

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinnen řádně ocitovat.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE



Studium Ser/Thr proteinkináz a  
fosfoproteinfosfatáz *Pseudomonas aeruginosa*

Michaela Urbanová

Diplomová práce

Praha 2007

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Pavel Branny, CSc.

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením RNDr. Pavla Brannyho, CSc. a Mgr. Jany Goldové (Nedvědové).

*Michela, Janková*

Moje poděkování patří RNDr. Pavlu Brannymu CSc., Mgr. Janě Goldové (Nedvědové) a Mgr. Petru Lněničkovi, kteří cennými radami a připomínkami přispěli k vypracování této diplomové práce.

Dále děkuji všem známým i neznámým, přátelům a láskám svým za vytvoření potřebného tvůrčího zázemí. A taky mamce a taťkovi.

Tato diplomová práce vznikla v letech 2005 - 2007 za finanční podpory grantu č. 161/2006/B-BIO/PřF grantové agentury UK „Analýza mutantů v genech pro Ser/Thr proteinkinázy a proteinfosfatázy *Pseudomonas aeruginosa*“.

## Abstract

In prokaryotes protein phosphorylation has been considered to occur primarily by histidine protein kinases. Recent studies clearly demonstrated that eukaryotes-type serine/threonine protein kinases as well as protein phosphatases operate in many bacteria.

Phosphorylation and dephosphorylation of proteins is well-known mechanism of the regulation of enzymatic function in eukaryotes.

Genome of an opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* contains at least five genes coding for eukaryotic-type Ser/Thr kinases and phosphatases. Three of them, PpkA and Stk1 kinases and Stp1 phosphatase, have been also biochemically characterized but very little is known about their cellular functions. PpkA has been implicated in *P. aeruginosa* virulence. Upstream of *ppkA* a gene encoding putative phosphoprotein phosphatase *pppA* can be identified. Dual kinase/phosphatase PpkB has been identified and biochemically characterized in our laboratory. To study the properties of particular proteins we prepared *E. coli* strains expressing protein kinase Stk1, and phosphatases Stp1 and PppA. We carried out a basic biochemical characterization of putative phosphatase PppA. We showed that the PppA activity is strictly either  $Mg^{2+}$  or  $Mn^{2+}$  dependent. We also determined an optimal concentration of ions (both 5mM), optimal temperature (42°) and pH (pH = 9). In addition, we studied the effect of phosphatase inhibitors on the enzymatic activity of PppA.

To prove the expected interaction of protein kinase Stk1 and protein phosphatase Stp1 we completed biochemical characterization of Stk1. Interaction studies performed with these two proteins showed that protein kinase Stk1 is *in vitro* substrate of protein phosphatase Stp1.

proteinkináza, protein kinase; proteinfosfatáza, phosphoprotein phosphatase; fosforylace, phosphorylation; defosforylace, dephosphorylation; biochemická charakterizace, biochemical characterization; interakce, interaction; signální dráha, signal pathway; quorum sensing

# Obsah

<b>1 Úvod</b>	<b>9</b>
<b>2 Přehled literatury</b>	<b>10</b>
2.1 Fosforylace a defosforylace proteinů . . . . .	10
2.2 Dělení proteinkináz a fosfoproteinfosfatáz podle akceptorové amino- kyseliny . . . . .	10
2.3 Fosforylace u eukaryot . . . . .	11
2.3.1 Katalytická doména Ser/Thr/Tyr eukaryotických proteinkináz	11
2.4 Fosforylační systémy u prokaryot . . . . .	13
2.4.1 Dvousložkový systém . . . . .	14
2.4.2 Fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferázový systém (PTS)	16
2.4.3 ATP-dependentní proteinkinázy . . . . .	17
2.4.4 Překryv prokaryotických fosforylačních systémů . . . . .	22
2.4.5 Fylogenetické předpoklady vzniku fosforylačních systémů a výjimky . . . . .	22
2.5 Fosfoproteinfosfatázy . . . . .	24
2.5.1 Serin/threoninové fosfoproteinfosfatázy . . . . .	24
2.5.2 Tyrosinové fosfoproteinfosfatázy PTP a LMW PTP . . . . .	26
2.6 Příklady proteinkináz a fosfoproteinfosfatáz u prokaryot . . . . .	28
2.7 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . . . . .	30
2.7.1 Proteinkinázy a fosfoproteinfosfatázy u <i>Pseudomonas aerugi- nosa</i> . . . . .	32
2.7.2 Quorum sensing systém . . . . .	34

<b>3</b>	<b>Cíl</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>Materiál a metodika</b>	<b>39</b>
4.1	Materiál . . . . .	39
4.1.1	Bakteriální kmeny . . . . .	39
4.1.2	Vektory . . . . .	39
4.1.3	Kultivační půdy . . . . .	40
4.1.4	Pufry a roztoky . . . . .	40
4.1.5	Software . . . . .	41
4.1.6	Chemikálie a enzymy . . . . .	42
4.2	Metodika . . . . .	44
4.2.1	Příprava a transformace kompetentních buněk . . . . .	44
4.2.2	DNA manipulace . . . . .	45
4.2.3	Elektroforéza DNA v agarózovém gelu . . . . .	48
4.2.4	Amplifikace pomocí PCR . . . . .	48
4.2.5	Manipulace s proteiny . . . . .	53
4.2.6	Fosforylace <i>in vitro</i> . . . . .	55
4.2.7	Defosforylace <i>in vitro</i> . . . . .	55
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>57</b>
5.1	Příprava nadprodukčních kmenů . . . . .	57
5.1.1	Příprava expresního kmene <i>E. coli</i> BL21(DE3) pro gen <i>ppkA</i> . . . . .	57
5.1.2	Příprava expresního kmene <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pro gen <i>pppA</i> . . . . .	59
5.1.3	Příprava expresního kmene <i>E. coli</i> BL21(DE3) pro gen <i>stk1</i> . . . . .	60
5.1.4	Příprava expresního kmene <i>E. coli</i> BL21(DE3) pro gen <i>stp1</i> . . . . .	62
5.2	Charakterizace proteinů a studium interakce proteinkinázy Stk1 a fosfoproteinfosfatázy Stp1 . . . . .	63
5.2.1	Charakterizace serin/threoninové proteinkinázy Stk1 . . . . .	63
5.2.2	Exprese serin/threoninové fosfoproteinfosfatázy Stp1 . . . . .	66
5.2.3	Studium interakce proteinkinázy Stk1 a fosfoproteinfosfatázy Stp1 . . . . .	67
5.2.4	Charakterizace serin/threoninové fosfoproteinfosfatázy PppA . . . . .	68

<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	<b>74</b>
6.1	Příprava plazmidových konstruktů . . . . .	75
6.2	Biochemická charakterizace Stk1 a studium interakcí Stk1 a Stp1 . . .	76
6.3	Charakterizace PppA a studium interakcí PppA a PpkA . . . . .	77
<b>7</b>	<b>Souhrn</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>Seznam citované literatury</b>	<b>81</b>



## Seznam zkratek

<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>bp</b>	pár bází
<b>BSA</b>	hovězí sérumalbumin
<b>cAMP</b>	cyklický adenosin-5'-monofosfát
<b>CF</b>	cystická fibróza
<b>cGMP</b>	cyklický guanosin-5'-monofosfát
<b>DAB</b>	diaminobenzidin
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>dNTP</b>	deoxyribonukleosidtrifosfát
<b>DTT</b>	dithiothreitol
<b>EDTA</b>	etylendiaminotetraoctová kyselina
<b>GTP</b>	guanosintrifosfát
<b>HSL</b>	homoserinlaktón
<b>IPTG</b>	isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktosid
<b>LMW PTP</b>	Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatases
<b>NaF</b>	fluorid sodný
<b>OD<sub>600</sub></b>	optická denzita <sup>při</sup> 600 nm
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce
<b>PPM/PP2C</b>	Protein Phosphatases M
<b>PPP</b>	Protein Phosphatases P
<b>PTP</b>	Protein Tyrosine Phosphatases
<b>PTS</b>	fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferázový systém
<b>PVDF</b>	polyvinylidendifluorid
<b>QS</b>	<i>quorum sensing</i>
<b>SDS</b>	dodecylsulfát sodný
<b>SDS PAGE</b>	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS
<b>STYK</b>	serin/threonin/tyrosinové proteinkinázy
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymetyl)aminometan

# Kapitola 1

## Úvod

Fosforylace, respektive defosforylace je kovalentní modifikace proteinů. Jedná se o posttranslační proces jejich úpravy. Připojením fosfátové skupiny dochází ke změně v jejich trojrozměrné struktuře, k ovlivnění elektrostatických interakcí a ionizačních stavů aminokyselin v katalytickém místě.

Tento typ modifikace proteinů byl původně objeven v padesátých letech u eukaryot na glykogenfosforyláze králičího svalu (KREBS A FISCHER 1956). Následoval objevitelský rozmach a podařilo se identifikovat mnoho fosfoproteinů. Fosforylace proteinů začala být považována za základní mechanismus ovlivnění buněčných funkcí a procesů (EDELMAN *et al.* 1987, FANT *et al.* 1993, HUNTER 1995).

Až o dvacet let později, roku 1978, byl tento typ posttranslační úpravy proteinů nalezen i u prokaryot. První objevenou proteinkinázou u bakterií byla kináza/fosfatáza isocitrátgehydrogenázy *Escherichie coli* a *Salmonella typhimurium* (WANG A KOSHLAND 1978, GARNAK A REEVES 1978, MANAI A COZZONE 1979).

Až do roku 1986 se předpokládalo, že u bakterií je fosforylace a defosforylace k regulaci buněčných procesů využívána daleko méně než u eukaryot (KREBS 1986).

Serin/threonin/tyrosinové proteinkinázy a fosfoproteinfosfatázy eukaryotického typu byly nalezeny také u gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* je podmíněný lidský patogen a předpokládá se, že signální dráhy, jejichž komponentami Ser/Thr/Tyr proteinkinázy a fosfoproteinfosfatázy jsou, ovlivňují virulenci této bakterie. Mechanizmy působení těchto enzymů, substráty ani přesné funkce nejsou zatím známy.

# Kapitola 2

## Přehled literatury

### 2.1 Fosforylace a defosforylace proteinů

Fosforylace a defosforylace proteinů u prokaryot a eukaryot jsou principiálně obdobné procesy, při kterých dochází k přenosu fosfátové skupiny na substrát dané proteinkinázy či odštěpení fosfátové skupiny ze substrátu prováděné fosfoproteinfosfatázou. Tato kovalentní modifikace proteinů ovlivňuje, ať už pozitivně či negativně, jejich aktivitu a tím biologické procesy v buňkách.

### 2.2 Dělení proteinkináz a fosfoproteinfosfatáz podle akceptorové aminokyseliny

Akceptorovou aminokyselinou substrátového proteinu přijímající fosfátovou skupinu z donoru v eukaryotech i prokaryotech může být (HUNTER 1991):

- **serin a threonin:** Alkoholová skupina těchto aminokyselin reaguje s fosfátovou skupinou donoru a tvoří fosfát-ester.
- **tyrosin:** Fosfát-ester může tvořit i fenolová skupina tyrosinu.
- **histidin, arginin, lysin:** Amidové skupiny histidinu v pozici 1 a 3, guanidová skupina argininu nebo  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> skupina lysinu tvoří s donorovou fosfátovou skupinou fosfoamidy.

- **aspartát a glutamát:** Acylový zbytek aspartátové nebo glutamátové kyseliny tvoří s fosfátovou skupinou fosfátanhydrid karboxylu dané kyseliny.
- **cystein:** Thiolová skupina cysteinu tvoří s fosfátovou skupinou thioester.

## 2.3 Fosforylace u eukaryot

Nejdůležitějším a nejlépe prostudovaným eukaryotickým fosforylačním systémem jsou serin/threonin/tyrosinové ATP-dependenční proteinkinázy (STYK). Homology histidinových proteinkináz objevené později na základě sekvenční homologie jsou prozkoumané méně a při regulaci buněčných dějů hrají minoritní roli.

Mezi regulované procesy u eukaryot patří přenos živin přes membránu a transport solí, buněčný metabolismus, syntéza proteinů, regulace aktivity buněčného skeletu nebo pohyb buněk (BOYER A KREBS 1986, SAIER JR. *et al.* 1988).

K fosforylaci dochází během odpovědi na extracelulární signál působícího na buňku (hormony, růstové faktory, neurotransmitery nebo světlo). Reakce pak může být zprostředkována cytoplazmatickými metabolity nebo druhými posly vážícími se na receptory proteinkináz (cAMP, cGMP nebo diacylglycerol) (BOYER A KREBS 1986). Tyto sloučeniny allostericky kontrolují katalytickou aktivitu proteinkináz nebo fosfoproteinfosfatáz. Substráty některých eukaryotických serin/threoninových proteinkináz jsou například histony, kasein, inzulin nebo různé transkripční faktory (HANKS *et al.* 1988).

Příkladem eukaryotických proteinkináz je Ser/Thr kaseinkináza II. Mezi eukaryotické tyrosinové proteinkinázy patří například pp60<sup>src</sup> nebo proteinkináza inzulinového receptoru. Dalšími eukaryotickými proteinkinázami jsou MAP kinázy nebo p34<sup>cdc2</sup>.

### 2.3.1 Katalytická doména Ser/Thr/Tyr eukaryotických proteinkináz

Kinázové domény eukaryotických proteinkináz mají tři odlišné role:

1. Vazbu a orientaci donoru fosfátové skupiny: ATP (nebo GTP) v komplexu s dvoumocnými kationty (obvykle  $Mg^{2+}$  nebo  $Mn^{2+}$ ).
2. Vazbu a orientaci proteinového substrátu.
3. Přenos  $\gamma$ -fosfátu z ATP (nebo GTP) na hydroxylovou skupinu aminokyselin: serinu, threoninu nebo tyrosinu.

Katalytická doména je dlouhá přibližně 280 aminokyselin (HANKS A HUNTER 1995). Tvoří ji 12 subdomén; I-V, VIa, VIb, VII-XI. Její N-terminální část složená z antiparalelních  $\beta$ -listů subdomén I-IV váže a správně orientuje donor fosfátové skupiny nukleosidtrifosfát. Větší C-terminální část, složená ze subdomén VIa-XI, zodpovídá za vazbu peptidového nebo proteinového substrátu a iniciuje přenos fosfátové skupiny (KNIGHTON *et al.* 1991, 1991). Skládá se hlavně z  $\alpha$ -helixů. Rýha mezi N-terminální a C-terminální částí je katalytickým místem serin/threoninových proteinkináz.

Subdomény jsou definované jako oblasti s větším počtem aminokyselin, které nejsou přerušeny žádnou inzercí a obsahují charakteristický motiv složený z invariantních zbytků. Stupeň úplné homologie všech konzervovaných zbytků je poměrně malý; jen 12 zbytků je konzervováno ve všech známých eukaryotických proteinkinázách (TAYLOR *et al.* 1993, HANKS A HUNTER 1995).

Subdomény I-IV tvoří nukleotid-vazebnou doménu. Klíčovými pro katalytickou funkci této domény jsou glycin a vysoce konzervované alifatické hydrofóbní hydroxylové nebo thiolové zbytky na konci Gly-X-Gly-X-X-Gly-X-Val sekvence subdomény I. Tato subdoména funguje jako záklopka, která brání uvolnění donoru fosfátové skupiny; hydrofóbní kapsa obklopuje adeninový kruh ATP. Dalšími nezbytnými konzervovanými aminokyselinami je lyzin subdomény II, který pomáhá kotvit a správně orientovat ATP interakcí s  $\alpha$ - a  $\beta$ -fosfátem. Lyzin je nezbytný pro maximální aktivitu proteinkinázy, jeho mutace vede ke ztrátě funkce proteinu. Glutamát subdomény III tvoří s lyzinem subdomény II vodíkový můstek a stabilizuje tak doménovou strukturu. Subdoména IV neobsahuje žádný konzervovaný aminokyselinový zbytek a není přímo zúčastněná v procesu katalýzy. Subdoména V leží poblíž rýhy mezi dvěma smyčkami tvořenými N-koncovou a C-koncovou částí. Glu,

Val a Glu subdomény V pomáhá kotvit adeninový a ribózový kruh ATP.

Subdoména VIa stabilizuje strukturu proteinu. Subdoména VIb obsahuje konsenzus sekvenci His-Arg-Asp-Leu-Lys-X-X-Asn tvořící katalytickou smyčku, jejíž Asp je hlavní katalytickou aminokyselinou přijímající proton z atakované hydroxylové skupiny substrátu. Lys v této subdoméně usnadňuje katalytickou reakci neutralizací negativního náboje  $\gamma$ -fosfátu. Asn pomáhá stabilizovat katalytickou smyčku vodíkovou vazbou s Asp a váže  $Mg^{2+}$ , který tvoří můstky s  $\alpha$ - a  $\gamma$ -fosfátem ATP. Subdoména VII obsahuje konzervovaný triplet Asp-Phe-Gly stabilizovaný vodíkovým můstkem mezi Asp-Gly. Asp váže  $Mg^{2+}$ , který pomáhá orientovat  $\beta$ - a  $\gamma$ -fosfát ATP do správné pozice a tím umožňuje přenos  $\gamma$ -fosfátu z ATP na substrát proteinkinázy. Dalšími konzervovanými aminokyselinovými zbytky serin/threoninových proteinkináz jsou glutamát v subdoméně VIII, aspartát v subdoméně IX a arginin v subdoméně XI. Asp v subdoméně IX tvoří vodíkové můstky s aminokyselinovou páteří katalytické smyčky tvořenou subdoménou VIb a tím ji stabilizuje (TAYLOR *et al.* 1993). Glu v subdoméně VIII, sekvenci Ala-Pro-Glu, tvoří vodíkovou vazbu s hydroxylem ribózy z ATP a účastní se i vazby substrátu. V eukaryotických proteinkinázách tvoří glutamát subdomény VIII vodíkovou vazbu s argininem subdomény XI, čímž na značnou vzdálenost pomáhá stabilizovat smyčku vážící peptid/protein (KNIGHTON *et al.* 1991, 1991). Subdoména IX obsahuje invariantní Asp. Subdoména X nemá žádný specifický motiv a její funkce je nejasná. Subdoména XI obsahuje konzervovaný Arg (VERON *et al.* 1993).

## 2.4 Fosforylační systémy u prokaryot

Řadu let byla regulace buněčných aktivit fosforylací proteinů u prokaryot neznámým dějem. Koncem 70. let byl objeven první důkaz fosforylace u prokaryot, byla prokázána fosforylace proteinů *Salmonella typhimurium* (WANG A KOSHLAND 1978) a *Escherichia coli* (GARNAK A REEVES 1978). Postupně se objevovaly další důkazy o přítomnosti proteinkináz v prokaryotech. V polovině 80. let byl u bakterií nalezen další fosforylační systém, tzv. dvousložkový systém.

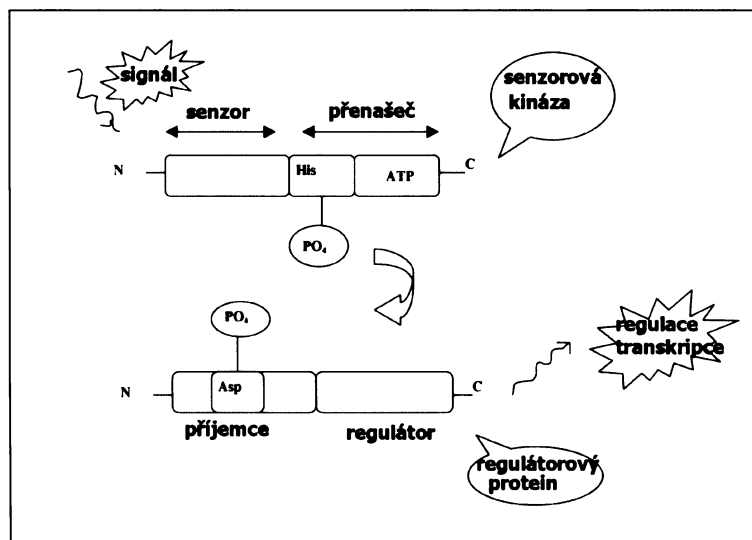
Prokaryota tedy zcela běžně využívají fosforylací proteinů ke kontrole buněč-

ných procesů. Zdrojem fosfátové skupiny je stejně jako u eukaryot ATP. Kromě ATP mohou fosfátovou skupinu poskytovat i jiné fosforylované sloučeniny, například některé nízkomolekulární metabolity jako jsou fosfoenolpyruvát, acetylfosfát nebo karbamoylfosfát (SAIER *et al.* 1990, LUKAS *et al.* 1992).

Typy fosforylačních systémů u prokaryot:

1. dvousložkový systém
2. fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferázový systém
3. serin/threoninové/tyrosinové ATP-dependentní proteinkinázy a fosfoproteinfosfatázy
  - bakteriální
  - eukaryotického typu

### 2.4.1 Dvousložkový systém



Obrázek 2.1: Schéma dvousložkového systému. Proteinkináza přijímá signál přicházející z vnějšího prostředí sensorovou doménou. Dochází k autofosforylaci na histidinu katalytické domény sensorové proteinkinázy. Signál je ve formě fosfátové skupiny předán dále na aspartát regulačního proteinu, který ovlivňuje transkripci různých genů a vyvolá tak buněčnou odpověď (SRIVIDHYA A KRISHNASWAMY 2004).

Dvousložkový systém byl dlouhou dobu považován za hlavní regulační systém prokaryot. Někdy bývá označován také jako histidin-aspartátový fosfát přenášející systém. Je tvořen sensorovou histidinovou proteinkinázou sloužící jako receptor a regulátorovým proteinem. Jako odpověď na stimuly přicházející z vnějšího prostředí dochází k autofosforylaci sensorové proteinkinázy na histidinových zbytcích konzervované C-terminální domény. Fosfátová skupina je poté z histidinu přenesena na aspartát konzervované N-terminální domény regulátorového proteinu. Sensorová proteinkináza může fungovat i jako fosfoproteinfosfatáza a přenášet fosfátovou skupinu z regulátorového proteinu. Prokázána byla i spontánní defosforylace fosforylovaného regulátoru (STOCK *et al.* 1989, SAIER *et al.* 1990).

Všechny známé sensorové proteinkinázy sdílí konzervovanou C-terminální doménu. Nejvíce sekvenčně homologní oblastí je okolí histidylového zbytku - aktivního místa sensorové proteinkinázy. Regulátorové proteiny mají naopak konzervovanou N-terminální doménu (SAIER *et al.* 1990). Některé z dvousložkových systémů se skládají pouze z jednoho polypeptidového řetězce, který má funkci jak sensorové histidinové proteinkinázy, tak regulátorového proteinu. Takovým příkladem může být FrzE protein kontrolující pohyb a formování kolonií myxobakterií (DWORKIN 1996). V jiných systémech je oddělená sensorová funkce proteinu od histidinové proteinkinázy. Pak může být tento systém označován jako tříložkový systém, složený ze senzoru/receptoru, histidinové proteinkinázy a regulátorového proteinu. Takovým příkladem je UhpCBA systém *E. coli* aktivující syntézu permeáz odpovědných za příjem fosforylovaných hexos z média jako odpověď na exogenní induktor (VERHAMME *et al.* 2002).

Některé systémy obsahují i několik proteinových komponent, které bakterii dovolují reagovat na široké spektrum stimulů a regulačních signálů. Například chemotaktická proteinkináza CheA *Helicobacter pylori* se váže na řadu transmembránových sensorů a přijímá tak množství chemických signálů přicházejících do buňky a odpovídá na ně fosforylací různého množství regulátorových proteinů, např. CheY (FOYNES *et al.* 2000).

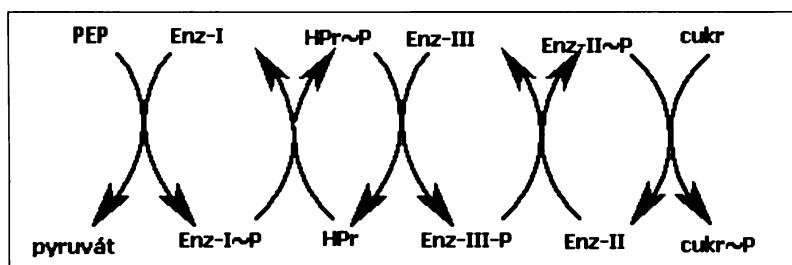
Bakteriální genomy kódují desítky homologních dvousložkových fosforylačních systémů. Jejich podobnost a provázanost dobře popisuje fenomén nazývaný „cross



talk“: senzorová proteinkináza jednoho systému může fosforylovat regulačtorový protein jiného systému (STOCK *et al.* 1989). Senzorové proteinkinázy tak dokáží fosforylovat i jiné proteiny než své přirozené substráty. Svě přirozené substráty však fosforylují s vysokou specifitou.

Dvousložkový systém reguluje různé bakteriální procesy mezi něž patří: infekce bakteriofágem (COZZONE 1988), virulence (GROISMAN A SAIER JR. 1990), chemotaxe (SAIER JR. 1989b), fixace dusíku a nodulace, sporulace a tvorba plodniček (PEREGO *et al.* 1989), indukce transportních systémů (CHIANG *et al.* 1989), regulace osmosenzitivity atd. (DEUTSCHER A SAIER JR. 1988).

#### 2.4.2 Fosfoenolpyruvát–dependentní fosfotransferázový systém (PTS)



Obrázek 2.2: Schématické znázornění fosfoenolpyruvát-dependentního fosfotransferázového systému. Cukr je z vnějšího prostředí přenesen do buňky pomocí fosforylovaného enzymu II, který svou fosfátovou skupinu získal postupnou fosforylací do řetězce uspořádaných proteinů; donorem fosfátové skupiny je fosfoenolpyruvát. Všechny proteiny kromě enzymu II se fosforylují na histidinu; enzym II se může fosforylovat i na cysteinu. Převzato ze skript College of Science, Southern Illinois University, 1999.

Fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferázový systém tvoří komplex proteinů přenášejících cukr přes cytoplazmatickou membránu do buňky. Donorem fosfátové skupiny je fosfoenolpyruvát, který fosfátovou skupinu předává na řetězec postupně se fosforylujících proteinů (POSTMA A LENGELER 1993, SAIER *et al.* 1995). Jeho další funkcí je účast na regulaci chemoreceptorů, regulaci syntézy cyklického AMP, katabolické represi, transkripční kontrole některých operonů, např.  $\beta$ -glukózoového operonu *bgl* u *E. coli* nebo sacharózoového operonu *sac* u *B. subtilis* (SAIER 1993,

REIZER *et al.* 1993, CHIN *et al.* 1989, POOLMAN *et al.* 1989).

PTS systém se skládá ze čtyř proteinů: cukr nescifických vazebných proteinů HPr a enzymu I, a dále enzymů II a III vykazujících specifitu k určité skupině cukrů. Většina proteinů PTS systému je fosforylována na histidinu, enzym II může být fosforylován kromě histidinu i na cysteinu (SAIER JR. 1989b).

Fosfátová skupina z fosfoenolpyruvátu je předána na řetězec fosforylujících se proteinů, z enzymu I putuje na protein HPr. Enzym I i protein HPr jsou cytoplazmatické proteiny. Z HPr přechází na enzym III a následně na enzym II, což jsou membránové proteiny vázající cukr. Enzym II fosforyluje přenášený cukr. Celý mechanismus je založený na třech dějích: chemorepci a navázání cukru, translokaci cukru přes membránu a jeho fosforylaci (POSTMA A LENGELER 1985, SAIER JR. 1989a, CHIN *et al.* 1989).

### 2.4.3 ATP-dependentní proteinkinázy

ATP-dependentní proteinkinázy nalezené v prokaryotech se dělí podle sekvenční homologie na bakteriální proteinkinázy a proteinkinázy eukaryotického typu.

Využívají fosfátovou skupinu poskytovanou nukleosidtrifosfátem a přenášejí ji na serin, threonin nebo tyrosin v katalytické doméně proteinu.

Rozdíly mezi oběma skupinami spočívají v regulaci katalytické aktivity a substrátové specifitě. ATP-dependentní proteinkinázy eukaryotického typu se odlišují svou závislostí na cyklických nukleosidmonofosfátech jako allosterických efektorech. Jsou schopny fosforylovat exogenní eukaryotické substráty. Takovými substráty mohou být kasein, histony, protaminy nebo fosvitin (COZZONE 1988). Příkladem ATP-dependentní proteinkinázy eukaryotického typu fosforylující eukaryotický histon H1 je proteinkináza Stk1 *P. aeruginosa* (MUKHOPADHYAY *et al.* 1999).

Většina známých bakteriálních ATP-dependentních proteinkináz je allostericky regulována jinými buněčnými metabolity než druhými posly (DEUTSCHER A SAIER JR. 1988, REIZER *et al.* 1988). Výjimečně byla zaznamenána i regulace aktivity enzymu cytoplazmatickým  $\text{Ca}^{2+}$  (PLATT *et al.* 1988, TURNER A MANN 1989) a cyklickým AMP či cyklickým GMP (DADSII A COZZONE 1990). Výjimkami jsou proteinkinázy *Legionella micdadei*, z nichž proteinkináza PK I je cAMP-dependentní

a proteinkináza PK II cGMP-dependentní (SAHA *et al.* 1988). Bakteriální ATP-dependentní proteinkinázy nevykazují substrátovou specifitu k substrátům eukaryotických proteinkináz. Výjimkami mezi bakteriálními ATP-dependentními proteinkinázami, které jsou schopné fosforylovat exogenní eukaryotické substráty, jsou dvě HPr-proteinkinázy *Streptococcus pyogenes* schopné fosforylovat mimo své endogenní substráty i histony a protaminy (CHIANG *et al.* 1989).

Cyklický AMP pozitivně stimuluje i autofosforylaci tyrosinové proteinkinázy bakterie *Acinetobacter calcoaceticus* (DADSSI A COZZONE 1990, GRANGEASSE *et al.* 1997).

ATP-dependentní proteinkinázy a fosfoproteinfosfatázy, bakteriální i eukaryotického typu, mají společnou regulaci některých procesů: regulaci metabolismu, transport uhlíkatých sloučenin, regulaci transkripce a regulaci buněčné diferenciaci (COZZONE 1988, DEUTSCHER A SAIER JR. 1988, SAIER JR. 1989b, PEREGO *et al.* 1989). Přehled serin/threonin/tyrosinových proteinkináz a fosfoproteinfosfatáz znázorňuje tabulka 2.1.

Nejlépe charakterizovanými bakteriálními proteinkinázami jsou kináza/fosfatáza isocitrátdehydrogenázy enterobakterií, která je allostericky inhibována cytoplazmatickými intermediáty bakteriálního metabolismu (isocitrátem, NADPH, AMP, fosfoenolpyruvátem atd.) a HPr-kináza/fosfatáza grampozitivních bakterií, která fosforyluje HPr protein (CHIANG *et al.* 1989). Tato proteinkináza je aktivována fruktóza-1,6-bisfosfátem nebo jinými fosforylovanými intermediáty uhlíkatých organických sloučenin.

Ser/Thr/Tyr proteinkinázy eukaryotického typu byly identifikovány u mnoha bakteriálních druhů. Sekvence jejich katalytických domén jsou homologní s eukaryotickými kinázovými doménami. Jsou známy případy proteinkináz, u kterých došlo k vymizení jedné z periferních subdomén.

U některých bakteriálních proteinkináz eukaryotického typu chybí subdoména X. Je však natolik vzdálená od katalytického centra enzymu, že její absence většinou neovlivňuje funkci enzymu (TAYLOR *et al.* 1993). Pokud chybí subdoména XI, chybí i arginin stabilizující smyčku vážící substrát proteinové povahy. Takové proteinkinázy pak rozeznávají substráty neproteinové povahy, např. aminoglykosidová antibiotika.

Se strukturálními odchylkami v konzervovaných subdoménách se častěji setkáváme u archeobakterií. Extrémní odchylky konzervovaných subdomén se týkají hlavně N- a C-koncových částí subdomén I, X a XI, kde nejčastěji dochází ke ztrátě důležitých motivů proteinkináz eukaryotického typu. Tyto části však mají spíše strukturální než katalytickou roli, a proto k významnému omezení funkce proteinu v takových případech nedochází. Dochází spíše k pozměnění funkce proteinu tak, že váže jiný donor fosfátové skupiny než nukleosidtrifosfát a jiný akceptor fosfátové skupiny, nejčastěji neproteinové povahy (KENNELLY A POTTS 1996, COZZONE 1993, C. C. ZHANG 1996).

Rodina	Název	Organismus	Doména	Datum
Eukaryotické proteinkinázy	Pkn1*	<i>M. xanthus</i>	B	1991
	YpkA*	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	B	1993
	AfsK	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	B	1994
	Pkn2	<i>M. xanthus</i>	B	1995
	Pkn5*	<i>M. xanthus</i>	B	1996
	Pkn6*	<i>M. xanthus</i>	B	1996
	Pkn9*	<i>M. xanthus</i>	B	1997
	Mbk	<i>M. tuberculosis</i>	B	1997
	Ptk	<i>A. johnsonii</i>	B	1997
	Pkg4*	<i>S. granaticolor</i>	B	1998
	Pkg2*	<i>S. granaticolor</i>	B	1999
	Wzc*	<i>E. coli</i>	B	1999
	Etk	<i>E. amylovora</i>	B	1999
	Stk1	<i>P. aeruginosa</i>	B	1999
	SpkA	<i>Synechocystis</i> PCC6803	B	2001
Serin/Threonin/Tyrosin specifické homology proteinkináz	SpoIIAB	<i>B. subtilis</i>	B	1993
	RsbW	<i>B. subtilis</i>	B	1994
	RsbT	<i>B. subtilis</i>	B	1996
	Slr1861	<i>Synechocystis</i> PCC6803	B	1999
	DivL	<i>C. crescens</i>	B	1999
IDH proteinkináza/fosfoproteinfosfatáza	AceK	<i>E. coli</i>	B	1982
HPr proteinkináza/fosfoproteinfosfatáza	PtsK	<i>B. subtilis</i>	B	1988
	HPrK	<i>S. salivarius</i>	B	1999
	HPrK	<i>E. faecalis</i>	B	1999
	HPrK	<i>L. casei</i>	B	2000

Rodina	Název	Organismus	Doména	Datum
<b>Skupina</b>	<b>fosfoproteinfosfatáz PP1-arch1</b>	<i>S. solfataricus</i>	A	1995
<b>PPP</b>				
	PP1-arch2	<i>M. thermophila</i> TM-1	A	1997
	PrpA	<i>E. coli</i>	B	1997
	PrpB	<i>E. coli</i>	B	1997
	Py-PP1	<i>P. abyssi</i> TAG11	A	1998
	PP1-cyano1	<i>M. aeruginosa</i> PCC7821	B	1999
	PP1-cyano2	<i>M. aeruginosa</i> UTEX2063	B	1999
	SppA	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	B	2000
<b>Skupina</b>	<b>fosfoproteinfosfatáz SpoIIE</b>	<i>B. subtilis</i>	B	1995
<b>PPM</b>				
	RsbU	<i>B. subtilis</i>	B	1996
	RsbX	<i>B. subtilis</i>	B	1996
	Stp1	<i>P. aeruginosa</i>	B	1996
	Slr1860/IegfG	<i>Synechocystis</i> PCC6803	B	1999
	RsbP	<i>B. subtilis</i>	B	2000
	PrpC	<i>B. subtilis</i>	B	2000
	Pph1	<i>M. xanthus</i>	B	2001
<b>Skupina</b>	<b>fosfoproteinfosfatáz YopH</b>	<i>Yersinia spp.</i>	B	1990
<b>PTP</b>				
	IphP	<i>N. commune</i> UTEX584	B	1993
	SptP	<i>S. typhimurium</i>	B	1996
	MPtpB	<i>M. tuberculosis</i>	B	2000
<b>Skupina</b>	<b>fosfoproteinfosfatáz PtpA</b>	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	B	1996
<b>LMW PTP</b>				
	Ptp	<i>A. johnsonii</i>	B	1998
	Wzb	<i>E. coli</i>	B	1999
	MPtpA	<i>M. tuberculosis</i>	B	2000

Tabulka 2.1: Přehled některých proteinkináz a fosfoproteinfosfatáz, bakteriálních a eukaryotického typu, u kterých byla prokázána katalytická aktivita. Hvězdičkou jsou označeny proteinkinázy s prokázanou autofosforylační aktivitou. „A“ označuje archeabakteriální původ kinázových domén, „B“ označuje eubakteriální původ kinázových domén. Datum udává rok, kdy byl poprvé publikován objev katalytické aktivity proteinu. Převzato Kennelly, 2002.

#### 2.4.4 Překryv prokaryotických fosforylačních systémů

Zajímavé je, že všechny uvedené systémy nejsou nezávislé, ale propojují se a tvoří regulační síť (STOCK *et al.* 1989, WANNER 1992).

Jak už bylo řečeno dříve, ATP-dependentní HPr-proteinkináza/fosfoproteinfosfátáza pravděpodobně kontroluje příjem zdrojů uhlíku a jiné fyziologické procesy gram pozitivních bakterií regulované PTS systémem. ATP-dependentní proteinkinázy eukaryotického typu regulují fosforylaci zprostředkovanou PTS systémem.

Naopak *SacB* a *bgl* specifické operony katabolismu uhlíku u *B. subtilis* jsou kontrolovány jak dvousložkovým systémem, tak fosforylací transkripčních antiterminátorových proteinů PTS systémem (STEINMETZ A AYMERICH 1987, KUNST *et al.* 1988). Dalším příkladem, ve kterém spolupracují dvousložkový systém a fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferázový systém je chemotaxe a příjem cukru PTS systémem. Cukr je přijatý PTS systémem, následná odpověď bakterie na přítomnost cukru, je vyvolána interakcí cytoplazmatických proteinů CheA a CheY, které vykazují znaky senzorové proteinkinázy a regulátorového proteinu (FOYNES *et al.* 2000).

U enterobakterií, např. *Escherichia coli*, PTS systém ovlivňuje glyoxalátovou spojku metabolismu uhlíkatých sloučenin, glukoneogenezi a virulenci regulací genové transkripce (BOOS A SHUMAN 1998).

#### 2.4.5 Fylogenetické předpoklady vzniku fosforylačních systémů a výjimky

Skutečnost, že prokaryotických fosforylačních systémů je více než eukaryotických, může mít dvě vysvětlení:

1. Prokaryota jsou organizmy komplexnější, co se mechanismů kontroly fosforylace týče, nebo určité systémy v eukaryotech chybí.
2. Prokaryota i eukaryota mají všechny systémy společné a některé z nich nebyly u eukaryot dosud objeveny.

Předpokládá se, že platí spíše druhá možnost, pro kterou svědčí i to, že některé složky prokaryotických fosforylačních systémů byly nalezeny také u eukaryot

a že substráty eukaryotických proteinkináz a fosfoproteinfosfatáz jsou vnímány jako substráty i prokaryotickými proteinkinázami a fosfoproteinfosfatázami. Vývoj fosforylačních systémů se pravděpodobně ubíral divergentní cestou, kdy ze společného předka vznikla prokaryota a eukaryota. Tento předek disponoval všemi známými fosforylačními systémy a během evoluce došlo k potlačení některých systémů díky odlišným životním prostředím jednotlivých organismů.

Prokaryotické enzymy mohou *in vitro* fosforylovat některé eukaryotické proteiny (RAMSDORF *et al.* 1974, CHIANG *et al.* 1989). Proteinkináza bakteriofága T7 může fosforylovat histony, protaminy a lysozym vaječného bílku. HPr-proteinkináza *Streptococcus pyogenes* může fosforylovat histony, protaminy a kasein (CHIANG *et al.* 1989).

Opačně platí, že eukaryotické proteinkinázy mohou fosforylovat *in vitro* přirozené substráty prokaryotických proteinkináz. Proteinkináza z králíčího svalu může fosforylovat iniciační faktor IF2 z *Escherichia coli* a stejně tak i dalších 11 ribozomálních proteinů této bakterie.

Přenos signálu pomocí dvousložkového systému probíhá i u eukaryot. U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byl nalezen protein SLN1 s vysokým stupněm sekvenční homologie se sensorovou i regulátorovou doménou proteinů dvousložkového systému (OTA A VARSHAVSKY 1993). SLN1 se účastní osmoregulační signální kaskády. Sekvenční podobnost se sensorovou i regulátorovou doménou vykazuje i protein ETR1 z *Arabidopsis thaliana* (CHANG *et al.* 1993, WOLANIN *et al.* 2002) nebo proteiny ps15 a p70 z houby *Neurospora crassa* (OTA A VARSHAVSKY 1993, THOMASON A KAY 2000). Protein podobný bakteriální histidinové proteinkináze exprimuje i *Dyctiostelium discoideum* (S. SCHUSTER *et al.* 1996).

Sekvenční podobnost s histidinovými proteinkinázami prokaryotického typu nesou i některé savčí proteiny, komponenty dýchacího řetězce, proteinproteinkináza dehydrogenázy  $\alpha$ -ketokyselin dýchacího řetězce (BCKDH proteinkináza) z krysích mitochondrií (POPOV *et al.* 1992) nebo proteinkináza pyruvátdehydrogenázy (POPOV *et al.* 1993).

Je pravděpodobné, že i homology komponent PTS systému by mohly být nalezeny alespoň u nižších eukaryot (BARKER *et al.* 1991, SEGOVIA A VINCENTE



1995).

## 2.5 Fosfoproteinfosfatázy

Fosfoproteinfosfatázy katalyzují odštěpení fosfátu, jsou to tedy funkční antagonisté proteinkináz. Hydrolýzou fosfátové skupiny nastává konformační a funkční změna proteinu.

Defosforylaci proteinů na serinu, threoninu nebo tyrosinu katalyzují dvě rodiny fosfoproteinfosfatáz. Serin/threoninové fosfoproteinfosfatázy se na základě architektury struktur svých katalytických domén slučují do jedné rodiny fosfoproteinfosfatáz, i když se úplně neshodují v sekvencích. Druhou rodinu tvoří tyrosinové fosfoproteinfosfatázy.

### 1. serin/threoninové fosfoproteinfosfatázy

- skupina PPP (Protein Phosphatases P)
- skupina PPM (Protein Phosphatases M)

### 2. tyrosinové fosfoproteinfosfatázy

- skupina PTP (Protein Tyrosine Phosphatases)
- skupina LMW PTP (Low Molecular Weight PTP)

### 2.5.1 Serin/threoninové fosfoproteinfosfatázy

#### PPP fosfoproteinfosfatázy

Nejběžnějšími eukaryotickými fosfoproteinfosfatázami jsou serin/threoninové fosfoproteinfosfatázy PP1, PP2A a PP2B náležející do skupiny PPP (MUMBY A WALTER 1993). Skupina PPP fosfoproteinfosfatáz se vyskytuje i mezi bakteriemi (BHADURI A SOWDHAMINI 2005). Katalytické domény fosfoproteinfosfatáz jsou si velmi podobné. Enzymy v každé ze skupin se shodují v terciární struktuře a katalytických mechanismech. Velké rozdíly jsou ve funkcích a struktuře jednotlivých proteinů, které jsou složené z různých regulátorových domén a šubdomén (BARFORD 1996).

Aktivita fosfoproteinfosfatáz ze skupiny PP2B je regulovaná  $\text{Ca}^{2+}$  a kalmodulinem. Jejich katalytická aktivita je závislá na přítomnosti  $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  (BARFORD 1996). Inhibitorem jsou například cyklosporin a cyklofilin (LIU *et al.* 1991). U eukaryot hrají důležitou roli v  $\text{Ca}^{2+}$  signální kaskádě, která aktivuje T-buňky (LAWSON A MAXFIELD 1995). Hojně se vyskytuje v nervové tkáni a varlatech (SCHREIBER 1992).

Fosfoproteinfosfatázy PP1 a PP2A vyžadují pro svou aktivitu přítomnost  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  iontů. Fosfoproteinfosfatázy jsou inhibovány různými přírodními toxiny, například kyselinou okadaovou, mikrocystinem nebo játrovým jedem produkovaným mořskými řasami. Tyto jedy příliš nepůsobí na fosfoproteinfosfatázy skupiny PP2B (MACKINOTSH A MACKINOTSH 1994). Skupina fosfoproteinfosfatáz PP1 a PP2A svou katalytickou aktivitou reguluje metabolismus glykogenu, kontrakci svalů, průběh buněčného cyklu a RNA splicing (HUBBARD A COHEN 1993).

Katalytické domény PPP fosfoproteinfosfatáz jsou dlouhé přibližně 220 aminokyselin a obsahují tři charakteristické konzervované sekvenční motivy: GDXHG (motiv I), GDXXDRG (motiv II) a GNHE (motiv III). Motivы II a III váží dvoumocné ionty kovů a umožňují tím dosažení správné konformace pro katalýzu reakce (BARTON *et al.* 1994).

Společně s ionty pomáhají správnou konformaci katalytické smyčky udržovat i dvě molekuly vody, které se zapojují do nukleofilního ataku fosforu fosfátové skupiny připojené k substrátu (BARFORD 1996).

PPP fosfoproteinfosfatázy byly nalezeny na základě sekvenční homologie v mnoha bakteriálních genomech. Jedná se například o fosfoproteinfosfatázu ApaH a PrpA *E. coli*, fosfoproteinfosfatázu PP1 *Anabaena* sp. atd. (SHI *et al.* 1998). Homology PP1/PP2A/PP2B podrodin fosfoproteinfosfatáz byly objeveny i u bakteriofágů  $\lambda$  a  $\phi 80$ .

### PPM fosfoproteinfosfatázy

Do skupiny fosfoproteinfosfatáz PPM (PP2C) náleží serin/threoninové fosfoproteinfosfatázy přítomné jak v prokaryotech, tak eukaryotech. Jsou příbuzné s mitochondriálními pyruvátdehydrogenázami (SHENOLIKAR, 1994). Pro svou katalytickou

aktivitu vyžadují přítomnost dvoumocných iontů, obvykle  $Mg^{2+}$  nebo  $Mn^{2+}$  a pro správnou konformaci celkem šest molekul vody (DAS *et al.* 1996). Enzymovou aktivitu inhibují EDTA a NaF. PPM fosfoproteinfosfatázy u eukaryot formují odpovědi na enviromentální stres, jako je anoxie, teplotní nebo osmotický šok atd. (BORK *et al.* 1996).

Katalytická N-terminální doména fosfoproteinfosfatáz PPM skupiny je dlouhá přibližně 290 aminokyselin (DAS *et al.* 1996). Tvoří ji 11 konzervovaných motivů obsahujících osm absolutně konzervovaných zbytků. Absolutně konzervovanými zbytky jsou asparagová kyselina v motivu I a II, threonin v motivu IV, glycin v motivu V a VI, Asp-Gly sekvence v motivu VIII a Asp v motivu XI (BORK *et al.* 1996). Asp zbytky v motivech I, II a XI koordinují vazbu iontu kovu do aktivního místa fosfoproteinfosfatázy (DAS *et al.* 1996).

Fosfoproteinfosfatázy rodiny PPM byly v prokaryotické říši objeveny jen u eubakterií a na výjimky se vůbec nevyskytují u archeobakterií. Výjimky tvoří archeobakterie *Archaeoglobus fulgidus*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* nebo *Methanococcus jannaschii*.

Členové této rodiny fosfoproteinfosfatáz byli podrobně studováni u *Bacillus subtilis*. Všechny tři fosfoproteinfosfatázy *B. subtilis*, RsbU, RsbX a SpoIIE vyžadují přítomnost dvoumocných iontů kovu pro svou serin/threoninovou aktivitu (DUNCAN *et al.* 1995, YANG *et al.* 1996, ADLER *et al.* 1997). RsbU, RsbX a SpoIIE regulují aktivitu transkripčních faktorů genů účastnících se odpovědi na enviromentální stres. SpoIIE spouští sporulaci (DUNCAN *et al.* 1995, KHVOROVA *et al.* 1998). RsbU and RsbX reagují na enviromentální a energetický stres (YANG *et al.* 1996, WISE A PRICE 1995).

## 2.5.2 Tyrosinové fosfoproteinfosfatázy PTP a LMW PTP

Rodina tyrosinových fosfoproteinfosfatáz je poměrně hojná. Vyskytují se jak mezi prokaryoty, tak mezi eukaryoty. Jejich pojmenování je však nepřesné: ne všechny fosfoproteinfosfatázy jsou specifické pouze k fosfotyrosinu, některé z nich odštěpují fosfátovou skupinu i z fosfoserinu nebo fosfothreoninu a jsou označovány jako fosfoproteinfosfatázy s dvojitou specifitou. Rodina tyrosinových fosfoproteinfosfatáz vznikla

splynutím dvou různých rodin, které se během evoluce přiblížily natolik, že se podobají katalytickými mechanizmy (GUAN A DIXON 1991, ZHOU *et al.* 1994) a geometrií aktivních míst (ECKSTEIN *et al.* 1996).

Tyrosinové fosfoproteinfosfatázy se dělí na dvě skupiny: PTP a LMW PTP. Mezi skupinu fosfoproteinfosfatáz PTP patří i fosfoproteinfosfatázy s dvojitou specifitou. Nevyskytují se mezi tyrosinovými fosfoproteinfosfatázami s nízkou molekulovou hmotností (LMW PTP).

Obě skupiny mají charakteristický společný motiv aktivního místa enzymu (His)-Cys-X-X-X-X-X-Asp. Cystein v aktivním místě působí jako nukleofil (GUAN A DIXON 1991, ZHOU *et al.* 1994, Z. Y. ZHANG A DIXON 1993, DENU A DIXON 1995). Hydrolyze fosfoesterové vazby pomáhá jedna molekula vody (JIA *et al.* 1995, PANIFER *et al.* 1998). V PTP fosfoproteinfosfatázách je aktivní motiv umístěn v centrální oblasti katalytické domény, která se nachází na N-konci enzymu. Katalytická doména je dlouhá asi 250 aminokyselin se zbytkem kyseliny asparagové mezi 25. a 50. aminokyselinou. V LMW PTP fosfoproteinfosfatázách je aktivní motiv lokalizován velmi blízko N-konce katalytické domény, která je významně menší než u tradičních PTP. Katalytická doména LMW PTP fosfoproteinfosfatáz zabírá jen 140 aminokyselinových zbytků a někdy i méně. Esenciální Asp je lokalizován kolem 80. - 110. zbytku katalytické domény. Ačkoliv je jeho umístění naprosto odlišné od PTP fosfoproteinfosfatáz, funkci má podobnou (ECKSTEIN *et al.* 1996).

Dobře charakterizovanými proteiny z této rodiny fosfoproteinfosfatáz jsou PTP fosfoproteinfosfatázy IphP *Nostoc commune* (POTTS *et al.* 1993, HOWELL *et al.* 1996), YopH *Yersinia pseudotuberculosis* (GUAN A DIXON 1990) nebo fosfoproteinfosfatáza SptP *Salmonella typhimurium* (KANIGA *et al.* 1996).

Mezi LMW PTP fosfoproteinfosfatázy patří fosfoproteinfosfatáza PtpA *Streptomyces coelicolor* (LI A STROHL 1996) nebo fosfoproteinfosfatáza Ptp *Acinetobacter johnsonii* (GRANGEASSE *et al.* 1998).

enzym	fosforylovaný substrát		enzym. aktivita					
	pTyr-peptid	pThr-peptid	vanadičnan	NaF	EDTA	EGTA	okad. kys.	TFP
skupiny fosfoproteinfosfatáz								
<b>PTP</b>	++++	-	-	++++	++++	++++	++++	++++
<b>PP2A</b>	-	++++	++++	-	++++	++++	-	++++
<b>PP2B</b>	++	+++	++	-	++++	-	++++	-
<b>PPM</b>	-	++++	++++	-	-	++++	++++	++++

Tabulka 2.2: Charakterizace fosfoproteinfosfatáz. ++++ vysoká aktivita, +++ mírně vysoká aktivita, ++ mírná aktivita, + nízká aktivita, - velmi nízká aktivita nebo aktivita nezaznamenána. Převzato z bulletinu: Serine/threonine phosphatase assay system, Promega 2005.

## 2.6 Příklady proteinkináz a fosfoproteinfosfatáz u prokaryot

Téměř ve všech sekvenovaných bakteriálních genomech byly nalezeny geny kódující proteinkinázy a fosfoproteinfosfatázy, avšak jejich funkce a substráty či signální dráhy nejsou dosud plně prostudovány. Z hlediska funkce lze bakteriální proteinkinázy a fosfoproteinfosfatázy rozdělit do několika obecných skupin.

### Proteinkinázy podílející se na regulaci sekundárního metabolismu

Do této skupiny patří např. proteinkináza AfsK *Streptomyces coelicolor*. Jedná se o transmembránový protein fosforylující globální regulátor sekundárního metabolismu AfsR, který kontroluje produkci pigmentu actinorhodinu (MATSUMOTO *et al.* 1994, UMEYAMA A HIRINOCHI 2001, HONG *et al.* 1993).

### Proteinkinázy podílející se na regulaci diferenciaci a morfologie buněk a kontrole buněčného cyklu

Tyto proteiny byly identifikovány např. u *Myxococcus xanthus*. Ke kontrole buněčného cyklu a tvorby plodniček využívá jak Ser/Thr proteinkinázy, tak dvousložkový systém (DWORKIN 1996). Mezi Ser/Thr proteinkinázy, které hrají roli při tvorbě plodniček, patří např. Pkn1 a Pkn9 (MUNOZ-DORADO *et al.* 1991).

Další proteinkinázou nezbytnou při sporulaci je Pkn14, jejímž substrátem je 6-fosfofruktokináza (PFK) (NARIYA A INOUE 2002, NARIYA A INOUE 2003).

Další známou proteinkinázou náležející do této skupiny je serin/threoninová proteinkináza PpkA identifikovaná u sinice *Anabaena* sp.. Účastní se kontroly růstu buněk a tvorby heterocyst (C. C. ZHANG 1993).

*Mycobacterium tuberculosis* kóduje několik STYK proteinkináz: PknA, B, D, E, F, G, H a I (GAY A EVERETT 2000) a dále serin/threoninovou fosfoproteinfosfatázu PstP a tyrosinové fosfoproteinfosfatázy PtpA a PtpB (KOUL *et al.* 2000). Proteinkinázy Pkn jsou nezbytné pro růst mykobakteria v kultuře, správnou morfologii buněk (KANG *et al.* 2005) a virulenci (SASSETTI A RUBIN 2003, COWLEY *et al.* 2004). Tyrosinové fosfoproteinfosfatázy PtpA a PtpB jsou funkční jen při infekci hostitelské buňky a zřejmě slouží k vniknutí bakterie do buňky (KOUL *et al.* 2000, KOUL *et al.* 2004).

Jedinečný vývojový cyklus sexuálně přenosného patogena *Chlamydia trachomatis* regulují proteinkinázy, které během vývoje interagují se signálními drahami hostitele (WEINSTOCK *et al.* 1994). Chlamydiální serin/threoninové proteinkinázy Pkn1 a PknD kontrolují přechod z jedné fáze vývojového cyklu do druhé fáze (MEGGIO A PINNA 2003). Jejich senzorové domény jsou umístěny v membráně vakuoly, inkluzonu, kde vývojový cyklus probíhá. V této membráně interagují s proteiny označovanými jako Incs (BANNANTINE *et al.* 2000, ROCKEY *et al.* 1997). Tím koordinují vývoj chlamydie (SCIDMORE A HACKSTADT 2001).

### **Proteinkinázy/fosfoproteinfosfatázy zapojující se do kontroly metabolických drah**

Tyto enzymy byly identifikovány např. u *Bacillus subtilis*. Jedná se o bifunkční proteinkinázu/fosfoproteinfosfatázu HPr proteinu. Zapojuje se do hlavní katabolické dráhy represe/aktivace metabolismu uhlíkatých sloučenin (CCR/CCA) (KRAVANJA *et al.* 1999, GALINIER *et al.* 1998, REIZER *et al.* 1998, TURINSKY *et al.* 1998). Ve formě hexameru má protein fosfatázovou aktivitu a ve formě trimeru kinázovou aktivitu. Přepínání obou aktivit se děje kompeticí ATP a anorganického fosfátu v buňce (JAULT *et al.* 2000). V přítomnosti ATP a uhlíkatých sloučenin,

např. glukózy, má protein HPr-kináza/fosfatáza kinázovou aktivitu (FIEULAINÉ *et al.* 2001).

Fosfoproteinfosfatáza IphP *Nostoc commune* je kódována na chromozomu a kontroluje metabolické pochody této sinice.

### Proteinkinázy/fosfoproteinfosfatázy podílející se na regulaci virulence

Mezi tyto enzymy patří serin/threoninové fosfoproteinfosfatázy YopH *Yersinia pseudotuberculosis* a SptP *Salmonella typhimurium*. Jsou exportovány z bakterie do hostitelského organismu sekrečním systémem typu III (BLISKA *et al.* 1991, FU A GALAN 1998). Fosfoproteinfosfatáza YopH je kódována extrachromozomálně, plazmidem. Fosfoproteinfosfatáza SptP je kódována na chromozomu.

Mykobakteriální proteinkináza PknB, zodpovědná za virulenci bakterie, sdílí největší sekvenční podobnost katalytické domény s proteinkinázou AfsK *Streptomyces coelicolor* (viz výše). Hledání genu homologního ke genu transkripčního regulátoru *afsR* *S. coelicolor* vedlo k odhalení genu *embR*, který je zodpovědný za rezistenci mykobakterie na etambutol (MOLLE *et al.* 2003).

Ser/Thr proteinkináza Pkn5 (aminoglykosid-3'-fosfotransferáza) *Chlamydia trachomatis* je zodpovědná za rezistenci bakterie na antibiotika. Jejími substráty jsou látky neproteinové povahy (HEINZEL *et al.* 1988, MARTIN *et al.* 1988).

Mezi enzymy ovlivňující virulenci *Streptococcus pneumoniae* pravděpodobně patří serin/threoninová proteinkináza StkP. Jedná se o membránový protein. Autofosforylovaná StkP je substrátem cytoplazmatické fosfoproteinfosfatázy PhpP ze skupiny PP2C a tvoří funkční pár. StkP fosforyluje *in vitro* fosfoglukosaminmutázu (GlmM), která katalyzuje první krok syntézy UDP-N-glukosaminu (NOVÁKOVÁ *et al.* 2005).

## 2.7 *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* je gramnegativní bakterie, která se vyskytuje jak volně žijící ve vodě a v půdě, tak i ve vylučovací soustavě zvířat a lidí. Pohybuje se pomocí polárního bičíku. Patří mezi chemoorganotrofní bakterie a je schopna metabolicky využít více než 30 organických látek. *P. aeruginosa* nemá pouzdro, někdy je však obalena



Obrázek 2.3: Elektronmikroskopický snímek *P. aeruginosa*. Julia Plotnikov, 2006.

slizovou vrstvou. V přírodě se vyskytuje buď ve formě biofilmu, přisedlá na povrchu nebo substrátu, nebo jako volně žijící planktonická jednobuněčná forma.

Většinu kmenů lze pěstovat na základních živných půdách, na kterých vytváří kovově lesklé kolonie. Nejčastějšími disociačními fázemi jsou hladké S (smooth), pocházející z klinických izolátů, a drsné R (rough), pocházející z přírodních izolátů. Pasážováním na kultivačních médiích se z S formy stává R forma. U pacientů s cystickou fibrózou (CF) se objevuje mukózní forma M (mucous). Starší kultury mají charakteristický zápach po trimethylaminu. Optimální kultivační teplota je 30-37 °C, bakterie se však množí i při pokojové teplotě a celkový rozsah teplot, při kterých je schopna růstu, je 10-42 °C.

Bakterie kolonizuje sliznice, převážně respiračního a močového ústrojí, u hostitelů se sníženou imunitou nebo pacientů s CF. Je jedním z nejčastějších původců nosokomiálních onemocnění. V nemocničních prostředích se vyskytuje hlavně na jednotkách intenzivní péče, resuscitačních a novorozeneckých odděleních.

Patogenita této bakterie je způsobena jednak faktory vázanými na bakteriální buňku (např. extracelulární polysacharid alginát, stěnový lipopolysacharid), jednak extracelulárními produkty (enzymy, toxiny, pigmenty). Navzdory tomu, že tato bakterie disponuje řadou virulenčních faktorů, vyvolává infekce jen u jedinců se sníženou imunitou. U zdravého člověka může v kontaminovaném prostředí dojít pouze ke kolonizaci, onemocnění však nevznikne. Ke snížení imunity dochází při defektech fagocytózy, rozsáhlých popáleninách, maligních procesech (hlavně při leukémii),



během podávání cytostatik, imunosupresiv, kortikoidů, při dlouhodobém podávání antibiotik, které umožní osídlení rezistentními bakteriemi, po těžkých operativních zásazích, při dlouhodobém zavedení cévních katetrů a katetrů do močových cest nebo při diabetes.

Velmi závažná je infekce u nemocných s cystickou fibrózou, kdy jsou dýchací cesty kolonizovány mukoidními kmeny s vysokou produkcí proteolytických enzymů. Ohroženi jsou také nedonošení novorozenci. Proteolytické enzymy bakterie ohrožují i poraněné sliznice oka, kdy infekce může skončit až jeho ztrátou a slepotou.

Kmeny vyvolávající nemocniční infekce jsou obvykle vysoce virulentní a rezistentní na antibiotika (BEDNÁŘ *et al.* 1996).

### 2.7.1 Proteinkinázy a fosfoproteinfosfatázy u *Pseudomonas aeruginosa*.

Serin/threonin/tyrosinové proteinkinázy a fosfoproteinfosfatázy byly na základě sekvenční homologie objeveny i u *Pseudomonas aeruginosa*. Předpokládá se, že ovlivňují virulenci této bakterie tak, že regulují expresi genů kódujících některé virulenční faktory. Proteinkinázy Stk1 a PpkA a fosfoproteinfosfatáza Stp1 již byly biochemicky charakterizovány. Další dva enzymy byly charakterizovány v naší laboratoři. Jsou to duální proteinkináza/fosfoproteinfosfatáza PpkB a fosfoproteinfosfatáza PppA.

Serin/threoninová proteinkináza Stk1 a fosfoproteinfosfatáza Stp1 tvoří funkční pár. Konec genu *stp1* a začátek genu *stk1* tvoří čtyřnukleotidový přesah. Oba geny jsou transkribovány společně s genem *icmF*.

Proteinkináza Stk1 velká 39 kDa a dlouhá 329 aminokyselin je zároveň nejmenší známou funkční serin/threoninovou proteinkinázou. Katalytická doména se nachází na N-konci proteinu. Více se autofosforyluje na threoninu než serinu. Fosforylační aktivita byla testována v přítomnosti eukaryotického histonu H1 jako možného substrátu (MUKHOPADHYAY *et al.* 1999).

Fosfoproteinfosfatáza Stp1 je velká 27 kDa a dlouhá 242 aminokyselin. Katalytická doména se nachází na N-konci enzymu. Obsahuje 11 konzervovaných motivů charakteristických pro fosfoproteinfosfatázy skupiny PPM. Její katalytická aktivita

je závislá na  $Mn^{2+}$  s optimální koncentrací 5-6 mM, nikoli na  $Ca^{2+}$  a  $Mg^{2+}$ . Jejimi inhibitory jsou EDTA a NaF. Neinhibuje ji okadaová kyselina. Fosfatázová aktivita byla testována na kaseinu fosforylovaném CKII proteinkinázou na serinu a threoninu (MUKHOPADHYAY *et al.* 1999).

Geny *stp1* a *stk1* se transkribují společně s homologem genu *icmF* *Legionella pneumophila*, který by v *Pseudomonas aeruginosa* mohl sloužit k přenosu molekul poškozujících makrofágy, podobně jako je tomu u legionelly (BETTINA *et al.* 1994, PURCELL A HUMAN 1998). Je také nezbytný pro konjugaci plazmidů (SEGAL *et al.* 1998).

Další serin/threoninovou proteinkinázou této bakterie je PpkA dlouhá 1032 aminokyselin. Jedná se o transmembránový protein s N-terminální katalytickou doménou dlouhou 250 aminokyselin lokalizovanou v cytoplazmě. Obsahuje 10 z 12 konzervovaných motivů Ser/Thr proteinkináz eukaryotického typu (HANKS *et al.* 1988). Za kinázovou doménou následuje prolin bohatá oblast o délce 75 aminokyselin, která může být důležitá pro vazbu PpkA na jiné proteiny, jako jsou substráty, kofaktory nebo regulátory (WILLIAMSON 1994). C-terminální doména patří mezi domény typu von Willebrand faktor A. Předpokládá se, že se účastní interakcí s povrchem hostitelské buňky. V eukaryotech tyto domény slouží k vazbě glykoproteinů a receptorů růstových faktorů (WHITTAKER A HYNES 2002). PpkA *in vitro* fosforyluje proteiny eukaryotického původu jako MBP (Myelin Basic Protein),  $\beta$ -kasein nebo aprotinin. Její přirozené substráty zatím nebyly nalezeny. Je schopná autofosforylace, po autofosforylaci však nedochází ke změně katalytické aktivity (MOTLEY A LORY 1999). PpkA je specificky indukována během infekce v neutropenické myši. Nadprodukce PpkA vede k inhibici růstu jak *E. coli*, tak *P. aeruginosa* (MOTLEY A LORY 1999).

S genem pro proteinkinázu PpkA sousedí gen kódující předpokládanou fosfoproteinfosfatázu PppA (PA0075). Charakterizace fosfoproteinfosfatázy PppA je součástí této diplomové práce a více o ní bude pojednáno v sekci „Výsledky“.

Druhým enzymem *Pseudomonas aeruginosa*, který se podařilo charakterizovat v naší laboratoři je duální proteinkináza/fosfoproteinfosfatáza PpkB (PA14\_41520). V genomu *P. aeruginosa* byla identifikována na základě sekvenční homologie s jinými Ser/Thr/Tyr proteinkinázami nalezenými v bakteriích. PpkB je protein o velikosti

58 kDa. Kinázová doména enzymu je spolu s transmembránovou doménou umístěna na C-konci enzymu. Na N-konci molekuly se nachází fosfatázová doména. Kinázová aktivita PpkB je závislá na přítomnosti  $Mg^{2+}$  a  $Mn^{2+}$  o optimální koncentraci 5 mM a neinhibují ji ani staurosporin (0-200  $\mu$ mol), ani maleinimid (0-200 nmol). Autofosforylace probíhá na tyrosinu. Fosfatázová aktivita PpkB je závislá na autofosforylaci kinázové domény enzymu a přítomnosti  $Mg^{2+}$  a  $Mn^{2+}$ . Fosfatázová doména je homologní s fosfoproteinofosfatázami skupiny PP2C (nepublikovaná data).

Další proteinkinázou *P. aeruginosa* je tyrosinová proteinkináza WaaP. Jedná se o proteinkinázu, která fosforyluje HepI (heptóza I) ve vnitřním jádře lipopolysacharidu na uhlíku číslo 4 (WALSH *et al.* 2000).

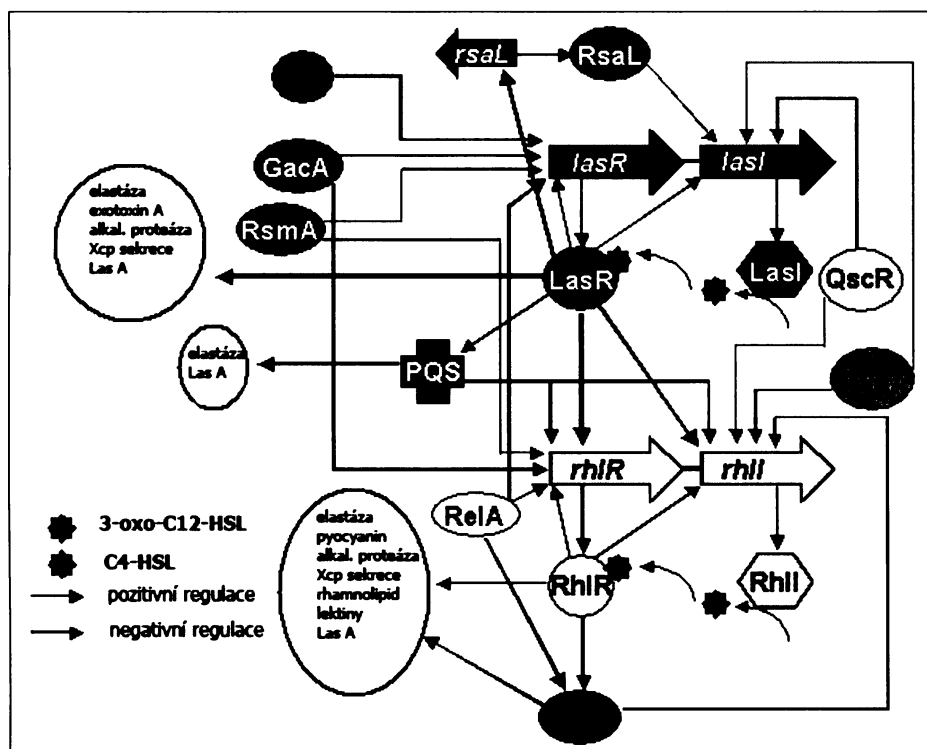
## 2.7.2 Quorum sensing systém

*Quorum sensing* (QS) je způsob mezibuněčné komunikace zprostředkované malými molekulami, tzv. autoinduktory. QS funguje na jednoduchém principu: množství autoinduktoru uvolněné do prostředí jednou bakterií je příliš malé, než aby bylo zaznamenáno. Je-li hustota bakteriální populace dostatečná, dosáhne koncentrace autoinduktoru prahové hodnoty, která dovoluje bakterii reagovat na tento podnět buď represí nebo stimulací cílových genů (KIEVIT A IGLEWSKI 2000). *P. aeruginosa* má celkem tři *quorum sensing* systémy. *Las* a *rhl* systémy se od PQS systému (*Pseudomonas quinolone signal*) liší chemickou povahou svých autoinduktorů. Jedná se o acylhomoserinlaktony syntetizované z prekursoru S-adenosylhomoserinlaktonu. V případě *las* systému se jedná o N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserinlaktón, v případě *rhl* systému je to N-butyryl-L-homoserinlaktón. Autoinduktorem PQS systému je 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PESCI *et al.* 1999). *Las* a *rhl* systémy obsahují tři komponenty: autoinduktor, syntázu autoinduktoru LasI/RhlI a transkripční regulátor LasR/RhlR (PASSADOR *et al.* 1993, PEARSON *et al.* 1994). Po navázání autoinduktoru na transkripční regulátor dojde k vytvoření aktivního komplexu, který reguluje expresi mnoha genů. Pod kontrolu *las* systému spadají geny elastáz *lasB*, *lasA*, alkalické proteázy *aprA*, geny proteinů sekreční dráhy *xcp*: *xcpP* a *xcpR* nebo gen *toxA* kódující exotoxin A (GAMBELLO A IGLEWSKI 1991, GAMBELLO *et al.* 1993, PEARSON *et al.* 1994, TODER *et al.* 1991, SEED *et al.* 1995, KIEVIT *et al.*

1999). Pod kontrolou *rhl* systému je gen rhamnolipidtransferázy *rhlAB*, geny elastáz *lasA* a *lasB*, gen kódující sigma faktor stacionární fáze RpoS, gen pro alkalickou proteázu *aprA*, geny *xcpP* a *xcpR* nebo geny pro syntézu pyocyaninu. QS systémy regulují i expresi genů nezbytných pro tvorbu biofilmu (DAVIS *et al.* 1998).

Z hlediska hierarchie je *las* systém nadřazený *rhl* systému (LATIFI *et al.* 1996, PESCI *et al.* 1997). Regulátor *las* systému LasR stimuluje expresi genu *lasI*, *rhlI* a *rhlR* a regulátor *rhl* systému RhlR stimuluje expresi *rhlI* (BRINT A OHMAN 1995, LATIFI *et al.* 1996, LATIFI *et al.* 1995, OCHSNER *et al.* 1994, PASSADOR *et al.* 1993, WINSON *et al.* 1995). PQS je také pod kontrolou *las quorum sensing* systému. K aktivitě PQS je nezbytný *rhl* systém (CHAPON *et al.* 1997).

Expese genů kódujících proteinkinázu *stk1* a fosfoproteinfosfatázu *stp1* je pod kontrolou *quorum sensing* systému *rhl*. Tyto geny jsou také reprimovány prostřednictvím RpoS (M. SCHUSTER *et al.* 2004).



Obrázek 2.4: Schéma *quorum sensing* systému *Pseudomonas aeruginosa*. Systém *las* je nadřazen systémům *rhl* a PQS. Komplex LasR-3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL pozitivně ovlivňuje transkripci regulátoru RhlR, genů systému PQS a genů některých virulenčních faktorů. Sám je stimulován proteiny Vfr a GacA. Společně se systémem *rhl* je reprimován proteinem RsmA. Systém PQS je pozitivně regulován LasR-3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL. Sám stimuluje systém *rhl*. Pozitivně působí i na transkripci některých virulenčních faktorů. Protein GacA: formování biofilmu; MvaT: regulace exprese genů zodpovědných za rezistenci k chloramfenikolu; QscR: kontrola časování exprese genů regulovaných QS; RelA: regulace odpovědi na nutriční stres; RsmA: pozitivní regulátor virulenčních faktorů transportovaných do buněk sekrečním systémem typu III; Vfr: regulátor virulenčních faktorů. Převzato Collection Mémoires et thèses électroniques, Université Laval, 2006.

# Kapitola 3

## Cíl

Cílem této diplomové práce byla příprava expresních plazmidů, izolace a charakterizace vybraných serin/threoninových proteinkináz a fosfoproteinfosfatáz gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Jednalo se o serin/threoninové proteinkinázy PpkA a Stk1 a fosfoproteinfosfatázy Stp1 a PppA. Některé z nich již byly částečně charakterizovány.

O všech studovaných proteinech se předpokládá, že ovlivňují patogenitu *Pseudomonas aeruginosa*. Signální dráha zahrnující proteinkinázu Stk1 a fosfoproteinfosfatázu Stp1 je pod kontrolou mechanismu *quorum sensing*. Mechanismem *quorum sensing* je řízena i exprese mnoha virulečních faktorů této bakterie. Domníváme se, že signální dráhy by mohly regulovat virulenci *P. aeruginosa*. Jaký je mechanismus vzájemné interakce není dosud přesně známo. Identifikace a studium jednotlivých složek těchto drah může pomoci porozumět biologickým pochodům, díky nimž se bakterie stává patogenní.

### **Cíle diplomové práce:**

1. Příprava vektorů pro nadprodukcí proteinů Stk1, Stp1, PpkA a PppA v *Escherichia coli* BL21(DE3)
2. Naprodukce a izolace těchto proteinů
3. Charakterizace předpokládané fosfoproteinfosfatázy PppA

4. Studium interakcí proteinů Stk1-Stp1 a PpkA-PppA

# Kapitola 4

## Materiál a metodika

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Bakteriální kmeny

*Pseudomonas aeruginosa*, divoký typ PT5 (laboratorní sbírka, Thilo Köhler, University of Geneva).

*Escherichia coli* BL21(DE3) (Promega):  $F^-$ , *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>*, ( $r_{B^-}$ ,  $m_{B^-}$ ), *dcm*, *gal*,  $\lambda$ (DE3), pLysS, Cm<sup>r</sup>.

*Escherichia coli* JM109 (Promega): *endA1*, *recA1*, *gyrA961*, *thi*, *hsdR17*( $r_{K^-}$ ,  $m_{K^+}$ ), *relA1*, *supE44*,  $\Delta$ (lac-proAB), [ $F'$ , *traD36*, *proAB*, *lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15*].

#### 4.1.2 Vektory

**pET28b(+)** (Novagen) komerční expresní vektor o velikosti 5,3 kb. Expres cílových genů je pod kontrolou T7 IPTG-inducibilního promotoru. Vektor umožňuje fúzi N-konce cílového proteinu s histidinovou a T7 kotvou. Dále se ve vektoru nachází hromadné klonovací místo (*Bam*HI-*Xho*I), T7 terminátor a gen odpovědný za rezistenci ke kanamycinu.

**pET42b(+)** (Novagen) komerční expresní vektor o velikosti 5,93 kb navržený pro klonování a nadprodukcí proteinů. Vektor obsahuje T7 promotor, histidinovou, GST- a S-kotvu, hromadné klonovací místo (*Psh*AI-*Xho*I), T7 terminátor a gen nesoucí rezistenci na kanamycin.



### 4.1.3 Kultivační půdy

Množství jednotlivých složek jsou vždy vztažena na 1 l půdy. Pevné půdy byly připraveny přidáním 20 g agaru na 1 l média. Selektivní půdy byly připraveny přidáním příslušného antibiotika na konečnou koncentraci:

pro *Escherichia coli*: 50 µg/ml kanamycinu

#### Půdy pro kultivaci *E. coli* a *P. aeruginosa*

##### Půda LB, pH 7,0:

- 10 g trypton (Oxoid)
- 5 g yeast extract (Oxoid)
- 10 g NaCl

#### Půdy pro kultivaci *E. coli*

##### Půda SOB:

- 20 g trypton (Oxoid)
- 5 g yeast extract (Oxoid)
- 0,58 g NaCl
- 0,186 g KCl

po sterilizaci přidáno:

- 10 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>
- 10 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>

### 4.1.4 Pufry a roztoky

- **TAE puf:** 40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 2 mM EDTA; pH 8,5
- **TB puf:** 10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl; pH 6,7; sterilizováno filtrací; po sterilizaci přidáno MnCl<sub>2</sub> (výsledná koncentrace 55 mM)

- **TE pufr:** 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0
- **GTE roztok:** 50 mM glukosa, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA; pH 8,0
- **PII roztok:** 0,2 M NaOH, 1% SDS
- **Fixační roztok:** 40% MetOH, 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
- **5x Denaturační (STOP) pufr:** 350 mM Tris-HCl; pH 6,8, 20% glycerol, 15% SDS, 25% β-merkaptoetanol
- **PAGE pufr:** 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1% SDS; pH 8,3
- **Blotovací pufr:** 48 mM Tris, 39 mM glycin, 0,0375% SDS, 20% metanol
- **PBS-Tris pufr:** 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 0,05% Tween-21; pH 7,5
- **Detekční roztok:** 100 ml PBS-Tris, 3 mg DAB (3,3'-diaminobenzidin), kapka DMSO, 3,3 μl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (na konečnou koncentraci 0,01%)
- **10x Pufr A:** 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM MnCl<sub>2</sub>
- **Eluční pufr:** 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 100 mM imidazol; pH 7,5
- **Promývací pufr:** 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol; pH 7,5
- **Koloidní Coomassie brilliant blue:** roztok A - 18,8 ml 85% kyseliny ortho-fosforečné, 80 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200 ml H<sub>2</sub>O; roztok B - 0,6 g Coomassie Blue G-250, 50 ml H<sub>2</sub>O; smíchat 110 ml deionizované vody, 40 ml methanolu, 10 ml roztoku B a 40 ml roztoku A

#### 4.1.5 Software

Mapy klonovacích vektorů byly sestaveny pomocí programu Clone Manager Version 4.01 (Scientific & Educational Software).

Analýza radiogramů byla provedena pomocí programu Aida-Advantage Image Data Analyzer Version 2.11 (Izotopenmessgeräte GmbH).

## 4.1.6 Chemikálie a enzymy

chemikálie	firma	zkratka
Akrylamid	Serva	AA
Bromfenolová modř	Lachema	BPB
Dithiothreitol	Promega	DTT
Hovězí sérový albumin	Exbio	BSA
Peroxodisíran amonný	Lachema	APS
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin	Serva	TEMED
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Serva	Tris
2'-Deoxyadenosin -5'-trifosfát	Promega	dATP
2'-Deoxycytidin -5'-trifosfát	Promega	dCTP
2'-Deoxyguanosin -5'-trifosfát	Promega	dGTP
2'-Deoxythymidin -5'-trifosfát	Promega	dTTP
6x Loading Dye	Fermentas	
Agarosa	Sevac	
Agarosa, LE, analytical grade	Promega	
Kanamycin	USB	Km
DNA 1 kb ladder	Fermentas	
DNA 100 bp ladder	NEB	
Dodecylsulfát sodný	Merck	SDS
Ethidium bromid	Sigma	EtBr
Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktosid	Sigma	IPTG
Lysozym	Boehringer	
Glycin	Serva	Gly
Adenosin-5-[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]trifosfát	MP-Bio	[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP
BCA Protein assay reagent	Pierce	
Kys. ethylenglycoltetraoctová	Sigma	EGTA
Dimethylsulfoxid	Sigma	DMSO
Kys. ethylendiaminotetraoctová dvojsodná sůl	Sigma	EDTA

Polyoxyethylenesorbitan monolaurate	Sigma	Tween 20
Ribonukleasa A	Boehringer	RNasa A
Proteinasa K	Boehringer	
Benzoáza	Merck	
Inhibitor proteáz	Sigma	
Primární protilátka Mouse monoclonal anti-His	Sigma	
Sekundární protilátka Sheep anti-mouse IgG-HRP	Sigma	
Prestained Protein Marker Broad Range	NEB	
Talon metal affinity resin	Clontech	

Ostatní chemikálie byly běžně dostupné látky analytické čistoty.

<b>enzymy modifikující DNA</b>	<b>firma</b>
restrikční endonukleázy	NEB
T4 DNA ligáza	Fermentas
Taq-purple DNA polymerase	Top-Bio
Herkulase enhanced polymerase	Stratagene
Pfu DNA polymerase	Stratagene

**oligonukleotidy**

<b>název</b>	<b>sekvence</b>
PPKA(Nde)FOR(60)	5'-GCA TAT CCA TAT GGA CAT AGA ACT TCC GGG-3'
PPKA(Xho)REV-H(60)	5'-GCG CTC GAG TGG CAG CGT CGA CAG CGG-3'
sPPKA(Hind)FOR(60)	5'-GGG AAG CTT CGA CGC CGA CGG-3'
sPPKA(Hind)REV(62)	5'-GGG AAG CTT TCC TTC GAG TCG AAG-3'
PPPA(Nde)FOR(62)	5'-GGA TAT CCA TAT GGT GCC CAA CTC AGT CAG-3'
PPPA(Xho)REV(62)	5'-GGC CTC GAG TTA TCA GAA GGC CCT GAC CAG C-3'
PPPA(Xho)REV-H(64)	5'-GCG CTC GAG GAA GGC CCT GAC CAC CAG G-3'
STK1(Nde)FOR(66)	5'-GGA TAT CCA TAT GAA CGA ACC GCT GTC GTC G-3'
STK1(Not)REV-H(58)	5'-ATA GTT TAG CGG CCG CAG GGG CAA GAA CGC CGG-3'
STK1(Eco)REV(62)	5'-TCG AAT TCT TAT CAA CGG GCA AGA ACG CCG-3'
STP1(Nde)FOR(60)	5'-CCA TAT CCA TAT GCA ACG CAG CGA GCC C-3'
STP1(Xho)REV-H(62)	5'-GTG CTC GAG TTG GCG GAT CAC CAC GGC CG-3'
STP1(Xho)REV(60)	5'-CCG CTC GAG TTA TCA TTG GCG GAT CAC CAG G-3'

Všechny oligonukleotidy byly syntetizovány společností VBC-GENOMICS (Viedeň).

## 4.2 Metodika

### 4.2.1 Příprava a transformace kompetentních buněk

#### Příprava kompetentních buněk JM109

Kompetentní buňky *E. coli* JM109 byly použity pro pomnožení a následnou izolaci plazmidových konstruktů. Buňky jsme připravili upravenou metodou podle Inoue (1990).

100 ml SOB pŕdy jsme naočkovali na  $OD_{600}=0,001$  bakteriální prekulturou narostlou přes noc a kultivovali při teplotě 20 °C za intenzivního třepání. Po dosažení  $OD_{600} = 0,6$  jsme kultivaci přerušili a buňky inkubovali 10 minut na ledu. Po centrifugaci (10 min, 2 500 g, 4 °C) jsme buňky resuspendovali ve 32 ml ledového pufru TB, suspenzi jsme inkubovali 10 min na ledu a centrifugovali za stejných podmínek.

Po resuspendování buněk v 8 ml pufru TB jsme pomalu přidávali DMSO do konečné koncentrace 7 % a po inkubaci 10 minut na ledu jsme kompetentní buňky rozdělili na alikvoty, prudce zmrazili v tekutém dusíku a dlouhodobě uchovávali při -70 °C.

### **Příprava jednorázových kompetentních buněk BL21(DE3)**

Přes noc narostlou kulturu jsme zaočkovali do 2 ml LB na  $OD_{600}=0,05$  a nechali růst v 37 °C do  $OD_{600}=0,6$ .

Během dalších kroků jsme kulturu udržovali na ledu. Po centrifugaci (3000 g, 10 minut) jsme resuspendovali peletu v 1 ml sterilního 100 mM  $CaCl_2$ . Následovala centrifugace (3000 g, 10 minut), resuspendování pelety v 1 ml 100 mM  $CaCl_2$ , opět centrifugace (3000 g, 10 minut) a resuspendování pelety v 100  $\mu$ l 100 mM  $CaCl_2$ . Kompetentní buňky jsme neprodleně transformovali.

### **Transformace kompetentních buněk *E. coli* plazmidovou DNA**

Ke 100  $\mu$ l rozmražených kompetentních buněk (případně čerstvě připravených) a uchovávaných na ledu jsme přidali přibližně 100 ng plazmidové DNA nebo ligační směs a inkubovali 30 minut na ledu. Poté jsme provedli teplotní šok 1,5 minuty ve 42 °C a následné ochlazení 1,5 minuty na ledu. K suspenzi buněk jsme přidali 4 objemy LB média a kultivovali 1 hod ve 37 °C. Suspenzi jsme vyseli na misku s LB půdou obsahující požadované antibiotikum.

## **4.2.2 DNA manipulace**

### **• Izolace plazmidové DNA z *E. coli***

Izolace plazmidové DNA jsme prováděli podle laboratorního manuálu Sambrook *et al.* (1989). Izolovanou bakteriální kolonii jsme zaočkovali do 2 ml LB média s příslušným antibiotikem a kultivovali přes noc ve 37 °C. 1,5 ml bakteriální suspenze jsme centrifugovali 2 minuty při 13 000 g a buňky resuspendovali ve 100  $\mu$ l roztoku GTE. Přidali jsme 200  $\mu$ l roztoku P II, šetrně promíchali a nechali inkubovat 5 minut při pokojové teplotě. Poté jsme ke směsi přidali 150  $\mu$ l 3 M roztoku octanu draselného, promíchali a inkubovali

10 minut na ledu. Vzorek jsme 10 minut centrifugovali (13 000 g), supernatant odsáli do nové zkumavky a plazmidovou DNA vysráželi stejným objemem isopropanolu (450  $\mu$ l). Centrifugovali jsme 10 min (13 000 g), supernatant odsáli a vzniklou sraženinu promyli 200  $\mu$ l 80% ethanolu. Plazmidovou DNA jsme vysušili a rozpustili ve 20  $\mu$ l TE s RNázou A (20  $\mu$ g/ml).

- **Izolace plazmidové DNA *E. coli* komerční soupravou**

Pro přípravu plazmidové DNA jsme používali také komerční soupravu QIAprepSpin Miniprep Kit (QIAGEN). Při práci jsme dodržovali pokyny výrobce.

- **Izolace chromozomální DNA *Pseudomonas aeruginosa***

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

- **Minipreparace genomové DNA *Pseudomonas aeruginosa***

Prekulturou narostlou přes noc jsme zaočkovali 5 ml LB média na  $OD_{600}=0,05$  a nechali růst při 37 °C do  $OD_{600} = 0,5$ . Poté jsme odebrali 1,5 ml kultury a centrifugovali (2 minuty, 13 000 g). Supernatant jsme odsáli a buňky re-suspendovali v 567  $\mu$ l TE, přidali 3  $\mu$ l Proteinázy K (20 mg/ml), dobře promíchali a inkubovali 60 minut ve 37 °C. Po inkubaci jsme přidali 100  $\mu$ l 5 M NaCl, promíchali a přidali 80  $\mu$ l CTAB/NaCl. Vzorek jsme dobře promíchali, inkubovali 10 minut při 65 °C a extrahovali 1 objemem (0,75 ml) chloroformu. Vzorek jsme centrifugovali (10 minut, 13 000 g) za pokojové teploty a supernatant převedli do nové zkumavky. K supernatantu jsme přidali 1  $\mu$ l RNázy A (10 mg/ml) a inkubovali 10 minut při pokojové teplotě. Následovala extrakce 1 objemem směsi fenol - chloroform a centrifugace (5 minut, 13 000 g). Supernatant jsme opět převedli do nové zkumavky a extrahovali 1 objemem chloroformu, centrifugovali (5 minut, 13 000 g) a vodní fázi odebrali do nové zkumavky. DNA jsme vysráželi přidáním 1 objemu isopropanolu. Vzorek jsme promíchali převrácením zkumavky a centrifugovali (15 minut, 13 000 g). DNA jsme promyli 0,5 ml 80% ethanolu. Vzorek jsme centrifugovali (5 minut, 13 000 g), odstranili ethanol, DNA vysušili a rozpustili v 50  $\mu$ l  $H_2O$ .

- **Krátké srážení DNA**

K ligační směsi nebo restrikční směsi jsme přidali 1  $\mu$ l glykogenu, 1/10 objemu NaOAc a 1 objem izopropanolu. Po promíchání pomocí vortexu a centrifugaci (10 minut, 13 000 g) jsme odsáli supernatant, přidali 200  $\mu$ l 80% ethanolu, opět promíchali pomocí vortexu a centrifugovali (5 minut, 13 000 g). Po odsání supernatantu jsme vysušili peletu a vzorek rozpustili ve vodě.

- **Reakce s enzymy modifikujícími DNA**

### Štěpení restrikčními endonukleázami

Při štěpení restrikčními endonukleázami jsme se řídili pokyny výrobce a používali originální reakční pufr. Pokud při štěpení dvěma endonukleázami nebylo



možné použít obě zároveň, reakční směs jsme před použitím druhého enzymu přesráželi.

### **Ligace molekul DNA**

Celkový objem ligační směsi činil 20  $\mu\text{l}$  s 1 U T4 DNA ligázy a 1/10 celkového objemu příslušného ligačního pufru. Poměr fragmentu a vektoru jsme dodržovali 2:1. Ligační reakci jsme nechali probíhat při pokojové teplotě přes noc.

## **4.2.3 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu**

### **Analytická DNA elektroforéza**

DNA jsme analyzovali na horizontální agarózové elektroforéze v TAE pufru. Hustotu agarózového gelu jsme obměňovali podle velikosti fragmentů DNA. DNA byla nanášena ve vzorkovém pufru ve směsi s 6x Loading Dye. Fragменты DNA jsme separovali při napětí 5 V/cm.

### **Preparativní DNA elektroforéza**

Fragменты separované v agarózovém gelu jsme izolovali pomocí komerční soupravy Gel Extraction Kit (Qiagen) dle návodu výrobce.

## **4.2.4 Amplifikace pomocí PCR**

Amplifikační PCR reakci jsme používali k syntéze požadovaných genů z genomu *Pseudomonas aeruginosa*, případně k ověření, že daný klon obsahuje požadovaný gen.

Pro výpočet teploty tání oligonukleotidů ( $T_m$ ) jsme použili vzorec:

$$T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$$

K amplifikaci genů pro jejich další použití jsme pracovali s polymerázami: Pfu DNA polymerase (Stratagene) a Herkulase enhanced DNA polymerase (Stratagene).

Pro ověření pozitivních klonů jsme používali Taq-purple DNA polymerase (Top-Bio). Jako templát jsme používali 100 ng chromozomální DNA.

Reakční směs s Pfu DNA polymerase obsahovala 1x reakční pufr; 4% - 10% DMSO; 1,8 - 2,5 U Pfu DNA polymerase; 0,25 - 1  $\mu$ M oligonukleotidů; 0,4 mM každého dNTP (viz tabulka 4.2). Reakční směs jsme míchali do celkových objemů 50  $\mu$ l.

Reakční směs s Herkulase enhanced DNA polymerase obsahovala 1x reakční pufr; 4% - 6 % DMSO; 5 U Herkulase enhanced DNA polymerase; 0,25  $\mu$ M oligonukleotidy; 0,4 mM každého dNTP (viz tabulka 4.2). Reakční směs jsme míchali do celkového objemu 50  $\mu$ l.

Reakční směs s Taq-purple DNA polymerase obsahovala 1x reakční pufr; 1 U Taq-purple DNA polymerase; 1,5 mM  $MgCl_2$ ; 1  $\mu$ M oligonukleotidy; 0,2 mM každého dNTP (viz tabulka 4.1). Reakční směs jsme míchali do celkového objemu 25  $\mu$ l.

PCR reakce probíhaly v cykleru Mastercycler gradient (Eppendorf).

Tabulka 4.1: Rozpis PCR reakcí jednotlivých genů s Taq-purple DNA polymerase

<b>PCR S Taq-purple polymerase</b>	
templát	1 $\mu$ l
oligonukl.	2 x 2.5 $\mu$ l
dNTP 's	0.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	1.5 $\mu$ l
pufř	2.5 $\mu$ l
Taq	1 $\mu$ l (1 U)
voda	13.5 $\mu$ l

Tabulka 4.2: Rozpis PCR reakcí s Pfu DNA polymerase a Herkulase enhanced DNA polymerase

<b>PCR genu <i>stk1</i></b>	
templát	1 $\mu$ l
oligonukl.	2 x 1.25 $\mu$ l
dNTP 's	2 $\mu$ l
DMSO	5 $\mu$ l (10%)
pufř	5 $\mu$ l
Pfu	0.75 $\mu$ l (1.8 U)
voda	33.75 $\mu$ l

<b>PCR genu <i>stp1</i></b>	
templát	1 $\mu$ l
oligonukl.	2 x 1.25 $\mu$ l
dNTP 's	2 $\mu$ l
DMSO	5 $\mu$ l (10%)
pufř	5 $\mu$ l
Pfu	0.75 $\mu$ l (1.8 U)
voda	33.75 $\mu$ l

<b>PCR genu <i>pppA</i></b>	
templát	1 $\mu$ l
oligonukl.	2 x 0.5 $\mu$ l
dNTP 's	5 $\mu$ l
DMSO	2 $\mu$ l (4%)
pufř	5 $\mu$ l
Pfu	1 $\mu$ l (2.5 U)
voda	39 $\mu$ l

<b>PCR genu <i>ppka1</i></b>	
templát	1 $\mu$ l
oligonukl.	2 x 1.25 $\mu$ l
dNTP 's	2 $\mu$ l
DMSO	3 $\mu$ l (6%)
pufř	5 $\mu$ l
herkuláza	1 $\mu$ l (5 U)
voda	35.5 $\mu$ l

<b>PCR genu <i>ppka2</i></b>	
templát	1 $\mu$ l
oligonukl.	2 x 1.25 $\mu$ l
dNTP 's	2 $\mu$ l
DMSO	2 $\mu$ l (4%)
pufř	5 $\mu$ l
herkuláza	1 $\mu$ l (5U)
voda	36.5 $\mu$ l



**Amplifikační cyklus pro gen *stk1* s Pfu DNA polymerase**

1. počáteční denaturace: 98 °C → 45 s
2. denaturace: 98 °C → 45 s
3. hybridizace primerů: 62 °C → 45 s
4. elongace: 72 °C → 2 min
5. závěrečná elongace: 72 °C → 10 min

Cyklus kroků 2 - 4 proběhl celkem 30krát.

**Amplifikační cyklus pro gen *stp1* s Pfu DNA polymerase**

1. počáteční denaturace: 98 °C → 45 s
2. denaturace: 98 °C → 45 s
3. hybridizace primerů: 60 °C → 45 s
4. elongace: 72 °C → 2 min
5. závěrečná elongace: 72 °C → 10 min

Cyklus kroků 2 - 4 proběhl celkem 30krát.

**Amplifikační cyklus pro gen *pppA* s Pfu DNA polymerase**

1. počáteční denaturace: 98 °C → 45 s
2. denaturace: 96 °C → 45 s
3. hybridizace primerů: 62 °C → 45 s
4. elongace: 72 °C → 2 min
5. závěrečná elongace: 72 °C → 10 min

Cyklus kroků 2 - 4 proběhl celkem 30krát.

**Amplifikační cyklus pro fragment *ppkA1* s Herkulase enhanced DNA polymerase**

1. počáteční denaturace: 98 °C → 3 min
2. denaturace: 98 °C → 40 s
3. hybridizace primerů: 62 °C → 30 s
4. elongace: 72 °C → 2 min

Cyklus 2 - 4 proběhl 10krát.

5. denaturace: 98 °C → 40 s
6. hybridizace primerů: 62 °C → 30 s
7. elongace: 72 °C → 2 min (+10 s/cyklus)
8. závěrečná elongace: 72 °C → 10 min

Cyklus kroků 5 - 7 proběhl 25krát.

**Amplifikační cyklus pro fragment *ppkA2* s Herkulase enhanced DNA polymerase**

1. počáteční denaturace: 98 °C → 3 min
2. denaturace: 98 °C → 40 s
3. hybridizace primerů: 63 °C → 30 s
4. elongace: 72 °C → 2 min

Cyklus kroků 2 - 4 proběhl 10krát.

5. počáteční denaturace: 98 °C → 40 s
6. hybridizace primerů: 63 °C → 30 s
7. elongace: 72 °C → 2 min (+10 s/cyklus)
8. závěrečná elongace: 72 °C → 10 min

Cyklus kroků 5 - 7 proběhl 25krát.

### **Amplifikační cyklus PCR s Taq-purple DNA polymerase**

1. počáteční denaturace: 96 °C → 1 minuta
2. denaturace: 96 °C → 35 s
3. hybridizace primerů: dle zvolených primerů → 35 s
4. elongace: 72 °C → dle délky amplifikovaného templátu
5. závěrečná elongace: 72 °C → 5 minut

Cyklus kroků 2-4 proběhl 25krát.

## **4.2.5 Manipulace s proteiny**

### **Exprese proteinů**

Bakteriální kulturu *E. coli* BL21(DE3) nesoucí příslušný expresní plazmid zaočkovanou přes noc do 5 ml LB média s antibiotikem jsme přeočkovali do potřebného objemu (25 nebo 50 ml LB média) na  $OD_{600} = 0,05$  a inkubovali v 30 °C či 18 °C do  $OD_{600} = 0,6$ . Indukci exprese jsme navodili přidáním IPTG do konečné koncentrace 1 mM. Po tříhodinové inkubaci jsme kulturu centrifugovali (10 000 g, 15 minut, 4 °C). Peletu jsme promyli 15 ml 50 mM TrisHCl (pH 7,5), resuspendovali a opět centrifugovali (10 000 g, 10 minut, 4 °C). Peletu jsme resuspendovali v 1 ml 50mM TrisHCl (pH 7,5), přidali 1  $\mu$ l benzonázy a 1  $\mu$ l inhibitoru proteáz a buňky dezintegrovali pomocí přístroje French Pressure Cell Press. Odebrali jsme 100  $\mu$ l hrubého extraktu. Lyzát jsme rozdělili centrifugací (15 minut, 9 000 g) na rozpustnou (cytoplazmatickou) a nerozpustnou frakci (inkluzi). Jednotlivé frakce jsme nanášeli na SDS-PAGE.

### **Izolace proteinů pomocí afinitní chromatografie**

Izolaci proteinů s histidinovou kotvou jsme prováděli dle návodu výrobce pomocí afinitní chromatografie za použití nosiče asociovaného s niklem (TALON<sup>(TM)</sup> Metal Affinity Resin, Clontech) při 4 °C.

### Stanovení koncentrace proteinů v bezbuněčném extraktu

Dle návodu výrobce jsme pro stanovení obsahu proteinů ve vzorcích použili BCA Protein assay reagent (Pierce). Jako standard pro tvorbu kalibrační přímky jsme použili různé koncentrace BSA.

### SDS PAGE

Analýzu proteinů jsme prováděli na SDS-polyakrylamidové elektroforéze (SDS-PAGE) v SDS-elektroforetickém pufru. Přípravovali jsme 11% separační gel a 4% zaostřovací gel viz tabulka 4.3. Proteiny jsme barvili koloidní Coomassie blue po fixaci proteinů ve fixačním roztoku. Nenavázanou barvu jsme z gelu odmyvali destilovanou vodou. Po odmytí jsme gel krátce promyli malým množstvím 100% glycerolu a sušili ve vakuové sušičce.

Tabulka 4.3: gely na SDS-PAGE

	11% separační gel	4% zaostřovací gel
30% akrylamid+1%bisakrylamid	11 ml	1,33 ml
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	7,5 ml	-
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	-	2,5 ml
10% SDS	300 $\mu$ l	100 $\mu$ l
voda	11 ml	6.1 ml
TEMED	13 $\mu$	5 $\mu$ l
10% APS	200 $\mu$ l	50 $\mu$ l

### Western blot

Proteiny rozdělené na SDS-PAGE jsme přenášeli metodou Western blot na PVDF membránu (Amersham) za použití přístroje The Panther SemiDry Electrobloetter (Owl Scientific). Celou aparaturu jsme sestavovali dle pokynů výrobce. Přenos proteinů probíhal při proudu 1 mA na cm<sup>2</sup> po dobu 2 hodin.

### Imunodetekce pomocí monoklonální protilátky

PVDF membránu s imobilizovanými proteiny jsme přes noc blokovali v PBS-Tris pufru s 3% BSA. Membránu jsme promyli 3 x 10 minut v PBS-Tris a inkubovali 1 hodinu s primární protilátkou ředěnou 1:4000 v 1% BSA/PBS-Tris. Po promytí 3 x 10 minut v PBS-Tris jsme inkubovali membránu 1 hodinu se sekundární protilátkou ředěnou 1:5000 v PBS-Tris pufru. Protilátka je konjugována s peroxidázou, která umožňuje barevnou detekci. Po odmytí 3 x 10 minut v PBS-Tris pufru jsme barvili membránu detekčním roztokem, barvení jsme zastavili destilovanou vodou.

#### 4.2.6 Fosforylace *in vitro*

Kinázovou reakci jsme provedli v případě cytoplazmatické frakce získané z *E. coli* BL21(DE3) s 30  $\mu\text{g}$  proteinů na reakci. Purifikovaného proteinu jsme používali v případě Stk1 5  $\mu\text{g}$  na reakci. Reakce (celkový objem 20  $\mu\text{l}$ ) obsahovala 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM  $\text{MnCl}_2$ ; 10  $\mu\text{M}$  ATP (mix neradioaktivního a radioaktivního ATP, 2  $\mu\text{Ci}$  radioaktivního ATP).

Testování fosforylační aktivity Stk1 probíhalo s 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{NiSO}_4$  a  $\text{ZnCl}_2$ , kterými jsme nahradili chlorid hořečnatý a chlorid manganatý v reakčním pufru. Reakční směs jsme inkubovali 30 minut při 37°C a fosforylační reakci zastavili acetonem a sráželi přes noc v -20°C. Před separací na SDS-PAGE se vzorky centrifugovaly (13 000g, 15 minut) a inkubovali v roztoku STOP pufru s Tris-HCl (1:4) 5 minut při 95°C. Radioaktivní proteiny byly vizualizovány na přístroji FX IMAGER (Biorad). Analýza radiogramu byla prováděna v programu AIDA Image Analyzer.

#### 4.2.7 Defosforylace *in vitro*

Ke stanovení fosfatázové aktivity enzymu jsme používali sadu Serine/Threonine phosphatase assay (Promega). Dodržovali jsme postup navržený výrobcem.

Aktivitu Stp1 jsme testovali v přítomnosti 5  $\mu\text{g}$  proteinu a 5 mM  $\text{MnCl}_2$ .

Pro testování závislosti aktivity PppA na přítomnosti dvoumocného iontu jsme



používali 5 mM MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> a NiSO<sub>4</sub>, a 0,5 - 5 μg proteinu. Fosfatázové reakce jsme inkubovali při 37°C. Pro stanovení optimální koncentrace esenciálního dvoumocného iontu jsme měnili koncentrace Mg<sup>2+</sup> a Mn<sup>2+</sup>. Pro stanovení optimální reakční teploty a pH jsme měnili i tyto parametry. Pro studium vlivu pH na aktivitu PppA bylo třeba izolovaný protein dialyzovat v dialyzačním pufru (500 mM NaCl, 1 mM DTT) při 4°C po dobu dvou hodin, aby nedocházelo k ovlivnění pH vlivem přítomnosti vzorkového pufru. Pro fosfatázové reakce byl použit odlišný (reakční) pufr (1 mM EGTA, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mg/ml BSA), který zachovával funkčnost enzymu a zároveň umožňoval testování aktivity při různém pH.

Defosforylační reakce jsme analyzovali pomocí spektrofotometru XFluor4Safir při 600 nm a pomocí kalibrační přímky vypočítané z absorbance standardů jsme vypočítali množství uvolněného fosfátu v reakci.

# Kapitola 5

## Výsledky

### 5.1 Příprava nadprodukčních kmenů

K přípravě konstruktů jsme použili vektory pET28b(+) a pET42b(+), které jsou určeny pro nadprodukcí proteinů v *E. coli*. Tyto vektory umožňují přípravu rekombinantních proteinů fúzovaných s různými typy kotev podle požadovaného způsobu izolace proteinů.

#### 5.1.1 Příprava expresního kmene *E. coli* BL21(DE3) pro gen *ppkA*

Pomocí metody PCR jsme se pokoušeli připravit DNA fragment dlouhý 3050 bp homologní k oblasti genu *ppkA*. Oligonukleotidy PPKA(Nde)-FOR(60) a PPKA(Xho)-REV-H(60) byly navrženy tak, aby obsahovaly restriční místo pro endonukleázy *NdeI* a *XhoI* a umožňovaly fúzi PpkA s histidinovou kotvou na C-konci proteinu (viz obr. 5.1).

PPKA(Nde)-FOR(60) 5'-GCA TAT CCA TAT GGA CAT AGA ACT TCC GGG-3'

PPKA(Xho)-REV-H(60) 5'-GCG CTC GAG TGG CAG CGT CGA CAG CGG-3'

Vzhledem k vysokému zastoupení GC (70 %) a předpokládané složité konformaci DNA v oblasti genu *ppkA* se nepodařilo celý gen *ppkA* amplifikovat. Navrhli jsme proto dva vnitřní oligonukleotidy sPPKA(Hind)-FOR(60) a sPPKA(Hind)-

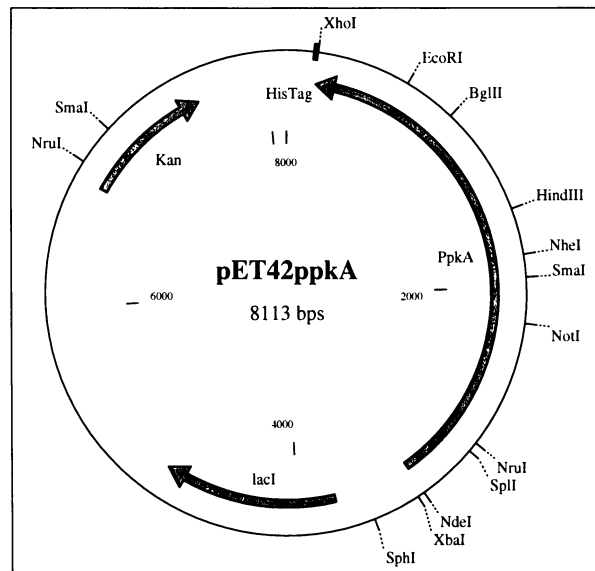
REV(62), kterými jsme fragment rozdělili na část *ppkA1* dlouhou 1660 bp a *ppkA2* dlouhou 1350 bp. Vnitřní oligonukleotidy byly navrženy tak, aby byl zachován čtecí rámec genu *ppkA* a obsahovaly přirozené restriční místo pro endonukleázu *HindIII*. Specifitu a výtěžek PCR reakce jsme zvýšili použitím Herkulase enhanced DNA polymerase, která je narozdíl od původně používané Pfu DNA polymerase určena pro amplifikaci GC bohatých templátů.

sPPKA(Hind)-FOR(60) 5'-GGG AAG CTT CGA CGC CGA CGG-3'

sPPKA(Hind)-REV(62) 5'-GGG AAG CTT TCC TTC GAG TCG AAG-3'

Takto získané PCR fragmenty jsme poté klonovali pomocí restričních míst *NdeI* a *HindIII*, a *HindIII* a *XhoI* do vektoru pET42b. Připravenou ligační směsí jsme transformovali *E. coli* JM109. Jako selekční znak jsme využívali rezistence ke kanamycinu, která je kódovaná plazmidem. Pozitivitu získaných klonů jsme ověřovali PCR metodou s Taq DNA polymerase s původními oligonukleotidy a restriční analýzou.

Expresní plazmidy pET42*ppkA* (viz obr. 5.1) se však nepodařilo připravit ani po opakovaných pokusech s postupným klonováním kratších fragmentů.



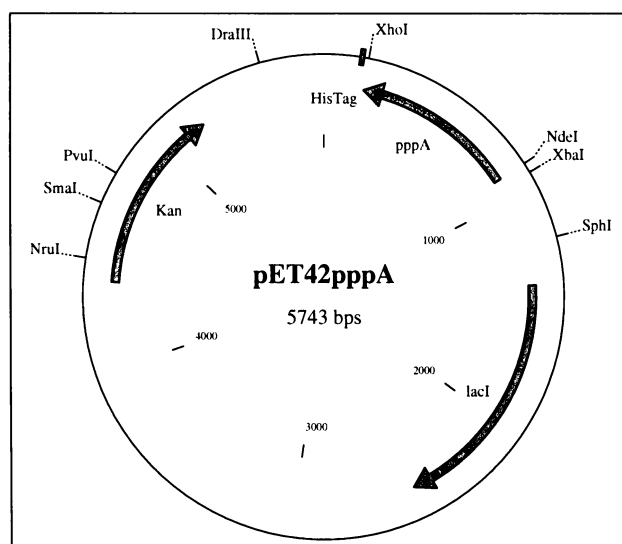
Obrázek 5.1: Mapa plazmidu pET42*ppkA*. Na obrázku je znázorněna lokalizace genů, jejich transkripční orientace a lokalizace histidinové kotvy na C-konci.

### 5.1.2 Příprava expresního kmene *E. coli* BL21 (DE3) pro gen *pppA*

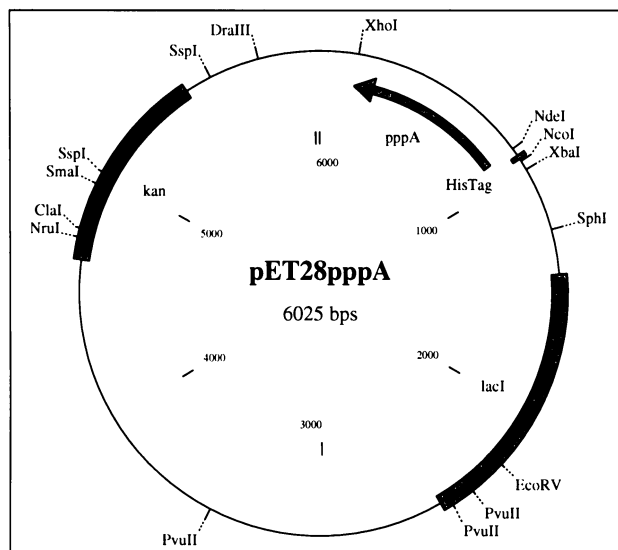
Při přípravě plazmidového konstruktů jsme postupovali podobně jako v předchozím případě. Navrhli jsme vnější oligonukleotidy PPPA(Nde)-FOR(62) a PPPA(Xho)-REV(62) pro klonování genu *pppA* do vektoru pET28b umožňující fúzi proteinu s histidinovou kotvou na N-konci, a PPPA(Nde)-FOR(62) a PPPA(Xho)-REV-H(64) pro klonování do pET42b umožňující fúzi proteinu s histidinovou kotvou na C-konci. Metodou PCR s Pfu DNA polymerázou jsme amplifikovali DNA fragment o velikosti 750 bp a pomocí restrikčních endonukleáz *NdeI* a *XhoI* jsme ho klonovali do pET28b a pET42b.

PPPA(Nde)-FOR(62)	5'-GGA TAT CCA TAT GGT GCC CAA CTC AGT CAG-3'
PPPA(Xho)-REV(62)	5'-GGC CTC GAG TTA TCA GAA GGC CCT GAC CAG C-3'
PPPA(Xho)-REV-H(64)	5'-GCG CTC GAG GAA GGC CCT GAC CAC CAG G-3'

Podarilo se nám připravit expresní plazmidy pET42*pppA* (viz obr. 5.2) a pET28*pppA* (viz obr. 5.3), kterými jsme transformovali *E. coli* BL21(DE3). Získané expresní kmeny jsme použili pro nadprodukcí fosfoproteinfosfatázy PppA.



Obrázek 5.2: Mapa plazmidu pET42*pppA*. Na obrázku je znázorněna lokalizace genů, jejich transkripční orientace a lokalizace histidinové kotvy na C-konci fúzovaného proteinu.



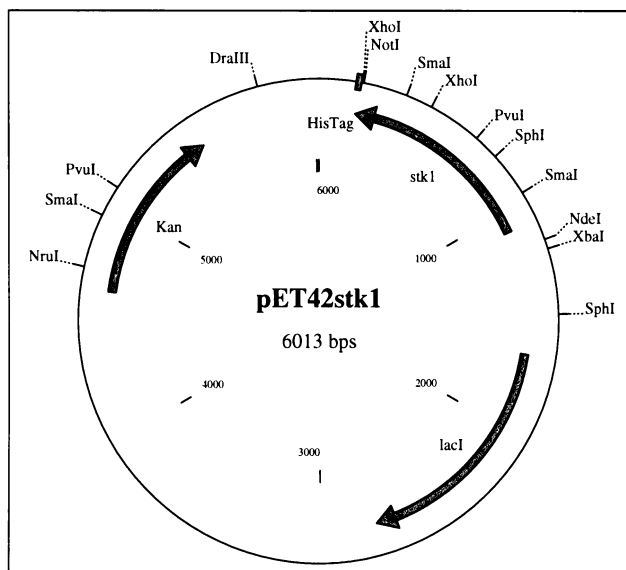
Obrázek 5.3: Mapa plazmidu pET28pppA. Na obrázku je znázorněna lokalizace genů, jejich transkripční orientace a lokalizace histidinové kotvy na N-konci fúzovaného proteinu.

### 5.1.3 Příprava expresního kmene *E. coli* BL21(DE3) pro gen *stk1*

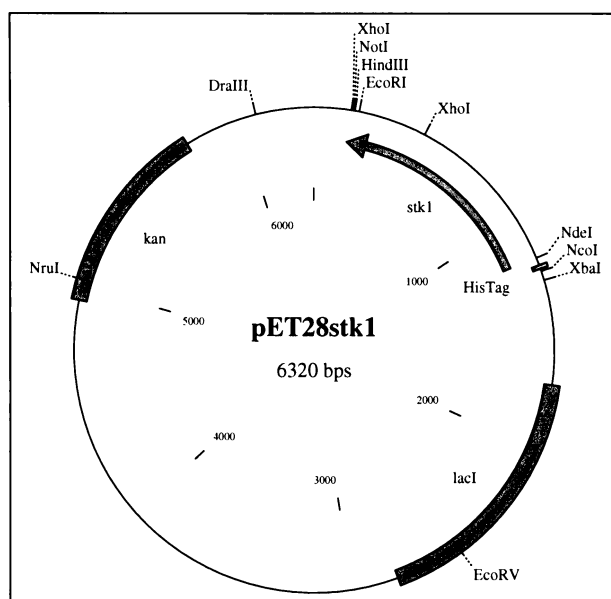
Pomocí PCR jsme amplifikovali gen serin/threoninové proteinkinázy Stk1 o velikosti 950 bp a ohraničený oligonukleotidy STK1(Nde)-FOR(66) a STK1(Eco)-REV(62) pro klonování do pET28b a oligonukleotidy STK1(Nde)-FOR(66) a STK1(Not)-REV-H(58) pro klonování do pET42b. Do vektorů jsme klonovali po restrikci endonukleázami *NdeI*, *NotI* a *EcoRI*. Rekombinantní protein v pET28b byl fúzován s histidinovou kotvu umístěnou na N-konci, rekombinantní protein v pET42b byl fúzován s histidinovou kotvu na C-konci.

STK1(Nde)-FOR(66)	5'-GGA TAT CCA TAT GAA CGA ACC GCT GTC GTC G-3'
STK1(Not)-REV-H(58)	5'-ATA GTT TAG CGG CCG CAG GGG CAA GAA CGC CGG-3'
STK1(Eco)-REV(62)	5'-TCG AAT TCT TAT CAA CGG GCA AGA ACG CCG-3'

Připravenými expresními plazmidy pET42*stk1* (viz obr. 5.4) a pET28*stk1* (viz obr. 5.5) jsme transformovali *E. coli* BL21(DE3) a získané expresní kmeny jsme použili pro nadprodukcí proteinkinázy Stk1.



Obrázek 5.4: Mapa plazmidu pET42*stk1*. Na obrázku je znázorněna lokalizace genů, jejich transkripční orientace a lokalizace histidinové kotvy na C-konci fúzovaného proteinu.



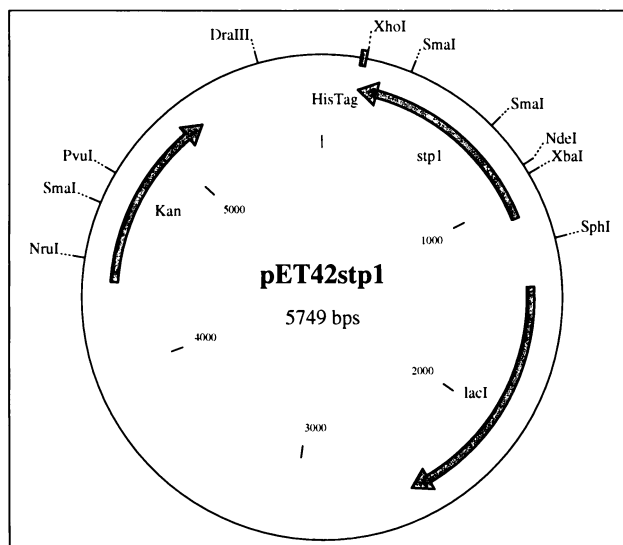
Obrázek 5.5: Mapa plazmidu pET28*stk1*. Na obrázku je znázorněna lokalizace genů, jejich transkripční orientace a lokalizace histidinové kotvy na N-konci proteinu.

### 5.1.4 Příprava expresního kmene *E. coli* BL21(DE3) pro gen *stp1*

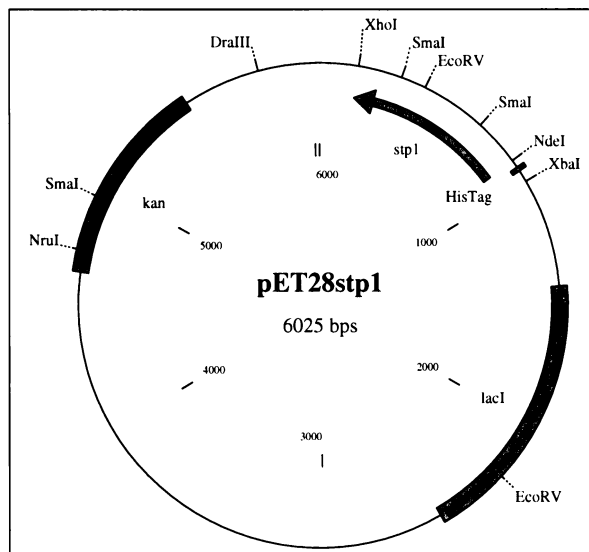
Postupovali jsme stejně jako v předchozích případech. Navrhli jsme vnější oligonukleotidy STP1(Nde)-FOR(60) a STP1(Xho)-REV-H(62) pro klonování do pET42b a STP1(Nde)-FOR(60) a STP1(Xho)-REV(60) pro klonování do pET28b. Amplifikovali jsme DNA fragment o délce 680 bp obsahující gen *stp1*.

STP1(Nde)-FOR(60)     5'-CCA TAT CCA TAT GCA ACG CAG CGA GCC C-3'  
 STP1(Xho)-REV-H(62)  5'-GTG CTC GAG TTG GCG GAT CAC CAC GGC CG-3'  
 STP1(Xho)-REV(60)    5'-CCG CTC GAG TTA TCA TTG GCG GAT CAC CAG G-3'

Připravili jsme expresní plazmidy pET42*stp1* (viz obr. 5.6) a pET28*stp1* (viz obr. 5.7), kterými jsme transformovali *E. coli* BL21(DE3) a získané produkční kmeny jsme použili pro nadprodukcii fosfoproteinofosfatázy Stp1.



Obrázek 5.6: Mapa plazmidu pET42*stp1*. Na obrázku je znázorněna lokalizaci genů, jejich transkripční orientace a lokalizace histidinové kotvy na C-konci fúzovaného proteinu.



Obrázek 5.7: Mapa plazmidu pET28*stp1*. Na obrázku je znázorněna lokalizace genů, jejich transkripční orientace a lokalizace histidinové kotvy na N-konci fúzovaného proteinu.

## 5.2 Charakterizace proteinů a studium interakce proteinkinázy Stk1 a fosfoproteinfosfatázy Stp1

Serin/threoninová proteinkináza Stk1 a fosfoproteinfosfatáza Stp1 byly již biochemicky charakterizovány (MUKHOPADHYAY *et al.* 1999). Charakteristiku proteinkinázy Stk1 jsme doplnili o další data. Dále jsme provedli experiment, pomocí kterého jsme ověřili hypotézu, že fosfoproteinfosfatáza Stp1 a proteinkináza Stk1 jsou interagující proteiny.

Autofosforylační reakce jsme prováděli s využitím [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (MP-Bio). Fosfatázová aktivita fosfoproteinfosfatázy Stp1 byla stanovena pomocí sady Serine/threonine phosphatase assay system (Promega).

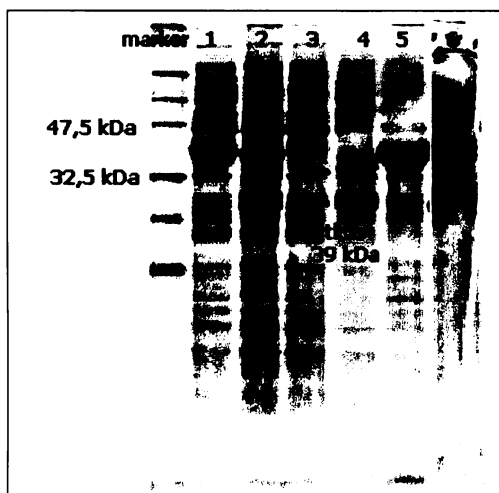
### 5.2.1 Charakterizace serin/threoninové proteinkinázy Stk1

#### Exprese serin/threoninové proteinkinázy Stk1

Ser/Thr proteinkináza Stk1 je protein velký 39 kDa. Testovali jsme expresi proteinu v pET28*stk1* a pET42*stk1* při 18 °C a 30 °C. Jako optimální se ukázala exprese v pET42*stk1* při 30 °C (viz obr. 5.8). Výskyt proteinu jsme potvrdili separací SDS-



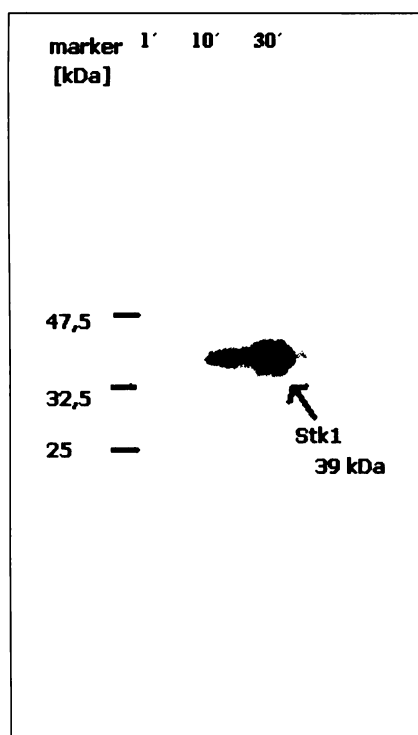
PAGE, barvením Coomassie blue a imunologickou detekcí.



Obrázek 5.8: Exprese Stk1 v pET42*stk1* při 30°C, SDS-PAGE barvená Coomassie blue; 1: hrubý extrakt (HE) - Stk1; 2: HE - pET42b; 3: cytoplazmatická frakce (CF) - Stk1; 4: CF - pET42b; 5: nerozpustná frakce (NF) - Stk1; 6: NF - pET42b.

### Charakterizace proteinkinázy Stk1

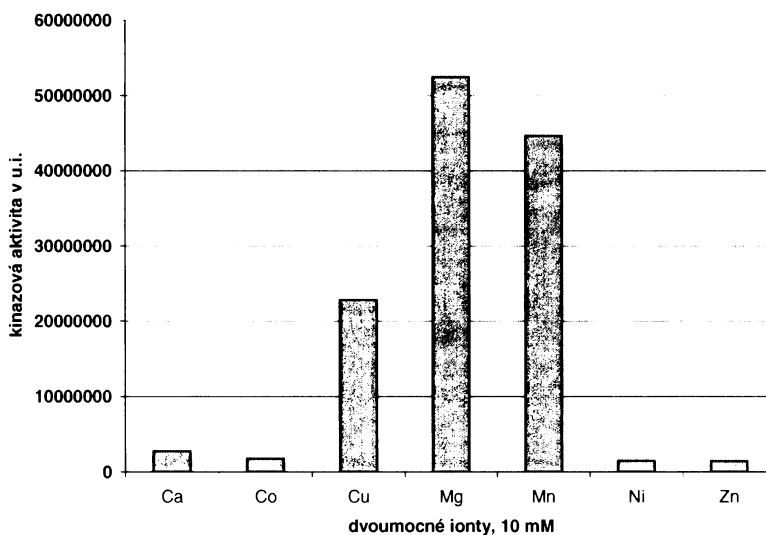
Po izolaci proteinu jsme nejprve provedli kinázovou reakci ve standardním pufru, abychom potvrdili aktivitu izolované proteinkinázy. Autofosforylaci jsme testovali pomocí  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  za přítomnosti  $\text{Mg}^{2+}$  při 37 °C po dobu 30 minut (viz obr. 5.9), posléze reakci zastavili acetonem.



Obrázek 5.9: Stanovení autofosforylační aktivity v čase. Autofosforylační reakce probíhala 1, 10 a 30 minut.

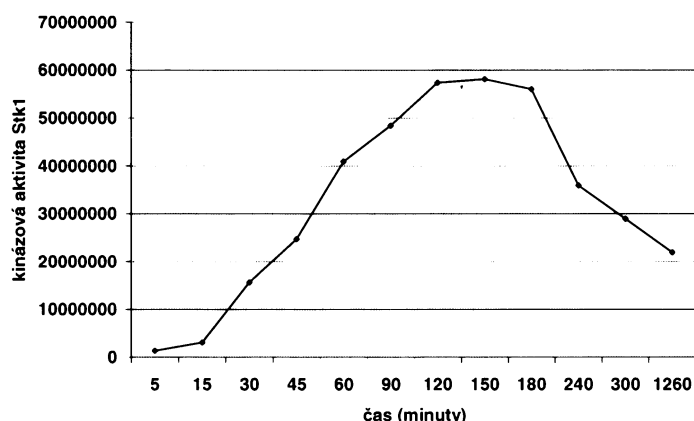
Následně jsme testovali aktivitu proteinkinázy Stk1 v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,

$\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  o koncentraci 10 mM při 37 °C. Nejvyšší aktivity dosahovala Stk1 v reakční směsi s  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{2+}$  (viz obr. 5.10).



Obrázek 5.10: Závislost aktivity Stk1 na typu dvoumocných iontů. Aktivitu Stk1 jsme testovali v přítomnosti vápníku, kobaltu, mědi, hořčíku, manganu, niklu a zinku. Kinázová aktivita je vyjádřena v u. i. (relativní jednotky intenzity fosforylace proteinů).

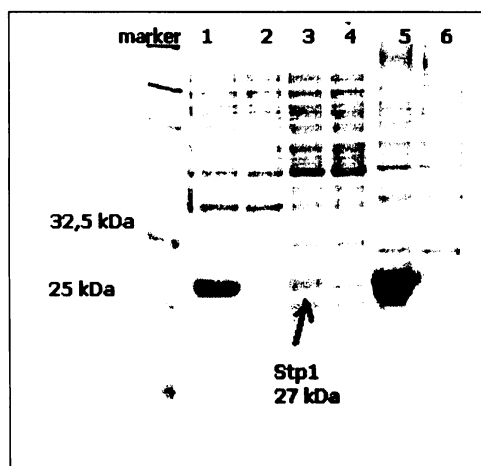
Časový průběh kinázové reakce jsme prováděli vždy se stejným množstvím proteinu, v přítomnosti  $\text{Mg}^{2+}$  iontů. Reakce jsme inkubovali při 37 °C v časovém rozmezí 5 minut až 21 hodin (5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 minut; 3, 4, 5, 21 hodin) (viz obr. 5.11). Po uplynutí těchto intervalů jsme reakce ukončovali přidáním acetonu. Nejvyšší úroveň autofosforylace dosáhla Stk1 mezi 2. a 3. hodinou inkubace.



Obrázek 5.11: Kinázová aktivita Stk1 v závislosti na čase. Autofosforylaci jsme měřili v intervalu 5 minut až 21 hodin. Kinázová aktivita je vyjádřena v u. i. (relativní jednotky intenzity fosforylace proteinů).

### 5.2.2 Exprese serin/threoninové fosfoproteinfosfatázy Stp1

Ser/Thr fosfoproteinfosfatáza Stp1 je protein o velikosti 27 kDa patřící do skupiny fosfoproteinfosfatáz PP2C. Optimální exprese probíhala při 18°C v pET28. Výskyt proteinu v cytoplazmatické frakci byl ověřen jak pomocí SDS-PAGE (viz obr. 5.12), tak imunologickou detekcí. Stp1 byla již dříve plně charakterizována, a proto jsme pouze pomocí sady Serine/Threonine phosphatase assay ověřili, že izolovaný protein je funkční a má fosfatázovou aktivitu (výsledky neuvedeny).



Obrázek 5.12: Exprese Stp1 v pET28b při 18°C, SDS-PAGE barvená Coomassie blue; 1: hrubý extrakt (HE) - Stk1, 2: HE - pET28b; 3: cytoplazmatická frakce (CF) - Stk1, 4: CF - pET28b; 5: nerozpustná frakce (NF) - Stk1, 6: NF - pET28b

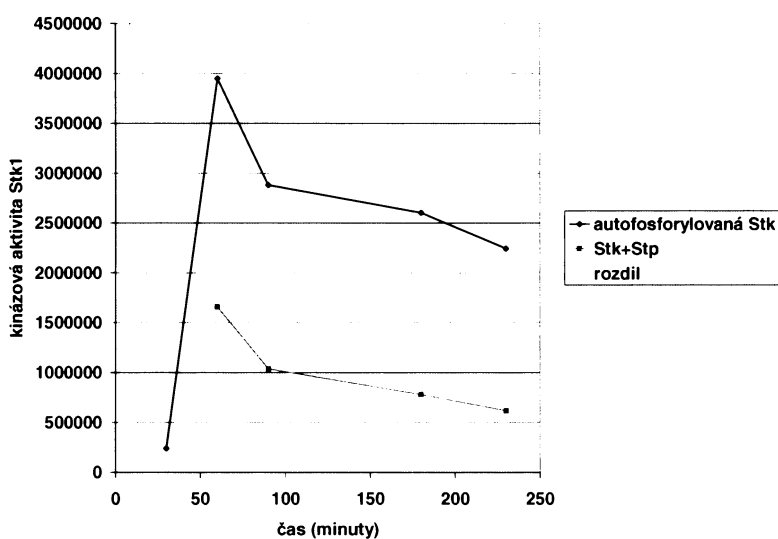
### 5.2.3 Studium interakce proteinkinázy Stk1 a fosfoprotein-fosfatázy Stp1

U bakterie *Streptococcus pneumoniae* byla prokázána interakce Ser/Thr proteinkinázy StkP a fosfoproteinofosfatázy PhpP (NOVÁKOVÁ *et al.* 2005). Geny pro tyto dva proteiny se nacházejí v jednom operonu a sdílí přesah jednoho nukleotidu. Geny pro proteinkinázu Stk1 a fosfoproteinofosfatázu Stp1 se rovněž nacházejí v jednom operonu a jsou přepisovány společně. Předpokládali jsme proto, že by se mohlo jednat o interagující proteiny, kdy by autofosforylovaná proteinkináza mohla být substrátem fosfoproteinofosfatázy Stp1 *in vitro*.

Pro studium interakcí Stk1 a Stp1 jsme připravili dvě sady reakcí. Jedna reakční sada obsahovala 5  $\mu\text{g}$  Stk1, 5  $\mu\text{l}$  ATP (konečná koncentrace v reakci 4  $\mu\text{M}$ ) a 10  $\mu\text{l}$  reakčního pufru s  $\text{Mn}^{2+}$  (Stp1 je  $\text{Mn}^{2+}$ -dependentní), do které byla po půlhodinové inkubaci přidána Stp1 (5  $\mu\text{g}$ ). Reakce i s počáteční půlhodinovou autofosforylací Stk1 probíhaly 60, 90, 180 a 240 minut.

Druhá sada reakcí obsahovala kontrolní vzorky pouze s Stk1. Reakční směs tvořilo 5  $\mu\text{g}$  Stk1, 5  $\mu\text{l}$  ATP (konečná koncentrace 4  $\mu\text{M}$ ) a 10  $\mu\text{l}$  pufru s  $\text{Mn}^{2+}$ . Kontroly jsme inkubovali stejně jako první sadu reakcí 30, 60, 90, 180 a 240 minut v 37°C.

Výsledkem experimentu bylo významné snížení fosforylace Stk1 po přidání Stp1 (viz obr. 5.13). Z tohoto pokusu vyplývá, že Stk1 je *in vitro* substrátem Stp1. Téměř lineární průběh rozdílu kinázové aktivity Stk1 a fosfatázové aktivity Stp1 naznačuje, že v průběhu experimentu nedošlo k vysycení kinázové reakce, která nadále pokračuje.



Obrázek 5.13: Interakce Stk1 a Stp1. Po přidání Stp1 do reakce dochází k intenzivnímu snížení hladiny fosforylace Stk1. Kinázová aktivita je vyjádřena v u. i. (relativní jednotky intenzity fosforylace proteinů).

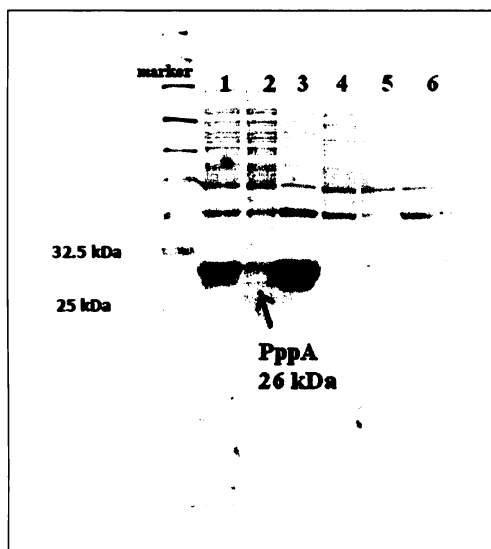
## 5.2.4 Charakterizace serin/threoninové fosfoproteinfosfatázy PppA

Předpokládaná fosfoproteinfosfatáza PppA je velká 26 kDa a na základě sekvenční homologie s jinými fosfoproteinfosfatázami je řazena do skupiny fosfoproteinfosfatáz PP2C. Určení funkce proteinu a biochemickou charakteristiku jsme prováděli sériemi defosforylačních pokusů se syntetickým substrátem.

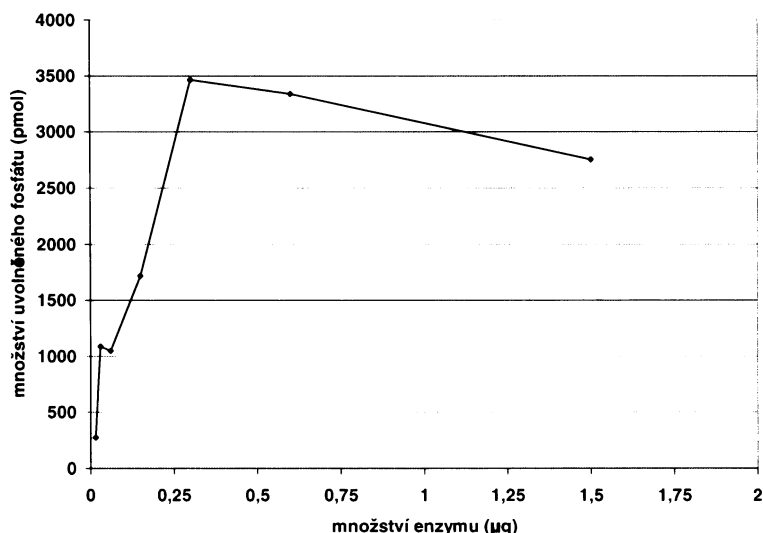
### Expres fosfoproteinfosfatázy PppA

Expres fosfoproteinfosfatázy PppA probíhala optimálně v pET28 *pppA* při 30°C. Po separaci jednotlivých frakcí na SDS-PAGE se ukázalo, že protein je exprimován v dostatečném množství v rozpustné cytoplazmatické frakci a jeho přítomnost byla potvrzena i imunodetekcí (viz obr. 5.14).

Nejprve jsme testovali aktivitu izolované fosfoproteinfosfatázy PppA. První sadou experimentů jsme stanovili optimální množství proteinu pro testy (viz obr. 5.15). Zjistili jsme, že PppA je velmi aktivní protein. Jeho dostačující množství na jednu reakci je 0,5  $\mu\text{g}$ , což je množství 10x nižší než fosfoproteinfosfatázy Stp1.

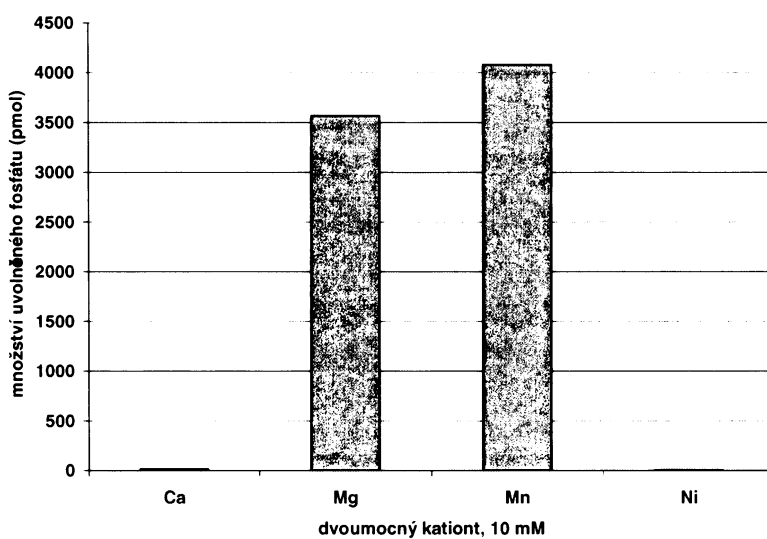


Obrázek 5.14: Expese PppA v pET28b při 30°C, SDS-PAGE barvená Coomassie blue; 1: hrubý extrakt (HE) - PppA, 2: cytoplazmatická frakce (CF) - PppA, 3: nerozpustná frakce (NF) - PppA; 4 - 6: (HE) - (CF) - (NF) - pET28b.

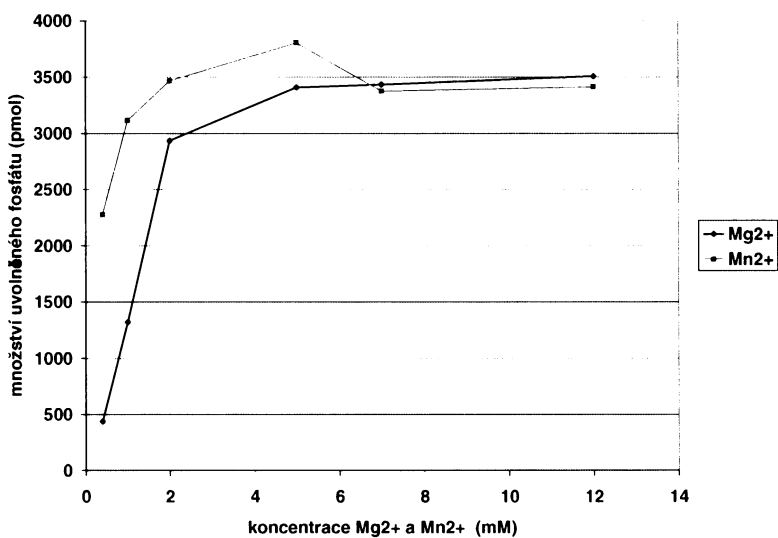


Obrázek 5.15: Závislost aktivity PppA na množství enzymu v reakci.

Následně jsme určovali závislost aktivity enzymu na přítomnosti různých dvoumocných iontů (viz obr. 5.16) a jejich optimální koncentraci (viz obr. 5.17). Testovanými ionty byly  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Ni}^{2+}$ . Z grafu 5.16 jasně vyplývá, že PppA je  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{2+}$ -dependentní fosfoproteinofosfatáza. K určení optimální koncentrace obou iontů jsme použili 0,4; 1; 2; 5; 7; a 12 mM  $\text{MgCl}_2$  a  $\text{MnCl}_2$ . Nejvyšší aktivity dosahoval protein s 5 mM  $\text{MgCl}_2$  a 5 mM  $\text{MnCl}_2$ . Rozdíly v aktivitě fosfoproteinofosfatázy za přítomnosti  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{2+}$  byly minimální, proto nelze jednoznačně určit primární závislost aktivity enzymu pouze na jednom z iontů.



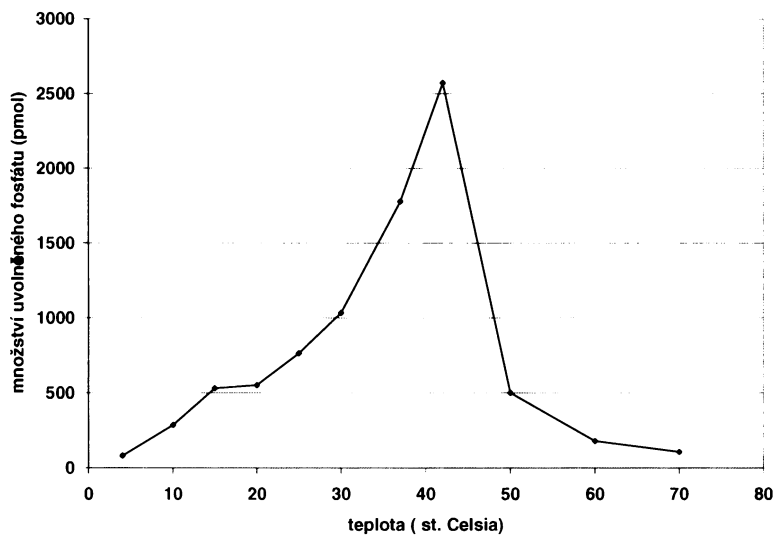
Obrázek 5.16: Závislost aktivity PppA na přítomnosti různých typů dvoumocných iontů kovů. Aktivitu jsme testovali v přítomnosti hořčíku, manganu, niklu a vápníku o koncentraci 10 mM.



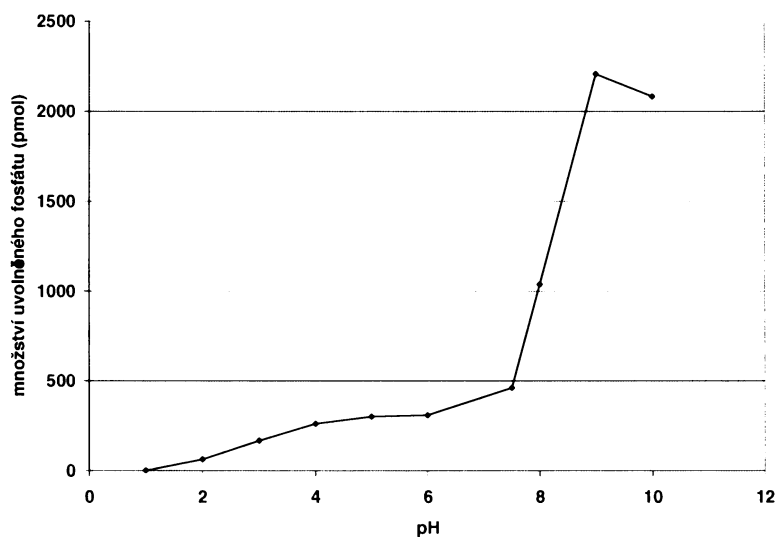
Obrázek 5.17: Stanovení optimální koncentrace Mg<sup>2+</sup> a Mn<sup>2+</sup>. Testované koncentrace: 0,4; 1; 2; 5; 7 a 12 mM.

Poté jsme stanovili optimální reakční teplotu a pH. Teplotu jsme testovali v rozmezí 4-70 °C (viz obr. 5.18) a pH 1 - 10 (viz obr. 5.19). Nejvyšší aktivity dosahoval enzym při teplotě 42 °C. Nicméně vysoké aktivity dosahoval i při teplotě 37 °C, při

které jsme veškerou biochemickou charakterizaci prováděli. pH, při kterém PppA vykazuje nejvyšší aktivitu *in vitro* se jeví pH = 9.



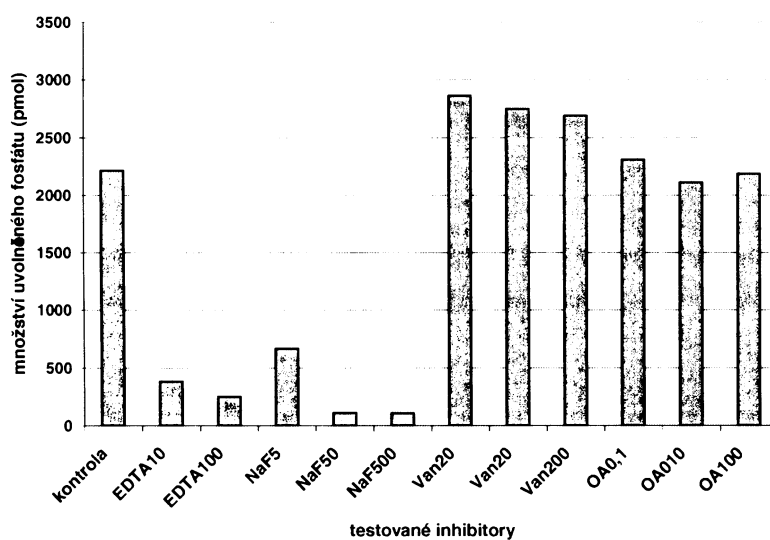
Obrázek 5.18: Závislost aktivity PppA na teplotě. Aktivitu PppA jsme testovali při 4 až 70 °C. Nejvyšší aktivity dosahovala PppA při 42 °C.



Obrázek 5.19: Závislost aktivity PppA na pH. Aktivitu PppA jsme testovali v rozmezí pH 1 až 10. Nejvyšší aktivity bylo dosaženo při pH = 9.

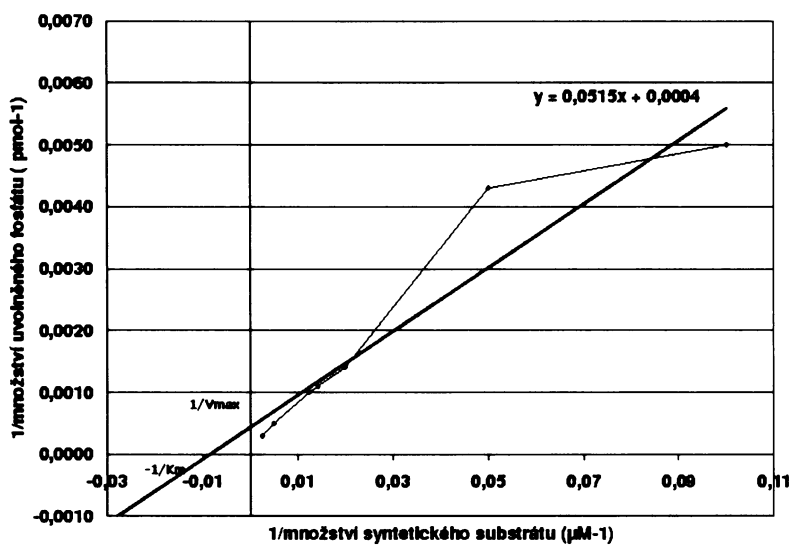


Při studiu inhibice fosfatázové aktivity byly použity obecné inhibitory fosfo-proteinfosfatáz: EDTA (10 a 100 mM); fluorid sodný (5, 50 a 500 mM); kyselina okadaová (0,1, 10 a 100 nM) a vanadičnan sodný (2, 20 a 200  $\mu$ M) (viz obr. 5.20). Aktivitu PppA velice silně inhibovala EDTA a fluorid sodný. Vanadičnan sodný aktivitu PppA lehce pozitivně stimuloval. K ovlivnění enzymatické aktivity okadaovou kyselinou nedošlo. Získaná data potvrzují fakt, že PppA patří mezi Ser/Thr fosfoproteinfosfatázy skupiny PP2C.



Obrázek 5.20: Závislost fosfatázové aktivity PppA na přítomném inhibitoru. Aktivita PP2C fosfoproteinfosfatáz je inhibována EDTA a NaF.

Na závěr této série testů jsme prováděli experiment sledující kinetické parametry proteinu. Z výsledků jsme vypočítali  $V_{max}$  a  $K_m$  fosfoproteinfosfatázy PppA.  $V_{max} = 0,62$  nmol/min/ $\mu$ g,  $K_m = 0,314$  mM (viz obr. 5.21).



Obrázek 5.21: Stanovení  $V_{max}$  a  $K_m$  fosfoproteinfosfatázy PppA. Průnik regresní přímky a osy y znázorňuje  $1/V_{max}$ ; průnik regresní přímky a osy x znázorňuje  $-1/K_m$ .

Veškerá měření jsme vždy prováděli v duplikátech a třikrát opakovali. Znázorněné hodnoty jsou průměry výsledných hodnot.

# Kapitola 6

## Diskuze

*Pseudomonas aeruginosa* je gramnegativní obligátně patogenní bakterie. Patří mezi nejčtenější původce nosokomiálních infekcí. Produkuje řadu virulencních faktorů, jejichž tvorba je pod kontrolou mechanismu *quorum sensing*. QS ovlivňuje také expresi proteinkinázy Stk1 a fosfoproteinfosfatázy Stp1 *Pseudomonas aeruginosa*. Předpokládá se, že *quorum sensing* sám může být pod kontrolou některé signální dráhy zahrnující proteinkinázy/fosfoproteinfosfatázy kódované touto bakterií.

Po dokončení sekvenace celého genomu *P. aeruginosa* byly na základě sekvenční homologie identifikovány tři serin/threoninové proteinkinázy eukaryotického typu. Jedná se o proteinkinázy PpkA a Stk1 (MUKHOPADHYAY *et al.* 1999, MONTLEY A LORY 1999) a duální proteinkinázu/fosfoproteinfosfatázu PpkB. Proteinkináza PpkA je specificky exprimována během infekce v neutropenické myši. Je to transmembránový protein dlouhý 1032 aminokyselin s N-koncovou katalytickou doménou. Na ni navazuje oblast bohatá na prolin, připojená k C-koncové doméně typu „von Willebrand faktoru A“. Její přirozený substrát zatím není znám. Další charakterizovanou proteinkinázou je serin/threoninová proteinkináza Stk1 o velikosti 39 kDa s N-koncovou katalytickou doménou. K autofosforylaci dochází přednostně na threoninu, v menší míře na serinu. Serin/threoninová fosfoproteinfosfatáza Stp1 se nachází ve stejném operonu jako proteinkináza Stk1. Geny *stk1* a *stp1* jsou přepisovány společně s homologem genu *icmF* *Legionella pneumophila*. Stp1 je velká 27 kDa a dlouhá 242 aminokyselin s katalytickou doménou na N-konci. Je Mn<sup>2+</sup> dependentní a patří do skupiny fosfoproteinfosfatáz PP2C. Na základě homologie se

serin/threoninovými fosfoproteinfosfatázami eukaryotického typu byl u *Pseudomonas aeruginosa* nalezen gen kódující předpokládanou fosfoproteinfosfatázu PppA, jejíž gen se nachází v jednom operonu s genem *ppkA*.

Naším cílem bylo připravit plazmidové konstrukty pro expresi proteinkináz PpkA a Stk1, fosfoproteinfosfatáz PppA a Stp1 v *E. coli* BL21 (DE3) a jejich exprese v tomto bakteriálním kmeni. Dalším úkolem bylo biochemicky charakterizovat PppA a doplnit charakterizaci Stk1. Dalším cílem bylo prokázat vzájemnou interakci fosfoproteinfosfatázy PppA s proteinkinázou PpkA a fosfoproteinfosfatázy Stp1 s proteinkinázou Stk1. Důkaz interakce by potvrzoval naši domněnku, že tyto proteiny spolu interagují v některé ze signálních drah *P. aeruginosa*.

## 6.1 Příprava plazmidových konstruktů

Prvním z cílů byla příprava plazmidových konstruktů pro nadprodukcii Ser/Thr proteinkináz PpkA a Stk1 a Ser/Thr fosfoproteinfosfatáz Stp1 a PppA. Konstrukty byly navrženy tak, aby ve vektoru pET28b obsahovaly histidinovou kotvu na N-konci fúzovaného proteinu a ve vektoru pET42b na C-konci fúzovaného proteinu. Toto uspořádání jsme zvolili proto, že histidinová kotva umístěna na jednom z konců proteinu může negativně ovlivnit enzymovou funkci proteinu. Předpokládali jsme, že pokud by k tomuto jevu došlo, projevil by se pouze u jedné z variant. Dalším důvodem byla rozdílná míra exprese proteinů z daných plazmidů.

Expresi proteinů v pET28b a pET42b jsme testovali při teplotách 18°C a 30°C. Sledovali jsme expresi v cytoplazmatické frakci, ze které se proteiny snadno izolují v nativním stavu. Snížením teploty ze 30°C na 18°C lze dosáhnout zvýšení podílu rozpustných proteinů v cytoplazmatické frakci a také se omezí agregace proteinů. Obě fosfoproteinfosfatázy se lépe exprimovaly v pET28b, kde je histidinová kotva umístěna na N-konci proteinu, Stp1 lépe při 18°C, PppA lépe při 30°C. Proteinkináza Stk1 se lépe exprimovala v pET42b s histidinovou kotvou na C-konci při 30°C.

## 6.2 Biochemická charakterizace Stk1 a studium interakcí Stk1 a Stp1

Proteinkináza Stk1 nebyla plně biochemicky charakterizována, proto jsme její charakterizaci doplnili o další data. Zjistili jsme, že proteinkináza Stk1 je hořčík i mangan dependentní, což bylo důležité z hlediska studia interakcí, neboť fosfoproteinfosfatáza Stp1 je striktně  $Mn^{2+}$ -dependentní a v reakční směsi s hořčíkem by nebyla aktivní. Z kinetiky kinázové reakce jsme určili průběh autofosforylace Stk1. Maxima autofosforylace bylo dosaženo mezi 2. a 3. hodinou inkubace proteinkinázové reakce při 37 °C.

Předpokládali jsme, že podobně jako byla prokázána interakce proteinkinázy StkP a fosfoproteinfosfatázy PhpP *Streptococcus pneumoniae* (NOVÁKOVÁ *et al.* 2005), mohla by být prokázána i pro pár Stk1/Stp1. Stejně jako geny *stkP* a *phpP* i *stk1* a *stp1* se nachází v jednom operonu a jsou transkribovány společně. Geny *stk1* a *stp1* jsou navíc pod kontrolou *quorum sensing* systému *rhl* a stacionárního sigma faktoru RpoS. RpoS i QS se významně podílí na regulaci virulence *P. aeruginosa*. Domníváme se, že svou interakcí by mohly ovlivňovat tyto regulační dráhy a tím i virulenci *Pseudomonas aeruginosa*.

Interakce fosfoproteinfosfatázy Stp1 s autofosforylovanou Stk1 byla zachycena na radiogramu, jehož analýza odhalila významný pokles fosforylace ve vzorcích s fosfoproteinfosfatázou Stp1 oproti kontrolním vzorkům, ve kterých byla přítomna pouze autofosforylovaná proteinkináza. Tím se potvrdil náš předpoklad, že v podmínkách *in vitro* je autofosforylovaná proteinkináza Stk1 substrátem fosfoproteinfosfatázy Stp1. Vzhledem k uspořádání genů *stk1* a *stp1* v genomu *P. aeruginosa* a shodnému uspořádání genů *stkP* a *phpP* u *S. pneumoniae* lze předpokládat interakci těchto proteinů také *in vivo*.

Ze zhotoveného grafu 5.13 znázorňujícího interakci obou proteinů je zřejmé, že rozdíl aktivit obou proteinů má sestupný lineární charakter. To, že dochází k poklesu autofosforylační aktivity proteinkinázy znamená, že nedošlo k ustavení rovnovážného stavu a fosfátová skupina je částečně spontánně hydrolyzována. Nicméně k defosforylaci autofosforylované proteinkinázy fosfoproteinfosfatázou prokazatelně dochází,

a to zhruba stejnou rychlostí s jakou probíhala fosforylace Stk1.

### 6.3 Charakterizace PppA a studium interakcí PppA a PpkA

Charakterizace fosfoproteinfosfatázy PppA spočívala v potvrzení předpokladu, že se jedná o funkční Ser/Thr fosfoproteinfosfatázu a že patří mezi PP2C fosfoproteinfosfatázy.

Nejprve jsme stanovili množství proteinu vhodné pro standardní průběh reakce definovaný výrobcem testovací sady. V porovnání s fosfoproteinfosfatázou Stp1 jsme používali 10x nižší množství proteinu. Zajímavé bylo, že protein po zamrazení neztrácel svou aktivitu.

Biochemická charakterizace proteinu znamenala určení závislosti aktivity enzymu na přítomnosti dvoumocných iontů kovu, jejich optimální koncentraci, určení inhibitorů reakce a stanovení optimální teploty a pH.

Nejvyšší aktivity dosahovala fosfoproteinfosfatáza v přítomnosti 5 mM  $Mg^{2+}$  a  $Mn^{2+}$ . Žádnou aktivitu nevykazovala v přítomnosti  $Ca^{2+}$  a  $Ni^{2+}$ . Rozdíly aktivit v závislosti na přítomnosti hořčíku či manganu byly tak malé, že nebylo možné rozhodnout o absolutní závislosti na jednom z iontů. PppA je tedy  $Mg^{2+}$ - i  $Mn^{2+}$ -dependentní. Již tyto výsledky naznačovaly, že PppA by skutečně mohla být fosfoproteinfosfatázou ze skupiny PP2C. Tento předpoklad byl dále potvrzen testováním inhibitorů fosfatázové reakce. NaF a EDTA jsou specifickými inhibitory skupiny fosfoproteinfosfatáz PP2C a aktivitu PppA silně inhibovaly. Vanadičnanem sodným, inhibitorem tyrosinových fosfoproteinfosfatáz, byla aktivita mírně stimulována. Kyselina okadaová, inhibitor skupin fosfoproteinfosfatáz PP2A a PP2B, PppA neinhibuje.

Dále jsme sledovali aktivitu PppA v rozmezí teplot 4-70 °C. Nejvyšší aktivity *in vitro* dosahovala PppA při teplotě 42 °C. Přesto jsme veškeré reakce prováděli při 37 °C. Tato teplota byla doporučena výrobcem testovací sady a aktivita fosfoproteinfosfatázy nebyla při této teplotě výrazně snížena.

Poté jsme určovali pH, ve kterém protein vykazoval nejvyšší aktivitu; té bylo

dosaženo při pH = 9. Při pH = 7,5 byla aktivita proteinu překvapivě velmi nízká. K poklesu aktivity pravděpodobně došlo v důsledku odlišného složení pufru (1 mM EGTA, 25 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,5 mg/ml BSA). Dialýza proteinu proti roztoku (500 mM NaCl, 1 mM DTT) mohla také ovlivnit aktivitu proteinu.

Při studiu enzymové kinetiky PppA jsme stanovili  $V_{max} = 0,62 \mu\text{mol}/\mu\text{g}/\text{min}$  a  $K_m = 0,314 \text{ mM}$ .

Amplifikace genu *ppkA* pomocí Pfu DNA polymerase byla opakovaně neúspěšná. Domníváme se, že problémy mohl způsobit vysoký obsah GC (70 %) genomu *P. aeruginosa* a předpokládaná složitá konformace DNA v této oblasti, která nejen stěžuje amplifikaci genu *ppkA*, ale znemožňuje i přípravu delečního mutantu v tomto genu pomocí homologní rekombinace (NEDVĚDOVÁ 2003). Problém jsme se pokusili vyřešit rozdělením fragmentu na dvě menší části pomocí dalšího páru oligonukleotidů. Ani amplifikace menších fragmentů pomocí Pfu DNA polymerase nebyla úspěšná, proto jsme přistoupili k syntéze obou menších částí pomocí Herkulase enhanced DNA polymerázy, která je vhodná pro syntézu dlouhých a GC bohatých templátů. Po úpravě reakčních podmínek se zvýšily výtěžky reakce. Klonování kratších fragmentů do vektoru pET42b však bylo opakovaně neúspěšné. Od další práce s tímto genem jsme upustili. Zamýšlené studium interakcí proteinů PpkA a PppA tedy nebylo realizováno. Lze však předpokládat, že i u tohoto páru by byla interakce vzhledem k uspořádání genů v genomu prokázána.

# Kapitola 7

## Souhrn

1. Připravili jsme plazmidy pET42*stk1* a pET28*stk1* pro expresi serin/threoninové proteinkinázy Stk1, plazmidy pET42*stp1* a pET28*stp1* pro expresi serin/threoninové fosfoproteinfosfatázy Stp1 a plazmidy pET42*pppA* a pET28*pppA* pro expresi serin/threoninové fosfoproteinfosfatázy PppA. Nepodařilo se nám připravit expresní plazmid pro serin/threoninovou proteinkinázu PpkA.
2. Rozšířili jsme biochemickou charakteristiku Stk1. Naše výsledky ukázaly, že se jedná o Mg<sup>2+</sup>- a Mn<sup>2+</sup>-dependentní enzym. Ze sledování kinetiky autofosforylační reakce jsme určili dobu, ve které dochází k maximální autofosforylaci Stk1.
3. Potvrdili jsme domněnku, že proteinkináza Stk1 a fosfoproteinfosfatáza Stp1 jsou interagující proteiny.
4. Provedli jsme biochemickou charakterizaci předpokládané Ser/Thr fosfoproteinfosfatázy PppA a potvrdili její fosfatázovou aktivitu v přítomnosti Mg<sup>2+</sup>- a Mn<sup>2+</sup> a inhibici aktivity EDTA a NaF. Z výsledků vyplývá, že se jedná o fosfoproteinfosfatázu ze skupiny fosfoproteinfosfatáz PP2C, která nejvyšší aktivity *in vitro* dosahuje při teplotě 42 °C a pH = 9.
5. Protože se nám nepodařilo připravit plazmid pET42*ppkA* a získat nativní proteinkinázu PpkA, nebylo možné ověřit náš předpoklad, že i proteiny PpkA-PppA spolu interagují a tvoří další funkční pár v některé ze signálních kaskád



ovlivňující virulenci *P. aeruginosa*.

# Kapitola 8

## Seznam citované literatury

1. Adler, E., Deana, A. D., Arigoni, F., Pinna, L., a Stragier, P. (1997). Structural relationship between a bacterial developmental protein and eukaryotic PP2C phosphatases. *Mol. Microbiol.* 23: 57–62.
2. Bannantine, J. P., Griffiths, R. S., Viratyosin, W., Brown, W. J., a Rockey, D. D. (2000). A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane. *Cell Microbiol.* 2: 35–47.
3. Barford, D. (1996). Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Bioch. Sci.* 21: 407–412.
4. Barker, S., Mattheus, R., Lee, W., Bostock, A., a Burne, L. (1991). Identification of a Gene Encoding an HPr-Like Protein in *Aspergillus fumigatus*. *J. Med. Vet. Mycol.* 29: 381–386.
5. Barton, G. J., Cohen, P. T. W., a Barford, D. (1994). Conservation analysis and structure prediction of the serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphate from *Escherichia coli* suggests homology to the protein phosphates. *Eur. J. Biochem.* 220: 225–237.
6. Bednář, M., Franková, V., Schindler, J., Souček, A., a Vávra, J. (1996). *Lékařská mikrobiologie*. Marvil.
7. Bettina, C. B., Sadovsky, A. B., a Shuman, H. A. (1994). The *Legionella pneumophila icm* locus: a set of genes required for intracellular multiplication in macrophages. *Mol. Microbiol.* 14: 797–808.
8. Bhaduri, A., a Sowdhamini, R. (2005). Genome-wide survey of prokaryotic O-

- protein phosphatases. *J. Mol. Biol.* 352: 736–752.
9. Bliska, J. B., Guan, K., Dixon, J. E., a Falkow, S. (1991). Tyrosine phosphatase hydrolysis of host proteins by an essential *Yersinia* virulence determinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1187–1191.
  10. Boos, W., a Shuman, H. (1998). Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 204–229.
  11. Bork, P., Brown, N. P., Hegyi, H., a Schultz, J. (1996). The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: detection of bacterial homologues. *Protein. Sci* 5: 1421–1425.
  12. Boyer, P. D., a Krebs, E. G. (1986). The Enzymes - Control by phosphorylation. *Academic Press* 17.
  13. Brint, J. M., a Ohman, D. E. (1995). Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under control RhlR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J. Bacteriol.* 177: 7155–7163.
  14. Chang, C., Kwok, S. F., Blecker, A. B., a Meyerowitz, E. M. (1993). *Arabidopsis* ethylene-response gene *ETR1* similarity of product to two-component regulators. *Science* 262: 539–544.
  15. Chapon, V. H., Akrim, M., Latifi, A., Williams, P., Lazdunski, A., a Bally, M. (1997). Regulation of the *xcp* secretion pathway by multiple *quorum sensing* modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 24: 1169–1178.
  16. Chiang, T. M., Reizer, J., a Beachey, E. H. (1989). Serine and tyrosine protein kinase activities in *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.* 264: 2957–2962.
  17. Chin, A. M., Feldheim, D. A., a Saier Jr., M. H. (1989). Altered transcriptional patterns affecting several metabolic pathways in strains of *Salmonella typhimurium* which overexpress the fructose regulon. *J. Bacteriol.* 171: 2424–2434.
  18. Cowley, S., Ko, M., Pick, N., Chow, R., Downing, K. J., a Gordhand, B. G. (2004). The *Mycobacterium tuberculosis* protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth *in vivo*. *Mol. Microbiol.* 52: 1691–1702.

19. Cozzone, A. J. (1988). Protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* 42: 97–125.
20. Cozzone, A. J. (1993). ATP-dependent protein kinases in bacteria. *J. Cell. Biochem.* 51: 7–13.
21. Dadsii, M., a Cozzone, A. J. (1990). Evidence of protein-tyrosine kinase activity in the bacterium *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Biol. Chem.* 265: 20996–20999.
22. Dadssi, M., a Cozzone, A. J. (1990). Occurrence of protein phosphorylation in various bacterial species. *Int. J. Biochem.* 22: 493–499.
23. Das, A. K., Helps, N. R., Cohen, P. T. W., a Bradford, D. (1996). Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO J.* 15: 6798–6809.
24. Davis, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., a Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280: 295–298.
25. Denu, J. M., a Dixon, J. E. (1995). A catalytic mechanism for the dual-specific phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5910–5914.
26. Deutscher, J., a Saier Jr., M. H. (1988). Protein phosphorylation in Bacteria - regulation of gene expression, transport functions and metabolic processes. *Angew. Chem.* 27: 1040–1049.
27. Duncan, L., Alper, S., Arigoni, F., Losick, R., a Stragier, P. (1995). Activation of cell specific transcription by serine phosphatase at the site of asymmetric division. *Science* 270: 641–644.
28. Dworkin, M. (1996). Recent advances in the social and developmental biology of the *Myobacteria*. *Microbiol. Rev.* 60: 70–102.
29. Eckstein, J. W., Romero, P. B., a Berdo, I. (1996). Identification of an essential acidic residue in Cdc25 protein phosphatase and a general three-dimensional model for a core region in protein phosphatases. *Protein Sci.* 5: 5–12.
30. Edelman, A. M., Blumenthal, D. K., a Krebs, E. G. (1987). Protein serine/threonine kinase. *Annu. Rev. biochem.* 56: 567–613.
31. Fant, W. J., Johnson, D. E., a Williams, E. F. (1993). Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 483–480.

32. Fieulaine, S., Morera, S., Poncet, S., Monedero, V., Chaignon, V. G., a Galinier, A. (2001). X-ray structure of HPr kinase: a bacterial protein kinase with a P-loop nucleotide-binding domain. *EMBO J.* 20: 3917–3927.
33. Foynes, S., Dorell, N., Ward, S. J., Stabler, S. A., McColm, A. A., a Rycroft, A. N. (2000). *Helicobacter pylori* possesses two CheY response regulators and a histidine kinase sensor, CheA, which are essential for chemotaxis and colonization of the gastric mucosa. *Immun. Infect.* 68: 2016–2023.
34. Fu, Y., a Galan, J. E. (1998). The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP in translocated into host cell and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol. Microbiol.* 27: 359–368.
35. Galinier, A., Kravanja, M., Engelmann, R., Hengstenberg, W., Kilhoffer, M. C., a Deutscher, J. (1998). New protein kinase and protein phosphatase families mediated signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1823–1828.
36. Gambello, M. J., a Iglewski, B. H. (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene: a transcriptional activator of elastase expression. *J. Bacteriol.* 173: 3000–3009.
37. Gambello, M. J., Kaye, S., a Iglewski, B. H. (1993). LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene *apr* and an enhancer of exotoxin A expression. *A Express. Infect. Immun.* 61: 1180–1184.
38. Garnak, M., a Reeves, H. C. (1978). Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Science* 203: 1111–1112.
39. Gay, A. V., a Everett, M. (2000). The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 8: 238–244.
40. Grangeasse, C., Doublet, P., Vincet, C., Vaganay, E., Riberty, M., a Duclos, B. (1998). Functional characterization of the low-molecular-mass phosphotyrosine-protein phosphatase of *Acinetobacter johnsonii*. *J. Mol. Biol.* 278: 339–347.
41. Grangeasse, C., Vaganay, E., Doublet, P., Riberty, M., Cozzone, A. J., a Duclos, B. (1997). Cyclic AMP stimulates the protein tyrosine kinase activity of *Acinetobacter calcoaceticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 152: 333–337.

42. Groisman, E. A., a Saier Jr., M. H. (1990). Salmonella virulence - new clues to intramacrophage survival. *Trends Biochem. Sci.* 15: 30–33.
43. Guan, K., a Dixon, J. (1990). Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* 249: 553–556.
44. Guan, K., a Dixon, J. E. (1991). Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. *J. Biol. Chem.* 266: 17026–17030.
45. Hanks, S. K., a Hunter, T. (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9: 576–596.
46. Hanks, S. K., Quinn, A. M., a Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42–52.
47. Heinzl, P., Werbitzky, O., Distler, J., a Piepersberg, W. (1988). A second streptomycin resistance gene form *Streptomyces griseus* codes for streptomycin-3'-phosphotransferase. Relationships between antibiotic and protein kinases. *Arch. Microbiol.* 150: 184–192.
48. Hong, S. K., Matsumoto, A., Horinouchi, S., a Beppu, T. (1993). Effectors of protein kinase inhibitors on in vitro protein phosphorylation and cellular differentiation of *Streptomyces griseus*. *ol. Gen. Genet.* 263: 347–354.
49. Howell, L. D., Griffiths, C., Slide, L. W., Potts, M., a Kennelly, P. J. (1996). Substrate specificity of IphP, a cyanobacterial dual-specificity protein phosphatase with MAP kinase phosphatase activity. *Biochemistry* 35: 7566–7572.
50. Hubbard, M. J., a Cohen, P. (1993). On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends. Biochem. Sci.* 18: 172–178.
51. Hunter, T. (1991). Protein kinase classification. *Methods. Enzymol.* 200: 3–37.
52. Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases, the Yin and Yang of protein phosphorylation and signalling. *Cell* 80: 225–236.
53. Jault, J. M., Fieulaine, S., Nessler, S., Gonzalo, P., DiPietro, A., a Deutscher, J. (2000). The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive cooperativity for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *J. Biol. Chem.* 275: 1773–1780.

54. Jia, Z., Barford, D., Flint, A. J., a Tonks, N. K. (1995). Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* 268: 1754–1758.
55. Kang, C. M., Abbott, D. W., Park, S. T., Dascher, C. C., Cantley, L. C., a Husson, R. N. (2005). The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes. Dev.* 19: 1692–1704.
56. Kaniga, K., Uralil, J., Bliska, J. B., a Galan, J. E. (1996). A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 21: 633–641.
57. Kennelly, P. J., a Potts, M. (1996). Fancy meeting you here! A fresh look at prokaryotic protein phosphorylation. *J. Bacteriol.* 176: 4759–4764.
58. Khvorova, A., Zhang, L., Higgins, M. L., a Piggot, P. J. (1998). The *spoIIIE* locus is involved in the SpoOA-dependent switch in the location of the FtsZ rings in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180: 1256–1260.
59. Kievit, T. R., a Iglewski, B. H. (2000). Bacterial *quorum sensing* in pathogenic relationship. *Infect. Immun.* 9: 4839–4849.
60. Kievit, T. R., Seed, P. C., Passador, L., Nezezon, J., a Iglewski, B. H. (1999). RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181: 2175–2184.
61. Knighton, D. R., Zheng, J., Eyck, L. T., Ashford, V. A., Xuong, N. H., a Taylor, S. S. (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253: 407–414.
62. Knighton, D. R., Zheng, J., Eyck, L. T., Ashford, V. A., Xuong, N. H., a Taylor, S. S. (1991). Structure of peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253: 414–420.
63. Koul, A., Herget, T., Klebl, B., a Ullrich, A. (2004). Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. *Natl. Rev. Microbiol.* 2: 189–202.
64. Koul, A., M. Treder, A. C. nad, Taiga, A. K., Drlica, K., Singh, Y., a Ullrich, A. (2000). Cloning and characterization of secretory tyrosine phosphatases of

- Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 182: 5425–5432.
65. Kravanja, M., Engelmann, R., Dossonnet, V., Bluggel, M., Meyer, H. E., a Frank, R. (1999). The *textithprK* gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Mol. Microbiol.* 312: 59–66.
66. Krebs, E. G. (1986). The Enzymes. *Academic Press* 17.
67. Krebs, E. G., a Fischer, E. H. (1956). The phosphorylase *b* to *a* converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Acta* 20: 150–153.
68. Kunst, F., Debarbouille, M., Msadek, T., Young, M., Mauel, C., a Karamata, D. (1988). Involvement of stringent factor RelA in expression of the alkaline protease gene *oprE* in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 170: 5093–5101.
69. Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., a Lazdunski, A. (1996). A hierarchical *quorum sensing* cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR a RhlR to expression of the stationary phase sigma factor RpoS. *Mol. Microbiol.* 21: 1137–1146.
70. Latifi, A., Winson, M. K., Foglino, M., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. A. B., a Lazdunski, L. (1995). Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through *quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.* 17: 333–343.
71. Lawson, M. A., a Maxfield, F. R. (1995). Ca<sup>2+</sup> and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature* 377: 75–79.
72. Li, Y., a Strohl, W. R. (1996). Cloning, purification and properties of a phosphotyrosine phosphatase from *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol* 178: 136–142.
73. Liu j., Farmer, J. D., Lane, L. S., Weissman, J. F. I., a Schreiber, S. L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807–815.
74. Lukas, G. S., McLeary, W. R., Stock, A. M., a Stock, J. B. (1992). Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 718–722.
75. MacKinotsh, C., a MacKinotsh, R. W. (1994). Inhibition of Protein Phosphatase-



- 1 by Clavosines A and B. *Trends. Biochem. Sci.* 17: 444–447.
76. Manai m., a Cozzone, A. J. (1979). Analysis of the protein activity of *Escherichia coli* cells. *Biochem. Biophys. Common. Res.* 91: 819–826.
77. Martin, P., Jullein, E., a Courvalin, P. (1988). Nucleotide sequence of *Acinetobacter baumannii aphA-6* gene: evolutionary and functional implications of sequence homologies with nucleotide-binding proteins, kinases and other aminoglycoside-modifying enzymes. *Mol. Microbiol.* 2: 615–625.
78. Matsumoto, A., Hong, S. K., Ishizuka, H., Horinouchi, S., a Beppu, I. (1994). Phosphorylation of the AfsK protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene* 146: 47–56.
79. Meggio, F., a Pinna, L. A. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.* 17: 349–368.
80. Molle, V., Kremer, L., Blanc, C. G., Besra, G. S., Cozzone, A. J., a Prost, J. F. (2003). An FHA phosphoprotein recognition domain mediates protein EmbR phosphorylation by PknH, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 42: 15300–15309.
81. Montley, S. T., a Lory, S. (1999). Functional characterization of serine/threonine protein kinase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 67: 5386–5394.
82. Motley, S. T., a Lory, S. (1999). Functional characterization of a serine/threonine protein kinase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 67: 5386–5394.
83. Mukhopadhyay, S., Kapatral, V., Xu, W., a Chakrabarty, A. M. (1999). Charakterization of Hank's type serine/threonine kinase and serine/threonine phosphoprotein phosphatase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol.* 181: 6615–6622.
84. Mumby, M. C., a Walter, G. (1993). Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation and functions in cell growth. *Physiol. Rev.* 73: 673–699.
85. Munoz-Dorado, J., Inouye, S., a Inouye, M. (1991). A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell* 67: 995–1006.
86. Nariya, H., a Inouye, S. (2002). Activation of 6-phosphofruktokinase via phosphorylation by Pkn4, a protein Ser/Thr kinase of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Micro-*

- biol.* 46: 1353-1366.
87. Nariya, H., a Inouye, S. (2003). An effective sporulation of *Myxococcus xanthus* require glycogen consumption via Pkn4-actived 6-phosphofructokinase. *Mol. Microbiol.* 49: 517-528.
88. Nedvědová, J. (2003). *Příprava delečních mutací genů signálního aparátu Pseudomonas aeruginosa a sledování fenotypového projevu*. Diplomová práce.
89. Nováková, L., Sasková, L., Pallová, P., Janeček, J., Novotná, J., a Ulrych, A. (2005). Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. *FEBS J.* 272: 1243-1254.
90. Ochsner, U. A., Koch, A. K., Fiechter, A., a Reiser, J. (1994). Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 176: 2044-2054.
91. Ota, I. M., a Varshavsky, A. (1993). A yeast protein similar to two-component regulators. *Science* 262: 566-569.
92. Pannifer, A. D. B., Flint, A. J., tonks, N. K., a Barford, D. (1998). Visualization of the cysteinyl-phosphate intermediate of a protein-tyrosine phosphatase by X-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* 273: 10454-10462.
93. Passador, L., Cook, M. J., Cambello, M. J., Rust, L., a Iglewski, B. H. (1993). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260: 1127-1130.
94. Pearson, J. P., Gray, K., Passador, L., Tucher, K. D., Eberhard, A., a Iglewski, B. H. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 197-201.
95. Perego, M., Cole, S. P., Burbulys, D., Trach, K., a Hoch, J. A. (1989). Characterization of the gene for a protein kinase which phosphorylates the sporulation-regulatory protein Spo OA and Spo OF of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 171: 6187-6196.
96. Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., a Greenberg, E. P. (1999). Quinolone signalling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11229-

- 11234.
97. Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C., a Iglewski, B. H. (1997). Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 179: 3127–3132.
98. Platt, M. W., Rottem, S., Milner, Y., F. Barile m., Peterkofsky, A., a Reizer, J. (1988). Protein phosphorylation in *Mycoplasma gallisepticum*. *Eur. J. Biochem.* 176: 61–67.
99. Poolman, B., Royer, T. J., Mainzer, S. E., a Schmidt, B. F. (1989). Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*: a hybrid protein with homology to the melibiose carrier protein and enzyme II of phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems. *J. Bacteriol.* 171: 244–253.
100. Popov, K. M., kedishvili, N. Y., Zhao, Y., Shimomura, Y., Crabb, D. W., a Harris, R. A. (1993). Primary structure of pyruvate dehydrogenase kinase establishes a new family of eukaryotic protein kinase. *J. Biol. Chem.* 268: 26602–26606.
101. Popov, K. M., Zhao, Y., Shimomura, Y., Kuntz, M. J., a Harris, R. A. (1992). Branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase kinase. Molecular cloning, expression and sequences similarity with histidine protein kinase. *J. Biol. Chem.* 267: 13127–13130.
102. Postma, P. W., a Lengeler, J. W. (1985). Energetics of glucose uptake in *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* 49: 232–269.
103. Postma, P. W., a Lengeler, J. W. (1993). Phosphoenolpyruvate-carbohydrate transferase systems in bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 543–594.
104. Potts, M., Sun, H., Mockaitis, K., Kennelly, P. J., Reed, D., a Tonks, N. K. (1993). A protein-serine/tyrosine phosphatase encoded by the genome of the cyanobacterium *Nostoc commune* UTEX 584. *J. Biol. Chem.* 268: 7632–7635.
105. Purcell, M., a Human, H. A. (1998). The *Legionella pneumophila icm GCDJBF* genes are required for killing of human macrophages. *Infect. Immun.* 66: 2245–2255.
106. Ramsdorf, H. J., Pai, S. H., Ponta, H., Herrlich, P., Roskoski, R., Jr., a Schweiger, M. (1974). Protein kinase induction in *Escherichia coli* by bacteriophage

- T7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 586–589.
107. Reizer, J., Hoischen, C., Titgemeyer, F., Rivolta, C., Rabus, R., a Stulke, J. (1998). A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol. Microbiol.* 27: 1157–1169.
108. Reizer, J., Romano, A. H., a Deutscher, J. (1993). The role of phosphorylation of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system in the regulation of carbon metabolism in Gram-positive bacteria. *J. Cell. Biochem.* 51: 543–594.
109. Reizer, J., Saier Jr., M. H., Deutscher, J., Grenier, F., Thompson, J., a Hengstenberg, W. (1988). Structure of the Histidine-containing Phosphocarrier Protein HPr from *Bacillus subtilis*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 15: 297–338.
110. Rockey, D. D., Grosenbach, D., Hruby, D. E., Peacock, M. G., Heinzen, R. A., a Hackstadt, T. (1997). *Chlamydia psittaci* IncA is phosphorylated by the host cell and is exposed on the cytoplasmatic face of the developing inclusion. *Mol. Microbiol.* 24: 217–228.
111. Saha, A. K., Dowling, J. N., Mukhopadhyay, N. K., a Glew, R. H. (1988). Demonstration of two protein kinases in extracts *Legionella micdadei*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1275–1281.
112. Saier, M. H. (1993). Regulatory interactions involving the proteins of the phosphotransferase system in enteric bacteria. *J. Cell. Biochem.* 51: 62–68.
113. Saier, M. H., Chauvaux, S., Deutscher, J., Reizer, J., a Ye, J. J. (1995). Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram-positive bacteria. *Trends Biochem. Sci.* 20: 267–271.
114. Saier, M. H., Wu, L. F., a Reizer, J. (1990). Regulation of bacterial physiological processes by three types of protein phosphorylating systems. *Trends Biochem. Sci.* 15: 391–395.
115. Saier Jr., M. H. (1989a). Identification of a site in the phosphocarrier protein, HPr, with influences its interactions with sugar permeases of the bacterial phosphotransferase system: kinetic analysis employing site-specific mutants. *Res. Microbiol.* 140: 349–352.
116. Saier Jr., M. H. (1989b). Protein phosphorylation and allosteric control of indu-

- cer exclusion and catabolic repression by the bacterial phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system. *Microbiol. Rev.* 53: 109–120.
117. Saier Jr., M. H., Daniels, G. A., Boerner, P., a Lin, J. (1988). Neutral amino-acid transport systems in animal cells - potential targets of oncogene action and regulators of cellular growth. *J. Membrane Biol.* 104: 1–20.
118. Sassetti, C. M., a Rubin, E. J. (2003). A genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 100: 12989–12994.
119. Schreiber, S. L. (1992). Immunophilin-sensitive protein phosphatase action in cell signalling pathways. *Cell* 70: 365–368.
120. Schuster, M., Hawkins, A. C., Hardwood, C. S., a Greenberg, E. P. (2004). The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to *quorum sensing*. *Mol. Microbiol.* 51: 973–985.
121. Schuster, S., Noegel, A. A., Oehme, F., Gerish, G., a Simon, M. I. (1996). The hybrid histidine kinase DokA is part of the osmotic response system of *Dyctiostelium*. *EMBO J.* 15: 3880–3889.
122. Scidmore, M. A., a Hackstadt, T. (2001). Mammalian 14-3-3 $\beta$  associates with the *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane via its interaction with IncG. *Mol. Microbiol.* 39: 1638–1650.
123. Seed, P. C., Passador, L., a Iglewski, B. H. (1995). Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinducer regulatory hierarchy. *J. Bacteriol.* 3: 654–659.
124. Segal, G., Purcell, M., a Human, H. A. (1998). Host killing and bacterial conjugation requires overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1669–1674.
125. Segovia, M., a Vincente, C. (1995). A fungal membrane-associated phosphoenolpyruvate: glucose phosphotransferase system, which includes adenylyl cyclase in the lichen *Evernia prunastri*. *J. Plant. Physiol.* 46: 437–444.
126. Shenolikar, S. (1994). Protein serine/threonine phosphatases - new avenues for cell regulation. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10: 55-86.
127. Shi, L., Potts, M., a Kennelly, P. J. (1998). The serine, threonine and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic orga-

- nisms: a family portrait. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 229–253.
128. Srividhya, K. V., a Krishnaswamy, S. (2004). A simulation model of *Escherichia coli* osmoregulatory switch using E-CELL system. *BMC Microbiology* 44: 1–13.
129. Steinmetz, M., a Aymerich, S. (1987). Genetics and Biotechnology of Bacilli. *Academic Press, New York* 3.
130. Stock, J. B., Ninfa, A. J., a Stock, A. M. (1989). A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Microbiol. Rev.* 53: 450–490.
131. Taylor, S. S., Knighton, D. R., Zheng, J., Sowadski, J. M., Gibbs, C. S., a Zoller, M. J. (1993). A template for the protein kinase family. *Trends. Biochem. Sci.* 18: 84–89.
132. Thomason, P., a Kay, R. (2000). Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. *J. Cell. Sci.* 133: 3141–3150.
133. Toder, D. S., Gambello, M. J., a Iglewski, B. H. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase gene under transcriptional control of *lasR*. *Mol. Microbiol.* 5: 2003–2010.
134. Turinsky, A. J., Grundy, F. J., Kim, J. H., Chambliss, G. H., a Henkin, T. M. (1998). Catabolite regulation of *Bacillus subtilis* acetate and acetoin utilization genes by CcpA. *J. Bacteriol.* 180: 5961–5967.
135. Turner, A. M., a Mann, N. H. (1989). Protein kinase activities in free-cell extracts of *Rhodospirillum rubrum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 57: 301–306.
136. Umeyama, T., a Hirinouchi, S. (2001). Autophosphorylation of the bacteria serine/threonine kinase, AfsK, is inhibited by kbpA, an AfsK-binding protein. *J. Bacteriol.* 183: 5506–5512.
137. Verhamme, D. T., Postma, P. W., Crielaard, W., a Hellingwerf, K. J. (2002). Cooperativity in signal transfer through the Uhp system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184: 4205–4210.
138. Veron, M., Andyelm, E. radyio, Tsigelnz, I., Eyck, L. F. T., a Taylor, S. S. (1993). A conserved helix motif complements the protein kinase core. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10618–10622.

139. Walsh, A. G., Matewish, M. J., Burrows, L. L., Monenteiro, M. A., Perry, M. E., a Lam, J. S. (2000). Lipopolysaccharide core phosphates are required for viability and intrinsic . *Mol. Microbiol.* 35: 718–727.
140. Wang, J. Z., a Koshland, E. D., Jr. (1978). Evidence for protein-kinase activities in prokaryote *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 253: 7605–7608.
141. Wanner, B. L. (1992). Is cross regulation by phosphorylation to two-component response regulator proteins importatn in bacteria? *J. Bacteriol.* 174: 2053–2058.
142. Weinstock, H. D., Dean, D., a Bolan, G. (1994). *Chlamydia trachomatis* infections. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 8: 797–819.
143. Whittaker, C. A., a Hynes, R. O. (2002). Distribution and evolution of von Willebrand/intergin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol. Biol. Cell.* 13: 3369–3387.
144. Williamson, M. P. (1994). The structure and function of prolin-rich regions in proteins. *Biochem. J.* 297: 249–260.
145. Winson, M. K., Camara, M., Lafiti, A., Foglino, M., Chabra, S. R., a Daykin, M. (1995). Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence dereminants and secondary metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9427–9431.
146. Wise, A. A., a Price, C. W. (1995). Four additional genes in the *sigB* operon of *Bacillus subtilis* that control activity of the general stress factor  $\sigma^B$  in response to enviromental signals. *J. Bacteriol.* 177: 123–133.
147. Wolanin, P. M., Thomason, P. A., a Stock, J. B. (2002). Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome. Biol.* 3: 3013.
148. Yang, X., Kang, C. M., Brody, M. S., a Price, C. W. (1996). Opposing pairs of serine protein kinases and phosphateses transmit signals of enviromental stress to activate a bacterial transcription faktor. *Genes Dev.* 10: 2265–2275.
149. Zhang, C. C. (1993). A gene encoding a protein related to eukaryotic protein kinase from the filamentous heterocystous cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11840–11844.

150. Zhang, C. C. (1996). Bacterial signalling involving eukaryotic-type protein kinases. *Mol. Microbiol.* 20: 9–15.
151. Zhang, Z. Y., a Dixon, J. E. (1993). Active site labeling of the *Yersinia* protein tyrosine phosphatase: the determination of the  $Pk_a$  of the active site cysteine and the function of conserved histidine 402. *Biochemistry* 32: 9340–9345.
152. Zhou, G., Denu, J. M., Wu, L., a Dixon, J. E. (1994). The catalytic role of Cys124 in the dual specificity phosphatase VHR. *J. Biol. Chem.* 269: 28084–28090.