od extracelulárních či intracelulárních receptorů ke specifickým efektorovým proteinům. Tento typ signalizace je evolučně starý a konzervovaný, vyskytuje se v každém buněčném organismu. Jednotlivé taxony se ale liší konkrétními sloučeninami, jež se v signální transdukcii uplatňují. V bakteriích se ve většině případů využívají různé deriváty nukleotidů. Nejvýznamnějšími příklady jsou cAMP, (p)ppGpp, c-di-GMP a c-di-AMP. Bakteriální druží poslové se zapojují do regulace metabolismu, tvorby biofilmu, stringentní odpovědi, osmoregulace, ochrany před virovou infekcí a do mnoha dalších procesů. Tato práce se kromě popisu těchto významných signálních drah zabývá i enzymy pro syntézu a degradaci těchto malých signálních molekul.

Klíčová slova: bakteriální signální dráhy, cAMP, c-di-AMP, c-di-GMP, (p)ppGpp

Abstract

Second messengers are small molecules that belong to one of the fundamental types of cell signalling. Their function is to transmit signals from extracellular or intracellular receptors to specific effector proteins. This type of signal transduction is evolutionarily ancient and conserved, occurring in every cellular organism. However, individual taxa differ in the specific compounds they use in signal transduction. In bacteria, different nucleotide derivatives are mostly used. The most important examples are cAMP, (p)ppGpp, c-di-GMP and c-di-AMP. Bacterial second messengers are involved in the regulation of metabolism, biofilm formation, stringent response, osmoregulation, protection against viral infection and many other processes. In addition to describing these signalling pathways, this work also deals with enzymes for synthesis and degradation of these small signalling molecules.

Keywords: bacterial signalling pathways, cAMP, c-di-AMP, c-di-GMP, (p)ppGpp

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Signalizace pomocí druhých poslů	2
3 cAMP	3
3.1 Struktura cAMP a historie objevu	3
3.2 Syntéza a degradace cAMP	3
3.3 CRP – hlavní efektor cAMP	4
3.4 Regulace <i>lac</i> operonu.....	6
3.5 Regulace tvorby biofilmu.....	7
3.6 Další efekty cAMP.....	8
3.6.1 Regulace asimilace dusíku	8
3.6.2 Regulace fototaxe a fototrofie	9
3.6.3 Regulace syntézy bičíku.....	9
3.6.4 Role v patogenezi	10
4 (p)ppGpp	10
4.1 Struktura (p)ppGpp a enzymy zodpovědné za jeho homeostázu	10
4.2 Mechanismy regulace syntézy (p)ppGpp.....	12
4.3 Efekty (p)ppGpp	14
4.3.1 Interakce s RNA polymerázou	14
4.3.2 Příklady dalších drah regulovaných (p)ppGpp.....	15
4.3.3 Role (p)ppGpp v rezistenci	16
5 c-di-GMP.....	16
5.1 Syntéza a degradace c-di-GMP	16
5.2 Efektory c-di-GMP	18
5.3 Účinky c-di-GMP	19
5.3.1 Příklady uplatnění c-di-GMP v regulaci tvorby biofilmu.....	19
5.3.2 Další účinky c-di-GMP	20
6 c-di-AMP.....	21
6.1 Objev a metabolismus c-di-AMP	21
6.1.1 Syntéza c-di-AMP	21
6.1.2 Degradace c-di-AMP	22
6.2 Efekty c-di-AMP	23
6.2.1 Regulace draselného transportu a osmoregulace.....	24
6.2.2 Vliv c-di-AMP na metabolismus a biofilm.....	24
6.2.3 Role c-di-AMP v hostitelské imunitní odpovědi.....	25
7 Minoritní druzí poslové.....	25
7.1 cGMP	25
7.2 Druží poslové v CBASS.....	27
8 Závěr	28
Seznam literatury	29

1 Úvod

Pro přežití všech živých organismů jsou nutné komplexní regulační dráhy, které umožňují efektivní adaptaci na nové podmínky. Bez těchto mechanismů by i sebemenší změna prostředí mohla vést k smrti jedince. Přestože bakteriální regulace nedosahuje robustnosti, která se objevuje u mnohobuněčných eukaryot, musí být tyto dráhy schopny odpovědi na široké spektrum různých fyzikálních a chemických proměnných. Vzhledem ke své velikosti totiž bakterie nemohou opustit nepříznivé prostředí. Pokud se nepřizpůsobí, zahynou. Bakteriální regulační systémy zahrnují quorum sensing, který umožňuje komunikaci mezi jedinci daného společenstva, dvousložkové systémy nebo kaskády založené na druhém poslu. Velká část bakteriálních signalizací využívá dvousložkové systémy, sestávající ze senzorkého proteinu, který po své aktivaci přenáší signál přímo na efektorový protein, jenž často funguje jako transkripční faktor. I přesto byla v bakteriích objevena řada drah, které pro přenos signálu využívají druhé posly. Ty v reakci na prvního posla signál amplifikují a přenáší ho do nitra buňky.

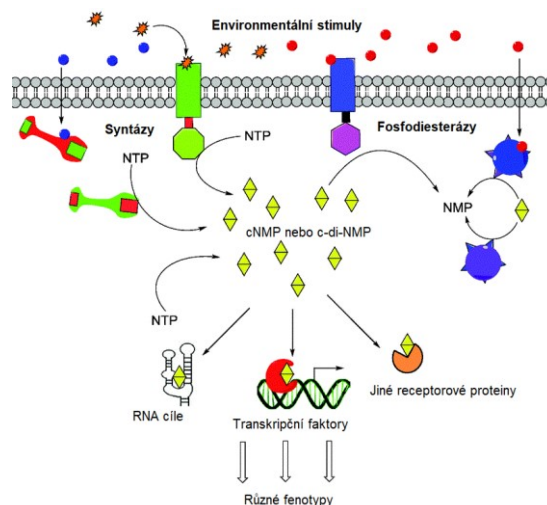
Roli sekundárních poslů většinou zastávají jednoduché molekuly, často se jedná o různé deriváty nukleotidů, v eukaryotech se také běžně uplatňují vápenaté ionty nebo produkty štěpení membránových fosfolipidů, jako je inositoltrifosfát. U bakterií je popsáno pět majoritních poslů: cAMP, ppGpp, pppGpp, c-di-GMP a c-di-AMP. Spektrum bakteriálních druhých poslů se ale neustále rozšiřuje. Bezsporně nejlépe prozkoumaným se stal cAMP, jehož popis ustanovil samotný fenomén sekundárních poslů. Jde o velmi rozšířenou molekulu, kterou hojně využívají bakterie i eukaryota. V bakteriálně doméně je jeho hlavní funkce spojena s přechody mezi využíváním různých zdrojů uhlíku. Produkce (p)ppGpp je spouštěna v důsledku nedostatku aminokyselin a jeho účinkem se například omezuje proteosyntéza. Jedná se tedy o mechanismus, který buňce pomáhá překonat stresové podmínky. Z toho důvodu je (p)ppGpp někdy označován jako alarmon. Cyklický di-GMP zase podporuje přechod od motilní volně žijící buňky k přisedlé formě a stimuluje tvorbu biofilmu. Účinkem c-di-AMP je udržování osmotické homeostáze, a to hlavně díky regulaci draselného transportu. Pokles koncentrace tohoto druhého posla také indikuje poškození DNA, c-di-AMP současně zasahuje do procesu sporulace. Zmíněná uplatnění nejčastějších bakteriálních poslů jsou samozřejmě ta nejrozšířenější a nejprozkoumanější. Tyto molekuly se účastní i dalších regulačních procesů, u dvou druhů dokonce mohou zastávat naprosto protichůdné funkce.

Cílem této práce je popsat hlavní nukleotidové sekundární posly u bakterií a mechanismy jejich syntézy a degradace. Zároveň budou uvedeny základní regulační dráhy, ve kterých druzí poslové vystupují.

2 Signalizace pomocí druhých poslů

Druzí poslové jsou malé molekuly, které zajišťují šíření konkrétního signálu buněčnou cytoplazmou. Proces od registrace signálu, přes jeho přenos, až po vyvolání finální odpovědi je označován jako signální transdukce. Signalizace pomocí druhých poslů je v modelovém případě zahajována vazbou primárního posla na specifický receptor. Ten následně sám nebo zprostředkovaně aktivuje enzymy pro syntézu sekundárních poslů (Rall & Sutherland, 1958). Bakterie nejčastěji jako druhé posly využívají cyklické nukleotidy a dinukleotidy. Jejich produkce je zajišťována pomocí tzv. cykláz. Například adenylátcykláza syntetizuje cAMP z molekuly ATP (Danchin *et al.*, 1984). Impulzy spouštějící tuto signalizaci mohou mít rozličný charakter. Nemusí jít o extracelulární molekulu, která je rozpoznávána membránovým receptorem, řada kaskád registruje i změny intracelulárního prostředí. Buňka takto například může odpovídat na nedostatek biosyntetických prekurzorů (Cashel, 1969). Nemusí se ani jednat o chemické sloučeniny, jako spouštěč může kupříkladu sloužit i záření (Savakis *et al.*, 2012).

Druzí poslové se následně vážou na své různorodé efektory. Alosterickou regulací tak mohou spouštět nebo naopak inhibovat aktivitu příslušných proteinů (Blötz *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2015). Mezi efektorové proteiny se často řadí i transkripční faktory (Weber & Steitz, 1987). Ve specifických případech mohou druzí poslové interagovat přímo s mRNA, a to díky riboswitchům, smyčkám a vlásečkám v regulační oblasti mRNA, které dokáží po vazbě ligandu měnit svou strukturu a řídit tak genovou expresi (Sudarsan *et al.*, 2008). Signalizace je v závěru ukončena aktivací degradačních enzymů, z nichž nejrozšířenější jsou různé fosfodiesterázy, které druhé posly konvertují na sloučeniny, jež přestanou být rozpoznávány příslušnými efektory (Imamura *et al.*, 1996). Tento model ilustrovaný obrázkem 1 ukazuje, jak dochází k zesilování iniciálního impulzu. Enzymy syntetizující sekundární posly dokáží od své aktivace po finální deaktivaci vyprodukovat velké množství signálních molekul.

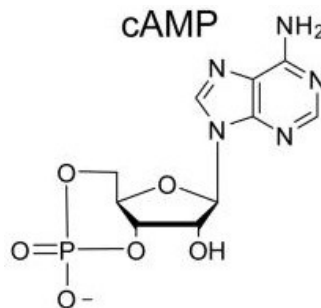


Obrázek 1: Schéma signalizace pomocí druhých poslů: Po interakci extracelulárního či intracelulárního prvního posla se syntázou dochází k produkci příslušného druhého posla, který se následně váže na RNA riboswitche, transkripční faktory nebo jiné receptorové proteiny. Signalizace zprostředkovaná nukleotidovými druhými posly je ukončována aktivitou fosfodiesteráz (převzato z Opoku-Temeng *et al.*, 2016; upraveno).

3 cAMP

3.1 Struktura cAMP a historie objevu

Cyklický AMP (cAMP) je běžně užívané označení pro 3',5'-adenosin cyklický monofosfát. Jedná se o β -D-ribofuranosu, jejíž 3' a 5' uhlíky jsou přemostěny pomocí zbytku kyseliny fosforečné. Na uhlíku 1' je následně přes svůj dusík na pozici 9 navázána adenosinová báze, a to pomocí N-glykosidické vazby (obr. 2).



Obrázek 2: Struktura cAMP (převzato z Shanahan & Strobel, 2012)

Molekula cAMP byla poprvé izolována a charakterizována při výzkumu hormonální aktivace jaterní glykogenfosforylázy pomocí adrenalinu a glykogenu (Rall *et al.*, 1957; Sutherland & Rall, 1958). Bylo zjištěno, že vazba adrenalinu na svůj receptor vede k markantnímu zvýšení intracelulární hladiny cAMP a že tato molekula tedy může fungovat jako spojovací článek mezi membránovým receptorem a intracelulárně umístěnými enzymy (Rall & Sutherland, 1958). Díky těmto publikacím se cAMP stal prvním charakterizovaným druhým poslem.

O několik let později popsali Jacques Monod a Francois Jacob první regulaci genové exprese na příkladu bakteriálního *lac* operonu. Ve své práci navrhli dvojí regulaci exprese pomocí represoru a aktivátoru. Podle tohoto modelu je v neaktivním stavu na regulační element genu či operonu navázaný represor, který brání nasednutí RNA polymerázy. Tento represor je ale schopen interagovat s určitými malými molekulami a po obsazení tohoto vazebného místa ztrácí afinitu k regulačnímu elementu operonu. K úspěšnému zahájení transkripce je zároveň nutná vazba aktivátoru, který po interakci s jinou malou molekulou afinitu k DNA naopak získává (Jacob & Monod, 1961). Tento model vysvětluje dříve popsaný glukózový efekt, při kterém přítomnost glukózy inhibuje jiné katabolické dráhy. Uplatnění v řízení přechodu mezi různými zdroji uhlíku u bakterií získává i cAMP. Tato molekula se totiž v této dráze váže na aktivátor a spouští expresi *lac* operonu v nepřítomnosti glukózy (Zubay *et al.*, 1970).

3.2 Syntéza a degradace cAMP

Syntéza cAMP probíhá pomocí enzymů, které se nazývají adenylátcyklázy. Ty se dělí do šesti tříd, přičemž nejvýznamnější jsou první tři (Télléz-Sosa *et al.*, 2002). Enzymy třídy I byly objeveny hlavně u proteobakterií. Zde jsou řízeny komponentami fosfotransferázového systému a uplatňují se tedy v nejlépe prozkoumaném mechanismu katabolické represe (Reddy *et al.*, 1985). Patří sem i první

popsaná bakteriální adenylátcykláza, která pochází z *Escherichia coli*, kde je kódována genem *cya* (Danchin *et al.*, 1984) Tento gen má ve svém čtecím rámci netypický start kodón. Místo standardního AUG začíná translace na UUG. Bylo předpokládáno, že by tento start kodón měl snižovat efektivitu translace. To ale potvrzeno nebylo, při nahrazení UUG klasickým AUG nedošlo k žádné signifikantní změně úrovně transkripce (Roy *et al.*, 1988). Třída II zahrnuje adenylátcyklázy zastávající funkce toxinů (Hanski & Farfel, 1985). Další významnou skupinou je třída III, která se vyskytuje u většiny známých bakteriálních kmenů. Tyto adenylátcyklázy často obsahují N-terminální doménu, která je schopna reagovat na různé intracelulární či extracelulární signály, zároveň jsou většinou svou transmembránovou doménou kotveny do membrány. Klasickým příkladem těchto enzymů je CyaB z *Pseudomonas aeruginosa* (Topal *et al.*, 2012).

Výchozí molekulou pro syntézu cAMP je ATP. Aktivní místo adenylátcyklázy deprotonuje hydroxylovou skupinou na 3' uhlíku ATP. Vzniklý alkoholátový anion následně v jednom kroku atakuje α -fosfát, což vede k tvorbě fosfodiesterové vazby mezi uhlíky 3' a 5', zároveň dochází k odštěpení pyrofosfátu. Ke své aktivitě enzym vyžaduje přítomnost hořčičných kationtů, které pomáhají orientovat substrát a stíní záporný náboj fosfátů (Rall & Sutherland, 1962).

Pro správné fungování cAMP jako druhého posla je nutná jeho degradace po odeznění extracelulárního signálu. Tuto funkci zastávají cAMP specifické fosfodiesterázy (cAMP-PDE), které katalyzují hydrolýzu cAMP na 5'-AMP (Imamura *et al.*, 1996). Tato konverze se ale netýká všech enzymů tohoto typu. Například Rv0805 z *Mycobacterium tuberculosis* je schopen vázat substrát v různých polohách, a proto vytváří směs 5'-AMP a 3'-AMP (Podobnik *et al.*, 2009). Některé PDE navíc mohou být promiskuitní, kdy kromě cAMP štěpí i cGMP (Fujisawa & Ohmori, 2005).

Fosfodiesterázy je možné rozdělit do třech tříd na základě podobnosti jejich sekvencí. Třída I se vyskytuje pouze u eukaryot. Třída II se také nalézá hlavně u eukaryot, ale minoritně se objevuje i u bakterií (Richter, 2002). V periplazmě se tento typ vyskytuje u *Vibrio fischeri*. Podle objevitelů by toto netypické umístění fosfodiesterázy mohlo souviset se schopností *V. fischeri* využívat extracelulární cAMP jako zdroj uhlíku či fosforu. Mutace v genu pro tuto PDE totiž vedla k neschopnosti bakterie růst na médiu, jehož veškeré zdroje uhlíku byly ve formě cAMP (Dunlap *et al.*, 1992; Dunlap & Callahan, 1993). Podrobnější analýzy ukázaly, že tento enzym ke své aktivitě vyžaduje zinek (Callahan *et al.*, 1995). Třída III je nejvíce rozšířenou skupinou cAMP fosfodiesteráz v bakteriální doméně (Richter, 2002). Nejvýznamnějším zástupcem je CpdA, která byla izolována z *E. coli*. Stejně jako u předchozích fosfodiesteráz se v aktivním místě třídy III vždy vyskytují kovové ionty, které jsou pro hydrolýzu cAMP nezbytné. U většiny včetně CpdA roli těchto kovů přejímají železnaté či železité ionty (Imamura *et al.*, 1996).

3.3 CRP – hlavní efektor cAMP

Nejlépe charakterizovaným efektorovým proteinem cAMP u bakterií je CRP (receptorový protein cAMP), který se též nazývá CAP (katabolický aktivační protein). CRP je bakteriální transkripční faktor,

který se po vazbě cAMP připojuje na celou řadu promotorů a reguluje asi 7 % genů u *E. coli* (Zheng *et al.*, 2004). CRP je v aktivním stavu dimer, každý monomer se skládá z 209 aminokyselinových zbytků a dvou domén. Větší N-koncová doména sestává z β -listů a pro menší C-koncovou doménu jsou typické α -helixy. Ty při správné orientaci umožňují interakci s DNA a dohromady tvoří DNA-vazebnou doménu. Mezi C a N koncem se poté nalézá pantová oblast, která umožňuje konformační změnu po interakci s cAMP. Vazebné místo pro druhého posla mají oba monomery CRP (Weber & Steitz, 1987). CRP se může vyskytovat ve třech konformacích: bez navázaného cAMP, s jednou molekulou cAMP a s dvěma molekulami cAMP. Vzhledem k obsahu dvou cAMP vazebných míst bylo očekáváno, že hlavní fyziologickou roli bude mít plně satureovaná forma CRP. Tomu však neodpovídají výzkumy, které naznačují, že CRP s dvěma molekulami cAMP nemá příliš významnou afinitu k specifické DNA. Naopak CRP s jedním cAMP vykazuje mnohem vyšší sekvenční specifitu, z čehož vyplývá, že za fyziologických podmínek je využívána hlavně tato konformace. Toto tvrzení je podpořeno i faktem, že v buňce se většinou cAMP nevyskytuje v dostatečné koncentraci, aby došlo k plné saturaci CRP (Heyduk & Lee, 1989).

Ke správnému průběhu signální transdukce je nutné i její vypnutí po odeznění primárního spouštěče. Tato regulace postihuje i CRP. Přestože konformace bez navázaného cAMP není náchylná k degradaci, po vazbě cAMP se citlivost k proteázám výrazně zvyšuje a protein je poměrně rychle degradován (Heyduk & Lee, 1989). Komplex CRP-cAMP rovněž reprimuje svůj vlastní gen. Tato negativní autoregulace ale neprobíhá přímo. Aktivovaný CRP spouští transkripci antisense RNA, která následně blokuje expresi *crp* (Okamoto & Freundlich, 1986). Ukončení signalizace je zajištěno i jinými mechanismy. CRP-cAMP je schopen přímo interagovat s regulačními elementy genu *cpdA*, aktivovat expresi kódované fosfodiesterázy, a tím účinně snižovat hladinu cAMP v cytoplazmě (Kim *et al.*, 2009). Rovněž dochází k negativní regulaci exprese adenylátcyklázy. CRP s cAMP se váže do promotoru genu *cya*, čímž komplex fyzicky brání správnému nasednutí RNA polymerázy (Aiba, 1985).

CRP ale není jediným cAMP-vazebným proteinem. Například v *Pseudomonas aeruginosa* tuto funkci zastává protein Vfr (virulence factor regulator). Jak jeho název napovídá jedná se o významný transkripční faktor, který spouští transkripci řady genů zapojených do virulence. Tento protein má navíc až 67% sekvenční homologii se standardním CRP a po výměně *crp* za *vfr* byl v *E. coli* schopen původní transkripční faktor funkčně nahradit (West *et al.*, 1994). V roce 2009 byl v této bakterii navíc charakterizován další protein, který interaguje s cAMP. Jedná se o CbpA (cAMP-binding protein A), jenž je svou strukturou značně podobný regulačním podjednotkám eukaryotické proteinkinázy A. Obsahuje C-terminální cAMP-vazebnou doménu a po interakci s druhým poslem se lokalizuje na pól s ukotveným bičíkem, což může souviset s jeho dosud nepopsanou funkcí. Samotná exprese jeho genu *cbpA* je pozitivně regulována pomocí Vfr (Endoh & Engel, 2009).

3.4 Regulace *lac* operonu

Nejnámějším modelovým příkladem uplatnění cAMP je regulace exprese *lac* operonu, která spadá mezi katabolickou represi. Tento systém byl charakterizován u *E. coli* a umožňuje buňce využívat vždy nejvýhodnější zdroj uhlíku, který je v dané chvíli dostupný v prostředí. Původně byla katabolická represe označována jako glukózový efekt. Glukóza je totiž nejvýhodnějším substrátem, který může rovnou vstupovat do glykolýzy, a v její přítomnosti bylo pozorováno zablokování mnoha enzymatických drah pro zpracování jiných substrátů (Epps & Gale, 1942). Katabolická represe reguluje i *lac* operon, který kóduje enzymy využívající laktózu. *Lac* operon sestává z regulačních elementů včetně promotoru, operátoru a třech genů, které nesou označení *lacY*, *lacZ* a *lacA*. Gen *lacY* kóduje permeázu laktózy, která zajišťuje transport laktózy do buňky (Jacob & Monod, 1961). Produktem *lacZ* genu je β -galaktosidáza, která štěpí laktózu na galaktózu a glukózu. Zároveň má enzym transgalaktosylázovou aktivitu a určitou frakci laktózy převádí na allolaktózu, kterou je poté schopen zpětně rozštěpit na monomery (Huber *et al.*, 1976). Poslední gen, tedy gen *lacA*, exprimuje thiogalaktosid transacetylázu. I přes obrovskou známost tohoto systému zůstává funkce tohoto proteinu v *E. coli* záhadou. Existuje však hypotéza, že slouží k detoxifikaci buňky, kdy by mohl acetylovat nemetabolizovatelné analogy β -galaktosidů a zajistit tak jejich vyloučení do média (Andrews & Lin, 1976).

Exprese *lac* operonu je řízena pozitivní i negativní regulací. V nepřítomnosti laktózy je *lac* operon blokován pomocí svého represoru, který je kódován genem *lacI* (Jacob & Monod, 1961). *Lac* represor funguje jako tetramer, váže se na primární O1 operátor a blokuje formování preiniciačního komplexu RNA polymerázy. Zároveň ale může vázat jeden z přidružených operátorů O2 a O3. To vede k formování DNA smyčky, která výrazně zvyšuje intenzitu represe (Oehler *et al.*, 1990). I přesto dochází k slabé bazální expresi genu a produkci nízkého počtu laktózové permeázy a β -galaktosidázy. Pokud se tedy v okolí vyskytne zdroj laktózy, malé množství tohoto disacharidu je transportováno do buňky, kde je konvertován na allolaktózu, která je přirozeným ligandem *LacI* represoru. Po vazbě dojde ke změně konformace *LacI* a snížení jeho afinity k operátoru (Jobe & Bourgeois, 1972). Promotor tohoto operonu je ale poměrně slabý a k efektivní transkripci potřebuje aktivátor, který je dostupný pouze při nedostatku glukózy. Tím je zajištěno, že se bakterie v přítomnosti glukózy nezdržuje užitím laktózy. Jako aktivátor slouží již dříve zmiňovaný CRP či CAP, který pro efektivní dimerizaci a zaujetí správné konformace vyžaduje vazbu cAMP (Zubay *et al.*, 1970).

Za normálních podmínek je koncentrace cAMP v buňce nízká a zvyšuje se až při absenci glukózy (Makman & Sutherland, 1965). Ta je do buňky transportována pomocí fosfotransferázového systému (PTS), který zajišťuje fosforylaci glukózy během jejího vstupu do buňky. Díky tomu je zajištěno, že glukóza neuniká ven z buňky a zároveň dochází k prvnímu kroku glykolýzy. Systém sestává z několika proteinů, které se postupně fosforylují. Dráha začíná na fosfoenolpyruvátu, který fosforyluje protein EI, ten následně předává fosfát na protein HPr a z něj se přenáší na EIIA. Glukóza se do buňky dostává pomocí transportéru nesoucího označení EIIC, na kterou je navázán EIIB. Tento enzym přijímá fosfát od EIIA a fosforyluje transportovanou glukózu (Kundig & Roseman, 1971). Enzym EIIA se zároveň

podílí na regulaci *lac* permeázy. Při aktivním transportu glukózy dochází k odebrání fosfátu z tohoto proteinu a defosforylovaný EI_{IA} se následně může vázat na LacY a bránit vstupu laktózy do buňky (Nelson *et al.* 1983). Pokud ale dojde k vyčerpání zdroje glukózy, zůstávají proteiny PTS fosforylované a v tomto stavu interagují s adenylátcyklázou, a tím ji aktivují (Reddy *et al.*, 1985). Adenylátcykláza začne produkovat cAMP. To aktivuje CRP, který se začne vázat na promotor *lac* operonu a interakcí s RNA polymerázou zvýší efektivitu transkripce tohoto operonu, což povede k zahájení utilizace laktózy (Zubay *et al.*, 1970). Podobnou roli má CRP-cAMP i v aktivaci *gal* operonu, jehož produkty zajišťují metabolismus galaktózy (Nissley *et al.*, 1971).

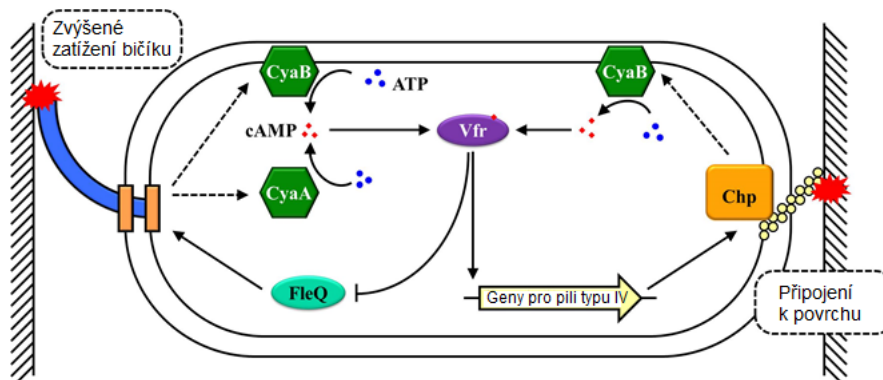
3.5 Regulace tvorby biofilmu

Ukazuje se, že u řady bakterií hraje cAMP roli i při formování biofilmu (Hufnagel *et al.*, 2016). Biofilm je strukturované společenstvo mikroorganismů, které adherují k nějakému pevnému podkladu. Buňky v biofilmu kolem sebe produkují extracelulární matrix, která jim často poskytuje ochranu před vnějšími nehostinnými faktory, jako jsou různé toxické látky. Struktura rovněž zadržuje vodu a chrání před vyschnutím. Bakteriím také umožňuje efektivně využívat zdroje a snadněji si vyměňovat metabolity (MacLeod *et al.*, 1990). Vytvoření této struktury je zásadní pro řadu patogenních druhů, umožňuje vysokou perzistenci, proto je studium těchto strukturovaných společenstev jedním z hlavních témat moderní lékařské mikrobiologie (Nickel *et al.*, 1985).

Formování biofilmu řídí hlavně c-di-GMP, a proto bude tento fenomén blíže popsán v kapitole, která se tímto druhým poslem zabývá. U mnoha druhů se ale při formování těchto povrchových struktur výrazně uplatňuje i regulace pomocí cAMP. Komplex CRP-cAMP u *E. coli* spouští expresi *csgD* (Hufnagel *et al.*, 2016). Protein CsgD je hlavním řídicím faktorem, který zahajuje syntézu klíčových složek extracelulární matrix. V případě *E. coli* jsou jednou z hlavních komponent tzv. curli fibers, což jsou proteinové polymery, které mají typickou amyloidní strukturu s velkým množstvím β -skládaných listů (Hufnagel *et al.*, 2015). Druhou významnou součástí matrix *E. coli* je i polysacharid celulóza (Zogaj *et al.*, 2001). Mimo to CRP-cAMP podporuje vývoj biofilmu i jinými mechanismy. U *E. coli* inhibuje *rpoS* (Lange & Hengge-Aronis, 1994). Tento gen kóduje faktor σ^S , jehož produkce je ve větší míře indukována po přechodu do stacionární fáze. Buňky exprimující tento σ faktor vykazují zvýšenou rezistenci vůči teplotnímu šoku nebo oxidativnímu stresu (Lange & Hengge-Aronis, 1991). Současně ale σ^S inhibuje formování biofilmu, a tudíž je nutné jeho činnost utlumit, aby bylo možné zahájit produkci extracelulární matrix (Corona-Izquierdo & Membrillo-Hernández, 2002).

Dobře charakterizované je formování biofilmu i u *Pseudomonas aeruginosa*, u které hraje výraznou roli v patogenezi. Iničiálním mechanosenzorem, který detekuje blízkost pevného povrchu, je v tomto případě bičík. Jakmile se dostane do kontaktu s pevným podkladem, zvýší se zátěž na rotaci bičíku, a to zprostředkovaně aktivuje adenylátcyklázy CyaA a CyaB, které zvyšují úroveň cAMP v buňce (Schniederberend *et al.*, 2019). Adhezi k povrchu detekují i pili typu IV, které jsou schopny tento signál přenést na Chp systém (Persat *et al.*, 2015). Komponenty této dráhy poté interagují s Cya proteiny

a stimulují ještě vyšší syntézu cAMP (Fulcher *et al.*, 2010). Druhý posel se následně váže na transkripční faktor Vfr a společně aktivují řadu virulenních faktorů včetně těch zapojených do biogeneze pilů typu IV, čímž je pravděpodobně zajištěno pevnější připojení k povrchu (Wolfgang *et al.*, 2003) (obr. 3).



Obrázek 3: Mechanismus regulace adheze pomocí cAMP u *P. aeruginosa*: Po setkání s pevným povrchem se zvyšuje zatížení bičičku, což stimuluje adenylátcyklázy CyaA a CyaB. Jimi produkovaný cAMP se váže na transkripční faktor Vfr. Vzniklý komplex inhibuje biosyntézu bičičku a aktivuje expresi pilů typu IV (převzato z Liu *et al.*, 2020; upraveno).

V obou těchto příkladech cAMP stimuluje tvorbu biofilmu, u některých druhů tomu je ale naopak. U *Vibrio cholerae* CRP-cAMP aktivuje transkripční faktor HapR, který brání produkci proteinů VpsR a VpsT. Ty stimulují expresi genů pro tvorbu *Vibrio* polysacharidů (VPS), jež společně s matrixovými proteiny tvoří hlavní složky extracelulární matrix. Mimo to je CRP-cAMP schopen tyto transkripční faktory reprimovat sám, navíc blokuje i přepis matrixových proteinů (Fong & Yildiz, 2008). Podobný efekt má cAMP i u bakterie *Serratia marcescens*. Na rozdíl od *E. coli* je tento druh schopen vytvářet biofilmy v médiu s vysokým obsahem glukózy. Vysvětlením tohoto jevu je zjištění, že zvýšená hladina cAMP potlačuje tvorbu pilů typu I, které jsou u této bakterie zásadní pro adhezi k povrchu. V médiu s glukózou díky katabolické represi nedochází k produkci cAMP, a proto může buňka zahájit tvorbu biofilmu (Kalivoda *et al.*, 2008).

3.6 Další efekty cAMP

3.6.1 Regulace asimilace dusíku

Kromě regulace zdrojů uhlíku se cyklický AMP zapojuje i do řízení metabolismu dusíku (Mao *et al.*, 2007). Hlavní zásobní molekulou dusíku v buňce je glutamin, potažmo glutamát. Tyto aminokyseliny slouží jako hlavní donory dusíku v různých syntetických drahách. Glutamin je syntetizován činností glutaminsyntetázy, která za spotřeby ATP navazuje amoniak na glutamát (Woolfolk *et al.*, 1966). Glutamin poté může být konvertován na dva glutamáty pomocí glutamátsyntázy. Ta přenáší aminoskupinu z glutaminu na α -ketoglutarát (Meers *et al.*, 1970).

Glutaminsyntetáza je kódována genem *glnA*, který leží v operonu *glnALG*. Z tohoto operonu jsou exprimovány dva další proteiny, které zastávají regulační funkce. Jedná se o NtrB a NtrC (Reitzer & Magasanik, 1983; Chen *et al.*, 1982). Při nedostatku zdrojů dusíku NtrB fosforyluje NtrC, který následně získá schopnost vázat se na DNA (Ninfa & Magasanik, 1986). Operon *glnALG* je kontrolován

dvěma hlavními promotory *glnAp1* a *glnAp2*. Slabší *glnAp1* je negativně regulován aktivovaným NtrC, transkripce z tohoto promotoru je naopak spouštěna po vazbě CRP-cAMP. Promotor je využíván hlavně v podmínkách limitace uhlíkem a jeho úlohou je udržovat základní úroveň esenciální glutaminsyntetázy v buňce. Druhý promotor, který nese označení *glnAp2*, je plně aktivován při nedostatku dusíku, kdy dochází k výrazné produkci faktoru σ^{54} . K expresi *glnALG* je kromě σ^{54} nutný i fosforylovaný NtrC, který za těchto okolností zastává roli transkripčního aktivátoru (Reitzer & Magasanik, 1985). Do regulace *glnAp2* se zapojuje i CRP-cAMP. Dokáže totiž interagovat s σ^{54} a následně ohýbat DNA, čímž brání nasednutí NtrC a blokuje zahájení transkripce z tohoto promotoru (Mao *et al.*, 2007).

Do řízení metabolismu dusíku může vstupovat CRP-cAMP i jiným mechanismem. Tento transkripční faktor je schopen aktivovat expresi genu *glnH*, jehož produkt se podílí na příjmu glutaminu z prostředí. Zvýšená koncentrace intracelulárního glutaminu následně ovlivňuje PII signalizační systém (Mao *et al.*, 2007). Při dostatku glutaminu se složky tohoto systému vážou na NtrB, a tím brání fosforylaci NtrC. Pokud ale dojde k výraznému snížení koncentrace této aminokyseliny, uridylylace PII brání jeho funkci, díky čemuž je spuštěna transkripce *glnA* (Ninfa & Magasanik, 1986). CRP-cAMP zprostředkovaný transport glutaminu tedy v důsledku potlačuje expresi glutaminsyntetázy (Mao *et al.*, 2007).

3.6.2 Regulace fototaxe a fototrofie

U sinice *Synechocystis* bylo pozorováno až desetinásobné zvýšení koncentrace cAMP po přesunu z kompletní tmy na světlo. Největší nárůst koncentrace byl zaznamenán po vystavení modrému světlu. Zvýšení hladiny cAMP vedlo k výraznému zvýšení motility buněk (Terauchi & Ohmori, 2004). Tato data jsou v souladu s předchozími studii, které ukazují, že *Synechocystis* vykazuje negativní fototaxi při ozáření modrým světlem (Ng *et al.*, 2003).

Cyklický AMP zároveň může přímo regulovat expresi fotosyntetického aparátu. Tento efekt se uplatňuje hlavně u fakultativně fototrofních druhů, jako je například *Rhodospirillum rubrum*. Tato bakterie žije anaerobně a za příznivých podmínek fermentuje pyruvát. Pokud jsou ale vyčerpány vhodné substráty v prostředí, dojde k zahájení biosyntézy fotosyntetického aparátu a bakterie přejde na autotrofní způsob výživy. V případě opětovného výskytu využitelných chemických sloučenin dochází k výraznému zvýšení cAMP, které zprostředkovaně potlačuje expresi bakteriochlorofylu a dalších pro fotosyntézu nezbytných složek (Solaiman & Uffen, 1984).

3.6.3 Regulace syntézy bičíku

CRP-cAMP se rovněž zapojuje do regulace tvorby bičíku (Soutourina *et al.*, 1999). Syntéza tohoto molekulárního motoru je umožněna celou řadou genů, které jsou hierarchicky uspořádány. U *E. coli* je nejvýše postavený operon obsahující geny *flhC* a *flhD*, jejichž produkty řídí expresi dalších flagelárních genů, z nichž nejvýznamnějším je gen *fliA*. Tento gen kóduje σ^{28} , který je zásadní pro transkripci strukturních genů bičíku (Liu & Matsumura, 1994). Transkripce z operonu *flhDC* je aktivována interakcí s CRP-cAMP. Mutanty v *crp* genu jsou nemotilní (Soutourina *et al.*, 1999).

Operon *flhDC* se nachází i u *Salmonella enterica*, kde byla identifikována dvě CRP-cAMP vazebná místa, z nichž jedno je tímto transkripčním faktorem regulováno pozitivně a druhé negativně (Yanagihara *et al.*, 1999). U *Pseudomonas aeruginosa* je hlavním regulátorem flagelární syntézy *FleQ*. V případě této bakterie je *fleQ* reprimován pomocí Vfr-cAMP (Dasgupta *et al.*, 2002).

3.6.4 Role v patogenezi

Některé druhy využívají cAMP jako nástroj ve své patogenezi. Jedním z nejlépe prostudovaných zástupců těchto bakterií je *Bordetella pertussis*, původce černého kašle. Během infekce svého hostitele tato bakterie produkuje toxin, kterým je extracelulární adenylátcykláza CyaA. Tento enzym je schopen vstoupit do hostitelské buňky a zde svou aktivitou zvyšovat hladinu cAMP (Hanski & Farfel, 1985). Kromě klasické cyklázové aktivity protein vykazuje vlastnosti hemolysinu, dokáže tedy vyvolávat lýzi červených krvinek (Glaser *et al.*, 1988). Toho je dosaženo díky schopnosti enzymu vytvářet drobné póry v membráně, které jsou propustné pro ionty (Benz *et al.*, 1994). Během internalizace ale CyaA tuto vlastnost nevyužívá a pravděpodobně se integruje do membrány, díky čemuž se adenylát cyklázová doména dostane do cytosolu (Osickova *et al.*, 2010). Pro plné spuštění syntézy cAMP je poté nutná interakce s hostitelským kalmodulinem. U *B. pertussis* se žádný protein podobný eukaryotickému kalmodulinu nevyskytuje, čímž je zajištěna ochrana bakterie před příliš včasnou aktivací adenylát cyklázy (Wolff *et al.*, 1980). CyaA má za úkol potlačovat imunitní systém, zvýšená hladina cAMP v leukocytech inhibuje chemotaxi a produkci kyslíkových radikálů (Friedman *et al.*, 1987). V krajních případech může vést příliš vysoká koncentrace intracelulárního cAMP k indukci apoptózy (Khelef *et al.*, 1993).

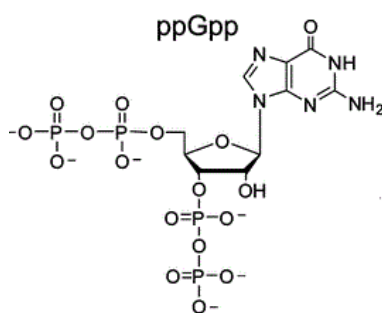
Adenylátcyklázovou aktivitu vykazuje i toxin EF (edema factor), který je produkován bakterií *Bacillus anthracis* (Leppla, 1982). Mechanismus, kterým se tento enzym dostává do buňky, je ale jiný než ten využívaný CyaA. Ke vstupu do hostitele EF vyžaduje PA (protective antigen), další toxin syntetizovaný *B. anthracis*. PA rozeznává specifické buněčné receptory a váže na sebe EF. Následně dochází k internalizaci celého komplexu pomocí klasické endocytózy (Leppla, 1982). Uvnitř endozomálního systému PA v důsledku snížení pH mění svou konformaci a vytváří kanál, který umožňuje vstup EF do cytoplazmy (Blaustein *et al.*, 1989). Adenylátcykláza je následně aktivována hostitelským kalmodulinem. Po aktivaci je enzym výrazně zvyšuje intracelulární koncentraci cAMP, což se projevuje vznikem edému (Leppla, 1982).

4 (p)ppGpp

4.1 Struktura (p)ppGpp a enzymy zodpovědné za jeho homeostázu

Již v 50. letech byl u hladovějících bakteriálních buněk pěstovaných v médiu s nízkým obsahem aminokyselin pozorován výrazný pokles proteosyntézy, který byl provázen snížením produkce nukleových kyselin (Sands & Roberts, 1952). Redukovaná syntéza proteinů tedy není dána pouhým nedostatkem prekurzorů, ale je regulována. Při absenci aminokyselin buňka sama výrazně potlačuje

produkci RNA (Pardee & Prestidge, 1956). Tento jev byl nazván stringentní odpověď (stringent response) a později byly objeveny i druzí poslové, které jsou za tento fenomén, jež zahrnuje i celou řadu jiných odpovědí, zodpovědní. Těmito molekulami se staly ppGpp a pppGpp (Cashel, 1969). pppGpp (guanosin-5'-trifosfát 3'-difosfát) a ppGpp (guanosin-3',5'-bis(difosfát)) jsou souhrnně označovány jako (p)ppGpp a liší se počtem fosfátů na 5' uhlíku. pppGpp je syntetizován z GTP přidáním pyrofosfátu původem z ATP na 3' pozici za tvorby fosfodiesterové vazby. Ve výsledku se tedy molekula skládá z ribózy, na jejímž 1' uhlíku je N-glykosidickou vazbou připojena guaninová báze, uhlík 3' váže dva fosfáty, uhlík 5' následně tři fosfátové zbytky. Struktura ppGpp je totožná, s tím rozdílem, že v poloze 5' se vyskytují dva fosfáty, což je způsobeno syntézou, která vychází z GDP (Sy & Lipmann, 1973) (obr. 4).



Obrázek 4: Struktura ppGpp (převzato z Shanahan & Strobel, 2012)

Intracelulární hladiny (p)ppGpp jsou samozřejmě přísně regulovány. Nejdůležitější roli v homeostáze těchto druhých poslů hrají RSH (RelA/SpoT Homologue) enzymy, které zajišťují jejich syntézu a částečně se podílí i na jejich degradaci. Jedná se o vysoce konzervované proteiny, vyskytují se téměř u všech známých bakteriálních taxonů. Mezi výjimky patří hlavně intracelulární symbionti a patogenní druhy, jako je *Treponema pallidum*. Tyto proteiny se nevyskytují ani u bakterií skupiny PVC, kam spadají *Planctomycetes*. Přestože sedm druhů rodu *Mycoplasma* tento enzym postrádá, *M. genitalium*, bakterie s jedním z nejmenších genomů, RSH kóduje (Atkinson *et al.*, 2011).

Označení RSH je odvozeno od dvou enzymů, které byly nalezeny u *E. coli*, konkrétně se jedná o proteiny RelA a SpoT. Obecně je možné RSH rozdělit na dva typy: krátké proteiny, jež se skládají pouze z jedné domény, a dlouhé multidoménové enzymy, mezi které patří i SpoT a RelA. Oba proteiny *E. coli* se podobně jako většina dlouhých RSH skládají z šesti domén. První dvě se souhrnně označují jako N-terminální doména a jedná se o (p)ppGpp hydrolytickou doménu (HD) a (p)ppGpp syntetizující doménu (SYNTH). Zbylé domény spadají pod CTD (C-terminální doménu) (Atkinson *et al.*, 2011). Jejich přesná funkce je neznámá, pravděpodobně se podílí na řízení aktivity N-terminální části enzymu (Mechold *et al.*, 2002).

Později byly u některých bakterií objeveny i krátké RSH, které sestávají pouze z jedné domény a každý tedy zastává jen jednu enzymatickou aktivitu (Nanamiya *et al.*, 2008). Dělí se na SAS (small alarmone synthetases), které mohou (p)ppGpp syntetizovat, a SAH (small alarmone hydrolases), které (p)ppGpp naopak degradují (Atkinson *et al.*, 2011). Tento typ enzymů je regulován hlavně na úrovni

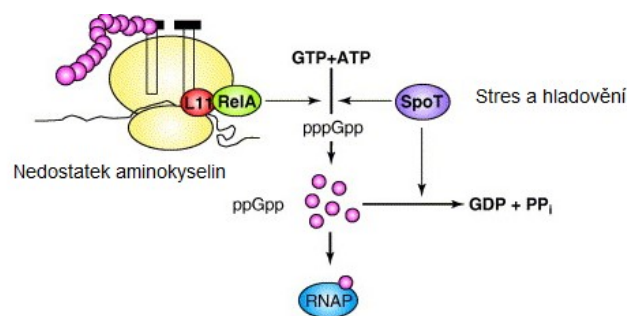
exprese a jejich transkripce je zahájena v momentě, kdy se buňka setká s nějakým stresorem. Například syntéza SAS u *B. subtilis* je indukována v reakci na alkalický šok (Nanamiya *et al.*, 2008). Za zmínku jistě stojí, že krátké RSH byly nalezeny i u živočichů, amoebozoí a výjimečně i u některých archeí (Atkinson *et al.*, 2011).

4.2 Mechanismy regulace syntézy (p)ppGpp

Nejlépe popsány RSH jsou zmíněné proteiny SpoT a RelA z *E. coli* (obr. 5). Oba zajišťují odpověď na stresové faktory. RelA odpovídá hlavně na aminokyselinovou deprivaci (Haseltine & Block, 1973). SpoT má širší spektrum stimulů, (p)ppGpp syntetizuje například při nedostatku mastných kyselin (Battesti & Bouveret, 2006), zdrojů uhlíku (Xiao *et al.*, 1991) nebo železa (Vinella *et al.*, 2005). Přestože je doménové složení obou proteinů stejné, postrádá HD doména RelA svou hydrolytickou funkci. RelA je tedy schopen (p)ppGpp pouze syntetizovat (Atkinson *et al.*, 2011).

RelA zprostředkovaně monitoruje hladinu aminokyselin díky schopnosti asociovat s ribozomem. Při nedostatku aminokyselin do ribozomu vstupuje velké množství deacylovaných tRNA, díky čemuž ribozom není schopen pokračovat v syntéze. Zablokovaný ribozom je rozpoznáván RelA, který se váže do blízkosti A místa. Zde po interakci s deacylovanými tRNA dojde k aktivaci RelA, který začne syntetizovat (p)ppGpp a ztratí afinitu k ribozomu (Wendrich *et al.*, 2002). K aktivaci je nutná 3'-OH skupina na akceptorovém rameni tRNA, na volnou 2'-OH enzym nereaguje (Sprinzl & Richter, 1976). Podle tzv. skákajícího modelu by se RelA po určitém čase opět navázal na jiný zablokovaný ribozom, čímž by bylo zajištěno, že množství (p)ppGpp bude růst v závislosti na počtu zastavených ribozomů. Tento model předpokládá, že RelA produkuje (p)ppGpp pouze v aktivním stavu, kdy je stále navázaný na ribozom, a že po disociaci syntéza ustává (Wendrich *et al.*, 2002). Novější data však naznačují, že je RelA aktivní i mezi přeskoky. Podle autorů enzym pokračuje v produkci druhého posla i po opuštění ribozomu a po určité době se sám deaktivuje činností regulační C-terminální domény (English *et al.*, 2011).

SpoT má více obecnou funkci, kdy reaguje na celou řadu stimulů souvisejících s hladověním. Jak již bylo zmíněno, SpoT se může podílet na syntéze i degradaci, v prostředí buňky však enzym (p)ppGpp převážně hydrolyzuje (Xiao *et al.*, 1991). Degradace je závislá na manganatých iontech a dochází při ní k odštěpení pyrofosfátu na uhlíku 3', výsledkem je tedy opět GTP nebo GDP (Sy, 1977). Směr aktivity je regulován interakcí s jinými proteiny. SpoT monitoruje množství mastných kyselin v buňce díky ACP (acyl carrier protein), který má zásadní úlohu při jejich syntéze. Pokud dojde k zastavení produkce mastných kyselin, ACP změní svou konformaci a interaguje se SpoT, který odpoví potlačením své degradační aktivity a spuštěním syntézy (p)ppGpp (Battesti & Bouveret, 2006). Interakce s G proteinem CtgA naopak spouští hydrolytickou činnost SpoT. Předpokládá se, že CtgA zastavuje stringentní odpověď v prostředí s dostatkem živin (Raskin *et al.*, 2007).



Obrázek 5: Stringentní odpověď u *E. coli*: Větší množství deacylovaných tRNA vstupujících do ribozomu aktivuje RelA, který začne syntetizovat (p)ppGpp. Tento druhý posel následně reguluje aktivitu RNA polymerázy. SpoT (p)ppGpp degraduje, různé stresové stimuly ale mohou tuto aktivitu utlumit, a naopak spouštět jeho (p)ppGpp syntetickou aktivitu (převzato z Magnusson et al., 2005; upraveno).

Metabolismus (p)ppGpp není vždy řízen dvěma RSH enzymy. Bakterie jako *Mycobacterium tuberculosis* kódují pouze jeden protein Rel. Ten podobně jako SpoT má hydrolytickou i syntetickou aktivitu. Svým fungováním ale připomíná spíše RelA. Také se váže na ribozom a při hromadění deacylovaných tRNA zvyšuje svou syntetickou aktivitu, a naopak utlumuje tu hydrolytickou (Avarbock et al., 2000). U řady bakterií je nutné splnit více podmínek, aby byla zahájena syntéza (p)ppGpp. *Caulobacter crescentus* žije v trvale nutričně chudém prostředí. K tomu, aby byla spuštěna stringentní odpověď, je nutný nedostatek aminokyselin a zároveň chybějící zdroj uhlíku nebo dusíku. Pouhá aminokyselinová deprivace není v tomto případě k aktivaci syntézy dostačující (Boutte & Crosson, 2011).

Kvůli své důležité funkci jsou enzymy produkující (p)ppGpp přísně regulovány na několika úrovních. Gen pro RelA má celkem čtyři promotory: *relAP1*, *relAP2*, *relAP3* a *relAP4*. Exprese z promotoru *relAP1* je konstitutivní, zbylé promotory se aktivují po vystavení nějakým stresovým podmínkám. *relAP2* je pozitivně regulován hlavně díky transkripčnímu faktoru CRP-cAMP, který se hromadí v důsledku nedostatku glukózy. Přepis z tohoto promotoru je spouštěn i po interakci s H-NS, RpoS naopak funguje jako slabý inhibitor exprese (Nakagawa et al., 2006). Zbylé dva promotory reagují na nedostatek zdrojů dusíku a jsou tedy závislé na σ^{54} . Při nízké hodnotě dusíkatých sloučenin dochází k fosforylaci NtrC, jehož nasednutí do regulační oblasti *relA* zvyšuje pravděpodobnost zahájení transkripce z promotorů P3 a P4. Za těchto okolností má RNA polymeráza s σ^{54} naopak nižší afinitu k promotoru genu *spoT*, což brání efektivnímu odbourávání (p)ppGpp (Brown et al., 2014). Na posttranslační úrovni je RelA pozitivně stimulován svým produktem, ppGpp. Samotná přítomnost ppGpp ale k přechodu RelA do aktivní konformace nestačí (Shyp et al., 2012). Na regulaci by se mohla rovněž podílet schopnost dlouhých RSH tvořit oligomery. Rel z *Mycobacterium tuberculosis* dokáže trimerizovat, přičemž má tato forma nižší syntetickou aktivitu než volné monomery. V trimerním stavu je totiž pravděpodobně funkční jen jedna podjednotka, enzymatická činnost zbylých dvou je potlačena (Avarbock et al., 2005).

4.3 Efekty (p)ppGpp

Jak již bylo zmíněno, (p)ppGpp se podílí na odpovědích buňky na hladovění a jiné stresové podmínky. Souhrnně jsou dráhy řízené tímto druhým poslem označovány jako stringentní odpověď (Cashel, 1969). Efekty (p)ppGpp mohou být přímé i nepřímé. Syntéza (p)ppGpp vyčerpává vnitrobuněčné zásoby GTP, což může ovlivnit aktivitu RNA polymerázy, která výrazně sníží přepis transkriptů začínajících inkorporací GTP. Taková regulace se týká například genů pro rRNA u *Bacillus subtilis*, protože v limitujících podmínkách je zbytečné a energeticky nevýhodné syntetizovat velké množství ribozomů (Krásný & Gourse, 2004). Deplece GTP ovlivňuje i proteiny, které ke své činnosti tento nukleotid vyžadují. U Firmicutes je mnoho genů spojených se stresovou odpovědí a sporulací umlčeno pomocí transkripčního represoru CodY, který pro svou činnost potřebuje GTP. Pokles tohoto nukleotidu tedy vede k odblokování exprese těchto genů (Geiger & Wolz, 2014).

4.3.1 Interakce s RNA polymerázou

Hlavní přímý efekt (p)ppGpp se týká jeho interakce s RNA polymerázou, u níž bylo na rozhraní β' a ω podjednotek nalezeno (p)ppGpp vazebné místo (Mechold *et al.*, 2013). Interakce (p)ppGpp s RNA polymerázou vede k rozpadu méně stabilních otevřených komplexů. Takto je například zabráněno syntéze rRNA u *E. coli* (Barker *et al.*, 2001). Přesný mechanismus není popsán, vazba (p)ppGpp ale může vést k menší konformační změně, která se projeví změnou katalytického místa s koordinovaným hořčíkem. Tato změna poté může zabránit transkripční aktivitě polymerázy a způsobit její uvolnění z přepisovaného vlákna DNA (Mechold *et al.*, 2013). Podle jiného modelu ovlivňuje vazba (p)ppGpp stabilitu otevřeného komplexu, což znemožňuje přechod do elongační fáze a podněcuje disociaci komplexu (Zuo *et al.*, 2013). Důležitou roli v předčasné terminaci transkripce zastává i protein DksA. Jedná se o transkripční faktor, který se váže do blízkosti sekundárního kanálu RNA polymerázy, jenž přivádí nukleotidy do aktivního místa enzymu. DksA do tohoto kanálu zasouvá svou coiled-coil doménu a zvyšuje náchylnost polymerázy na změnu konformace (Lennon *et al.*, 2012). Vazba DksA zároveň vytváří nové vazebné místo pro (p)ppGpp, které se nachází právě na rozhraní tohoto transkripčního faktoru a polymerázy. Kombinace těchto dvou efektů výrazně amplifikuje účinek (p)ppGpp (Ross *et al.*, 2016).

Komplex RNA polymerázy s navázanými DksA a (p)ppGpp ovlivňuje mnoho transkriptů, přičemž po 10 minutách od nárůstu hladiny (p)ppGpp dochází u *E. coli* ke změně exprese asi 1200 transkriptů. Kromě klasické represe rRNA syntézy dochází k zablokování exprese genů pro tRNA, rRNA helikázy, RNázy, RNA modifikační enzymy a další proteiny zapojené do maturace ribozomů. Současně ale probíhá i aktivace poměrně velké frakce genů (Sanchez-Vazquez *et al.*, 2019). Tato pozitivní regulace se týká hlavně genů pro biosyntézu aminokyselin. Dříve se předpokládalo, že aktivace exprese probíhá výhradně nepřímo, kdy rozpad RNAP na negativně regulovaných genech zvyšuje množství dostupné polymerázy pro geny pro syntézu aminokyselin (Barker *et al.*, 2001). Tento mechanismus v menší míře

stále platí, ale podle novějších dat je DksA společně s (p)ppGpp schopen transkripci aktivovat přímo. Zvýšení přepisu je promotor specifické a plně závislé na přítomnosti DksA (Paul *et al.*, 2005).

4.3.2 Příklady dalších drah regulovaných (p)ppGpp

Tento druhý posel se kromě RNA polymerázy přímo váže i na jiné enzymy. Například dokáže inhibovat primázu DnaG. Ta je zodpovědná za syntézu RNA primeru, který umožňuje nasednutí DNA polymerázy. Tímto mechanismem je zajištěno zablokování replikace při hladovění. Za normálních okolností by při zastavení postupu replikační vidličky byl rekrutován protein RecA, jenž je zodpovědný za spouštění rekombinačních procesů a dalších opravných mechanismů, které pomáhají opět pokračovat v replikaci. Při stringentní odpovědi ale k vazbě RecA nedochází. Není jisté, jak vazba (p)ppGpp brání zahájení rekombinace. RecA rozpoznává úseky tvořené ssDNA, je tedy možné, že inhibovaná primáza moduluje aktivitu helikázy, která udržuje nejkratší možný úsek jednořetězcové DNA. Předpokládá se, že interakce primázy s (p)ppGpp stabilizuje replikační komplex a brání genomovým přestavbám, které by mohly vést k četným mutacím. Tento způsob zastavení replikace je reverzibilní, po odeznění signalizace může replikační mašinerie opět pokračovat ve své aktivitě (Wang *et al.*, 2007).

Další přímé negativní regulace se týkají některých GTPáz, které jsou kromě deplece GTP inaktivovány i vazbou (p)ppGpp. V případě bakterie *Staphylococcus aureus* se například jedná o RsgA, RbgA, Era nebo HflX, tedy o enzymy zapojené do sestavování ribozomů. Mezi přímo inhibované proteiny patří i enzymy vystupující v drahách pro syntézu GTP, čímž je umocněn efekt vyčerpání dostupného GTP v buňce. U grampozitivních bakterií jsou blokovány enzymy Gmk a HprT. Gmk zajišťuje fosforylaci GMP na GDP, HprT produkuje GMP za využití guaninu (Corrigan *et al.*, 2016).

V rámci nutnosti udržet pouze esenciální procesy v buňce (p)ppGpp blokuje i jiné biosyntetické dráhy, například se podílí na regulaci syntézy lipidů a fosfolipidů. První enzym vystupující v syntéze mastných kyselin je acetyl-CoA karboxyláza, která zajišťuje karboxylaci acetyl-CoA za vzniku malonyl-CoA, jenž je výchozí látkou pro další kroky dráhy. Komplex se skládá z několika podjednotek, přičemž (p)ppGpp inhibuje právě poslední z nich. Ta je označována jako acetyl-CoA karboxyltransferáza a je zodpovědná za samotný přenos karboxylu na acetyl-CoA (Polakis *et al.*, 1973). Zvýšená koncentrace (p)ppGpp současně vede k deaktivaci enzymů podílejících se na syntéze fosfolipidů. Inhibiční vliv byl prokázán u glycerol-3-fosfát acyltransferázy a fosfatidylglycerofosfátsyntázy. První zmíněný enzym konvertuje glycerol-3-fosfát a acyl-CoA na kyselinu lysofosfatidovou, fosfatidylglycerolfosfátsyntáza zase využívá diacylglycerol aktivovaný díky asociaci s CDP a navazuje na něj glycerol-3-fosfát (Merlie & Pizer, 1973). Blokována je i dráha pro syntézu glykogenu, a to díky inhibici ADP-glukóza syntetázy (Dietzler & Leckie, 1977).

Mezi efekторы (p)ppGpp patří i aminokyselinové dekarboxylázy. Při studiu struktury lysinové dekarboxylázy LdcI z *E. coli* byla odhalena schopnost tohoto enzymu interagovat s (p)ppGpp. Přidružené experimenty prokázaly, že tento druhý posel výrazně inhibuje činnost LdcI (Kanjee *et al.*, 2011a). V této souvislosti byly zkoumány i další proteiny tohoto typu, konkrétně se jednalo o lysinovou

dekarboxylázu LdcC, argininovou dekarboxylázu AdiA a ornitinové dekarboxylázy SpeF a SpeC. Přímá interakce těchto proteinů s (p)ppGpp vede v případě LdcC, Ldcl a SpeC k poměrně silné inhibici jejich aktivity. U SpeF bylo pozorováno pouze slabé snížení aktivity a AdiA na zvýšenou koncentraci (p)ppGpp nereaguje. Zablokování těchto enzymů při stringentní odpovědi pravděpodobně pomáhá zachovat více aminokyselin, jejichž nedostatek patří k hlavním spouštěčům syntézy (p)ppGpp (Kanjee *et al.*, 2011b).

4.3.3 Role (p)ppGpp v rezistenci

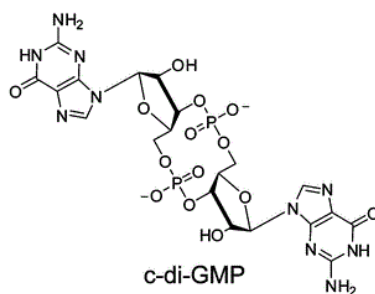
Bakterie se spuštěnou stringentní odpovědí vykazují větší odolnost vůči antibiotikům penicilinového typu, které cílí na biosyntézu buněčné stěny. (p)ppGpp totiž zprostředkovaně inhibuje syntézu peptidoglykanu, díky čemuž buňka přestane na penicilin reagovat (Rodionov & Ishiguro, 1995). V jiných případech může tento druhý posel indukovat expresi efluxních pump, které vylučují cizorodé látky z buňky (Jung *et al.*, 2020). U *Pseudomonas aeruginosa* stringentní odpověď aktivuje superoxid dismutázu, která přeměňuje superoxid na kyslík a peroxid vodíku, čímž se zvyšuje odolnost vůči reaktivním formám kyslíku (ROS), jejichž nárůst je efektem celé řady antibiotik (Martins *et al.*, 2018).

Zvýšená odolnost patogenů vůči antibiotikům může být zajištěna i nepřímo. Vysokou rezistenci vykazují hlavně bakteriální společenstva tvořící biofilm. Buňky zde mají pomalejší růst, ale zároveň jsou u nich aktivované mechanismy horizontálního genového přenosu (HGT), které bakteriím umožňují získat přístup k nové genetické informaci pocházející od jiných mikroorganismů. To zajišťuje velmi rychlé šíření genů s rezistencí. Na regulaci HGT u buněk žijících v biofilmu se mimo jiné také podílí (p)ppGpp. Jeho zvýšená koncentrace v *E. coli* zprostředkovaně spouští expresi integrázy, což v buňce zvyšuje pravděpodobnost rekombinačních událostí (Strugeon *et al.*, 2016).

5 c-di-GMP

5.1 Syntéza a degradace c-di-GMP

Cyklický di-GMP byl poprvé popsán při studiu regulace celulóza syntázy v *Acetobacter xylinum*. Molekula se skládá ze dvou GMP, které jsou propojeny dvěma 5'-3' fosfodiesterovými vazbami (Ross *et al.*, 1985) (obr.6). Na metabolismu c-di-GMP se podílí hlavně proteiny obsahující domény GGDEF a EAL. Proteiny s GGDEF doménami jsou diguanylátcyklázy zodpovědné za produkci tohoto druhého posla (Paul *et al.*, 2004). Enzymy s EAL doménami naopak c-di-GMP odbourávají, jedná se tedy o fosfodiesterázy. GGDEF a EAL domény se označují podle konzervované sekvence aminokyselin, která se v nich objevuje. V případě GGDEF jde o motiv glycin-glycin-aspartát-glutamát-fenylalanin, EAL obsahuje glutamát, alanin a leucin (Christen *et al.*, 2005). Tyto domény se většinou vyskytují v multidoménových proteinech, v mnoha případech může jeden protein obsahovat GGDEF i EAL. Enzymy tohoto typu jsou navíc často opatřeny senzorkou N-terminální doménou, která je schopna reagovat na různé signály. Podstatná část těchto N-terminálních domén je transmembránová, díky čemuž mohou odpovídat na periplazmatické nebo přímo extracelulární impulzy (Tal *et al.*, 1998).



Obrázek 6: Struktura c-di-GMP (převzato z Shanahan & Strobel, 2012)

Enzymy s diguanylátcyklázovou aktivitou obsahují jedno GTP vazebné místo. Aby mohla reakce proběhnout, musí tedy dimerizovat dvě GGDEF domény, čímž vzniká kompletní katalytické místo (Chan *et al.*, 2004). C-di-GMP fosfodiesteráza ke své funkci vznik oligomerů nepotřebuje. EAL doména však nezajišťuje plnou degradaci c-di-GMP na GMP. Aktivitou této domény, která se také označuje jako PDE-A (fosfodiesteráza A) vzniká pGpG, tedy lineární diguanylát. Tento dinukleotid je následně nutné znovu hydrolyzovat, aby vznikly dvě finální molekuly GMP. Enzym s touto katalytickou aktivitou se nazývá PDE-B (fosfodiesteráza B). Jistou PDE-B aktivitu vykazuje samotná EAL doména, ta je ale velice slabá a fyziologicky pravděpodobně nevýznamná (Schmidt *et al.*, 2005). pGpG je tedy rozkládán jinými enzymy, jako je oligoribonukleáza Orn (Orr *et al.*, 2018). Přestože většina bakterií má GGDEF doménu, řada druhů postrádá EAL doménu. Mezi tyto bakterie patří *Treponema pallidum* či *Thermotoga maritima*. V těchto organismech hydrolytickou aktivitu zastupuje méně charakterizovaná doména HD-GYP (Galperin *et al.*, 1999).

Regulace aktivity proteinů zapojených do metabolismu c-di-GMP probíhá hlavně díky již zmíněné sensorické N-terminální doméně. Ta je často zabudována do membrány a obsahuje periplazmatické smyčky, které dokážou interagovat s různými substráty. Například u *Salmonella enterica* je diguanylátcykláza pozitivně regulována argininem. Syntéza c-di-GMP je spouštěna interakcí N-terminální domény s periplazmatickým arginin vazebným proteinem (Mills *et al.*, 2015). Podobně může být řízena i činnost PDE-A. C-di-GMP fosfodiesteráza *Bdellovibrio bacteriovorus* obsahuje sensorickou podjednotku s cAMP vazebnou oblastí, která se strukturně podobá CRP. Zvýšená koncentrace cAMP tedy v tomto případě vede k degradaci c-di-GMP, což je nejspíš důležité pro přechod mezi životem uvnitř a vně hostitele (Cadby *et al.*, 2019).

U fotosyntetizujících bakterií dokonce existuje velká frakce fosfodiesteráz a diguanylátcykláz, které reagují na světlo o různé vlnové délce. Role světla pro regulaci produkce c-di-GMP byla demonstrována u sinice *Synechocystis*. Její protein Cph2 obsahuje dvě N-koncové GAF domény, EAL, CBCR a dvě GGDEF domény, z nichž jedna je degenerovaná. Na světlo citlivé jsou GAF domény, které vnímají červené světlo a doména CBCR, jenž reaguje na modré světlo a spouští diguanylátcyklázovou aktivitu zachované C-koncové GGDEF podjednotky. Zdá se, že aktivní může být i EAL, její regulace možná probíhá přes nefunkční GGDEF doménu. Fotoreceptor zajišťuje kontrolu motility a fototaxe (Savakis *et al.*, 2012).

5.2 Efektory c-di-GMP

C-di-GMP má velmi rozsáhlý soubor efektorů, z nichž se velká část uplatňuje při formování biofilmu. Jedná se o proteiny, ale i o RNA riboswitche. Proteinové vazebné kapsy mají variabilní strukturu. Sdílejí pouze malé množství společných charakteristik, mezi něž patří častý motiv obsahující arginin a aspartát, které přímo interagují s c-di-GMP (Christen *et al.*, 2006). Mezi c-di-GMP vazebné proteiny patří i nefunkční GGDEF a EAL domény. Ty se uplatňují například u *Pseudomonas*, kde je tímto způsobem regulována adheze při formování biofilmu. Vazba c-di-GMP na degenerovanou EAL doménu transmembránového proteinu LapD vede ke změně jeho periplazmatické domény (Newell *et al.*, 2009). Ta následně inhibuje periplazmatickou proteázu LapG. Díky deaktivaci této proteázy se ve vnější membráně začne hromadit adhezín LapA, který u tohoto druhu zahajuje připojení k povrchu (Newell *et al.*, 2011). Významnou c-di-GMP vazebnou doménou je PilZ, která se u enterobakterií vyskytuje například v proteinech BcsA a YcgR. První jmenovaný plní roli celulóza syntázy, druhý reguluje pohyb pomocí bičíku. Oba se tedy podílí na přechodu mezi přisedlou a volně se pohybující buňkou (Ryjenkov *et al.*, 2006).

C-di-GMP také interaguje s transkripčními faktory. Nejvýznamnějším je FleQ z *Pseudomonas aeruginosa*. FleQ je hlavně zodpovědný za aktivaci genů pro biosyntézu bičíku, současně ale reprimuje geny pro syntézu exopolysacharidů. Po navázání c-di-GMP dochází ke změně konformace tohoto transkripčního faktoru, což vede k uvolnění FleQ a k obnově syntézy exopolysacharidů. Tak výrazný efekt ale nebyl pozorován u genů, které jsou díky FleQ aktivovány. To může souviset s tím, že tyto geny využívají σ^{54} místo klasického σ^{70} (Hickman & Harwood, 2008).

C-di-GMP je oproti ostatním dříve zmíněným druhým posílům unikátní tím, že je schopen interagovat s riboswitche (Sudarsan *et al.*, 2008). Riboswitche jsou regulační elementy, které ovlivňují genovou expresi. Sestávají z nekódující RNA a nachází se na 5' nepřekládaném konci mRNA (5' UTR). Vytvářejí komplexní terciární struktury, které v sobě mohou zahrnovat regulační elementy, jako je ribozom vazebná sekvence, a tím bránit úspěšné expresi. Zároveň jsou schopny interagovat s malými ligandy, jejichž vazba vede ke změně struktury a odmaskování potřebných regulačních elementů (Winkler *et al.*, 2002). Riboswitche vázající c-di-GMP se označují jako GEMM a lze je rozdělit do dvou tříd. První popsanou byla třída I, která jako většina riboswitchů po vazbě ligandu mění svou konformaci (Sudarsan *et al.*, 2008). Třída II je zajímavá tím, že vykazuje vlastnosti ribozymu. V deaktivovaném stavu je start kodón součástí jedné stopky riboswitche, čímž je zabráněno nasednutí ribozomu. Kromě c-di-GMP váže tento riboswitch i GTP. Po vazbě obou ligandů dochází k autokatalytickému štěpení části riboswitche a uvolnění start kodonu včetně ribozom vazebné sekvence, což umožňuje efektivní nasednutí ribozomu. Pokud je v buňce nízká koncentrace c-di-GMP, obsazuje riboswitch pouze GTP, které bez druhého partnera začne preferenčně štěpit těsně před start kodónem, čímž je vyštěpena ribozom vazebná sekvence a nedochází k úspěšnému zahájení translace (Lee *et al.*, 2010).

5.3 Účinky c-di-GMP

5.3.1 Příklady uplatnění c-di-GMP v regulaci tvorby biofilmu

Nejvýznamnějším a nejlépe popsáným účinkem c-di-GMP je regulace přechodu z motilního stavu do stádia sesilního, ve kterém bakterie tvoří biofilmy, komplexní mnohadruhová společenstva obklopená extracelulární matrix (Hickman & Harwood, 2008). Vytvoření této struktury je zásadní pro řadu patogenních druhů, umožňuje spuštění virulence a perzistenci (Nickel *et al.*, 1985). Pro adhezi k povrchu slouží různé typy pilů. Klasickým příkladem jsou pili typu IV (Bordeleau *et al.*, 2015). K počátečnímu připojení k podkladu některé druhy využívají i bičík. Roli adhezinu může plnit cap protein (Arora *et al.*, 1998) i samotný flagelin (Lillehoj *et al.*, 2002). U *Pseudomonas aeruginosa* jsou oba zodpovědní za připojení k mucinu.

C-di-GMP se podílí na přechodu mezi volně žijící a přisedlou buňkou pomocí inhibice flagelární biosyntézy a podpory genů pro produkci adhezínů a komponent extracelulární matrix. V souvislosti s LapD a transkripčním faktorem FleQ byl tento přechod již popsán u *Pseudomonas aeruginosa* (Hickman & Harwood, 2008). U této bakterie je přechod do nemotilní fáze života podporován i regulací chemotaxe. C-di-GMP se váže na PilZ doménu proteinu MapZ, který následně inhibuje chemotaktickou methyltransferázu CheR1 (Yan *et al.*, 2018).

Dobře je formování biofilmu zdokumentováno i u *Vibrio cholerae*, gramnegativního původce cholery, závažného průjmového onemocnění. Připojení k povrchu u ní zajišťují MshA pili, jejichž polymerace je umožněna díky ATPáze MshE, která je aktivována přímou vazbou c-di-GMP (Jones *et al.*, 2015). Cyklický di-GMP také spouští expresi genů pro matrix pomocí interakce s transkripčními faktory VpsR a VpsT (Zamorano-Sánchez *et al.*, 2015). Mimo to c-di-GMP u této bakterie reguluje sekreční systém typu VI, který při kontaktu s okolními buňkami sekretuje toxin. Tento systém je řízen *tfoY*, jehož transkript obsahuje c-di-GMP riboswitch třídy I. V tomto konkrétním případě zvýšená koncentrace c-di-GMP ukončuje translaci tohoto genu (Metzger *et al.*, 2016). Samotná produkce druhého posla pomocí diguanylátcykláz *Vibrio* odpovídá na velké množství mimobuněčných signálů, ke zvýšení exprese diguanylátcykláz dochází například při nižší teplotě (Townsend & Yildiz, 2015).

V případě *E. coli* je přechod mezi buňkou s bičíky a bakterií produkující extracelulární matrix regulován fosfodiesterázou YciR, která nově nese označení PdeR. Tento protein je multifunkční, obsahuje N-terminální doménu, GGDEF a EAL doménu. Diguanylátcyklázová aktivita je ale slabá a protein tedy primárně funguje jako fosfodiesteráza. Za normálních okolností váže svou nekatalytickou část diguanylátcyklázu YdaM, kterou inhibuje. Po interakci s c-di-GMP dochází k jeho uvolnění, což uvolňuje YdaM, která začne produkovat větší množství c-di-GMP a zároveň přímo aktivuje transkripční faktor MlrA, jenž následně spouští expresi genu *csgD*. Ten kóduje protein podílející se na sestavování curlí vláken, důležitých komponent extracelulární matrix *E. coli*. Samotná vazba c-di-GMP na PdeR je uskutečněna přes katalyticky funkční EAL doménu, což je relativně vzácné. Většina GGDEF a EAL vázající c-di-GMP je totiž degenerovaná (Lindenberg *et al.*, 2013).

Podobný účinek má c-di-GMP i u grampozitivní bakterie *Clostridium difficile*. Jedná se o nebezpečný patogen, který běžně způsobuje nosokomiální onemocnění, která mohou končit i smrtí. Tato bakterie je striktně anaerobní, napadá tedy hlavně střeva, díky tvorbě spor je ale schopna přežít i v prostředí s kyslíkem. Zvýšení intracelulární koncentrace c-di-GMP vede k inhibici biosyntézy bičíku a podporuje sesilitu. C-di-GMP se váže na riboswitch třídy I, který je součástí transkriptu operonu *flgB* a blokuje jeho expresi. Produkty operonu *flgB* pozitivně regulují další operony zapojené v řízení tvorby bičíku. (Purcell *et al.*, 2012). Jiný c-di-GMP riboswitch naopak podporuje expresi genu *pilA1*, který je zodpovědný za tvorbu pilů typu IV, což umožňují agregaci buněk a připojení k povrchu (Bordeleau *et al.*, 2015). Pomocí riboswitchu c-di-GMP také reprimuje syntézu zinkové metaloproteázy ZmpI, která v aktivním stavu odbourává adhezín CD2831. Zvýšená koncentrace c-di-GMP rovněž posiluje expresi tohoto adhezínu (Peltier *et al.*, 2015).

Význam c-di-GMP se však mezi taxony může významně lišit. *Staphylococcus* nemá žádnou c-di-GMP fosfodiesterázu a kóduje pouze jeden protein s doménou GGDEF, který nese označení GdpS. Ten ale nevykazuje diguanylátcyklázovou aktivitu. U této bakterie nejspíš tedy došlo ke kompletní ztrátě potřebného metabolického aparátu pro c-di-GMP a GdpS je posledním zbytkem dříve existujících drah. I přesto se GdpS podílí na regulaci formování biofilmu. Je totiž zodpovědný za aktivaci *ica* operonu, který zajišťuje biosyntézu exopolysacharidu (Holland *et al.*, 2008).

5.3.2 Další účinky c-di-GMP

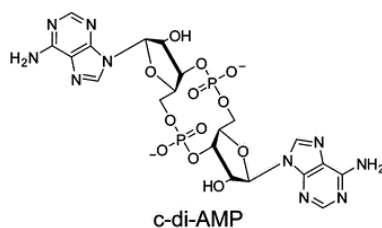
Cyklický di-GMP se rovněž uplatňuje u streptomycet. Tato skupina grampozitivních bakterií je intenzivně zkoumána díky své schopnosti produkovat celou řadu antimikrobiálních látek. *Streptomyces* rostou v podobě hyf dvojího typu, vláknitých vegetativních hyf a vzdušných hyf. Druhý typ zajišťuje tvorbu a uvolňování spor, které se šíří vzduchem a umožňují kolonizaci nového prostředí. Syntetizované c-di-GMP se u *Streptomyces coelicolor* váže na transkripční faktor BldD, který následně inhibuje tvorbu vzdušných hyf a sporulaci (Tschowri *et al.*, 2014). BldD zároveň brání produkci antibiotik. Kromě svých jiných cílů se váže i na promotory genu *cdgA*, který kóduje diguanylátcyklázu, a tím pozitivní zpětnou vazbou zvyšuje syntézu c-di-GMP (Den Hengst *et al.*, 2010).

C-di-GMP může ale v organismu zastávat i jiné funkce. V případě *Caulobacter crescentus* je c-di-GMP zodpovědný za regulaci buněčného cyklu. *C. crescentus* je znám pro asymetrické buněčné dělení, při kterém vzniká jedna přisedlá a jedna motilní dceřiná buňka. Nízká hladina c-di-GMP během růstové fáze buněčného cyklu je udržována díky protichůdné činnosti fosfodiesterázy PdeA a diguanylátcyklázy DgcB. Ke konci této fáze dochází k proteolytické degradaci PdeA a zároveň je díky fosforylaci aktivována další diguanylátcykláza, která nese označení PleD. To vede k velkému nárůstu c-di-GMP, který interaguje s proteinem PopA. Zahájení replikace je blokováno hlavním regulátorem CtrA, jenž brání formování iniciačního komplexu na počátku replikace. PopA spouští kaskádu vedoucí k aktivaci CtrA specifické proteázy. Odbourání CtrA následně odbrzdí buněčný cyklus a zahájí replikaci chromozomu (Abel *et al.*, 2011).

6 c-di-AMP

6.1 Objev a metabolismus c-di-AMP

Cyklický di-3',5'-adenosin monofosfát (c-di-AMP) je z dříve zmíněných molekul nejpozději objeveným druhým poslem. Poprvé byl potvrzen až v roce 2008 při výzkumu struktury proteinu DisA (DNA integrity scanning protein A) z *Bacillus subtilis*. Bylo poukázáno na schopnost DisA syntetizovat c-di-AMP ze dvou molekul ATP. Při bližším ohledání byla také objevena diadenylátcyklázová doména, která byla podle své funkce pojmenována jako DAC doména. Hledání homologických sekvencí potvrdilo, že je tato doména vysoce rozšířena nejen mezi bakteriemi, ale dokonce mezi archea. Struktura tohoto dinukleotidu je totožná s c-di-GMP, jediným rozdílem je náhrada guaninu za adenin. Skládá se ze dvou AMP, které jsou cyklicky propojeny pomocí dvou 5'-3' fosfodiesterových vazeb (Witte *et al.*, 2008) (obr. 7). Stejně jako v případě ostatních nukleotidových sekundárních poslů, homeostázu zajišťují specifické cyklázy a fosfodiesterázy.



Obrázek 7: Struktura c-di-AMP (převzato z Shanahan & Strobel, 2012)

6.1.1 Syntéza c-di-AMP

Katalytické místo diadenylátcyklázy se skládá z β -listů, které jsou obklopeny α -helixy, dohromady vytváří dvě zrcadlově orientované ATP vazebné kapsy. Do reakce vstupují dvě molekuly ATP, ty jsou následně propojeny do podoby c-di-AMP za odštěpení dvou pyrofosfátů (Witte *et al.*, 2008). Je rozpoznáváno pět nejvýznamnějších bakteriálních tříd těchto enzymů: CdaA, CdaM, CdaS, CdaZ a DisA. Většina bakterií kóduje pouze jednu diadenylátcyklázu. U *B. subtilis* ale byly objeveny DisA, CdaA i CdaS, přičemž každý enzym má svou specifickou funkci.

DisA je v kompletní podobě oktamer, který má kromě DAC domény i DNA vazebné domény. K syntéze c-di-AMP tento enzym vyžaduje hořčičnaté ionty. DisA má pozoruhodnou aktivitu, funguje totiž jako senzor problémů v replikaci či segregaci chromozomů. Enzym se pohybuje po bakteriálním genomu a monitoruje strukturní chyby v řetězci DNA. Registruje hlavně větvení DNA, ke kterému dochází při tvorbě Holliday junction nebo při zastavení replikační vidlice. V menší míře enzym reaguje i na zlomy DNA. Po odhalení těchto chyb ustává jeho diadenylátcyklázová aktivita a pokles v produkovaném c-di-AMP spouští odpověď na poškození DNA, tzv. DNA damage response (Witte *et al.*, 2008). Tomu odpovídá i zjištění, že DisA je inhibován pomocí RadA, který stimuluje migraci řetězců při rekombinačních opravách (Gándara *et al.*, 2017).

CdaA je hlavním proteinem, který v tomto organismu zajišťuje produkci c-di-AMP (Mehne *et al.*, 2013). Jedná se o membránový enzym, který pro svou aktivitu vyžaduje kovový ion, nejčastěji mangan či kobalt, čímž se liší od dříve zmíněného DisA, jenž využívá hořčičnaté ionty (Rosenberg *et al.*, 2015). Jeho funkce souvisí s řízením syntézy peptidoglykanu, dysregulace tohoto enzymu narušuje správné formování buněčné stěny. Gen pro CdaA se navíc nachází v stejném operonu jako *glmM*, gen kódující fosfoglukosaminmutázu. Ta zajišťuje syntézu glukosamin-1-fosfátu, který je důležitým prekurzorem pro tvorbu peptidoglykanu (Mehne *et al.*, 2013). Shodný operon kóduje i gen pro CdaR, který je jedním z hlavních regulátorů aktivity CdaA. Předpokládá se, že CdaR slouží jako senzor, který kontroluje integritu buněčné stěny a na tomto základě reguluje aktivitu CdaA (Rismondo *et al.*, 2016).

CdaS má významnou roli v regulaci procesu sporulace. V buňce se vyskytuje ve formě hexameru, jednotlivé monomery sestávají z DAC domény a N-terminální domény, která je tvořena dvěma α -helixy. N-koncová doména je zodpovědná za modulaci syntézy c-di-AMP. Ve vegetativní buňce není CdaS produkován, jeho exprese je limitována pouze na sporulaci. Přestože je tento enzym u rodu *Bacillus* zásadní, jiné sporulující bakterie, jako je například *Clostridium*, ho ve svém genomu nekódují (Mehne *et al.*, 2014). Zástupcem další třídy proteinů s DAC je CdaM, který byl identifikován v bakterii *Mycoplasma pneumoniae*. Jedná se o transmembránový enzym, který je v tomto organismu jedinou diadenylátcyklázou (Blötz *et al.*, 2017). CdaZ, který se někdy označuje jako DacY, je třída vyskytující se hlavně u archeí. Výjimečně je tento enzym k nalezení u bakterií (Braun *et al.*, 2019).

6.1.2 Degradace c-di-AMP

Odbourávání c-di-AMP zajišťují fosfodiesterázy, které degradují tohoto druhého posla na lineární dinukleotid pApA, který je poté dále štěpen na finální AMP. Jednou z těchto fosfodiesteráz je GdpP, která byla objevena u *B. subtilis* a dříve nesla označení YybT (Mehne *et al.*, 2013). Sestává z N-terminálních transmembránové domény, PAS domény, degenerované GGDEF domény a DHH/DHHA1 domény. Poslední zmiňovaná zajišťuje samotné štěpení c-di-AMP. Kromě této aktivity je ale schopna vázat ppGpp, který slouží jako její silný inhibitor. Tato interakce ukazuje na těsné propojení signalizace pomocí těchto druhých poslů. Během stringentní odpovědi dochází k výraznému vzrůstu intracelulární koncentrace c-di-AMP. I přes existenci degenerované GGDEF domény nebyla podobná provázanost prokázána u c-di-GMP. Tato doména je totiž netypická a c-di-GMP není schopna vázat. Místo toho funguje jako ATPáza (Rao *et al.*, 2010). Za regulaci enzymu je zodpovědná i senzorická PAS doména, která se vyskytuje i u mnoha diguanylátcykláz a fosfodiesteráz, kde dokáže vázat různé malé molekuly. U GdpP byla prokázána schopnost vázat hem (Tan *et al.*, 2013).

Kromě klasické GdpP kódují některé bakterie i samostatnou DHH/DHHA1 doménu, která je občas jedinou c-di-AMP fosfodiesterázou v buňce. Příkladem této jednodoménové fosfodiesterázy může být PdeM z *Mycoplasma pneumoniae*. Ta byla v této bakterii identifikována společně s enzymem NrnA, což je strukturně velmi podobný protein. Navzdory této podobnosti tento enzym není schopen štěpit c-di-AMP, jeho aktivita je zaměřená na krátké oligoribonukleotidy (Blötz *et al.*, 2017). Ukázalo se, že

NrnA zajišťuje degradaci pApA, který vzniká aktivitou c-di-AMP fosfodiesterázy, a zajišťuje tak konečný převod na dvě molekuly AMP. Na mononukleotidy štěpí i pGpG, jenž vzniká při metabolismu c-di-GMP (Gall *et al.*, 2021).

Ne všechny fosfodiesterázy využívají DHH/DHHA1 doménu ke štěpení c-di-AMP. PgpH odbourává tohoto druhého posla pomocí HD domény, jež nese své jméno podle konzervovaného histidin-aspartátového motivu. PgpH byla popsána u *Listeria monocytogenes*. Jedná se o membránový protein, který má sedm transmembránových helixů a extracelulární 7TMR-HDED doménu, která pravděpodobně slouží k detekci extracelulárního signálu (Huynh *et al.*, 2015).

Ani jedna z dříve popsaných domén fosfodiesteráz se nevyskytuje u aktinobakterií. I zde se však vyskytuje c-di-AMP fosfodiesteráza nesoucí označení AtaC. Jedná se o jednodoménný protein, který pro svou aktivitu vyžaduje manganaté ionty. Jeho delece narušuje přechod od vegetativních hyf k zahájení sporulace. Zvýšená koncentrace c-di-AMP vede k narušení iontové homeostáze, která je nejspíš pro tvorbu spor zásadní (Latoscha *et al.*, 2020). Zajímavou lokalizaci má CdnP, fosfodiesteráza identifikována u bakterie *Streptococcus*. Tento enzym je totiž ektonukleotidáza, která degraduje extracelulární c-di-AMP. Přesná úloha tohoto proteinu není jistá, nejspíš neslouží k utilizaci c-di-AMP jako zdroje uhlíku. Pravděpodobnější je obrana před spuštěním imunitního systému. C-di-AMP se přirozeně v lidském organismu nevyskytuje a jeho přítomnost tedy silně stimuluje imunitní reakci. Díky degradaci mimobuněčného c-di-AMP může CdnP částečně maskovat výskyt této bakterie v hostitelském organismu (Andrade *et al.*, 2016).

Hodnoty intracelulární koncentrace c-di-AMP jsou kromě syntézy a degradace kontrolovány i pumpami, které tohoto druhého posla vylučují ven z buňky. Na tomto transportu se podílí i MDR (multidrug resistance) pumpy. Jedná se o ABC transportéry, které jsou známy hlavně díky své schopnosti z buňky vylučovat různé cizorodé molekuly včetně antibiotik a jiných léčiv. *L. monocytogenes* využívá své MDR pro exkreci c-di-AMP. Role tohoto transportu není jistá, protože c-di-AMP spouští interferonovou odpověď. Výzkumy ale naznačují, že by se mohl podílet na regulaci syntézy buněčné stěny (Kaplan Zeevi *et al.*, 2013).

6.2 Efekty c-di-AMP

Efektory c-di-AMP jsou proteiny i riboswitche. Mezi c-di-AMP závislé riboswitche se řadí hlavně YdaO motiv. Tyto riboswitche se nejčastěji vyskytují u sinic, aktinobakterií a Firmicutes. Jejich role se ale mezi těmito taxony liší. U aktinobakterií jsou tyto riboswitche asociovány výhradně s geny pro syntézu buněčné stěny. U Firmicutes se takto kontrolované geny zapojují i do regulace intracelulární koncentrace draslíku či transportu a metabolismu aminokyselin. Sinice pro řízení tvorby peptidoglykanu tyto riboswitche nepoužívají, regulují ale expresi různorodých transportérů a genů pro syntézu kompatibilních osmolytů (Nelson *et al.* 2013).

6.2.1 Regulace draselného transportu a osmoregulace

Jednou z nejvýznamnějších funkcí tohoto druhého posla je udržování homeostáze draslíku. Kromě toho, že je tento ion zásadní pro funkci řady proteinů, podílí se i na regulaci osmotického tlaku. Při příliš vysoké intracelulární koncentraci draslíku dochází k aktivaci syntézy c-di-AMP, který následně blokuje aktivitu enzymů pro import, a naopak podporuje exportní systémy K^+ . Regulace může probíhat přímo na úrovni exprese. To bylo pozorováno například u transportéru KimA, který je zodpovědný za příjem draslíku. Jeho mRNA obsahuje riboswitch, jenž je rozpoznáván c-di-AMP. Po vazbě druhého posla dochází k terminaci jeho exprese (Gundlach *et al.*, 2017). Kontrola ale probíhá i pomocí přímých interakcí s proteiny. Při nízké koncentraci intracelulárního draslíku nebo v hyperosmotickém prostředí dochází k expresi dodatečného draselného transportéru KdpFABC. Tento komplex je kódován na operonu, jehož exprese je řízena dvousložkovým systémem, který sestává ze senzoru draslíku KdpD a transkripčního faktoru KdpE. Při nízké koncentraci draslíku KdpD fosforyluje KdpE, který spouští transkripci draslíkového transportéru. Právě KdpD byl identifikován jako receptor pro c-di-AMP (Corrigan *et al.*, 2013).

Schopnost interagovat s c-di-AMP byla prokázána i přímo u draslíkových transportérů. Vazba c-di-AMP inhibuje aktivitu KtrCD. Tento komplex se skládá z membránové části KtrD a regulační podjednotky KtrC, která je za vazbu c-di-AMP přímo zodpovědná (Blötz *et al.*, 2017). Stejná regulace se týká i transportéru KtrAB, zde roli receptoru pro druhého posla zastává KtrA. Oba proteiny pro interakci s c-di-AMP využívají RCK_C doménu, která se vyskytuje i u celé řady jiných proteinů. Nalézá se i ve struktuře CpaA. Jedná se o antiportér, který za spotřeby protonového gradientu přenáší draselný či sodný ion ven z buňky (Corrigan *et al.*, 2013). Dalším příkladem může být protein CabP, který je za normálních okolností navázaný na transmembránový protein SPD_0076 a společně zajišťují příjem draslíku. Syntetizované c-di-AMP se váže k CabP, které díky této interakci ztrácí afinitu k SPD_0076, čímž je transport přerušen (Bai *et al.*, 2014).

Kromě draslíku c-di-AMP zasahuje do osmoregulace i přes jiné osmolyty. Dalšími významnými osmoprotektanty jsou například glycin betain nebo karnitin. První jmenovaný se do buňky dostává BusAB transportérem. Zvýšená koncentrace c-di-AMP inhibuje aktivitu tohoto proteinu přes transkripční faktor BusR, který po vazbě druhého posla blokuje expresi *busAB* operonu (Devaux *et al.*, 2018). Karnitinový příjem je zajišťován OpuABC systémem. C-di-AMP blokuje transport tohoto osmolytu vazbou cytoplazmatické komponenty OpuCA (Schuster *et al.*, 2016).

6.2.2 Vliv c-di-AMP na metabolismus a biofilm

C-di-AMP také výrazně zasahuje do energetického metabolismu. Slouží totiž jako allosterický inhibitor pyruvátkarboxylázy u bakterie *Listeria monocytogenes*. Pyruvátkarboxyláza je enzym vystupující v anaplerotických drahách standardního či rozpojeného Krebsova cyklu. Enzym katalyzuje syntézu oxalacetátu z pyruvátu za spotřeby ATP (Sureka *et al.*, 2014).

V některých organismech c-di-AMP zastává i úlohu v regulaci formování biofilmu. Mutanti *Streptococcus gallolyticus* s vyřazenou fosfodiesterázou vykazují nižší schopnost adheze, což je mimo jiné dáno sníženou expresí Pil3 pilů. C-di-AMP u tohoto druhu zároveň potlačuje produkci bakteriocinu, který zabíjí konkurenční střevní bakterie (Teh *et al.*, 2019). Inhibice genů pro exopolysacharidy a další důležité složky matrix byla při zvýšené koncentraci c-di-AMP pozorována i u *B. subtilis*. Cyklický di-AMP řídí aktivitu hlavního regulátoru SinR, který reprimuje geny pro formování biofilmu (Gundlach *et al.*, 2016). V rozporu s dvěma dříve zmíněnými studiemi c-di-AMP podporuje sesilitu u *Streptococcus mutans*. Byl identifikován c-di-AMP vazebný protein CabPA, který interaguje s transkripčním faktorem VicR, a následně spouští expresi GtfB. Ten poté syntetizuje glukan, komponentu zajišťující u této bakterie iniciační adhezi k povrchu (Peng *et al.*, 2016).

6.2.3 Role c-di-AMP v hostitelské imunitní odpovědi

Na přítomnost c-di-AMP silně reaguje hostitelský imunitní systém. Eukaryota postrádají diadenylátcyklázy, a proto je výskyt tohoto druhého posla jasným cizorodým signálem. Některé eukaryotické proteiny dokáží detekovat c-di-AMP. Hlavním eukaryotickým senzorem pro c-di-AMP je STING, který následně spouští kaskádu vedoucí k produkci interferonu. STING je zároveň schopen detekovat přítomnost cGAMP, který je mimo jiné produkován eukaryotickým proteinem cGAS po rozpoznání cizorodé dvouřetězcové DNA (Andrade *et al.*, 2016). Dráhu vedoucí ke spuštění interferonu ještě zesiluje helikáza DDX41, která je rovněž schopna vázat c-di-AMP. Kromě něj rozpoznává i c-di-GMP. Po vazbě těchto druhých poslů interaguje se STINGem a posiluje produkci interferonu (Parvatiyar *et al.*, 2012). Dalším eukaryotickým receptorem je RECON, jenž za normálních okolností brání aktivaci NF- κ B. Vazba c-di-AMP tuto inhibiční aktivitu potlačuje, což následně vede ke spuštění imunitní odpovědi (McFarland *et al.*, 2017). Účinek c-di-AMP vedoucí k silné stimulaci imunity se využívá v boji s různými patogeny. Zvýšení exprese diadenylátcyklázy DisA v BCG, živé atenuované vakcíně proti *Mycobacterium tuberculosis*, vede k vyšší imunogenicitě a účinnosti vakcíny (Ning *et al.*, 2019).

7 Minoritní druzí poslové

7.1 cGMP

Cyklický GMP patří mezi rozšířené eukaryotické druhé posly. I přesto dlouhou dobu nebylo možné zjistit jeho výskyt u bakterií. Později jeho přítomnost prokázána byla (Bernlohr *et al.*, 1974). Začal ale panovat názor, že v bakteriích nezastupuje žádnou důležitou signalizační roli a že se pouze jedná o vedlejší produkt adenylátcyklázy (Shibuya *et al.*, 1977). V rozporu s tímto přesvědčením byla v roce 2000 v sinici *Synechocystis* objevena nukleotidylcykláza Cya2, která preferenčně syntetizovala cGMP. Jednalo se o první popsanou bakteriální guanylátcyklázu (Ochoa de Alda *et al.*, 2000). Postupně bylo prokázáno zapojení cGMP do bakteriálních regulačních drah a legitimizovala ho jako druhého posla v této doméně.

Nejlépe je signalizace cGMP prokázána u sinic. *Synechocystis* v reakci na vystavení účinkům UV-B snižuje intracelulární koncentraci cGMP (Cadoret *et al.*, 2005). Zvýšená hodnota UV záření poškozuje důležité komponenty fotosyntetického aparátu, nejvíce je degradován fotosystém II. Sinice tedy musí být schopny vypořádat se s těmito až život ohrožujícími stresovými podmínkami. Nejjednodušší reakcí je zvýšení produkce stavebních bloků fotosystémů, aby je byla buňka schopna regenerovat dříve, než jsou odbourávány (Máté *et al.*, 1998). Právě v této dráze je úloha cGMP nezastupitelná. U rodu *Synechocystis* byl navíc popsán protein, který je za pokles cGMP zodpovědný, a jedná se tedy o první popsanou cGMP specifickou fosfodiesterázu u bakterií (Cadoret *et al.*, 2005). Ostatní bakterie totiž pravděpodobně využívají činnost polyspecifických fosfodiesteráz, jež jsou schopny degradovat cAMP i cGMP (Fujisawa & Ohmori, 2005).

Cyklický GMP se také uplatňuje v regulaci vývoje dormantních stádií u α – proteobakterií (Marden *et al.*, 2011). Tento taxon spadá do gramnegativních bakterií, jeho zástupci tedy nejsou schopni vytvářet extrémně odolné spory jako například některé druhy sporulujících Firmicutes. Přesto dokáže řada proteobakteriálních druhů přežít nepříznivé podmínky díky tvorbě cyst. Encystace je většinou spojena s nedostatkem živin a vede ke zvýšenému ukládání polyhydroxybutyrátu, který slouží jako zásobní polymer, a tvorbě dodatečných ochranných vrstev z lipoproteinů a lipopolysacharidů (Berleman & Bauer, 2004). Regulace tohoto procesu byla studována u druhu *Rhodospirillum centenum*, který kromě tvorby klidových stádií dokáže přecházet mezi volně plovoucí buňkou s jedním polárním bičíkem a buňkou s více laterálními bičíky. Exprese většího množství bičíků je typické pro bakterie pěstované na pevném médiu, kde jsou kolonie schopny rychlého pohybu po podkladu, což je označováno jako tzv. swarming (Ragatz *et al.*, 1994). Na této tranzici se podílí cGMP, umělé přidání cGMP podporuje přechod do dormantního stádia. *R. centenum* vlastní guanylátcyklázu GeyA, která je společně s enzymem ze *Synechocystis* jednou z mála charakterizovaných cykláz tohoto typu u bakterií. Během encystace dochází k významnému vzrůstu její aktivity, bohužel není známý mechanismus, jak hladovění spouští činnost guanylátcyklázy. Drtivá většina produkovaného cGMP je kupodivu sekretována ven z buňky. Předpokládá se, že část je následně zpětně transportována do buňky, kde se váže na svůj efektor, který spouští geny pro dormanci. U *R. centenum* byl totiž identifikován homologický protein s CRP, který ale místo cAMP preferenčně interaguje s cGMP (Marden *et al.*, 2011).

Další uplatnění cGMP bylo prokázáno i u rostlinného patogenu *Xanthomonas campestris*. Zablokování guanylátcyklázy v tomto druhu snižuje virulenci a brání formování biofilmu. Účinek je propojen s c-di-GMP signalizací, mezi efektoři cyklického GMP totiž spadá i protein s diguanylátcyklázovou doménou. Zvýšená hladina cGMP stimuluje syntézu c-di-GMP. Tímto mechanismem cGMP zasahuje do tvorby biofilmu (An *et al.*, 2013).

7.2 Druzí poslové v CBASS

V posledních letech bylo v souvislosti s CBASS identifikováno velké množství nových druhých poslů. CBASS (cyclic oligonucleotide-based anti-phage signaling system) je součástí bakteriální imunity. Jeho aktivace v souvislosti s infekcí bakteriofágem vede k smrti buňky, čímž bakterie brání šíření fága v populaci, která je často tvořena blízce příbuznými jedinci. Dráha je zahajována CD-NTázami (cGAS/DcnV-like nucleotidyltransferase). Tyto enzymy dosud nepopsaným mechanismem detekují přítomnost viru a následně zahajují syntézu rozličných druhých poslů, kteří spouští sebedestrukční proteiny (Lau *et al.*, 2020).

První popsanou CD-NTázou se stal DncV z *Vibrio cholerae*. DncV katalyzuje reakci, jejímž produktem je cyklický GMP-AMP (cGAMP) (Davies *et al.*, 2012). Tento druhý posel spouští aktivitu fosfolipázy CapV (Severin *et al.*, 2018). Ta štěpí membránové fosfolipidy a snižuje integritu membrány, což může vést až k lýzi bakteriální buňky. Tento obranný systém připomíná dráhu cGAS a STING, která figuruje v imunitních odpovědích eukaryot. Velká podobnost s bakteriálním systémem by mohla naznačovat, že se jedná o evolučně velmi starou a konzervovanou dráhu (Cohen *et al.*, 2019).

Podobně CBASS funguje i u *E. coli*. Při zkoumání homologů DncV byl u *E. coli* objeven gen *cdnE*. Pokud bylo k jeho produktu CdnE přidány radioaktivně značené nukleotidy překvapivě začal místo cGMP-AMP syntetizovat pyrimidin purinový hybrid cUMP-AMP. CdnE obsahuje stejný nukleotidyltransferázový fold, jako má katalytické jádro DncV i eukaryotické cGAS, což by mohlo ukazovat na jejich společný evoluční původ. CdnE se ale liší asparaginovým vedlejším řetězcem, který může tvořit vodíkové můstky s uracilem a pravděpodobně se jedná o strukturální element, jenž zajišťuje substrátovou preferenci tohoto enzymu. Identifikována byla i *E. coli* verze CapV. Tento protein získal označení CapE a stejně jako CapV jde o fosfolipázu. Testována byla i interakce cUMP-AMP s živočišným imunitním systémem. Přídavek cUMP-AMP k aktivaci proteinu STING nevede. Na druhou stranu RECON, který kontroluje NF- κ B, na cUMP-AMP odpovídá. Jeho přítomnost inhibuje RECON, stejně jako v případě c-di-AMP nebo cGAMP (Whiteley *et al.*, 2019).

Analyzována byla i nukleotidylcykláza *EcCdnD02* z *Enterobacter cloacae*. První výzkumy naznačovaly, že hlavním produktem tohoto enzymu je některý z cyklických dipurinů, bližší pohled ale ukázal, že *EcCdnD02* primárně syntetizuje c-AMP-AMP-GMP (cAAG), tedy cyklický trinukleotid (Whiteley *et al.*, 2019). Podobný protein *EcCdnC* z *E. coli* zase syntetizuje cAAA (Ye *et al.*, 2020). Oproti dříve jmenovaným tento druhý posel aktivuje DNA endonukleázu NucC, která degraduje bakteriální genom. Tento enzym je podobný restrikcčním endonukleázám, na rozdíl od nich ale tvoří homotrimery (Lau *et al.*, 2020).

8 Závěr

Téma druhých posílů se v bakteriologii stává plodnou oblastí výzkumu. Přestože byl koncept tohoto typu signalizace ustanoven již před více než půl stoletím, stále přibývají další objevy, které tuto koncepci prohlubují a rozšiřují. U bakterií bylo popsáno pět sekundárních posílů, kteří nějakým způsobem vystupují v signalizačních drahách většiny popsaných druhů. Jedná se o látky s dlouhou historií, jako je cAMP a (p)ppGpp, ale i o nověji popsané c-di-GMP a c-di-AMP. Funkce těchto molekul v buňce byla dobře charakterizována, přestože v mnoha případech chybí kompletní popisy drah, ve kterých vystupují. Na druhou stranu začíná být ustanovováno velké množství nových druhých posílů. Jedná se o klasické, dlouho zvažované sloučeniny, mezi něž lze zařadit cGMP, jiné z nich jsou ale naprosto obskurní a dosud nepopsané. Těmi jsou například cyklické trinukleotidy. Tento vývoj ukazuje, že pravděpodobně existuje velké množství regulačních mechanismů, které čekají na své objevení.

Kromě toho, že popsání nových posílů a kaskád, které regulují, dává velký vhled do bakteriální fyziologie, poskytují tyto znalosti i nové možnosti léčby bakteriálních infekcí. Velká část těchto regulací je totiž unikátní pouze pro prokaryota, a poskytují tak možné cíle nových terapeutik. Velmi významné je i pochopení regulačních drah, jež zahajují formování biofilmu, který je jedním z nejvýznamnějších problémů současného lékařství hlavně v souvislosti s nosokomiálními infekcemi.

Seznam literatury

- Abel, S., Chien, P., Wassmann, P., Schirmer, T., Kaefer, V., Laub, M. T., ... & Jenal, U. (2011). Regulatory cohesion of cell cycle and cell differentiation through interlinked phosphorylation and second messenger networks. *Molecular cell*, 43(4), 550-560.
- Aiba, H. (1985). Transcription of the *Escherichia coli* adenylate cyclase gene is negatively regulated by cAMP-cAMP receptor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 260(5), 3063-3070.
- An, S. Q., Chin, K. H., Febrer, M., McCarthy, Y., Yang, J. G., Liu, C. L., ... & Ryan, R. P. (2013). A cyclic GMP-dependent signalling pathway regulates bacterial phytopathogenesis. *The EMBO journal*, 32(18), 2430-2438.
- Andrade, W. A., Firon, A., Schmidt, T., Hornung, V., Fitzgerald, K. A., Kurt-Jones, E. A., ... & Kaminski, P. A. (2016). Group B *Streptococcus* degrades cyclic-di-AMP to modulate STING-dependent type I interferon production. *Cell host & microbe*, 20(1), 49-59.
- Andrews, K. J., & Lin, E. C. (1976). Thiogalactoside transacetylase of the lactose operon as an enzyme for detoxification. *Journal of bacteriology*, 128(1), 510-513.
- Arora, S. K., Ritchings, B. W., Almira, E. C., Lory, S., & Ramphal, R. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infection and immunity*, 66(3), 1000-1007.
- Atkinson, G. C., Tenson, T., & Hauryliuk, V. (2011). The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PloS one*, 6(8), e23479.
- Avarbock, A., Avarbock, D., Teh, J. S., Buckstein, M., Wang, Z. M., & Rubin, H. (2005). Functional regulation of the opposing (p) ppGpp synthetase/hydrolase activities of RelMtb from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 44(29), 9913-9923.
- Avarbock, D., Avarbock, A., & Rubin, H. (2000). Differential Regulation of Opposing Rel_{Mtb} Activities by the Aminoacylation State of a tRNA·Ribosome·mRNA·Rel_{Mtb} Complex. *Biochemistry*, 39(38), 11640-11648.
- Bai, Y., Yang, J., Zarrella, T. M., Zhang, Y., Metzger, D. W., & Bai, G. (2014). Cyclic di-AMP impairs potassium uptake mediated by a cyclic di-AMP binding protein in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 196(3), 614-623.
- Barker, M. M., Gaal, T., Josaitis, C. A., & Gourse, R. L. (2001). Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and in vitro. *Journal of molecular biology*, 305(4), 673-688.
- Battesti, A., & Bouveret, E. (2006). Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Molecular microbiology*, 62(4), 1048-1063.
- Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A., & Sebo, P. (1994). Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(44), 27231-27239.
- Berleman, J. E., & Bauer, C. E. (2004). Characterization of cyst cell formation in the purple photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Microbiology*, 150(2), 383-390.
- Bernlohr, R. W., Haddox, M. K., & Goldberg, N. D. (1974). Cyclic guanosine 3':5'-monophosphate in *Escherichia coli* and *Bacillus licheniformis*. *Journal of Biological Chemistry*, 249(13), 4329-4331.
- Blaustein, R. O., Koehler, T. M., Collier, R. J., & Finkelstein, A. (1989). Anthrax toxin: channel-forming activity of protective antigen in planar phospholipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(7), 2209-2213.

- Blötz, C., Treffon, K., Kaefer, V., Schwede, F., Hammer, E., & Stülke, J. (2017). Identification of the components involved in cyclic di-AMP signaling in *Mycoplasma pneumoniae*. *Frontiers in microbiology*, 8, 1328.
- Bordeleau, E., Purcell, E. B., Lafontaine, D. A., Fortier, L. C., Tamayo, R., & Burrus, V. (2015). Cyclic di-GMP riboswitch-regulated type IV pili contribute to aggregation of *Clostridium difficile*. *Journal of bacteriology*, 197(5), 819-832.
- Boutte, C. C., & Crosson, S. (2011). The complex logic of stringent response regulation in *Caulobacter crescentus*: starvation signalling in an oligotrophic environment. *Molecular microbiology*, 80(3), 695-714.
- Braun, F., Thomalla, L., van der Does, C., Quax, T. E., Allers, T., Kaefer, V., & Albers, S. V. (2019). Cyclic nucleotides in archaea: Cyclic di-AMP in the archaeon *Haloferax volcanii* and its putative role. *Microbiologyopen*, 8(9), e00829.
- Brown, D. R., Barton, G., Pan, Z., Buck, M., & Wigneshweraraj, S. (2014). Nitrogen stress response and stringent response are coupled in *Escherichia coli*. *Nature communications*, 5(1), 1-8.
- Cadby, I. T., Basford, S. M., Nottingham, R., Meek, R., Lowry, R., Lambert, C., ... & Lovering, A. L. (2019). Nucleotide signaling pathway convergence in a cAMP-sensing bacterial c-di-GMP phosphodiesterase. *The EMBO journal*, 38(17), e100772.
- Cadoret, J. C., Rousseau, B., Perewoska, I., Sicora, C., Cheregi, O., Vass, I., & Houmard, J. (2005). Cyclic nucleotides, the photosynthetic apparatus and response to a UV-B stress in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33935-33944.
- Callahan, S. M., Cornell, N. W., & Dunlap, P. V. (1995). Purification and properties of periplasmic 3': 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase: a novel zinc-containing enzyme from the marine symbiotic bacterium *Vibrio fischeri*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(29), 17627-17632.
- Cashel, M. (1969). The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*: IV. Relevance of unusual phosphorylated compounds from amino acid-starved stringent strains. *Journal of Biological Chemistry*, 244(12), 3133-3141.
- Cohen, D., Melamed, S., Millman, A., Shulman, G., Oppenheimer-Shaanan, Y., Kacen, A., ... & Sorek, R. (2019). Cyclic GMP-AMP signalling protects bacteria against viral infection. *Nature*, 574(7780), 691-695.
- Corona-Izquierdo, F. P., & Membrillo-Hernández, J. (2002). A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth. *FEMS microbiology letters*, 211(1), 105-110.
- Corrigan, R. M., Bellows, L. E., Wood, A., & Gründling, A. (2016). ppGpp negatively impacts ribosome assembly affecting growth and antimicrobial tolerance in Gram-positive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(12), E1710-E1719.
- Corrigan, R. M., Campeotto, I., Jeganathan, T., Roelofs, K. G., Lee, V. T., & Gründling, A. (2013). Systematic identification of conserved bacterial c-di-AMP receptor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22), 9084-9089.
- Danchin, A., Guiso, N., Roy, A., & Ullmann, A. (1984). Identification of the *Escherichia coli* *cya* gene product as authentic adenylate cyclase. *Journal of Molecular Biology*, 175(3), 403-408.
- Dasgupta, N., Ferrell, E. P., Kanack, K. J., West, S. E., & Ramphal, R. (2002). *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is σ^{70} dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *Journal of bacteriology*, 184(19), 5240-5250.
- Davies, B. W., Bogard, R. W., Young, T. S., & Mekalanos, J. J. (2012). Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V. cholerae* virulence. *Cell*, 149(2), 358-370.

- Den Hengst, C. D., Tran, N. T., Bibb, M. J., Chandra, G., Leskiw, B. K., & Buttner, M. J. (2010). Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth. *Molecular microbiology*, *78*(2), 361-379.
- Devaux, L., Sleiman, D., Mazzuoli, M. V., Gominet, M., Lanotte, P., Trieu-Cuot, P., ... & Firon, A. (2018). Cyclic di-AMP regulation of osmotic homeostasis is essential in Group B *Streptococcus*. *PLoS genetics*, *14*(4), e1007342.
- Dietzler, D. N., & Leckie, M. P. (1977). Regulation of ADP-glucose synthetase, the rate-limiting enzyme of bacterial glycogen synthesis, by the pleiotropic nucleotides ppGpp and pppGpp. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *77*(4), 1459-1467.
- Dunlap, P. V., & Callahan, S. M. (1993). Characterization of a periplasmic 3': 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase gene, *cpdP*, from the marine symbiotic bacterium *Vibrio fischeri*. *Journal of bacteriology*, *175*(15), 4615-4624.
- Dunlap, P. V., Mueller, U., Lisa, T. A., & Lundberg, K. S. (1992). Growth of the marine luminous bacterium *Vibrio fischeri* on 3': 5'-cyclic AMP: correlation with a periplasmic 3':5'-cyclic AMP phosphodiesterase. *Microbiology*, *138*(1), 115-123.
- Endoh, T., & Engel, J. N. (2009). CbpA: a polarly localized novel cyclic AMP-binding protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, *191*(23), 7193-7205.
- English, B. P., Hauryliuk, V., Sanamrad, A., Tankov, S., Dekker, N. H., & Elf, J. (2011). Single-molecule investigations of the stringent response machinery in living bacterial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(31), E365-E373.
- Epps, H. M., & Gale, E. F. (1942). The influence of the presence of glucose during growth on the enzymic activities of *Escherichia coli*: comparison of the effect with that produced by fermentation acids. *Biochemical Journal*, *36*(7-9), 619.
- Fong, J. C., & Yildiz, F. H. (2008). Interplay between cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein and cyclic di-GMP signaling in *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Journal of bacteriology*, *190*(20), 6646-6659.
- Friedman, R. L., Fiederlein, R. L., Glasser, L., & Galgiani, J. N. (1987). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: effects of affinity-purified adenylate cyclase on human polymorphonuclear leukocyte functions. *Infection and immunity*, *55*(1), 135-140.
- Fujisawa, T., & Ohmori, M. (2005). Biochemical properties of a cAMP phosphodiesterase in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Microbes and environments*, *20*(2), 92-96.
- Fulcher, N. B., Holliday, P. M., Klem, E., Cann, M. J., & Wolfgang, M. C. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* Chp chemosensory system regulates intracellular cAMP levels by modulating adenylate cyclase activity. *Molecular microbiology*, *76*(4), 889-904.
- Gall, A. R., Hsueh, B. Y., Siletti, C., Waters, C. M., & Huynh, T. N. (2021). NrmA is a linear dinucleotide phosphodiesterase with limited function in cyclic dinucleotide metabolism in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, *204*(1), e00206-21.
- Galperin, M. Y., Natale, D. A., Aravind, L., & Koonin, E. V. (1999). A specialized version of the HD hydrolase domain implicated in signal transduction. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, *1*(2), 303.
- Gándara, C., de Lucena, D. K., Torres, R., Serrano, E., Altenburger, S., Graumann, P. L., & Alonso, J. C. (2017). Activity and in vivo dynamics of *Bacillus subtilis* DisA are affected by RadA/Sms and by Holliday junction-processing proteins. *DNA repair*, *55*, 17-30.
- Geiger, T., & Wolz, C. (2014). Intersection of the stringent response and the CodY regulon in low GC Gram-positive bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, *304*(2), 150-155.

- Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A., & Danchin, A. (1988). Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *The EMBO journal*, 7(12), 3997-4004.
- Gundlach, J., Herzberg, C., Kaefer, V., Gunka, K., Hoffmann, T., Weiß, M., ... & Stülke, J. (2017). Control of potassium homeostasis is an essential function of the second messenger cyclic di-AMP in *Bacillus subtilis*. *Science signaling*, 10(475), eaal3011.
- Gundlach, J., Rath, H., Herzberg, C., Mäder, U., & Stülke, J. (2016). Second messenger signaling in *Bacillus subtilis*: accumulation of cyclic di-AMP inhibits biofilm formation. *Frontiers in microbiology*, 7, 804.
- Hanski, E., & Farfel, Z. (1985). *Bordetella pertussis* invasive adenylate cyclase. Partial resolution and properties of its cellular penetration. *Journal of Biological Chemistry*, 260(9), 5526-5532.
- Haseltine, W. A., & Block, R. (1973). Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(5), 1564-1568.
- Heyduk, T., & Lee, J. C. (1989). *Escherichia coli* cAMP receptor protein: evidence for three protein conformational states with different promoter binding affinities. *Biochemistry*, 28(17), 6914-6924.
- Hickman, J. W., & Harwood, C. S. (2008). Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular microbiology*, 69(2), 376-389.
- Holland, L. M., O'donnell, S. T., Ryjenkov, D. A., Gomelsky, L., Slater, S. R., Fey, P. D., ... & O'Gara, J. P. (2008). A staphylococcal GGDEF domain protein regulates biofilm formation independently of cyclic dimeric GMP. *Journal of bacteriology*, 190(15), 5178-5189.
- Huber, R. E., Kurz, G., & Wallenfels, K. (1976). A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β -galactosidase (*E. coli*) on lactose. *Biochemistry*, 15(9), 1994-2001.
- Hufnagel, D. A., Depas, W. H., & Chapman, M. R. (2015). The biology of the *Escherichia coli* extracellular matrix. *Microbiology spectrum*, 3(3), 3-3.
- Hufnagel, D. A., Evans, M. L., Greene, S. E., Pinkner, J. S., Hultgren, S. J., & Chapman, M. R. (2016). The catabolite repressor protein-cyclic AMP complex regulates csgD and biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 198(24), 3329-3334.
- Huynh, T. N., Luo, S., Pensinger, D., Sauer, J. D., Tong, L., & Woodward, J. J. (2015). An HD-domain phosphodiesterase mediates cooperative hydrolysis of c-di-AMP to affect bacterial growth and virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(7), E747-E756.
- Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N. C., Giese, B., Jenal, U., & Schirmer, T. (2004). Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(49), 17084-17089.
- Chen, Y. M., Backman, K., & Magasanik, B. (1982). Characterization of a gene, *glnL*, the product of which is involved in the regulation of nitrogen utilization in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 150(1), 214-220.
- Christen, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P., ... & Jenal, U. (2006). Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 281(42), 32015-32024.
- Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A., & Jenal, U. (2005). Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 30829-30837.
- Imamura, R., Yamanaka, K., Ogura, T., Hiraga, S., Fujita, N., Ishihama, A., & Niki, H. (1996). Identification of the *cpdA* gene encoding cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate phosphodiesterase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(41), 25423-25429.

- Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology*, 3(3), 318-356.
- Jobe, A., & Bourgeois, S. (1972). Lac repressor-operator interaction: VI. The natural inducer of the *lac* operon. *Journal of molecular biology*, 69(3), 397-408.
- Jones, C. J., Utada, A., Davis, K. R., Thongsomboon, W., Zamorano Sanchez, D., Banakar, V., ... & Yildiz, F. H. (2015). C-di-GMP regulates motile to sessile transition by modulating MshA pili biogenesis and near-surface motility behavior in *Vibrio cholerae*. *PLoS pathogens*, 11(10), e1005068.
- Jung, H. W., Kim, K., Islam, M. M., Lee, J. C., & Shin, M. (2020). Role of ppGpp-regulated efflux genes in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(5), 1130-1134.
- Kalivoda, E. J., Stella, N. A., O'Dee, D. M., Nau, G. J., & Shanks, R. M. (2008). The cyclic AMP-dependent catabolite repression system of *Serratia marcescens* mediates biofilm formation through regulation of type 1 fimbriae. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(11), 3461-3470.
- Kanjee, U., Gutsche, I., Alexopoulos, E., Zhao, B., El Bakkouri, M., Thibault, G., ... & Houry, W. A. (2011a). Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: the structure of the inducible lysine decarboxylase. *The EMBO journal*, 30(5), 931-944.
- Kanjee, U., Gutsche, I., Ramachandran, S., & Houry, W. A. (2011b). The enzymatic activities of the *Escherichia coli* basic aliphatic amino acid decarboxylases exhibit a pH zone of inhibition. *Biochemistry*, 50(43), 9388-9398.
- Kaplan Zeevi, M., Shafir, N. S., Shaham, S., Friedman, S., Sigal, N., Nir Paz, R., ... & Herskovits, A. A. (2013). *Listeria monocytogenes* multidrug resistance transporters and cyclic di-AMP, which contribute to type I interferon induction, play a role in cell wall stress. *Journal of bacteriology*, 195(23), 5250-5261.
- Khelef, N., Zychlinsky, A., & Guiso, N. (1993). *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infection and Immunity*, 61(10), 4064-4071.
- Kim, H. S., Kim, S. M., Lee, H. J., Park, S. J., & Lee, K. H. (2009). Expression of the *cpdA* gene, encoding a 3', 5'-cyclic AMP (cAMP) phosphodiesterase, is positively regulated by the cAMP-cAMP receptor protein complex. *Journal of bacteriology*, 191(3), 922-930.
- Krásný, L., & Gourse, R. L. (2004). An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *The EMBO journal*, 23(22), 4473-4483.
- Kundig, W., & Roseman, S. (1971). Sugar Transport: I. Isolation of a phosphotransferase system from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 246(5), 1393-1406.
- Lange, R., & Hengge-Aronis, R. (1991). Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 5(1), 49-59.
- Lange, R., & Hengge-Aronis, R. (1994). The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes & development*, 8(13), 1600-1612.
- Latoscha, A., Drexler, D. J., Al-Bassam, M. M., Bandera, A. M., Kaefer, V., Findlay, K. C., ... & Tschowri, N. (2020). c-di-AMP hydrolysis by the phosphodiesterase AtaC promotes differentiation of multicellular bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(13), 7392-7400.
- Lau, R. K., Ye, Q., Birkholz, E. A., Berg, K. R., Patel, L., Mathews, I. T., ... & Corbett, K. D. (2020). Structure and mechanism of a cyclic trinucleotide-activated bacterial endonuclease mediating bacteriophage immunity. *Molecular cell*, 77(4), 723-733.
- Lee, E. R., Baker, J. L., Weinberg, Z., Sudarsan, N., & Breaker, R. R. (2010). An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. *Science*, 329(5993), 845-848.

- Lennon, C. W., Ross, W., Martin-Tomasz, S., Touloukhonov, I., Vrentas, C. E., Rutherford, S. T., ... & Gourse, R. L. (2012). Direct interactions between the coiled-coil tip of DksA and the trigger loop of RNA polymerase mediate transcriptional regulation. *Genes & development*, *26*(23), 2634-2646.
- Leppala, S. H. (1982). Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *79*(10), 3162-3166.
- Lillehoj, E. P., Kim, B. T., & Kim, K. C. (2002). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *282*(4), L751-L756.
- Lindenberg, S., Klauck, G., Pesavento, C., Klauck, E., & Hengge, R. (2013). The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in *E. coli* biofilm control. *The EMBO journal*, *32*(14), 2001-2014.
- Liu, C., Sun, D., Zhu, J., Liu, J., & Liu, W. (2020). The regulation of bacterial biofilm formation by cAMP-CRP: a mini-review. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 802.
- Liu, X., & Matsumura, P. (1994). The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *Journal of bacteriology*, *176*(23), 7345-7351.
- MacLeod, F. A., Guiot, S. R., & Costerton, J. (1990). Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(6), 1598-1607.
- Magnusson, L. U., Farewell, A., & Nyström, T. (2005). ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends in microbiology*, *13*(5), 236-242.
- Makman, R. S., & Sutherland, E. W. (1965). Adenosine 3', 5'-Phosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, *240*(3), 1309-1314.
- Mao, X. J., Huo, Y. X., Buck, M., Kolb, A., & Wang, Y. P. (2007). Interplay between CRP-cAMP and PII-Ntr systems forms novel regulatory network between carbon metabolism and nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, *35*(5), 1432-1440.
- Marden, J. N., Dong, Q., Roychowdhury, S., Berleman, J. E., & Bauer, C. E. (2011). Cyclic GMP controls *Rhodospirillum centenum* cyst development. *Molecular microbiology*, *79*(3), 600-615.
- Martins, D., McKay, G., Sampathkumar, G., Khakimova, M., English, A. M., & Nguyen, D. (2018). Superoxide dismutase activity confers (p) ppGpp-mediated antibiotic tolerance to stationary-phase *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(39), 9797-9802.
- Máté, Z., Sass, L., Szekeres, M., Vass, I., & Nagy, F. (1998). UV-B-induced differential transcription of *psbA* genes encoding the D1 protein of photosystem II in the Cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(28), 17439-17444.
- McFarland, A. P., Luo, S., Ahmed-Qadri, F., Zuck, M., Thayer, E. F., Goo, Y. A., ... & Woodward, J. J. (2017). Sensing of bacterial cyclic dinucleotides by the oxidoreductase RECON promotes NF-κB activation and shapes a proinflammatory antibacterial state. *Immunity*, *46*(3), 433-445.
- Meers, J. L., Tempest, D. W., & Brown, C. M. (1970). 'Glutamine (amide): 2-oxoglutarate amino transferase oxido-reductase (NADP)', an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *Microbiology*, *64*(2), 187-194.
- Mehne, F. M., Gunka, K., Eilers, H., Herzberg, C., Kaefer, V., & Stülke, J. (2013). Cyclic di-AMP homeostasis in *Bacillus subtilis*: both lack and high level accumulation of the nucleotide are detrimental for cell growth. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(3), 2004-2017.
- Mehne, F. M., Schröder-Tittmann, K., Eijlander, R. T., Herzberg, C., Hewitt, L., Kaefer, V., ... & Stülke, J. (2014). Control of the diadenylate cyclase CdaS in *Bacillus subtilis*: an autoinhibitory domain limits cyclic di-AMP production. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(30), 21098-21107.

- Mechold, U., Murphy, H., Brown, L., & Cashel, M. (2002). Intramolecular regulation of the opposing (p) ppGpp catalytic activities of Rel_{Seq}, the Rel/Spo enzyme from *Streptococcus equisimilis*. *Journal of bacteriology*, 184(11), 2878-2888.
- Mechold, U., Potrykus, K., Murphy, H., Murakami, K. S., & Cashel, M. (2013). Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 41(12), 6175-6189.
- Merlie, J. P., & Pizer, L. I. (1973). Regulation of phospholipid synthesis in *Escherichia coli* by guanosine tetraphosphate. *Journal of Bacteriology*, 116(1), 355-366.
- Metzger, L. C., Stutzmann, S., Scignari, T., Van der Henst, C., Matthey, N., & Blokesch, M. (2016). Independent regulation of type VI secretion in *Vibrio cholerae* by TfoX and TfoY. *Cell reports*, 15(5), 951-958.
- Mills, E., Petersen, E., Kulasekara, B. R., & Miller, S. I. (2015). A direct screen for c-di-GMP modulators reveals a *Salmonella typhimurium* periplasmic L-arginine-sensing pathway. *Science signaling*, 8(380), ra57-ra57.
- Nakagawa, A., Oshima, T., & Mori, H. (2006). Identification and characterization of a second, inducible promoter of relA in *Escherichia coli*. *Genes & genetic systems*, 81(5), 299-310.
- Nanamiya, H., Kasai, K., Nozawa, A., Yun, C. S., Narisawa, T., Murakami, K., ... & Tozawa, Y. (2008). Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 67(2), 291-304.
- Nelson, J. W., Sudarsan, N., Furukawa, K., Weinberg, Z., Wang, J. X., & Breaker, R. R. (2013). Riboswitches in eubacteria sense the second messenger c-di-AMP. *Nature chemical biology*, 9(12), 834-839.
- Nelson, S. O., Wright, J. K., & Postma, P. W. (1983). The mechanism of inducer exclusion. Direct interaction between purified III_{Glc} of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and the lactose carrier of *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 2(5), 715-720.
- Newell, P. D., Boyd, C. D., Sondermann, H., & O'Toole, G. A. (2011). A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage. *PLoS biology*, 9(2), e1000587.
- Newell, P. D., Monds, R. D., & O'Toole, G. A. (2009). LapD is a bis-(3', 5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3461-3466.
- Ng, W. O., Grossman, A. R., & Bhaya, D. (2003). Multiple light inputs control phototaxis in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Journal of Bacteriology*, 185(5), 1599-1607.
- Nickel, J. C., Ruseska, I., Wright, J. B., & Costerton, J. W. (1985). Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 27(4), 619-624.
- Ninfa, A. J., & Magasanik, B. (1986). Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(16), 5909-5913.
- Ning, H., Wang, L., Zhou, J., Lu, Y., Kang, J., Ding, T., ... & Bai, Y. (2019). Recombinant BCG with bacterial signaling molecule cyclic di-AMP as endogenous adjuvant induces elevated immune responses after *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Frontiers in immunology*, 1519.
- Nissley, S. P., Anderson, W. B., Gottesman, M. E., Perlman, R. L., & Pastan, I. (1971). In vitro transcription of the *gal* operon requires cyclic adenosine monophosphate and cyclic adenosine monophosphate receptor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 246(15), 4671-4678.
- Oehler, S., Eismann, E. R., Krämer, H., & Müller-Hill, B. (1990). The three operators of the *lac* operon cooperate in repression. *The EMBO journal*, 9(4), 973-979.

- Ochoa de Alda, J. A., Ajlani, G., & Houmard, J. (2000). *Synechocystis* strain PCC 6803 *cya2*, a prokaryotic gene that encodes a guanylyl cyclase. *Journal of Bacteriology*, *182*(13), 3839-3842.
- Okamoto, K., & Freundlich, M. (1986). Mechanism for the autogenous control of the *crp* operon: transcriptional inhibition by a divergent RNA transcript. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *83*(14), 5000-5004.
- Opoku-Temeng, C., Zhou, J., Zheng, Y., Su, J., & Sintim, H. O. (2016). Cyclic dinucleotide (c-di-GMP, c-di-AMP, and cGAMP) signalings have come of age to be inhibited by small molecules. *Chemical Communications*, *52*(60), 9327-9342.
- Orr, M. W., Weiss, C. A., Severin, G. B., Turdiev, H., Kim, S. K., Turdiev, A., ... & Lee, V. T. (2018). A subset of exoribonucleases serve as degradative enzymes for pGpG in c-di-GMP signaling. *Journal of bacteriology*, *200*(24), e00300-18.
- Osickova, A., Masin, J., Fayolle, C., Krusek, J., Basler, M., Pospisilova, E., ... & Sebo, P. (2010). Adenylate cyclase toxin translocates across target cell membrane without forming a pore. *Molecular microbiology*, *75*(6), 1550-1562.
- Pardee, A. B., & Prestidge, L. S. (1956). The dependence of nucleic acid syntheses on the presence of amino acids in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *71*(6), 677-683.
- Parvatiyar, K., Zhang, Z., Teles, R. M., Ouyang, S., Jiang, Y., Iyer, S. S., ... & Cheng, G. (2012). The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nature immunology*, *13*(12), 1155-1161.
- Paul, B. J., Berkmen, M. B., & Gourse, R. L. (2005). DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(22), 7823-7828.
- Paul, R., Weiser, S., Amiot, N. C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., & Jenal, U. (2004). Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes & development*, *18*(6), 715-727.
- Peltier, J., Shaw, H. A., Couchman, E. C., Dawson, L. F., Yu, L., Choudhary, J. S., ... & Fairweather, N. F. (2015). Cyclic diGMP regulates production of sortase substrates of *Clostridium difficile* and their surface exposure through ZmpI protease-mediated cleavage. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(40), 24453-24469.
- Peng, X., Zhang, Y., Bai, G., Zhou, X., & Wu, H. (2016). Cyclic di-AMP mediates biofilm formation. *Molecular microbiology*, *99*(5), 945-959.
- Persat, A., Inclan, Y. F., Engel, J. N., Stone, H. A., & Gitai, Z. (2015). Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(24), 7563-7568.
- Podobnik, M., Tyagi, R., Matange, N., Dermol, U., Gupta, A. K., Mattoo, R., ... & Visweswariah, S. S. (2009). A mycobacterial cyclic AMP phosphodiesterase that moonlights as a modifier of cell wall permeability. *Journal of biological chemistry*, *284*(47), 32846-32857.
- Polakis, S. E., Guchhait, R. B., & Lane, M. D. (1973). Stringent control of fatty acid synthesis in *Escherichia coli*: possible regulation of acetyl coenzyme A carboxylase by ppGpp. *Journal of Biological Chemistry*, *248*(22), 7957-7966.
- Purcell, E. B., McKee, R. W., McBride, S. M., Waters, C. M., & Tamayo, R. (2012). Cyclic diguanylate inversely regulates motility and aggregation in *Clostridium difficile*. *Journal of bacteriology*, *194*(13), 3307-3316.
- Ragatz, L., Jiang, Z. Y., Bauer, C., & Gest, H. (1994). Phototactic purple bacteria. *Nature*, *370*(6485), 104-104.
- Rall, T. W., Sutherland, E. W., & Berthet, J. (1957). The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase: IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. *Journal of Biological Chemistry*, *224*(1), 463-475.

- Rall, T. W., & Sutherland, E. W. (1958). Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *Journal of Biological Chemistry*, 232(2), 1065-1076.
- Rall, T. W., Sutherland, E. W., Maxwell, M., & Davis, J. W. (1962). Adenyl Cyclase: II. The enzymatically catalyzed formation of adenosine 3', 5'-phosphate and inorganic pyrophosphate from adenosine triphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 237(4), 1228-1232.
- Rao, F., See, R. Y., Zhang, D., Toh, D. C., Ji, Q., & Liang, Z. X. (2010). YybT is a signaling protein that contains a cyclic dinucleotide phosphodiesterase domain and a GGDEF domain with ATPase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 285(1), 473-482.
- Raskin, D. M., Judson, N., & Mekalanos, J. J. (2007). Regulation of the stringent response is the essential function of the conserved bacterial G protein CgtA in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(11), 4636-4641.
- Reddy, P., Meadow, N., Roseman, S., & Peterkofsky, A. (1985). Reconstitution of regulatory properties of adenylate cyclase in *Escherichia coli* extracts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(24), 8300-8304.
- Reitzer, L. J., & Magasanik, B. (1983). Isolation of the nitrogen assimilation regulator NRI, the product of the *glnG* gene of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(18), 5554-5558.
- Reitzer, L. J., & Magasanik, B. (1985). Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(7), 1979-1983.
- Richter, W. (2002). 3', 5'-Cyclic nucleotide phosphodiesterases class III: Members, structure, and catalytic mechanism. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 46(3), 278-286.
- Rismondo, J., Gibhardt, J., Rosenberg, J., Kaefer, V., Halbedel, S., & Commichau, F. M. (2016). Phenotypes associated with the essential diadenylate cyclase CdaA and its potential regulator CdaR in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Journal of bacteriology*, 198(3), 416-426.
- Rodionov, D. G., & Ishiguro, E. E. (1995). Direct correlation between overproduction of guanosine 3', 5'-bispyrophosphate (ppGpp) and penicillin tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 177(15), 4224-4229.
- Rosenberg, J., Dickmanns, A., Neumann, P., Gunka, K., Arens, J., Kaefer, V., ... & Commichau, F. M. (2015). Structural and biochemical analysis of the essential diadenylate cyclase CdaA from *Listeria monocytogenes*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(10), 6596-6606.
- Ross, P., Aloni, Y., Weinhouse, C., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Meyer, R., & Benziman, M. (1985). An unusual guanyl oligonucleotide regulates cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEBS letters*, 186(2), 191-196.
- Ross, W., Sanchez-Vazquez, P., Chen, A. Y., Lee, J. H., Burgos, H. L., & Gourse, R. L. (2016). ppGpp binding to a site at the RNAP-DksA interface accounts for its dramatic effects on transcription initiation during the stringent response. *Molecular cell*, 62(6), 811-823.
- Roy, A., Glaser, P., & Danchin, A. (1988). Aspects of the regulation of adenylate cyclase synthesis in *Escherichia coli* K12. *Microbiology*, 134(2), 359-367.
- Ryjenkov, D. A., Simm, R., Römling, U., & Gomelsky, M. (2006). The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 281(41), 30310-30314.
- Sands, M. K., & Roberts, R. B. (1952). The effects of a tryptophan-histidine deficiency in a mutant of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 63(4), 505-511.
- Sanchez-Vazquez, P., Dewey, C. N., Kitten, N., Ross, W., & Gourse, R. L. (2019). Genome-wide effects on *Escherichia coli* transcription from ppGpp binding to its two sites on RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(17), 8310-8319.

- Savakis, P., De Causmaecker, S., Angerer, V., Ruppert, U., Anders, K., Essen, L. O., & Wilde, A. (2012). Light-induced alteration of c-di-GMP level controls motility of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular microbiology*, 85(2), 239-251.
- Severin, G. B., Ramliden, M. S., Hawver, L. A., Wang, K., Pell, M. E., Kieninger, A. K., ... & Ng, W. L. (2018). Direct activation of a phospholipase by cyclic GMP-AMP in El Tor *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(26), E6048-E6055.
- Shanahan, C. A., & Strobel, S. A. (2012). The bacterial second messenger c-di-GMP: probing interactions with protein and RNA binding partners using cyclic dinucleotide analogs. *Organic & biomolecular chemistry*, 10(46), 9113-9129.
- Shibuya, M., Takebe, Y., & Kaziro, Y. (1977). A possible involvement of *cya* gene in the synthesis of cyclic guanosine 3': 5'-monophosphate in *E. coli*. *Cell*, 12(2), 521-528.
- Shyp, V., Tankov, S., Ermakov, A., Kudrin, P., English, B. P., Ehrenberg, M., ... & Haurlyuk, V. (2012). Positive allosteric feedback regulation of the stringent response enzyme RelA by its product. *EMBO reports*, 13(9), 835-839.
- Schmidt, A. J., Ryjenkov, D. A., & Gomelsky, M. (2005). The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *Journal of bacteriology*, 187(14), 4774-4781.
- Schniederberend, M., Williams, J. F., Shine, E., Shen, C., Jain, R., Emonet, T., & Kazmierczak, B. I. (2019). Modulation of flagellar rotation in surface-attached bacteria: A pathway for rapid surface-sensing after flagellar attachment. *PLoS pathogens*, 15(11), e1008149.
- Schuster, C. F., Bellows, L. E., Tosi, T., Campeotto, I., Corrigan, R. M., Freemont, P., & Gründling, A. (2016). The second messenger c-di-AMP inhibits the osmolyte uptake system OpuC in *Staphylococcus aureus*. *Science signaling*, 9(441), ra81-ra81.
- Solaiman, D., & Uffen, R. L. (1984). Influence of cyclic AMP on photosynthetic development in *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of bacteriology*, 159(2), 790-792.
- Soutourina, O., Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A., & Bertin, P. (1999). Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. *Journal of bacteriology*, 181(24), 7500-7508.
- Sprinzi, M., & Richter, D. (1976). Free 3'-OH Group of the terminal adenosine of the tRNA molecule is essential for the synthesis in vitro of guanosine tetraphosphate and pentaphosphate in a ribosomal system from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 71(1), 171-176.
- Strugeon, E., Tilloy, V., Ploy, M. C., & Da Re, S. (2016). The stringent response promotes antibiotic resistance dissemination by regulating integron integrase expression in biofilms. *MBio*, 7(4), e00868-16.
- Sudarsan, N., Lee, E. R., Weinberg, Z., Moy, R. H., Kim, J. N., Link, K. H., & Breaker, R. R. (2008). Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science*, 321(5887), 411-413.
- Sureka, K., Choi, P. H., Precit, M., Delince, M., Pensinger, D. A., Huynh, T. N., ... & Woodward, J. J. (2014). The cyclic dinucleotide c-di-AMP is an allosteric regulator of metabolic enzyme function. *Cell*, 158(6), 1389-1401.
- Sutherland, E. W., & Rall, T. W. (1958). Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *Journal of Biological Chemistry*, 232(2), 1077-1091.
- Sy, J. (1977). In vitro degradation of guanosine 5'-diphosphate, 3'-diphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5529-5533.
- Sy, J., & Lipmann, F. (1973). Identification of the synthesis of guanosine tetraphosphate (MS I) as insertion of a pyrophosphoryl group into the 3'-position in guanosine 5'-diphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(2), 306-309.

- Tal, R., Wong, H. C., Calhoon, R., Gelfand, D., Fear, A. L., Volman, G., ... & Benziman, M. (1998). Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *Journal of bacteriology*, 180(17), 4416-4425.
- Tan, E., Rao, F., Pasunooti, S., Pham, T. H., Soehano, I., Turner, M. S., ... & Liang, Z. X. (2013). Solution structure of the PAS domain of a thermophilic YybT protein homolog reveals a potential ligand-binding site. *Journal of Biological Chemistry*, 288(17), 11949-11959.
- Teh, W. K., Dramsi, S., Tolker-Nielsen, T., Yang, L., & Givskov, M. (2019). Increased intracellular cyclic di-AMP levels sensitize *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* to osmotic stress and reduce biofilm formation and adherence on intestinal cells. *Journal of bacteriology*, 201(6), e00597-18.
- Téllez-Sosa, J., Soberón, N., Vega-Segura, A., Torres-Márquez, M. E., & Cevallos, M. A. (2002). The *Rhizobium etli* *cyuC* product: characterization of a novel adenylate cyclase class. *Journal of bacteriology*, 184(13), 3560-3568.
- Terauchi, K., & Ohmori, M. (2004). Blue light stimulates cyanobacterial motility via a cAMP signal transduction system. *Molecular microbiology*, 52(1), 303-309.
- Topal, H., Fulcher, N. B., Bitterman, J., Salazar, E., Buck, J., Levin, L. R., ... & Steegborn, C. (2012). Crystal structure and regulation mechanisms of the CyaB adenyl cyclase from the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of molecular biology*, 416(2), 271-286.
- Townsley, L., & Yildiz, F. H. (2015). Temperature affects c-di-GMP signalling and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Environmental microbiology*, 17(11), 4290-4305.
- Tschowri, N., Schumacher, M. A., Schlimpert, S., babu Chinnam, N., Findlay, K. C., Brennan, R. G., & Buttner, M. J. (2014). Tetrameric c-di-GMP mediates effective transcription factor dimerization to control *Streptomyces* development. *Cell*, 158(5), 1136-1147.
- Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M., & d'Ari, R. (2005). Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 56(4), 958-970.
- Wang, J. D., Sanders, G. M., & Grossman, A. D. (2007). Nutritional control of elongation of DNA replication by (p)ppGpp. *Cell*, 128(5), 865-875.
- Weber, I. T., & Steitz, T. A. (1987). Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 198(2), 311-326.
- Wendrich, T. M., Blaha, G., Wilson, D. N., Marahiel, M. A., & Nierhaus, K. H. (2002). Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Molecular cell*, 10(4), 779-788.
- West, S. E., Sample, A. K., & Runyen-Janecky, L. J. (1994). The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. *Journal of bacteriology*, 176(24), 7532-7542.
- Whiteley, A. T., Eaglesham, J. B., de Oliveira Mann, C. C., Morehouse, B. R., Lowey, B., Nieminen, E. A., ... & Kranzusch, P. J. (2019). Bacterial cGAS-like enzymes synthesize diverse nucleotide signals. *Nature*, 567(7747), 194-199.
- Winkler, W. C., Cohen-Chalamish, S., & Breaker, R. R. (2002). An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 15908-15913.
- Witte, G., Hartung, S., Büttner, K., & Hopfner, K. P. (2008). Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. *Molecular cell*, 30(2), 167-178.
- Wolff, J. G. A. S., Cook, G. H., Goldhammer, A. R., & Berkowitz, S. A. (1980). Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(7), 3841-3844.

- Wolfgang, M. C., Lee, V. T., Gilmore, M. E., & Lory, S. (2003). Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Developmental cell*, 4(2), 253-263.
- Woolfolk, C. A., Shapiro, B. T., & Stadtman, E. R. (1966). Regulation of glutamine synthetase: I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 116, 177-192.
- Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G., & Cashel, M. (1991). Residual guanosine 3', 5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *Journal of Biological Chemistry*, 266(9), 5980-5990.
- Yan, X. F., Xin, L., Yen, J. T., Zeng, Y., Jin, S., Cheang, Q. W., ... & Gao, Y. G. (2018). Structural analyses unravel the molecular mechanism of cyclic di-GMP regulation of bacterial chemotaxis via a PilZ adaptor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 293(1), 100-111.
- Yanagihara, S., Iyoda, S., Ohnishi, K., Iino, T., & Kutsukake, K. (1999). Structure and transcriptional control of the flagellar master operon of *Salmonella typhimurium*. *Genes & genetic systems*, 74(3), 105-111.
- Ye, Q., Lau, R. K., Mathews, I. T., Birkholz, E. A., Watrous, J. D., Azimi, C. S., ... & Corbett, K. D. (2020). HORMA domain proteins and a Trip13-like ATPase regulate bacterial cGAS-like enzymes to mediate bacteriophage immunity. *Molecular cell*, 77(4), 709-722.
- Zamorano-Sánchez, D., Fong, J. C., Kilic, S., Erill, I., & Yildiz, F. H. (2015). Identification and characterization of VpsR and VpsT binding sites in *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology*, 197(7), 1221-1235.
- Zheng, D., Constantinidou, C., Hobman, J. L., & Minchin, S. D. (2004). Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling. *Nucleic acids research*, 32(19), 5874-5893.
- Zogaj, X., Nimtze, M., Rohde, M., Bokranz, W., & Römling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular microbiology*, 39(6), 1452-1463.
- Zubay, G., Schwartz, D., & Beckwith, J. (1970). Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes: a positive control system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 66(1), 104-110.
- Zuo, Y., Wang, Y., & Steitz, T. A. (2013). The mechanism of E. coli RNA polymerase regulation by ppGpp is suggested by the structure of their complex. *Molecular cell*, 50(3), 430-436.