

Abstrakt

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

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

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

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

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