

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Petra Sklenářová**

**Konformační změny proteinových  
membránových senzorů**

Conformational changes of the membrane protein sensors

**Bakalářská práce**

Školitel: doc. RNDr. Ivo Konopásek CSc.

Praha, 2011

**Prohlášení:**

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

V Praze, 19. 08. 2011

Podpis

**Poděkování:**

Ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucímu práce Doc. RNDr. Ivu Konopáskovi, CSc. za ochotu, trpělivost a cenné rady při vypracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Janě Beranové, PhD. za podporu a pomoc při vyhledávání použité literatury.

## Obsah

<b>Obsah .....</b>	<b>1</b>
<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>2</b>
<b>Abstrakt .....</b>	<b>4</b>
<b>1 Úvod.....</b>	<b>6</b>
<b>2 Prokaryotické signální systémy .....</b>	<b>7</b>
2.1 Jednokomponentové systémy .....	7
2.2 Dvoukomponentové systémy.....	8
2.2.1 PAS, PDC a GAF domény dvoukomponentových systémů .....	10
2.2.2 Příklady dvoukomponentových systémů.....	12
2.2.2.1 PhoP/PhoQ dvoukomponentový systém .....	12
2.2.2.2 DcuS/DcuR dvoukomponentový systém.....	14
2.2.2.3 CitA/CitB dvoukomponentový systém .....	15
2.3 Tříkomponentové systémy .....	18
<b>3 Metody výzkumu dvoukomponentových systémů.....</b>	<b>20</b>
3.1 Fosforylace proteinů dvoukomponentových systémů radioaktivně značeným [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP.....	20
3.2 Specializované fosforylační testy.....	21
3.2.1 Sledování fosforylačních reakcí dvoukomponentových systémů bez použití radioaktivního fosforu .....	21
3.2.2 Technologie „Fosfo-tag“ .....	22
3.3 Další fluorescenční metody .....	23
3.3.1 Zelený fluorescenční protein (GFP).....	23
3.3.2 Metoda FRET .....	25
<b>4 Stavba senzorických domén dvoukomponentových systémů.....</b>	<b>26</b>
4.1 Extracelulární senzorické domény .....	26
4.2 Membránové senzorické domény .....	27
4.3 Cytoplazmatické senzorické domény.....	28
<b>5 Mechanismus přenosu signálu u dvoukomponentových systémů.....</b>	<b>29</b>
5.1 Přenos signálu u dvoukomponentových systémů .....	29
5.2 „Základní“ a složený (fosforelay) systém přenosu signálu .....	31
<b>6 Závěr.....</b>	<b>33</b>
<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>34</b>

## Seznam zkratek

Å	ångström
ADP	adenosine <b>d</b> iphosphate
ARNT	aryl hydrocarbon <b>r</b> eceptor <b>n</b> uclear <b>t</b> ranslocator
Asp	<b>a</b> spartate
ATP	adenosine <b>t</b> riphosphate
bp	<b>b</b> ase <b>p</b> airs
CFP	cyan <b>f</b> luorescent <b>p</b> rotein
cGMP	cyclic <b>g</b> uanosine <b>m</b> onophosphate
Da	<b>d</b> alton
DHp	dimerization domain ( <b>d</b> imerization and <b>h</b> istidine phosphotransfer)
DNA	<b>d</b> eoxyribonucleic acid
DsRed	<b>r</b> ed fluorescent protein ( <i>Discosoma striata</i> )
FAD	flavin <b>a</b> denine <b>d</b> inucleotide
FCS	fluorescence <b>c</b> orrelation spectroscopy
FRET	fluorescence <b>r</b> esonance <b>e</b> nergy <b>t</b> ransfer
GAF doména	cGMP-specific phosphodiesterases, <b>a</b> denyl cyclases and FhlA
GFP	<b>g</b> reen <b>f</b> luorescent <b>p</b> rotein
GPI kotva	<b>g</b> lycophosphatidylinositol anchor
H1-H6	<b>h</b> elices 1-6
HAMP	<b>h</b> istidine kinases, <b>a</b> denyl cyclases, <b>m</b> ethyl-accepting proteins and <b>p</b> hosphatases
HATPase	<b>h</b> istidine kinase-type <b>A</b> TPase catalytic domain
His	<b>h</b> istidine
HisKA	dimerization domain ( <b>H</b> is <b>K</b> inase <b>A</b> )
HK	<b>h</b> istidine <b>k</b> inase
Hpt doména	<b>h</b> is-containing <b>p</b> hosphotransfer domain
HTH	<b>h</b> elix- <b>t</b> urn- <b>h</b> elix
k <sub>T</sub>	transfer rate in resonance energy transfer
mM	<b>m</b> ilimolar
nm	<b>n</b> anometre

<b>nM</b>	<b>nanomolar</b>
<b>μM</b>	<b>micromolar</b>
<b>PAS doména</b>	<b>PER/ARNT/SIM</b>
<b>PDC doména</b>	<b>PhoQ/DcuS/CitA</b>
<b>PER</b>	<b>period clock protein</b>
<b>REC doména</b>	<b>receiver domain</b>
<b>r</b>	distance between the donor and acceptor
<b>RR</b>	<b>response regulator</b>
<b>R<sub>0</sub></b>	Förster distance in resonance energy transfer
<b>S1-S5</b>	strands 1-5
<b>SIM</b>	<b>single-minded protein</b>
<b>TCS</b>	<b>two-component system</b>
<b>TM1, TM2</b>	<b>transmembrane helix 1,2</b>
<b>TMR1, TMR2</b>	<b>transmembrane region 1,2</b>
<b>Tyr</b>	<b>tyrosine</b>
<b>UAS</b>	<b>upstream activating sequence</b>
<b>UMP</b>	<b>uridine monophosphate</b>
<b>YFP</b>	<b>yellow fluorescent protein</b>
<b>τ<sub>D</sub></b>	lifetime of the donor in the absence of energy transfer

## **Abstrakt**

Tato práce je zaměřena na stavbu a funkci prokaryotických signálních systémů. V bakteriích se nacházejí tři typy signálních systémů: jednokomponentové, dvoukomponentové a tříkomponentové systémy. Tyto tři systémy se od sebe liší zejména stavbou a počtem proteinů a domén, které jsou jejich součástí. Zabývala jsem se zejména dvoukomponentovými systémy u bakterií, i když byl jejich výskyt potvrzen i u nižších eukaryot. Prokaryotické dvoukomponentové systémy jsou hlavními prostředky, kterými bakterie rozpoznávají různé podněty z prostředí a reagují na ně. U bakterií jsou dosud popsány dva typy dvoukomponentových systémů. Prvním je základní systém a druhým systém složený. Oba typy dvoukomponentových systémů obsahují dva nepostradatelné proteiny: histidin kinázu a odpovídající regulátor. Liší se však doménovou stavbou proteinů a mechanismem přenosu signálu. U základního systému přenos probíhá ve dvou krocích, u složeného celkem ve čtyřech krocích. Vždy je však princip stejný, jde o přenesení fosfátové skupiny z histidin kinázy na odpovídající regulátor, který je tímto signálem aktivován a může regulovat transkripci DNA.

**Klíčová slova:** proteinový senzor, konformace proteinu, dvoukomponentový systém, histidin kináza, odpovídající regulátor

## **Abstract**

This work focuses on a structure and a function of prokaryotic signal systems. There are three types of signal systems in bacteria: one-component, two-component and three-component systems. These three systems differ with respect to their structure and number of protein components and domain. I have focused mainly on two-component systems in bacteria despite their occurrence has been confirmed also in lower eukaryotes. Prokaryotic two-component system are the main instruments which help bacteria to differentiate between different stimuli from the environment and to react to them. So far, there were described two types of two-component systems. The first one is the basic system and the second one is the phosphorelay system. Both types of two-component systems contain two indispensable proteins: histidine kinase and response regulator. They are different with respect to their domain structure of proteins and in a mechanism by which they transfer the signal. The signal transmission system consists of two or four steps in case of the basis or phosphorelay systems, respectively. The principle of the signal transmission is the same for both of them, a phosphate group from the histidine kinase is transferred to response regulator. In such manner, response regulator is activated by and is able to regulate the transcription of DNA.

**Keywords:** protein sensor, protein conformation, two-component system, histidine kinase, response regulator



## 1 Úvod

Přenos signálu přes membránu je nejdůležitější pro schopnost buněk zpracovávat informace o vnějším prostředí. V bakteriích je signál přes membránu většinou přenesen pomocí tzv. dvoukomponentových systémů, ty regulují důležité buněčné procesy nejen u bakterií, ale i u archaea a u některých nižších eukaryotických organismů, jako jsou rostliny nebo houby. Buněčné procesy regulované pomocí dvoukomponentových systémů jsou různé, regulují procesy od patogeneze nebo vývoje buňky po metabolismus nebo chemotaxi. V posledních letech byly odhaleny stovky dvoukomponentových systémů. Na základě knock-out experimentů se zdají být některé dvoukomponentové systémy nezbytné pro život bakterií. Dvoukomponentové systémy (TCS) jsou přítomny u více než 95% bakteriálních organismů, jejichž genom byl osekvenován a mohly z něj být TCS identifikovány (Reinelt 2003; Cho *et al.* 2006; Cheung *et al.* 2010; Scharf 2010).

Každý dvoukomponentový systém se skládá z homodimerického histidin kinázového receptoru a cytoplazmatického odpovídajícího regulátoru. Extracelulární kinázová doména snímá specifický signál, vedoucí k autofosforylaci cytoplazmatické domény a k přenosu fosfátové skupiny na její příbuzný odpovídající regulátor. Fosforylovaný odpovídající regulátor vyvolává buněčnou odpověď na původní signál tím, že aktivuje skupinu cílových genů (Hoskisson *et al.* 2006; Cheung *et al.* 2010).

Cílem této práce je pohlédnout na některé dvoukomponentové systémy, které jsou významné z hlediska poznání jejich strategie při napadení hostitelské buňky, jejich přežití v hostiteli, ale také z hlediska pochopení mechanismů obrany hostitelské buňky. Na základě těchto poznatků jsou pak zkoumány a objevovány nové druhy léků, zejména léků založených na principu antimikrobiálních proteinů, s jejichž pomocí se vyšší eukaryota brání při napadení bakteriemi.

## 2 Prokaryotické signální systémy

### 2.1 Jednokomponentové systémy

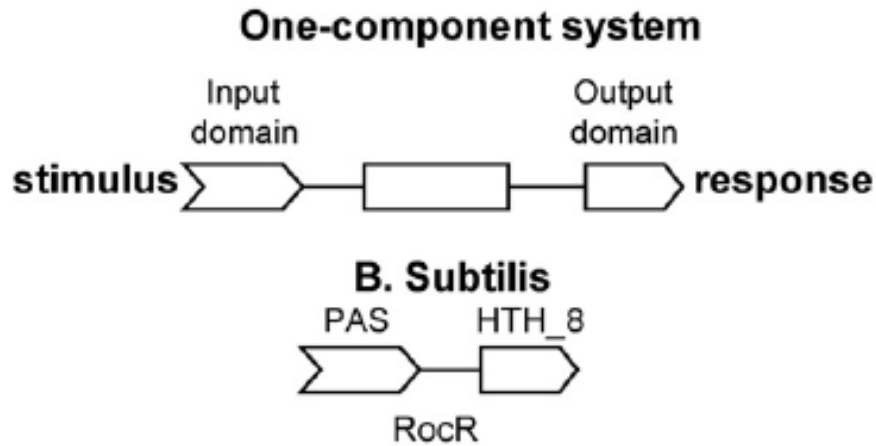
Jednokomponentový systém je tvořen jediným proteinem. Ten má (nejméně) dvě specializované oblasti, jednu pro vstup a druhou pro výstup. V mnoha případech aktivovaný odpovídající regulátor vystupuje jako transkripční faktor s DNA vazebnou výstupní doménou regulující expresi genů spojených s odpovědí na daný signál (Marijuán *et al.* 2010). Jednokomponentové systémy se velmi zřídka vyskytují jako transmembránové proteiny na rozdíl od dvoukomponentových systémů, které jsou ve většině případů transmembránové (Ulrich *et al.* 2005).

Jednokomponentové regulátory jsou evolučními předchůdci dvoukomponentových systémů. Modulární konstrukce jednokomponentových systémů je jednodušší, než u dvoukomponentových systémů. Doména regulátorů u jednokomponentových je značně rozmanitější než u dvoukomponentových systémů. Jednokomponentové regulátory jsou mezi prokaryoty více rozšířené než dvoukomponentové. Naproti tomu dvoukomponentové systémy chybí u mnoha druhů, zejména u některých archaea. Kromě toho, archaeální dvoukomponentové systémy byly pravděpodobně získány z bakterií horizontálním genovým přenosem. Analýzou 145 genomů prokaryot, bylo zjištěno, že většina signálních systémů se skládá z jednoho proteinu, který obsahuje vstupní a výstupní doménu, ale postrádá fosfotransferové domény typické pro dvoukomponentové systémy (Ulrich *et al.* 2005).

Jednokomponentové systémy jsou definovány jako bílkoviny, které obsahují známé nebo předpokládané vstupní a výstupní domény, ale postrádají histidin kinázu a senzitivní doménu. Složení vstupních a výstupních domén jednokomponentových systémů je obdobné jako u dvoukomponentových systémů. Jednokomponentové systémy využívají mnohem jednodušší přenos signálu než dvoukomponentové systémy. U jednokomponentových systémů dojde k navázání ligandu, následně nastane konformační změna proteinu. Takto aktivovaný protein může regulovat transkripci DNA (Obr. 1). Absencí histidin kinázy a odpovídajícího regulátoru jsou vynechány některé zbytečné kroky, které jsou pro buňku energeticky náročné. Jednokomponentové systémy jsou evolučně starší, více rozšířené mezi prokaryoty a mají větší rozmanitost domén než dvoukomponentové systémy (Ulrich *et al.* 2005).

Příkladem jednokomponentového systému je RocR jednokomponentový systém. RocR polypeptid je regulátorem katabolismu argininu. Skládá se z PAS domény

(popsána níže v kapitole 2.2.1) a obsahuje „helix-turn-helix“ (HTH) motiv v C-koncové části proteinu. HTH motiv se podílí na interakci s upstream (proti proudu transkripce) aktivujícími sekvencemi (UAS) (Calogero *et al.* 1994).



**Obr. 1:** Schéma jednokomponentového systému, kde je znázorněn konkrétní příklad RocR jednokomponentový systém, patřící *Bacillus subtilis* a zahrnující domény PAS a HTH 8. Převzato z (Marijuán *et al.* 2010)

## 2.2 Dvoukomponentové systémy

Dvoukomponentové signalizační systémy jsou složeny ze dvou proteinů a čtyř domén: autofosforylační histidin kinázy citlivé k signálu (zvané také receptor nebo transmitterový protein) a příbuzného odpovídajícího regulátoru (zvaný také transduktorový protein), který často působí jako transkripční faktor.

Histidin kináza je obvykle transmembránový protein obsahující N-koncovou senzickou extracelulární doménu a C-koncovou transmitterovou cytoplazmatickou doménu, lemovanou dvěma transmembránovými šroubovicemi a cytoplazmatickou histidin kinázovou doménou (Reinelt 2003; Cheung *et al.* 2008a). Histidin kinázy mají několik katalytických aktivit. Mohou fungovat jako autokinázy, tedy fosforylační enzymy, dále mohou sloužit jako fosfotransferázy, což jsou enzymy katalyzující přenos fosfátu z jedné domény na druhou, nebo mohou fungovat jako fosfatázy, tedy enzymy, které proteiny defosforylují. Dále katalyzují přenos fosfátu na jejich příslušný odpovídající regulátor a tedy i funkční výsledky signálních drah (Albanesi *et al.* 2009).

Odpovídající regulátor je obvykle dvou doménový protein se zachovanou N-koncovou regulační doménou a C-koncovou efektorovou doménou. Regulační doména odpovídajícího regulátoru má tři aktivity: interaguje s fosforylovanou histidin kinázou a katalyzuje přenos fosforylové skupiny z histidin kinázy na vlastní

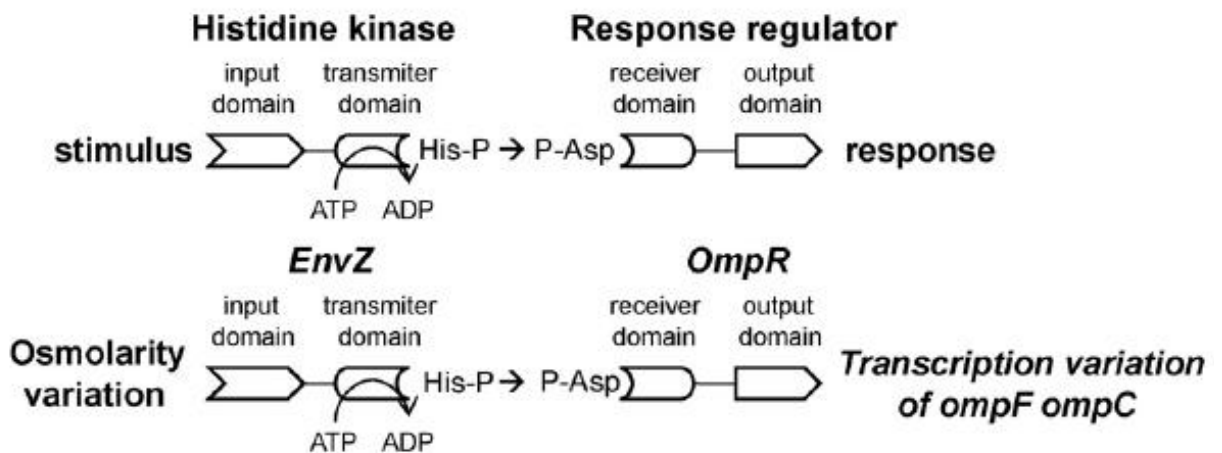
konzervovaný aspartát. Druhou aktivitou tohoto proteinu je katalýza vlastní autodeforylace. Poslední aktivitou je regulace aktivity efektorové domény. Efektorová doména vazbou na DNA vyvolává specifickou výstupní odpověď (West *et al.* 2001).

Přenos fosfátové skupiny z histidin kinázy na odpovídající regulátor spouští přepis genů, spuštění přepisu genů je reakcí na vnější signály (Grigoroudis *et al.* 2007). Většina histidin kináz, které byly experimentálně studovány, je membránově vázaná a má extracelulární vstupní doménu, zatímco všechny odpovídající regulátory jsou lokalizovány v cytosolu. Vstupní doména sensorické histidin kinázy vnímá signál z okolí (obvykle je signálem malá molekula - ligand), což vede k aktivaci histidin kinázové domény, která autofosforyluje zbytek histidinu (Ulrich *et al.* 2005). Při autofosforylaci dochází k odštěpení  $\gamma$ -fosfátu z ATP (adenosintrifosfát) a jeho navázání na histidin kinázu (Cheung *et al.* 2008b). Poté je fosfátová skupina přenesena na příslušný zbytek aspartátu v přijímací doméně odpovídajícího regulátoru. Fosforylace odpovídajícího regulátoru aktivuje výstupní doménu, čímž dojde k vazbě DNA na HTH (helix-turn-helix) motiv. Nefosforylovaný regulátor je neaktivní a nedochází zde tedy k navázání DNA (Ulrich *et al.* 2005). Přenos může být regulován nebo zesílen přidáním dalších modulů k původním doménám a začleněním doplňkových bílkovin označovaných jako konektorové (spojovací) proteiny (Casino *et al.* 2010).

Na obrázku č. 2 je jako příklad uvedeno schéma EnvZ/OmpR dvoukomponentového systému. EnvZ histidin kináza/fosfatáza v *Escherichia coli* reaguje na změnu osmolarity v prostředí fosforylací transkripčního faktoru OmpR, který reguluje hladinu exprese vnějších membránových porinů OmpF a OmpC. EnvZ histidin kináza je trans-autofosforylována na vysoce konzervovaném His-243 zbytku. Aby mohlo k trans-autofosforylaci vůbec dojít, musí být nejdříve vytvořen dimer či oligomer (Yang *et al.* 1991; Cai 2002). Fosfátová skupina je následně přenesena na konzervovaný Asp-55 zbytek na odpovídajícím regulátoru OmpR. Fosforylovaný OmpR (OmpR-P) funguje jako transkripční faktor ovládající expresi genů pro hlavní membránové poriny ompC a ompF. OmpC a OmpF tvoří póry ve vnější membráně a umožňují pasivní difúze malých hydrofilních molekul menších než 650 Da. Množství OmpR-P v buňce ovlivňuje přepis genů ompF a ompC. Při slabé osmolaritě je v buňce nízká hladina OmpR-P, což vyplývá z nižšího poměru mezi kinázovou a fosfatázovou aktivitou EnvZ proteinu a proto je podporována transkripce genu ompF. Se zvyšujícím se poměrem

mezi kinázovou a fosfatázovou aktivitou EnvZ proteinu v buňce se při silné osmolaritě zvyšuje i výskyt OmpR-P, čímž dochází k aktivaci přepisu genu *ompC* (Cai 2002).

V následujících kapitolách budou probrány příklady vybraných a dobře prostudovaných dvoukomponentových systémů. Nejdříve však budou popsány jednotlivé domény, které se mohou vyskytovat ve struktuře histidin kináz u dvoukomponentových systémů. Tyto domény mají různé funkce, ale nejčastější jejich funkcí je příjem signálu z okolí bakterie, jsou tedy senzorickými doménami histidin kináz.



**Obr. 2:** Příklad dvoukomponentového systému u *E. coli*. Systém citlivý k osmotickému tlaku se skládá z osmosenzoru HK (EnvZ) a transkripčního faktoru RR (OmpR). Změny v osmolaritě jsou vnímány N-koncovou doménou na EnvZ. Převzato z (Kremling *et al.* 2004).

### 2.2.1 PAS, PDC a GAF domény dvoukomponentových systémů

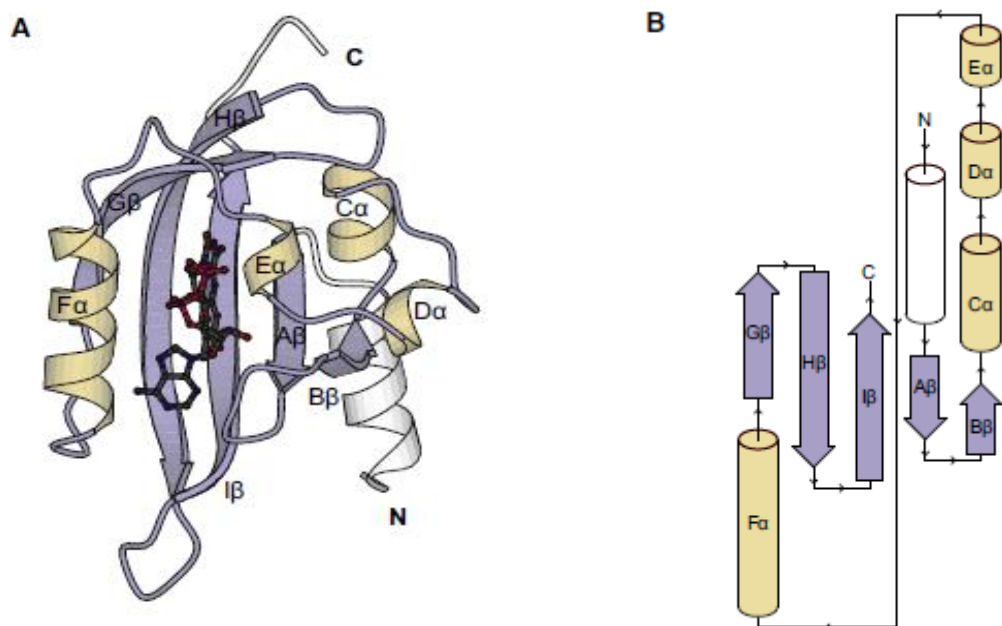
Název pro PDC senzory vznikl z počátečních písmen PhoQ/DcuS/CitA senzorických domén, u kterých byly PDC senzory poprvé identifikovány. Charakteristický PDC senzor začíná svoji strukturu N-koncovým  $\alpha$ -helixem, který vede do centrálního jádra proteinu. Jádro je tvořeno pěti vzájemně antiparalelními  $\beta$ -listy, které dohromady tvoří kostru celého proteinu. Obě strany tohoto centra lemují dva krátké helixy, které jsou charakteristické jak pro všechny PDC domény, tak pro všechny PAS domény (Cheung *et al.* 2008a; Cheung *et al.* 2010).

Název PAS byl vytvořen z počátečních písmen proteinů, ve kterých byla tato doména poprvé nalezena, jsou to proteiny PER (period clock protein), ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), SIM (single-minded protein). PER a SIM byly objeveny u rodu *Drosophila* a ARNT byl nalezen u obratlovců. U bakterií a

archaea se PAS domény objevují výhradně ve dvoukomponentových regulačních systémech, ale existují i výjimky, kdy se PAS doména vyskytuje v jednokomponentových regulačních systémech (např. RocR jednokomponentový systém). Toto platí pro všechny dosud kompletně osekvenované bakteriální a archeální genomy u kterých byly PAS domény objeveny, z toho lze usoudit, že v jiných systémech se zřejmě nenacházejí (Taylor *et al.* 1999; Marijuán *et al.* 2010). PAS domény přijímají z okolí různé podněty, kterými může být světlo, kyslík, redoxní potenciál nebo energie (Taylor *et al.* 1999; Ayers *et al.* 2008). Strukturální jádro PAS domén je stejné jako u PDC domén, skládá se z pěti antiparalelně uspořádaných  $\beta$ -listů, tvořících kostru celého proteinu. Dále obsahuje další  $\alpha$ -šroubovice, které obklopují centrální  $\beta$ -listy. Na N-konci i na C-konci se nacházejí další prodlužující úseky (Obr. 3). N-konec je zodpovědný za vazbu transkripčních faktorů a C-konec, který je sekvenčně homologní k histidin kináze, je nutný pro navázání senzorkého proteinu (Key *et al.* 2007; Möglich *et al.* 2009).

PAS domény jsou téměř vždy kovalentně připojeny k N-konci efektorové (výstupní) domény, ale v několika málo příkladech se nacházejí na C-konec efektorové domény. Zatím nebyl objeven případ, ve kterém by byla PAS doména vložena do efektorové domény. Protein nemusí vždy obsahovat jen jednu nebo dvě PAS domény, ale může obsahovat až šest PAS domén, což mu umožňuje lepší citlivost k daným signálům. Pokud má protein více jak jednu PAS doménu, nemusí se vždy nacházet vedle sebe, mohou být odděleny nějakou jinou doménou nebo více doménami (Vreede 2003; Möglich *et al.* 2009).

První GAF domény byly nalezeny u bakterie *Mycobacterium tuberculosis* v senzorkých doménách DosS a DosT. Název GAF senzorkých domén byl poskládán z počátečních písmen těchto molekul cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases, FhlA. GAF jsou cGMP (3',5'-cyklický guanosin monofosfát) vazebné domény. PAS a GAF domény si jsou evolučně velice blízké (Ho *et al.* 2000). GAF domény se skládají ze šesti antiparalelně poskládaných  $\beta$ -listů, které se svým uspořádáním podobají uspořádání pěti antiparalelním  $\beta$ -listů v PAS doménách. Také GAF domény mají po stranách centrálního jádra N- a C-koncové úseky lemující centrum proteinu. Stejně jako u PAS domén, může protein obsahovat víc GAF domén, které často bývají naskládány v řadě za sebou v cytoplazmatických histidin kinázových senzorech (Möglich *et al.* 2009; Cheung *et al.* 2010).



**Obr. 3:** Na obrázku A se nachází strukturní znázornění PAS domény NifL proteinu u bakterie *Azotobacter vinelandii*, na obrázku B se nachází topologický diagram této PAS domény. Jádrem této domény je tvořeno pěti antiparalelními  $\beta$ -listy označenými jako A $\beta$ , B $\beta$ , G $\beta$ , H $\beta$  a I $\beta$  (na obrázcích vyznačeny fialovou barvou), dále jsou součástí PAS domény čtyři  $\alpha$ -šroubovice označené jako C $\alpha$ , D $\alpha$ , E $\alpha$  a F $\alpha$ , které obklopují centrální  $\beta$ -listy (na obrázcích vyznačeny hnědou barvou). Bílou barvou je vyznačen N- a C-konec, které slouží jako prodlužující úseky. Převzato z (Möglich *et al.* 2009).

## 2.2.2 Příklady dvoukomponentových systémů

V této práci jsou podrobně popsány tři příklady dvoukomponentových systémů. Konkrétně byly vybrány PhoP/PhoQ dvoukomponentový systém, DcuS/DcuR dvoukomponentový systém a jako poslední CitA/CitB dvoukomponentový systém. Tyto tři dvoukomponentové systémy patří mezi jedny z nejprozkoumanějších regulačních systémů a zároveň obsahují PAS, PDC a GAF domény, které byly popsány v předešlé podkapitole 2.2.1.

### 2.2.2.1 PhoP/PhoQ dvoukomponentový systém

Na tomto systému byl zkoumán mechanismus dvoukomponentových systémů spojených s virulencí bakterií. U *Salmonella enterica* PhoP/PhoQ řídí některé fyziologické funkce, jako je přežití bakterie ve fagolysosomech makrofágů, a již zmíněnou virulenci bakterie. U této bakterie je PhoP/PhoQ systém propojen s dalšími dvoukomponentovými systémy a společně ovlivňují regulátory transkripce. V tomto důmyslně propojeném systému hraje PhoP/PhoQ systém důležitou roli při vazbě periplazmatických iontů, kterými jsou  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ . Skládá se z odpovídajícího

regulátoru PhoP a senzoricke domény (histidin kinázy) PhoQ. PhoQ je integrální protein se dvěma transmembránovými doménami nacházející se u gramnegativních bakterií ve vnitřní cytoplazmatické membráně. Reaguje na změnu koncentrace periplazmatických iontů. Strukturálním rysem PhoQ senzoroové domény je, že jedna strana jeho povrchu je plochá a vysoce negativně nabitá. Tuto negativně nabitou část využívá k vazbě  $\text{Ca}^{2+}$  nebo  $\text{Mg}^{2+}$ , které fungují jako ligand a vyvolávají konformační změny, které ovlivňují kinázovou nebo fosfatázovou činnost histidin kinázy (Waldburger *et al.* 1996; Beier *et al.* 2006; Cho *et al.* 2006; Choi *et al.* 2009). Inaktivace tohoto regulátoru vede k útlumu virulence v organismu, k neschopnosti bakterie přežít v makrofázích a ke zvýšené náchylnosti k zabíjení antimikrobiálními peptidy (Beier *et al.* 2006). Systém je aktivní v médiu s nízkou koncentrací dvojmocných kationtů (např.  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ ), naopak v médiu s vysokou koncentrací těchto kovů je jeho aktivita potlačována. Dále je PhoP/PhoQ systém citlivý na pH nižší než 5,5 a reaguje i na vysokou koncentraci antimikrobiálních peptidů produkovaných hostitelskými buňkami.

Ke zvýšení koncentrace antimikrobiálních peptidů dochází při fagocytóze bakterií makrofágy (Cho *et al.* 2006; Mascher *et al.* 2006). Mnohobuněčné organismy se brání napadení těmito bakteriemi pomocí kationických a anionických antimikrobiálních peptidů. Anionické antimikrobiální peptidy jsou malé, mají záporný náboj a pro svoji baktericidní aktivitu vyžadují zinek. Tyto antimikrobiální peptidy byly objeveny v játrech, tenkém střevě, plicích a v krevním séru. Kationické antimikrobiální peptidy jsou peptidy o velikosti menší než 50 aminokyselin a mají pozitivní náboj. Díky svému náboji se mohou vázat na bakteriální membrány, které mají náboj opačný. Po navázání antimikrobiálních peptidů na povrch, dojde k jejich proniknutí do buněk a následně dojde k jejich usmrcení. Smrt buňky nastane v důsledku narušení syntézy DNA a RNA a v důsledku narušení bakteriální membrány. Bakteriální membrána obsahuje velké množství negativně nabitých fosfolipidů, díky nimž je bakteriální buňka neomylně rozpoznána antimikrobiálními peptidy od hostitelské. Bakterie odolné vůči antimikrobiálním peptidům získávají svoji rezistenci úpravou povrchu buněk a to zejména úpravou lipidů a lipopolysacharidů, které provádí PhoP/PhoQ systém. (Heidari *et al.* 2002; Reddy *et al.* 2004; Bader *et al.* 2005; Mascher *et al.* 2006).

Růst salmonely v prostředí s nízkou koncentrací  $\text{Mg}^{2+}$  je umožněn aktivovanou formou odpovídajícího regulátoru PhoP, který řídí expresi *mgtA* a *mgtB* genů, které kódují přenašeče pro  $\text{Mg}^{2+}$ . V kyselém prostředí dochází k expresi *pagA*, *phoN* a *pmrD*



genů, které jsou regulovány PhoP proteinem a je tak umožněno salmonelle růst i v nízkém pH. Dvoukomponentový systém PhoP/PhoQ je schopen kromě předešlých genů ovládat aktivitu některých dalších regulátorů např. RstA/RstB dvoukomponentový systém, který se skládá z RstA odpovídajícího regulátoru a RstB senzoru. Fosforylovaný PhoP regulátor ovlivňuje expresi genu *rstA*, který kóduje RstA regulátor. RstA podporuje transkripci *feoB* genu, který kóduje FeoB přenašeč železnatých iontů a tím napomáhá salmonelle růst v kyselém prostředí s nízkou koncentrací železa (Choi *et al.* 2009).

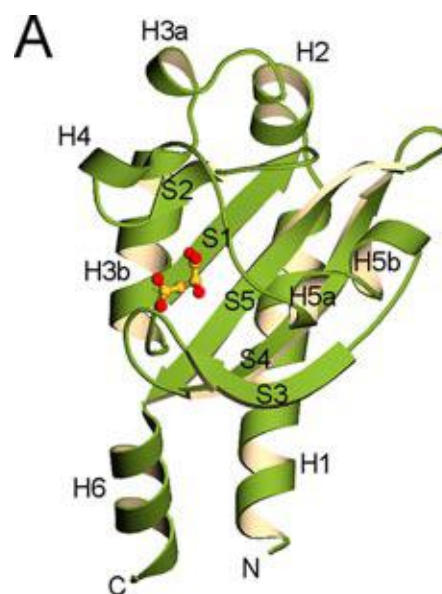
#### **2.2.2.2 DcuS/DcuR dvoukomponentový systém**

Dalším příkladem je DcuS/DcuR dvoukomponentový systém, který se podílí na regulaci anaerobní fumarátové respirační dráhy u *Escherichia coli* (Cheung *et al.* 2008b). DcuS patří do rodiny CitA senzorů, které jsou specifické pro registraci koncentrace dikarboxylových a trikarboxylových kyselin, mezi které patří například fumarát, sukcinát, malát nebo vinan (Pappalardo 2003; Cheung *et al.* 2008b). Periplazmatická sensorická DcuS doména u *Escherichia coli* a DctB u *Vibrio cholerae* se podílejí na regulaci transportu karboxylových kyselin a na jejich metabolismu (Cheung *et al.* 2008b). DcuS/DcuR dvoukomponentový systém stimuluje expresi genů, které kódují přenašeče pro extracelulární karboxylové kyseliny a dále kódují enzymy nezbytné pro katabolismus těchto kyselin. Jedním z hlavních genů, které DcuS/DcuR systém ovlivňuje, je *dcuB* gen, který kóduje DcuB přenašeč karboxylových kyselin. Gen *dcuB* je transkripčně aktivován fosforylací DcuR odpovídajícího regulátoru, který se fosforyluje v přítomnosti karboxylových kyselin (Kneuper 2005).

DcuS je transmembránový protein, který má periplazmaticky uspořádané sensorické domény. Periplazmatická doména DcuS je složená ze 140 aminokyselin. Tato periplazmatická doména je vložena mezi dvě hydrofobní transmembránové šroubovice DcuS proteinu. Dále obsahuje cytoplazmatické části, jako jsou coiled coil domény, PAS domény a histidin kinázové domény. Struktura periplazmatické domény DcuS je známá, ale mechanismus vazby karboxylových kyselin je stále nejasný, přestože je známo, že vazba karboxylových kyselin je zprostředkována vodíkovými můstky (Kneuper 2005; Cheung *et al.* 2008b). K vazbě karboxylových kyselin dochází na N-konci periplazmatické vstupní domény. DcuR protein obsahuje na N-konci přijímací doménu a na C-konci má výstupní doménu, která obsahuje DNA vazebný motiv „helix-turn-helix“, což odpovídá typické skladbě odpovídajícího regulátoru

(Golby *et al.* 1999). DcuS se v úseku od 42. do 181. aminokyseliny skládá ze smíšené  $\alpha/\beta$ -struktury obsahující centrální  $\beta$ -list lemovaný po obou stranách  $\alpha$ -helixy (Obr. 4). Centrální  $\beta$ -list se skládá z antiparalelně uspořádaných  $\beta$ -listů označovaných S1 až S5, dále se zde nachází několik  $\alpha$ -helixů, které jsou označovány jako H1 až H6. Na N-konci se nachází helixy H1, H2, H3a a H3b, na ně navazuje centrální jádro proteinu tvořené S1 až S5  $\beta$ -listy, kdy mezi S2 a S3 jsou vloženy H4, H5a a H5b a na C-konci se nachází poslední H6 helix (Cheung *et al.* 2008b).

Mezi dvoukomponentové systémy regulující transport karboxylových kyselin patří i DctB/DctD dvoukomponentový systém, který se nachází v bakterii *Rhizobium leguminosarum*. DctB je stejně jako DcuS transmembránový kinázový senzor, který je citlivý na přítomnost dikarboxylových kyselin jako je sukcinát. Periplazmatická senzorová doména se skládá přibližně z 270 aminokyselin, což je téměř dvakrát více než u periplazmatické senzorové domény DcuS. Odpovídající regulátor DctD řídí expresi dikarboxylátového DctA transportéru.



**Obr. 4:** Strukturní model DcuS. Převzato z (Cheung *et al.* 2008b)

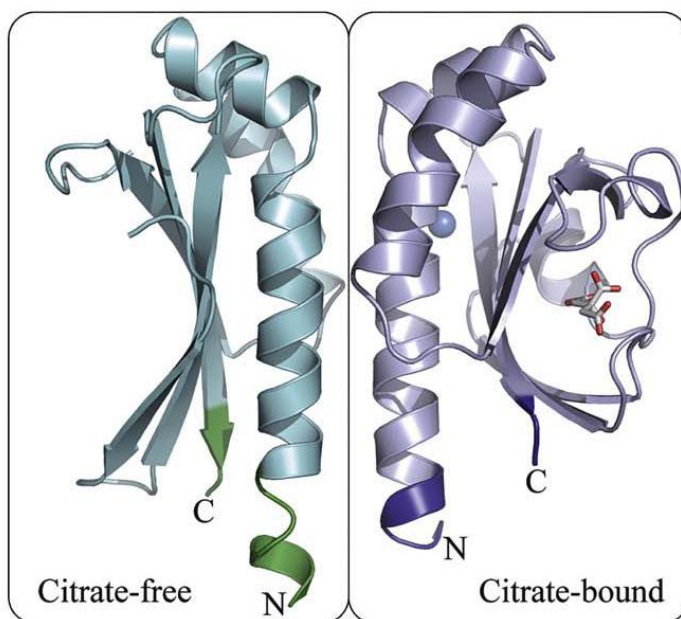
### 2.2.2.3 CitA/CitB dvoukomponentový systém

CitA/CitB dvoukomponentový systém u *Klebsiella pneumoniae* je důležitý pro indukci genů pro anaerobní katabolismus citrátu (Kaspar *et al.* 1999). Citrát je využíván za anaerobních podmínek jako jediný zdroj uhlíku a energie. Je katabolizován fermentací na acetát, formiát a oxid uhličitý (Meyer *et al.* 1997). CitA je membránově vázaný kinázový senzor, který se skládá z periplazmatické domény lemované dvěma

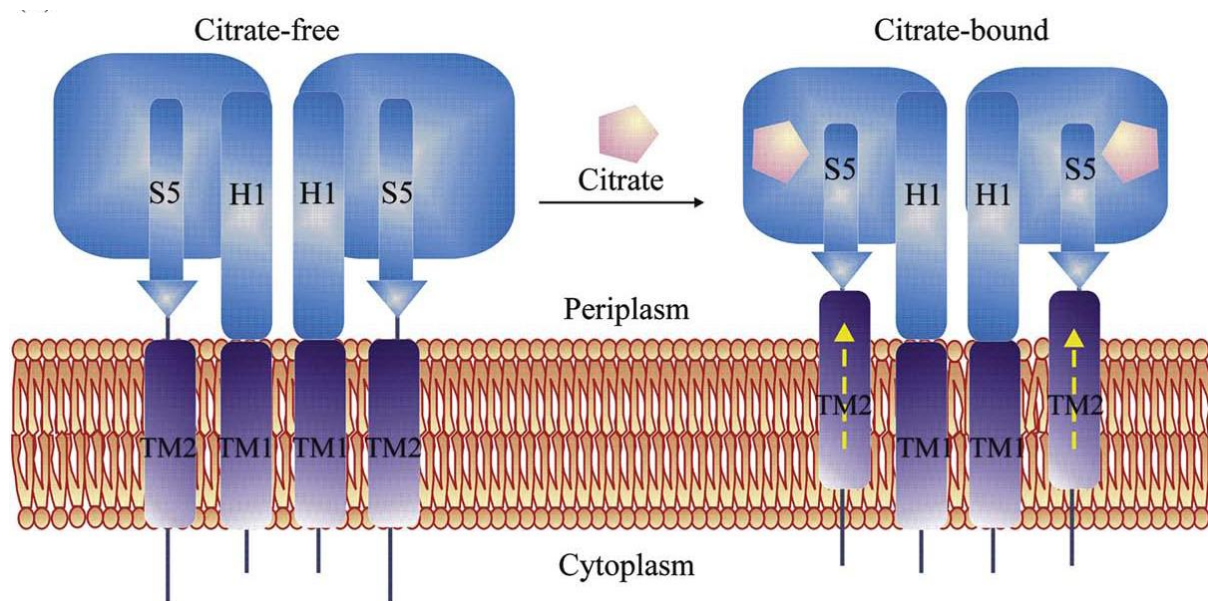
transmembránovými helixy, spojovací doménou a konzervovanou kinázou nebo přenašečovou doménou. Po navázání citrátu na CitA dochází k přenosu  $\gamma$ -fosfát z ATP na odpovídající regulátor CitB (Kaspar *et al.* 1999). Odpovídající regulátor CitB má typickou podobu odpovídajícího regulátoru. Má přijímací doménu na N-konci a efektorovou (zvanou též výstupní) doménu na C-konci (Meyer *et al.* 1997).

Protein příbuzný CitA z *Klebsiella pneumoniae* se nachází i u *Escherichia coli*. Stejně jako v *K. pneumoniae* se tento systém označuje jako CitA/CitB dvokomponentový systém. V *E. coli* funguje periplazmatická doména senzorké kinázy CitA jako vysokoafinní citrátový receptor. Dvoukomponentový systém CitA/CitB u *E. coli* reguluje expresi skupiny genů citCDEFXGT, která kóduje syntetázu citrát lyázy (citC). Tento enzym je nutný k přeměně enzymaticky neaktivní formy citrát lyázy na formu aktivní. Dále geny citCDEFXGT kódují tři podjednotky ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) citrát lyázy (citDEF), citrát lyáza katalyzuje štěpení citrátu na acetát a oxalacetát, který je následně přeměňován na sukcinát. Tyto geny dále kódují dva proteiny zřejmě zapojené do biosyntézy protetické skupiny citrát lyázy (citXG) a přenašeč (citT), který ovládá citrát/sukcinátový antiportr (Antranikian *et al.* 1982; Bott *et al.* 1994; Kaspar *et al.* 2002).

U CitA proteinu je známá změna konformace po navázání citrátu. Takto popsaných proteinů je velmi málo, proto je v této práci popsán podrobněji. Při navázání citrátu dochází ke konformační změně CitA proteinu, která se projeví ohnutím centrálního  $\beta$ -listu (Obr. 5). Vazba ligandu na periplazmatickou senzorkou doménu histidin kinázy (HK) má za následek strukturální změnu dimeru a následnou transautofosforylaci HK. V molekule s navázaným citrátem je konec  $\beta$ -listu vytažen směrem k vazebnému místu pro citrát, které váže ligand. To narušuje interakce mezi dvěma řetězci S4 a S5 a zároveň táhne C-konec nahoru od membrány. Změny jsou přenášeny přímo na transmembránové TM2 šroubovice, což způsobuje okamžitý přenos informace o vazbě ligandu do konformační změny proteinu a jak je uvedeno výše, dojde k transautofosforylaci HK (Sevvana *et al.* 2008).



**Obr. 5:** Strukturální model PAS domény monomeru CitA proteinu bez citrátu (vlevo) a s navázaným citrátem (vpravo). Převzato z (Sevvana *et al.* 2008).



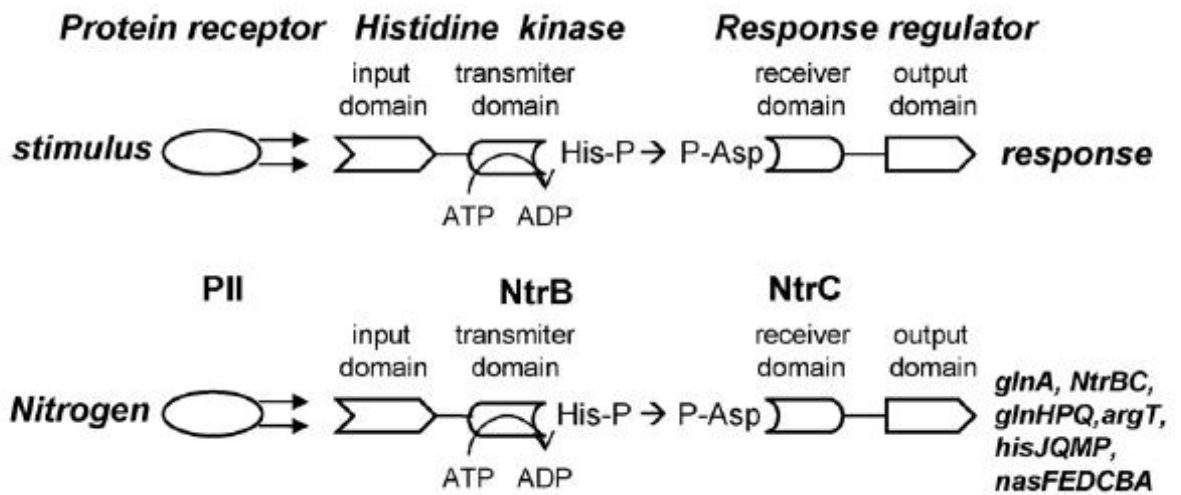
**Obr. 6:** Periplazmatická PAS doména CitA proteinu, s transmembránovými helixy (TM) a její model mechanismu vytažení TM2 šroubovice z membrány po navázání citrátu do vazebného místa. Vlevo stav bez citrátu, vpravo s navázaným citrátem. Po navázání citrátu dojde ke konformační změně (povytažení TM2) a k přenosu signálu přes membránu do cytoplazmy. Převzato z (Sevvana *et al.* 2008).

### 2.3 Tříkomponentové systémy

Tříkomponentový senzor zahrnuje typické součásti bakteriálního dvoukomponentového systému histidin kinázu a odpovídající regulátor a navíc receptor, který se u dvoukomponentových systémů nevyskytuje. Na tento receptor je lokalizován v membráně a naváže se na něj sloučenina (ligand) z vnějšího prostředí (v uvedeném příkladu jsou sloučeninami ATP,  $\alpha$ -ketoglutarát nebo glutamát, viz níže) a následně dojde k aktivaci receptoru. Po jeho aktivaci moduluje činnost histidin kinázy (Li *et al.* 2007).

Jako příklad tříkomponentového systému jsem vybrala NtrB/NtrC systém. NtrB je cytoplazmatický protein, který nemá membránovou kotvu. Membránová kotva obvykle připojuje protein k membráně kovalentní vazbou. Nejčastěji jsou proteiny připojovány GPI kotvou (glykofosfatidylinositol), tato kotva však u NtrB chybí. NtrB/NtrC systém zahrnuje receptor P<sub>II</sub> a dvoukomponentový regulační systém složený z histidin proteinkinázy NtrB a odpovídajícího regulátoru NtrC. P<sub>II</sub> je trimer, který může vázat ATP,  $\alpha$ -ketoglutarát a glutamát. Vazbou jednoho z těchto tří ligandů, dojde ke stimulaci P<sub>II</sub> proteinu a k následné vazbě P<sub>II</sub> na NtrB protein, čímž dojde k ovlivnění NtrB fosfotransferázové aktivity. Při nedostatku dusíku vyvolává  $\alpha$ -ketoglutarát konformační změnu v P<sub>II</sub>, vzniká optimální konformace pro uridylyaci. P<sub>II</sub> je uridylován na Tyr-51 uridyl transferázou, vzniká P<sub>II</sub>-UMP (UMP – uridine monophosphate). Při dostatku dusíku váže glutamát, který inhibuje uridylyaci. N-terminální doména NtrB působí jako receptor pro P<sub>II</sub>. NtrB protein poté fosforyluje NtrC protein při nedostatku dusíku, ale může také fungovat jako fosfatáza a NtrC defosforylovat při nízké hladině dusíku. NtrB katalyzuje fosforylaci a následně aktivuje odpovídající regulátor NtrC (Obr. 7) (Merrick *et al.* 1995; Zhang *et al.* 2005; Marijuán *et al.* 2010).

Odpovídající regulátor NtrC je dimerický protein, obsahující domény vázající faktor  $\sigma^{54}$ . NtrC působí jako transkripční faktor pro *nifA*, *glnA* a další operony podílející se na fixaci a asimilaci dusíku (Zhang *et al.* 2005).



**Obr. 7:** Příkladem tříkomponentového systému na obrázku je systém regulace dusíku u *Enterobacteriaceae*, Ntr systém. Zahrnuje receptor P<sub>II</sub> a dvoukomponentový regulační systém složený z histidin protein-kinázy NtrB a odpovídajícího regulátoru NtrC. Převzato z (Marijuán *et al.* 2010).

### 3 Metody výzkumu dvoukomponentových systémů

Metody pro analýzu dvoukomponentových systémů byly původně vyvinuty v 80. letech 20. století ke studiu asimilace dusíku u bakterie *Escherichia coli* a ke studiu chemotaxe u bakterií *Escherichia coli* a *Salmonella enterica*. V posledních třiceti letech bylo vyvinuto a zdokonaleno mnoho nových metod. Dnešní metody pro analýzu dvoukomponentových systémů se používají hlavně pro sledování fosforylace a defosforylace proteinů s využitím radioaktivních i neradioaktivních metod, fluorescenční metody sloužící k určení lokalizace dvoukomponentových systémů v buňce a analýza bioinformatických databází dvoukomponentových systémů (Scharf 2010).

#### 3.1 Fosforylace proteinů dvoukomponentových systémů radioaktivně značeným [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP

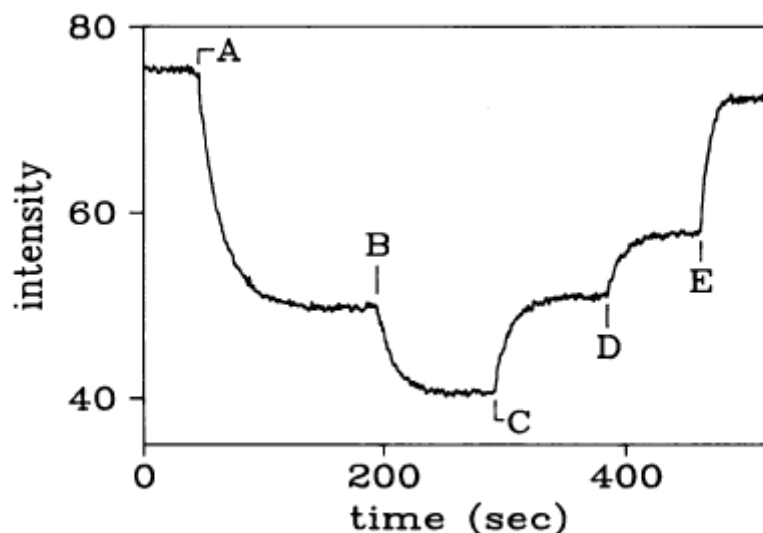
Fosforylace proteinů pomocí radioaktivně značeného ATP je jednou z nejdůležitějších metod výzkumu TCS (two-component signal transduction system). Při této metodě se využívá směsi, která je připravována smícháním neradioaktivního ATP a radioaktivně značeného ATP. Tato směs se smíchává s purifikovanou histidin kinázou, která má zachovanou schopnost autofosforylace histidinového zbytku. Pokud je zároveň zrovna přítomen purifikovaný odpovídající regulátor, který má schopnost autofosforylace, dojde k přenosu radioaktivní fosfátové skupiny ze zbytku histidinu histidin kinázy, na aspartátový zbytek odpovídajícího regulátoru. Poté se proteiny rozdělí pomocí SDS elektroforézy a stanoví se množství fosforylovaných proteinů pomocí autoradiografické analýzy (Noriega *et al.* 2008; Scharf 2010).

Fosforylace proteinů je závislá na mnoha různých faktorech, mezi tyto faktory patří například pH. Kromě pH jsou histidin kinázy závislé například i na koncentraci ATP (adenosintrifosfát) v roztoku. Histidin kinázy různých dvoukomponentových systémů mají různou afinitu k ATP, lze to pozorovat i na příkladu CheA proteinu (Noriega *et al.* 2008). Dále je pro autofosforylaci histidin kinázy nezbytná přítomnost sodných iontů. Pro fosforylaci a defosforylaci odpovídajících regulátorů jsou nezbytné dvojmocné ionty, například hořečnaté či manganaté (Scharf 2010).

## 3.2 Specializované fosforylační testy

### 3.2.1 Sledování fosforylačních reakcí dvoukomponentových systémů bez použití radioaktivního fosforu

Existuje několik různých metod a postupů sledování fosforylace bez použití [ $^{32}\text{P}$ ]. Příkladem je sledování fosforylace CheY proteinu, který má jeden tryptofan Trp-58 v blízkosti místa fosforylace Asp-57. Je zde využito fluorescence tryptofanu, kdy je použit jako sonda, která registruje fosforylaci CheY. V případě přítomnosti  $\text{Mg}^{2+}$ , acetyl fosfátu, karbamoyl fosfátu a fosforamidátu (amidofosforitanového anionu  $(\text{NH}_2\text{PO}_3)^{2-}$ ) dochází ke zhášení fluorescence. Acetyl fosfát, fosforyluje protein CheY a dojde k poklesu fluorescence tryptofanu. Přidáním CheZ lze zhášení naopak zcela zastavit, protože se fosfát uvolní z CheY proteinu a naváže se na CheZ protein. Přidáváním CheZ se zvýší uvolňování fosfátu z CheY a dojde k postupnému navýšení intenzity fluorescence (Obr. 8) (Lucat *et al.* 1992). Nevýhoda této metody spočívá v jejím omezení pouze pro odpovídající regulátory nesoucí tryptofan v aktivním místě. (Scharf 2010).



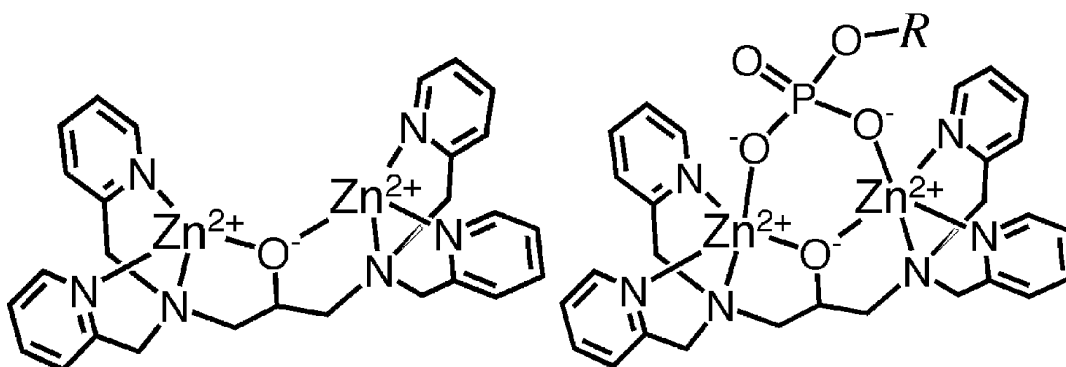
**Obr. 8:** Zobrazení intenzity fluorescence tryptofanu CheY proteinu jako funkce času sledování fosforylace CheY. Excitační vlnová délka byla 295 nm a intenzita fluorescence byla sledována při 346 nm. Reakce probíhala za stálé teploty 20°C ve 100 mM Tris·HCl (pH 7), před zahájením pokusu byly do roztoku přidány 4  $\mu\text{M}$  CheY a 8,8 mM  $\text{MgCl}_2$ . Následně byl pokus odstartován v bodě A a byl přidáván acetyl fosfát jako zhášedlo v různých koncentracích. V bodě A je vidět moment přidání 1,2 mM acetyl fosfátu, v bodě B bylo přidáno 2,4 mM acetyl fosfátu, v důsledku zhášecí reakce lze pozorovat pokles křivky. V bodě C už nebylo přidáváno zhášedlo, ale CheZ v koncentraci 26 nM, v bodě D 39 nM CheZ a v bodě E 92 nM CheZ. Od prvního přidání CheZ v bodě C lze pozorovat nárůst intenzity fluorescence až k ustálení po posledním přidání v bodě E, kdy je původní a znovudosažená intenzita fluorescence téměř identická (Lucat *et al.* 1992).



### 3.2.2 Technologie „Fosfo-tag“

Pod názvem fosfo-tag se ukrývá komplexní sloučenina, která ve své struktuře obsahuje dva dvojmocné kationty ( $Zn^{2+}$  nebo  $Mn^{2+}$ ). Oba kationty jsou od sebe vzdáleny 3-4 Å. Obecně se pro tuto sloučeninu používá komerční název „fosfo-tag“, jde o 1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-olato dizinečnatý komplex s celkovým nábojem +3. Jak je uvedeno výše, dvojmocný kation zinku může být v této sloučenině nahrazen dvěma molekulami dvojmocného manganu. Na obr. 9 vlevo je strukturní vzorec „fosfo-tag“ molekuly, která má vazebné místo mezi zinečnatými anionty volné a vpravo je tatáž molekula, ale s navázaným fosfátem. U „fosfo-tag“ byla prokázána jeho selektivní interakce s fosforylovanými peptidy nebo proteiny obsahující fosfoserinové, fosfothreoninové, fosfotyrosinové a fosfohistidinové zbytky (Kinoshita *et al.* 2004; Kinoshita 2005; Barbieri *et al.* 2008).

Molekula fosfo-tag je dnes hojně využívána ve spojení s dalšími metodami výzkumu membránových struktur. Může být spojena s fluorescenční sondou, dále využita v chromatografii, gelové elektroforéze nebo v imunoblotovacích metodách (např. Western blot). Tato metoda je všestranně využitelná sledování fosforylace odpovídajících regulátorů, protože nevyžaduje žádnou specifickou proteinovou strukturu (primární, sekundární nebo terciární) (Barbieri *et al.* 2008). Tyto metody využívající „fosfo-tag“ jsou podrobně popsány v pracovních protokolech, které jsou dostupné na internetových stránkách <http://www.phos-tag.com>.



**Obr. 9:** Strukturní vzorec molekuly fosfo-tag s volným vazebným místem (vlevo), strukturní vzorec fosfo.tag molekuly s navázaným fosfátem ve vazebném místě (vpravo). Sumární vzorec molekuly fosfo-tag [ $C_{27}H_{29}N_6OZn_2$ ] $^{3+}$ . Převzato z (Kinoshita *et al.* 2004).

### 3.3 Další fluorescenční metody

Fluorescence se využívá k pozorování a studování různých proteinů, včetně proteinů dvoukomponentových systémů. Například chemotaktické proteiny u *E.coli* byly studovány pomocí fúze s fluorescenčními proteiny. Nejčastěji využívaný zelený fluorescenční protein (GFP) se používá ke studiu lokalizace, struktury a dynamiky bílkovin u jednobuněčných organismů a také u jednobuněčných a mnohobuněčných eukaryot (viz níže kapitola 3.3.1.). Dále se využívají jeho varianty: žlutý fluorescenční protein (YFP) nebo modrozelený fluorescenční protein (CFP). Metodou využívající fluorescenci je metoda FRET (fluorescence resonance energy transfer) pro měření proteinových interakcí, který se hojně využívá k měření vzdáleností mezi dvěma fluoreskujícími molekulami (Scharf 2010).

#### 3.3.1 Zelený fluorescenční protein (GFP)

Zelený fluorescenční protein (GFP) je fluorescenční molekula pocházející z medúzy *Aequorea victoria*. Jako první ho v roce 1961 izoloval japonský vědec Shimomura, za tento objev mu byla v roce 2008 udělena Nobelova cena. GFP je protein sestávající se z 238 aminokyselin uspořádaných do struktury rigidního  $\beta$ -soudku z 11  $\beta$ -listů. Uvnitř toho  $\beta$ -soudku se nachází chromofor, který má ve své struktuře sekvenci tří aminokyselin zodpovědnou za fluorescenci. Chromofor je díky pevné struktuře  $\beta$ -soudku chráněn před vnějším prostředím. Díky tomuto umístění chromoforu je GFP protein velice stabilní, dokáže odolat i mírným denaturačním činidlům (Hebshi *et al.* 2007).

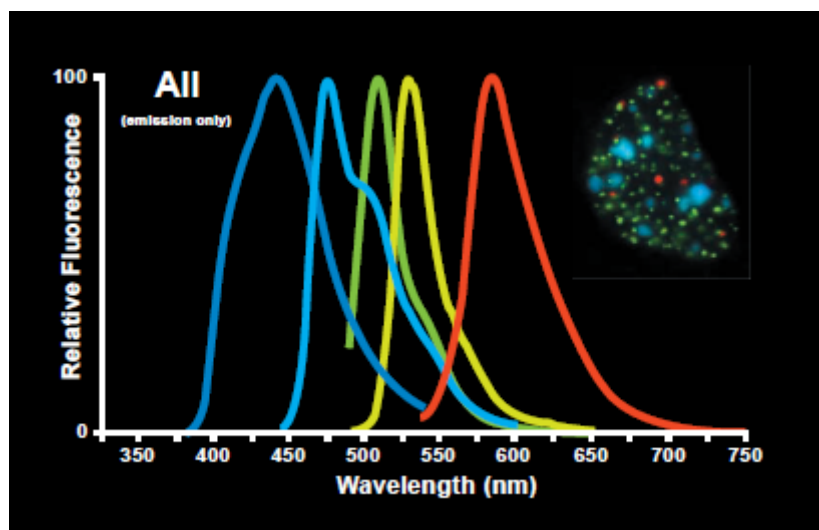
GFP má excitační maximum na vlnové délce 395 nm s vedlejším excitačním vrcholem na 475 nm. Emisní maximum má na 509 nm s vedlejším vrcholem na 540 nm, což je oblast zeleného viditelného světla. K vytvoření fluoroforu, do kterých byl protein importován, potřebuje GFP kyslík, nepotřebuje protein aequorin jako je tomu v těle medúzy, u které byl poprvé objeven (Hebshi *et al.* 2007).

Protein značený GFP proteinem se do buněk savců nebo do celých organismů může dostat pomocí plasmidové transfekce nebo virovou infekcí. Gen pro GFP je poměrně malý (714 bp), může se tedy snadno integrovat do expresních vektorů, aniž by významně zvýšil velikost vektoru. GFP se dále využívá k značení transgenických zvířat, např. savců, není pro ně totiž toxický a jejich orgány nebo celé organismy s proteinem značeným GFP lze pozorovat pod UV nebo modrým světlem. GFP se běžně využívá při

FRET (fluorescence resonance energy transfer), díky této technice se dají studovat konformační změny proteinů nebo interakce mezi dvěma proteiny (Hebshi *et al.* 2007).

Mutagenézí a genetickými manipulacemi GFP byly vytvořeny různé varianty GFP, které jsou vhodnější k fluorescenční mikroskopii, než divoký typ GFP. Zelená variant GFP byla nejvíce využívána *in vivo* jako reportér, díky své odolnosti proti vybělení a vysokému kvantovému výtěžku. Nejnáchylnější k vybělení je žlutý fluorescenční protein (YFP), k jeho vybělení dochází díky vysoké absorpci. Zelenomodrý fluorescenční protein (CFP) má naopak nízkou absorpci. Dále bylo spektrum barev rozšířeno o další zelené, azurové a modré proteiny, nejnovějším objeveným proteinem je červeně fluoreskující protein DsRed pocházející ze sasanky *Discosoma striata*, který má s GFP proteinem 25 % shodných sekvencí (Patterson *et al.* 2001).

Výzkum dvoukomponentových systémů těmito proteiny byl poprvé vyzkoušen na chemotaktickém aparátu bakterie *E. coli*, konkrétně byl využit YFP. YFP byl v pokusu sfúzován s chemotaktickými proteiny CheY, CheZ, CheA a FliM. Následně byla s jeho pomocí určena lokalizace daných proteinů. Shrnutí v (Sourjik *et al.* 2002).



**Obr. 10:** Tento graf znázorňuje emisní spektra fluorescenčních proteinů. Pořadí spekter zleva doprava odpovídá pořadí názvů v levém sloupci Tabulky 1. Převzato z (Patterson *et al.* 2001).

	Residue changes	Extinction coefficient ( $M^{-1} cm^{-1}$ )	Quantum yield (%)	Excitation peak (nm)	Emission peak (nm)	pH dependence (EC50)	Bleaching time (relative)
EBFP	F64L, Y66H, Y145F	31,000	25	383	445	5.8	3
ECFP	S65A, Y66W, S72A, N146I, M153T, V163A	26,000	40	434	477	4.7	85
EGFP	F64L, S65T	55,000	60	489	508	5.9	100
EYFP	S65G, V68L, S72A, T203Y	84,000	61	514	527	6.5	35
dsRed		72,500	68	558	583	4.3	145

**Tabulka 1:** Tabulka vlastností různých fluorescenčních proteinů. Převzato z (Patterson *et al.* 2001).

### 3.3.2 Metoda FRET

FRET (Fluorescence resonance energy transfer) je technika, která se využívá k měření interakcí mezi dvěma molekulami (např. proteiny) označenými dvěma různými fluorofory donorem a akceptorem. Mezi excitovaným donorem a akceptorem v základním stavu dochází k rezonančnímu přenosu energie, nedochází mezi nimi k přenosu fotonu. FRET se používá ke studiu struktury a dynamiky biomolekul. Z výsledků lze získat informace o vzdálenostech mezi proteiny v řádech 10 až 100 Å (Wu *et al.* 1994; Berney *et al.* 2003; Piston *et al.* 2007)

FRET je elektrodynamický jev, ke kterému dochází mezi donorem v excitovaném stavu a akceptorem ve stavu neexcitovaném (základním). Akceptor nemusí mít schopnost fluorescence, ale je důležité, aby se překrývalo emisní spektrum donoru a absorpční spektrum akceptoru. Překrytí spekter může být popsáno tzv. Försterovou vzdáleností v následující rovnici:

$$k_T(r) = 1/\tau_D \cdot (R_0/r)^6$$

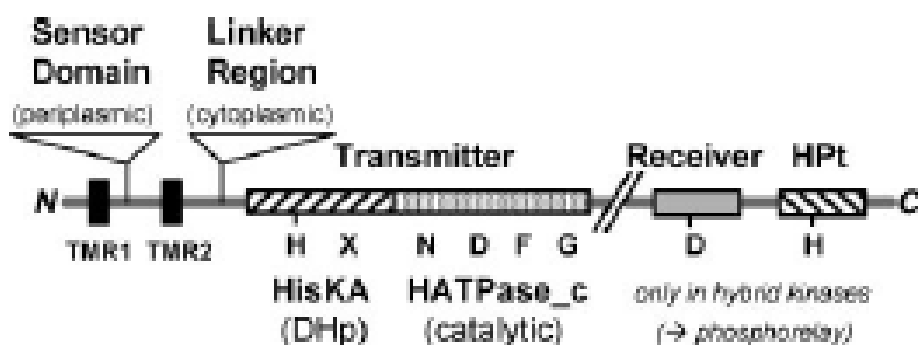
kde  $R_0$  je Försterova vzdálenost,  $k_T(r)$  rychlost přenosu energie,  $r$  představuje vzdálenost mezi donorem a akceptorem,  $\tau_D$  je doba existence donora bez přenosu energie. Rychlost přenosu energie závisí na rozsahu spektrálního překrytí emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru a na vzdálenosti mezi donorem a akceptorem. Mezi donorem a akceptorem působí dipól-dipólové interakce, orientace dipólu také ovlivňuje rychlost přenosu energie. Při použití FRET je dobré znát i jeho účinnost přenosu energie. Účinnost přenosu energie je podíl absorbovaných fotonů donorem, které jsou ve formě rezonanční energie přeneseny na akceptor. Tato účinnost se měří pomocí relativní intenzity fluorescence donora (Lakowicz 2006a; Lakowicz 2006b).

K měření FRET se používají dva různé postupy. Prvním je měření emise akceptoru, kdy dochází k excitaci donoru a k následné detekci emitovaného světla akceptoru. Když dojde k přenosu energie, emise donoru se sníží a naopak emise z akceptoru se zvýší. Druhým postupem je cílené vybělení akceptoru (photobleaching) (Berney *et al.* 2003).

## 4 Stavba senzoričkých domén dvoukomponentových systémů

### 4.1 Extracelulární senzoričké domény

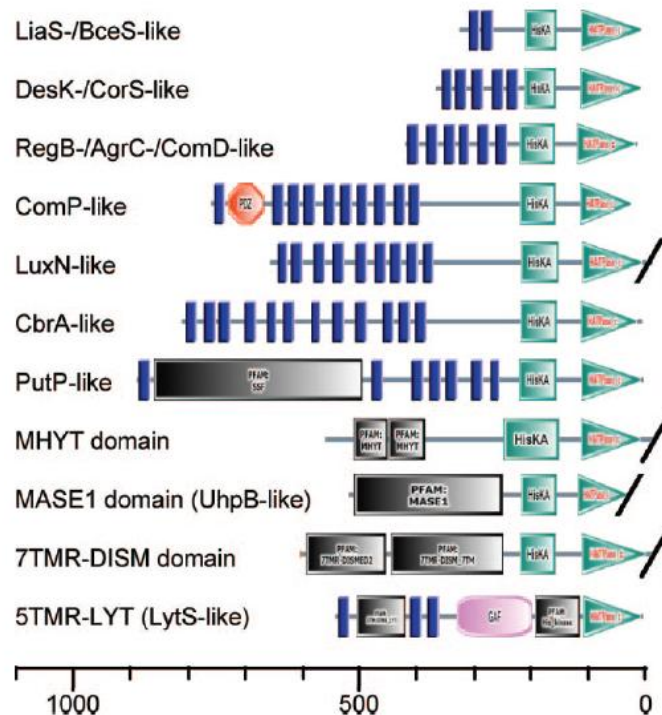
Extracelulární senzoričké domény se skládají ze dvou částí, kterými jsou N-koncová senzoričká periplazmatická doména, lemovaná po obou stranách dvěma transmembránovými regiony (TMR1 a TMR2), na které navazuje C-koncová přenašečová (transmitter) cytoplazmatická doména (Obr. 11). Přenašečová doména se skládá z H boxu, který obsahuje sekvence s konzervovanými histidinovými zbytky, které mohou být autofosforylovány a která končí vysoce konzervovanými kinázovými doménami. H box ještě navíc velmi často obsahuje X box, který je tvořen dvěma  $\alpha$ -helixy, ty slouží k dimerizaci domény (na obrázku značena jako DHp nebo HisKA doména). Dále přenašečová doména obsahuje katalytickou doménu, která v sobě obsahuje konzervované motivy, N, D, F, a G boxy, které mají ve své sekvenci konzervované aminokyselinové zbytky (na obrázku je tato doména značena HATPase). Tyto boxy ovlivňují vazbu ATP a pravděpodobně také katalýzu a přenos fosfátu na odpovídající regulátor. Katalytická doména sdílí strukturní homologii s ATP-vazebnými doménami typu topoisomeráz II (např. DNA gyráza B). Mezi TMR2 (transmembrane region) a přenašečovou doménou se může nacházet spojovací oblast „linker“ region, který může být také označován jako HAMP doména (Wolanin *et al.* 2002; Mascher *et al.* 2006). Tyto spojovací oblasti jsou důležité pro správný přenos signálu, dále se podílejí na vazbě kofaktorů, jako je FAD (flavin adenin dinukleotid). Spojovací oblasti mohou být rozděleny do několika skupin podle velikosti, menší než 40 aminokyselin, 60 – 80 aminokyselin a 130 – 170 aminokyselin a mohou mít analogickou strukturu s transkripčními faktory obsahujícími strukturu HTH (Fabret *et al.* 1999; Stock *et al.* 2000; Wolanin *et al.* 2002).



**Obr. 11:** Znáznornění stavby extracelulární senzoričké domény. Převzato z (Mascher *et al.* 2006).

## 4.2 Membránové senzory domény

U membránových senzorych domén jsou nejdůležitější součásti transmembránové helixy, které vnímají okolní podněty. N-koncová vstupní doména histidin kináz, které patří do této skupiny, se skládá z transmembránových regionů (TMR). Mezi TMR, které jsou složeny z helixů, se nachází nevýznamné spojovací části (linkery), nejspíš bez funkce. Podle stavby a počtu helixů je můžeme rozdělit do několika skupin (Obr. 12): 1) malé senzory kinázy se dvěma TMR postrádajícími významný cytoplasmatický linker (např. histidin kinázy v systémech LiaS/LiaF, BceS/BceR a další jim podobné); 2) DesK teplotní sensor v systému DesR/DesK a jemu podobné senzory se čtyřmi nebo pěti TMR, který registruje membránovou fluiditu; 3) sensor kinázy se šesti TMR (např. histidin kináza ze systému RegB/RegA a další podobné histidin kinázy); 4) histidin kinázy pro quorum-senzing se šesti až deseti TMR, které se nacházejí hlavně u grampozitivních bakterií (např. histidin kinázy v systémech AgrC/AgrA, ComD/ComE, ComP/ComA nebo LuxN/LuxQ a další histidin kinázy jim podobné), 5) histidin kinázy s dvanácti až dvaceti TMR (např. histidin kinázy CbrA/CbrB nebo PutP/PutA a další jim podobné) a 6) histidin kinázy s „neznámou konzervovanou“ vstupní doménou se šesti až osmi TMR (např. některé domény MHYT-, MASE1-, 7TMR-DISM- a 5TMR-LYT a další podobné domény) (Mascher *et al.* 2006).



**Obr. 12:** Stavba senzorych domén vestavěných do membrány. Modrými obdélníky jsou značeny transmembránové helixy, zeleně jsou znázorněny histidin kinázy a HATPasy (histidine kinase-type

ATPase catalytic domain), které jsou pro lepší znázornění dost zjednodušené. Převzato z (Mascher *et al.* 2006).

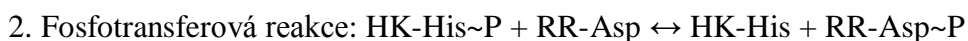
### 4.3 Cytoplazmatické senzoričké domény

Již z názvu je zřejmé, že cytoplazmatické senzoričké domény histidin kináz se nachází v cytoplazmě. Signál přijímají z cytoplazmy nebo z cytoplazmatické strany membrány. Všechny tyto histidin kinázy mají ve své struktuře zabudované PAS domény, některé mají navíc i GAF doménu. Senzoričké proteiny mohou být několika typů: 1) histidin kinázy ukotvené do membrány membránovou kotvou s volným cytoplazmatickým C-koncem nebo histidin kinázy ukotvené do membrány s volným cytoplazmatickým N-koncem (např. histidin kinázy v systémech KdpD/KdpE, ArcB/ArcA, FixL/FixJ a další histidin kinázy podobné těmto). Histidin kinázy patřící do první skupiny mají jako jediné ve své struktuře dva až čtyři TM helixy. Ostatní histidin kinázy patřící do druhé a třetí skupiny TM helixy nemají. 2) cytoplazmatické senzoričké proteiny asociované s integrálními membránovými proteiny (např. histidin kináza v systému CheA/CheY a této další podobné histidin kinázy); 3) histidin kinázy trvale lokalizované v cytoplazmě bez vazby na membránu (např. histidin kinázy v systémech NtrB/NtrC, KinA a další podobné histidin kinázy) (Mascher *et al.* 2006).

## 5 Mechanismus přenosu signálu u dvoukomponentových systémů

Typická HK obsahuje extracelulární senzorkou doménu, na jejímž N-konci se nachází úsek lemovaný dvěma transmembránovými helixy (TM1 a TM2) a dále intracelulární dimerizační doménu fosforylace histidinu (DHp) a C-koncovou doménu. Přijímací domény HK kináz (histidine kinase) a RR (response regulator) jsou vysoce konzervovány v pořadí nukleotidů a terciární struktuře, také základní mechanismy transdukce jsou zachovány (Zhang *et al.* 2010).

Propojení mezi senzorem a kinázovou doménou umožňuje těmto proteinům přenos signálu přes membránu do cytoplasmy, spouští navazující kaskádu, která zahrnuje autofosforylaci konzervovaného histidinového zbytku v rámci kinázové domény a následný přenos fosfátové skupiny na zbytek aspartátu na příslušném RR (Reinelt 2003). Mechanismus je popsán v následujících třech reakcích. Kaskáda začíná autofosforylační reakcí, kdy je odštěpen  $\gamma$ -fosfát z ATP a je navázán na histidinový zbytek na histidin kináze, následuje fosfotransferázová reakce a po ní defosforylační reakce. V defosforylační reakci dochází k uvolnění fosfátu v reakci hydrolyzy vody. Všechny tři reakce ke svému běhu nutně vyžadují dvojmocné kationty ( $Mg^{2+}$ ) (Stock *et al.* 2000).

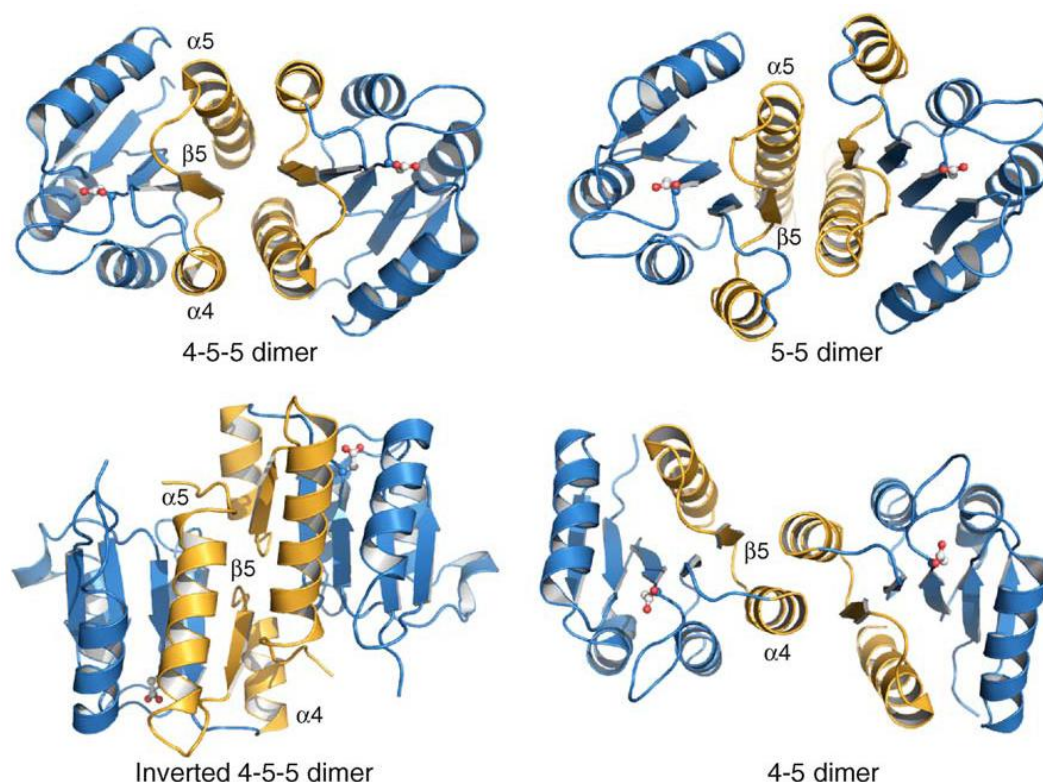


### 5.1 Přenos signálu u dvoukomponentových systémů

Přenos signálu je spuštěn fosforylací histidin kinázy  $\gamma$ -fosfátem pocházejícím z ATP. Fosforylaci zprostředkovává C-koncová katalytická doména, která váže ATP a fosforyluje histidin na dimeru histidin kinázové domény. Fosfát je poté přenesen z histidinu na aspartátový zbytek, který se nachází v přijímací doméně odpovídajícího regulátoru. Fosforylace odpovídajícího regulátoru vyvolá změny v jeho konformaci (Casino *et al.* 2010). Většina odpovídajících regulátorů obsahuje jen jednu DNA vazebnou doménu fungující jako efektorová doména. Efektorová doména řídí vazbu odpovídajícího regulátoru na DNA a může se aktivně zapojovat do jeho dimerizace. Fosforylací této domény dochází k dimerizaci přijímací domény odpovídajícího regulátoru a k následnému zvýšení vazby DNA k DNA vazebné doméně a k aktivaci transkripce DNA. Dimerizační doména se obvykle nachází v N-koncové přijímací



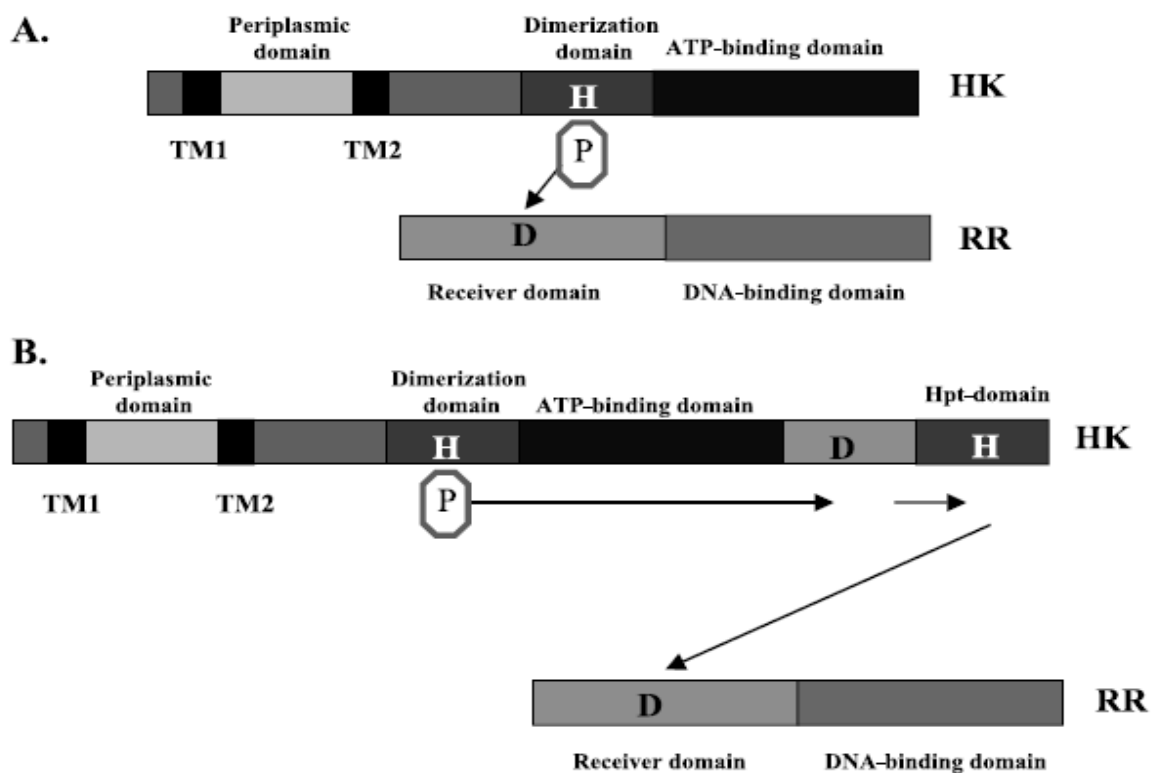
doméně a to v  $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$  oblasti (Obr. 13). Podle orientace  $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$  oblastí a povrchů zapojených do interakce lze určit stavbu a konformaci dimeru odpovídajícího regulátoru (Obr. 13). Nejčastěji se vyskytuje struktura, kdy je dimer vytvořen ze dvou podjednotek, které se dotýkají celou svojí oblastí  $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$  a jsou k sobě orientovány paralelně (Obr. 13 – dimer 4-5-5). Tento dimer je typický pro aktivované přijímací domény odpovídajících regulátorů OmpR nebo PhoB. Kromě toho typu dimerizace se vyskytují další tři typy dimerizace odpovídajících regulátorů. Tyto dimery mají mezi svými podjednotkami menší kontaktní plochy. Dále v sobě mají další šikmo umístěné sekundární strukturní prvky, jsou k sobě přiloženy antiparalelně a jejich dimerické podjednotky jsou obrácené (Obr. 13 – invertovaný 4-5-5 dimer). Dále se u některých systémů objevuje dimer  $\beta 5$ - $\alpha 5$ , lze ho najít u odpovídajícího regulátoru HupR (Obr. 13 – dimer 5-5). Poslední variantou dimerizace je  $\alpha 4$ - $\beta 5$  dimer, který se nachází u odpovídajícího regulátoru FixJ (Obr. 13 – dimer 4-5). Díky  $\alpha 5$  šroubovici jsou tyto struktury celkově velmi plastické, umožňuje jim vytvářet další stabilizující interakce s různými proteiny (Gao *et al.* 2009; Gao *et al.* 2010).



**Obr. 13:** Znárodnění různých způsobů dimerizace přijímacích domén odpovídajících regulátorů. Červeně jsou na obrázku vyznačeny aspartátové zbytky. Převzato z (Gao *et al.* 2010).

## 5.2 „Základní“ a složený (fosforelay) systém přenosu signálu

Základním systémem přenosu signálu je myšlen systém, který se skládá z membránově vázané histidin kinázy, která obsahuje senzorkou doménu, dva transmembránové helixy, dimerizační histidinovou doménu a katalytickou doménu pro ATP, a z odpovídajícího regulátoru, který obsahuje přijímací doménu a efektorovou doménu. Mechanismus přenosu signálu základního systému byl popsán v předešlých kapitolách, zde je popsán mechanismus složené dráhy, tzv. fosforelay systému (Casino *et al.* 2010). Složený systém bakterie nejčastěji využívají při řízení buněčného cyklu nebo sporulace. Tyto systémy byly nalezeny také u nižších eukaryot, např. u *Dictyostelium discoideum* z oddělení *Mycetozoa* (hlenky), a u rostlin, např. u *Arabidopsis thaliana* z oddělení *Magnoliophyta* (krytosemenné rostliny). Složený systém se od základního systému liší složitějším přenosem signálu s využitím dalších regulátorů a domén, které se nacházejí na témže proteinu. Histidin kináza obvykle obsahuje Hpt doménu (His-containing phosphotransfer domain) a REC doménu na obrázku je označena jako „D“ (receiver domain), která je podobná REC doméně odpovídajícího regulátoru. K přenosu signálu dochází postupnou fosforylací ve čtyřech krocích (Obr. 14b), z HK domény na REC doménu, následně je signál přenesen na Hpt doménu a poté na odpovídající regulátor (HK-REC-Hpt-RR), dochází tedy k přenosu fosfátu v pořadí His-Asp-His-Asp (Hoch 2000; Cotter 2003; Csikasz-Nagy *et al.* 2010). U některých patogenních prokaryot regulují virulenci, např. u *Bordetella pertusis*, nebo u eukaryotních kvasinek a hub, např. u *Candida albicans* nebo *Aspergillus fumigatus*, dále mohou ovlivňovat reakce na stres např. u *Bacillus subtilis*, kde regulují proces sporulace, nebo signalizaci cytokininů (Stephenson *et al.* 2002; Csikasz-Nagy *et al.* 2010). Studium signalizace složeného systému je velmi obtížné na rozdíl od studia základního přenosu signálu. K popsání těchto systémů je potřebná podrobná genetická a biochemická analýza. Je známo, že fosforylovaný histidin a aspartát mají ve složeném systému mnohem horší stabilitu, dalším problémem je složitý vývoj protilátek, které by umožnily fosfohistidinové a fosfoaspartátové značení. Tyto překážky stojí v cestě podrobnému studiu složitých systémů a také vývoji léků, proti virulentním bakteriím s těmito systémy (Thomason *et al.* 2000).



**Obr. 14:** Porovnání přenosu fosfátu z histidin kinázy na odpovídající regulátor mezi základním a složitějším systémem. Na prvním schématu (A) je základní systém, kdy je fosfát přenesen z histidinu histidin kinázy na aspartát odpovídajícího regulátoru. Tento systém je typický pro EnvZ/OmpR a PhoQ/PhoP dvoukomponentové systémy. Na druhém schématu (B) je znázorněn přenos fosfátu ve směru histidin-aspartát-histidin-aspartát. Tento systém je typický například pro BvgS/BvgA dvoukomponentový systém u *Bordetella pertussis*. Převzato z (Calva *et al.* 2006).

## 6 Závěr

Dvoukomponentové systémy jsou součástí signálních drah nejen u bakterií, ale i u nižších eukaryot a rostlin. Umožňují buňce vnímat změny v jejím nejbližším okolí a reagovat na ně. Reakcí na tyto okolní změny buňka dokáže ovlivňovat svoje fyziologické funkce, buněčný cyklus a některé biochemické dráhy. U bakterií jsou tyto systémy zapojeny i do regulace virulence či do mechanismu sporulace.

Přestože je řada dvoukomponentových systémů podrobně popsána a prostudována, stále je jich v porovnání se všemi existujícími systémy zanedbatelné množství. Nadále nejsou zodpovězeny některé otázky u základních systémů, například regulace v rámci jednotlivých cest. Především se čeká na odhalení některých vlastností složených systémů. U těchto složených systémů například stále chybí plné pochopení jejich regulačních schopností. Dále nebyla zcela popsána signalizace propojení mezi komponenty složeného systému. Studium složených systémů je velmi náročné a u většiny je k pochopení těchto systémů nutná rozsáhlá genetická a biochemická analýza. Přesto je popsání těchto systémů velmi důležité - vzhledem k tomu, že se tyto systémy nenacházejí u vyšších eukaryot, mohly by být základem pro vývoj nových léků.

U dvoukomponentových systémů je toho tedy ještě mnoho k jejich dokonalému pochopení, hlavně k pochopení jejich mechanismů a propojení jejich signalizace v různých fyziologických situacích.

## Seznam použité literatury

- Albanesi, D., M. Martin, F. Trajtenberg, M. C. Mansilla, A. Haouz, P. M. Alzari, D. de Mendoza and A. Buschiazzo (2009).** "Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(38): 16185-16190.
- Antranikian, G. and G. Gottschalk (1982).** "Copurification of Citrate Lyase and Citrate Lyase Ligase from *Rhodospseudomonas gelatinosa* and Subsequent Separation of the Two Enzymes." *European Journal of Biochemistry* 126(1): 43-47.
- Ayers, R. A. and K. Moffat (2008).** "Changes in Quaternary Structure in the Signaling Mechanisms of PAS Domains." *Biochemistry* 47: 12078-12086.
- Bader, M. W., S. Sanowar, M. E. Daley, A. R. Schneider, U. Cho, W. Xu, R. E. Klevit, H. Le Moual and S. I. Miller (2005).** "Recognition of Antimicrobial Peptides by a Bacterial Sensor Kinase." *Cell* 122(3): 461-472.
- Barbieri, C. and A. Stock (2008).** "Universally applicable methods for monitoring response regulator aspartate phosphorylation both in vitro and in vivo using Phos-tag-based reagents." *Analytical Biochemistry* 376(1): 73-82.
- Beier, D. and R. Gross (2006).** "Regulation of bacterial virulence by two-component systems." *Current Opinion in Microbiology* 9(2): 143-152.
- Berney, C. and G. Danuser (2003).** "FRET or No FRET: A Quantitative Comparison." *Biophysical Journal* 84(6): 3992-4010.
- Bott, M. and P. Dimroth (1994).** "Klebsiella pneumoniae genes for citrate lyase and citrate lyase ligase: localization, sequencing, and expression." *Molecular Microbiology* 14(2): 347-356.
- Cai, S. J. (2002).** "EnvZ-OmpR Interaction and Osmoregulation in *Escherichia coli*." *Journal of Biological Chemistry* 277(27): 24155-24161.
- Calogero, S., R. Gardan, P. Glaser, J. Schweizer, G. Rapoport and M. Debarbouille (1994).** "RocR, a Novel Regulatory Protein Controlling Arginine Utilization in *Bacillus subtilis*, Belongs to the NtrC/NifA Family of Transcriptional Activators." *Journal of Bacteriology* 176 (5): 1234-1241.
- Calva, E. and R. Oropeza (2006).** "Two-Component Signal Transduction Systems, Environmental Signals, and Virulence." *Microbial Ecology* 51(2): 166-176.
- Casino, P., V. Rubio and A. Marina (2010).** "The mechanism of signal transduction by two-component systems." *Current Opinion in Structural Biology* 20(6): 763-771.
- Cotter, P. (2003).** "Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*." *Trends in Microbiology* 11(8): 367-373.

- Csikasz-Nagy, A., L. Cardelli and O. S. Soyer (2010).** "Response dynamics of phosphorelays suggest their potential utility in cell signalling." *Journal of The Royal Society Interface* 8(57): 480-488.
- Fabret, C., V. A. Feher and J. A. Hoch (1999).** "Two-Component Signal Transduction in *Bacillus subtilis*: How One Organism Sees Its World." *Journal of Bacteriology* 181(7): 1975-1983.
- Gao, R. and A. M. Stock (2009).** "Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins." *Annual Review of Microbiology* 63(1): 133-154.
- Gao, R. and A. M. Stock (2010).** "Molecular strategies for phosphorylation-mediated regulation of response regulator activity." *Current Opinion in Microbiology* 13(2): 160-167.
- Golby, P., S. Davies, D. J. Kelly, J. R. Guest and S. C. Andrews (1999).** "Identification and Characterization of a Two-Component Sensor-Kinase and Response-Regulator System (DcuS-DcuR) Controlling Gene Expression in Response to C4-Dicarboxylates in *Escherichia coli*." *Journal of Bacteriology* 181(4): 1238-1248.
- Grigoroudis, A. I., C. A. Panagiotidis, E. E. Lioliou, M. Vlassi and D. A. Kyriakidis (2007).** "Molecular modeling and functional analysis of the AtoS-AtoC two-component signal transduction system of *Escherichia coli*." *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1770(8): 1248-1258.
- Hebshi, L. D., B. M. Angres, X. L. Li and S. R. Kain. (2007).** "Green Fluorescent Protein." *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*, from [www.els.net](http://www.els.net).
- Heidari, M., A. Hamir, C. R. Cutlip and K. A. Brogden (2002).** "Antimicrobial anionic peptide binds in vivo to *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* attached to ovine alveolar epithelium." *International Journal of Antimicrobial Agents* 20(1): 69-72.
- Ho, Y. S. J., L. M. Burden and J. H. Hurley (2000).** "Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor." *EMBO JOURNAL* 19(20): 5288-5299.
- Hoch, J. (2000).** "Two-component and phosphorelay signal transduction." *Current Opinion in Microbiology* 3(2): 165-170.
- Hoskisson, P. A. and M. I. Hutchings (2006).** "MtrAB-LpqB: a conserved three-component system in actinobacteria?" *Trends in Microbiology* 14(10): 444-449.
- Cheung, J., C. A. Bingman, M. Reingold, W. A. Hendrickson and C. D. Waldburger (2008a).** "Crystal Structure of a Functional Dimer of the PhoQ Sensor Domain." *Journal of Biological Chemistry* 283(20): 13762-13770.
- Cheung, J. and W. A. Hendrickson (2008b).** "Crystal Structures of C4-Dicarboxylate Ligand Complexes with Sensor Domains of Histidine Kinases DcuS and DctB." *Journal of Biological Chemistry* 283(44): 30256-30265.

- Cheung, J. and W. A. Hendrickson (2010).** "Sensor domains of two-component regulatory systems." *Current Opinion in Microbiology* 13(2): 116-123.
- Cho, U. S., M. W. Bader, M. F. Amaya, M. E. Daley, R. E. Klevit, S. I. Miller and W. Xu (2006).** "Metal Bridges between the PhoQ Sensor Domain and the Membrane Regulate Transmembrane Signaling." *Journal of Molecular Biology* 356(5): 1193-1206.
- Choi, E., E. A. Groisman and D. Shin (2009).** "Activated by Different Signals, the PhoP/PhoQ Two-Component System Differentially Regulates Metal Uptake." *Journal of Bacteriology* 191(23): 7174-7181.
- Kaspar, S. and M. Bott (2002).** "The sensor kinase CitA (DpiB) of *Escherichia coli* functions as a high-affinity citrate receptor." *Archives of Microbiology* 177(4): 313-321.
- Kaspar, S., R. Perozzo, S. Reinelt, M. Meyer, K. Pfister, L. Scapozza and M. Bott (1999).** "The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor." *Molecular Microbiology* 33(4): 858-872.
- Key, J., M. Hefti, E. B. Purcell and K. Moffat (2007).** "Structure of the Redox Sensor Domain of *Azotobacter Vinelandii* NifL at Atomic Resolution: Signaling, Dimerization, and Mechanism." *Biochemistry* 46(12): 3614-3623.
- Kinoshita, E. (2005).** "Phosphate-binding Tag, a New Tool to Visualize Phosphorylated Proteins." *Molecular & Cellular Proteomics* 5(4): 749-757.
- Kinoshita, E., M. Takahashi, H. Takeda, M. Shiro and T. Koike (2004).** "Recognition of phosphate monoester dianion by an alkoxide-bridged dinuclear zinc(ii) complex." *Dalton Transactions*(8): 1189.
- Kneuper, H. (2005).** "The Nature of the Stimulus and of the Fumarate Binding Site of the Fumarate Sensor DcuS of *Escherichia coli*." *Journal of Biological Chemistry* 280(21): 20596-20603.
- Kremling, A., R. Heermann, F. Centler, K. Jung and E. D. Gilles (2004).** "Analysis of two-component signal transduction by mathematical modeling using the KdpD/KdpE system of *Escherichia coli*." *Biosystems* 78(1-3): 23-37.
- Lakowicz, J. R. (2006a).** *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Fourth Edition. Kluwer Academic: Plenum Publishers, 2006a. 954 p. 443-475.
- Lakowicz, J. R. (2006b).** *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Fourth Edition. Kluwer Academic: Plenum Publishers, 2006b. 954 p. 13-14.
- Li, M., Y. Lai, A. E. Villaruz, D. J. Cha, D. E. Sturdevant and M. Otto (2007).** "Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(22): 9469-9474.

- Lucat, G. S., W. R. McCleary, A. M. Stock and J. B. Stock (1992).** "Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89(2): 718-722.
- Marijuán, P. C., J. Navarro and R. del Moral (2010).** "On prokaryotic intelligence: Strategies for sensing the environment." *Biosystems* 99(2): 94-103.
- Mascher, T., J. D. Helmann and G. Uden (2006).** "Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(4): 910-938.
- Merrick, M. J. and R. A. EDWARDS (1995).** "Nitrogen Control in Bacteria." *MICROBIOLOGICAL REVIEWS* 59( 4): 604-622.
- Meyer, M., P. Dimroth and M. Bott (1997).** "In Vitro Binding of the Response Regulator CitB and of its Carboxy-terminal Domain to A + T-rich DNA Target Sequences in the Control Region of the Divergent citC and citS Operons of *Klebsiella pneumoniae*." *Journal of Molecular Biology* 269(5): 719-731.
- Möglich, A., R. A. Ayers and K. Moffat (2009).** "Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains." *Structure* 17(10): 1282-1294.
- Noriega, C. E., R. Schmidt, M. J. Gray, L. L. Chen and V. Stewart (2008).** "Autophosphorylation and Dephosphorylation by Soluble Forms of the Nitrate-Responsive Sensors NarX and NarQ from *Escherichia coli* K-12." *Journal of Bacteriology* 190(11): 3869-3876.
- Pappalardo, L. (2003).** "The NMR Structure of the Sensory Domain of the Membranous Two-component Fumarate Sensor (Histidine Protein Kinase) DcuS of *Escherichia coli*." *Journal of Biological Chemistry* 278(40): 39185-39188.
- Patterson, G., R. N. Day and D. Piston (2001).** "Fluorescent protein spectra." *Journal of Cell Science* 114(5): 837-838.
- Piston, D. W. and G.-J. Kremers (2007).** "Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly." *Trends in Biochemical Sciences* 32(9): 407-414.
- Reddy, K. V. R., R. D. Yedery and C. Aranha (2004).** "Antimicrobial peptides: premises and promises." *International Journal of Antimicrobial Agents* 24(6): 536-547.
- Reinelt, S. (2003).** "The Structure of the Periplasmic Ligand-binding Domain of the Sensor Kinase CitA Reveals the First Extracellular PAS Domain." *Journal of Biological Chemistry* 278(40): 39189-39196.
- Sevvana, M., V. Vijayan, M. Zweckstetter, S. Reinelt, D. R. Madden, R. Herbst-Irmer, G. M. Sheldrick, M. Bott, C. Griesinger and S. Becker (2008).** "A Ligand-Induced Switch in the Periplasmic Domain of Sensor Histidine Kinase CitA." *Journal of Molecular Biology* 377(2): 512-523.
- Scharf, B. E. (2010).** "Summary of useful methods for two-component system research." *Current Opinion in Microbiology* 13(2): 246-252.



- Sourjik, V. and H. C. Berg (2002).** "Localization of components of the chemotaxis machinery of *Escherichia coli* using fluorescent protein fusions." *Molecular Microbiology* 37(4): 740-751.
- Stephenson, K. and J. Hoch (2002).** "Two-component and phosphorelay signal-transduction systems as therapeutic targets." *Current Opinion in Pharmacology* 2(5 ): 507-512.
- Stock, A. M., V. L. Robinson and P. N. Goudreau (2000).** "Two-component signal transduction." *Annual Review of Biochemistry* 69: 183–215.
- Taylor, B. L. and I. B. Zhulin (1999).** "PAS domains Internal sensors of oxygen, redox potential, and light." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(2): 479-506.
- Thomason, P. A. and R. Kay (2000).** "Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay." *Journal of Cell Science* 113(18): 3141-3150.
- Ulrich, L., E. Koonin and I. Zhulin (2005).** "One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes." *Trends in Microbiology* 13(2): 52-56.
- Vreede, J. (2003).** "PAS Domains. COMMON STRUCTURE AND COMMON FLEXIBILITY." *Journal of Biological Chemistry* 278(20): 18434-18439.
- Waldburger, C. D. and R. T. Sauer (1996).** "Signal Detection by the PhoQ Sensor-Transmitter." *The Journal of Biological Chemistry* 271(25): 26630–26636.
- West, A. H. and A. M. Stock (2001).** "Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems." *Trends in Biochemical Sciences* 21(6): 366-376.
- Wolanin, P. M., P. A. Thomason and J. B. Stock (2002).** "Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom." *Genome Biology* 3: reviews3013-reviews3013.3018
- Wu, P. and L. Brand (1994).** "Resonance Energy Transfer: Methods and Applications." *Analytical Biochemistry* 218(1): 1-13.
- Yang, Y. and M. Inouye (1991).** "Intermolecular complementation between two defective mutant signal-transducing receptors of *Escherichia coli*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(24): 11057-11061.
- Zhang, Y., E. L. Pohlmann and G. P. Roberts (2005).** "GlnD Is Essential for NifA Activation, NtrB/NtrC-Regulated Gene Expression, and Posttranslational Regulation of Nitrogenase Activity in the Photosynthetic, Nitrogen-Fixing Bacterium *Rhodospirillum rubrum*." *Journal of Bacteriology* 187(4): 1254-1265.
- Zhang, Z. and W. A. Hendrickson (2010).** "Structural Characterization of the Predominant Family of Histidine Kinase Sensor Domains." *Journal of Molecular Biology* 400(3): 335-353.