

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program:

Biologie

Studijní obor:

Biologie



Petr Kolář

Úloha malých efektorových molekul při signalizaci u bakterií.

Role of small effector molecules in bacterial signalling.

Bakalářská práce

Školitel: **RNDr. Irena Lichá, CSc.**

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze, 15. 5. 2013

Podpis:

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, cursive letters, likely representing the author's name.

Děkuji RNDr. Ireně Liché, CSc. za trpělivé vedení bakalářské práce a Mgr. Lukášovi Dvořáčkovi za korekturu a rady při finální úpravě.

Abstrakt

Malé efektorové molekuly plní důležitou úlohu ve fyziologii bakterií. Jsou rozděleny do několika podkategorií molekul, vyskytujících se v bakteriální buňce. Jednu z nich tvoří malé signální molekuly mechanismu *quorum sensing*, které v rámci extracelulární signalizace umožňují mezibuněčnou komunikaci v bakteriálních populacích. Zprostředkují informaci o buněčné hustotě a různých vlastnostech vnějšího okolí. Další podkategorií malých efektorových molekul jsou modifikované nukleotidy. Účastní se intracelulárních signálních drah, které vedou k regulaci změn životních strategií bakteriálních populací, v závislosti na měnících se zevních podmínkách. Nejlépe prozkoumané jsou signalizační dráhy využívající molekuly c-di-GMP a (p)ppGpp. Podrobné studie byly provedeny u zástupců gram pozitivních (*Bacillus subtilis*) a gram negativních (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*) bakterií, u kterých bylo také prokázáno propojení signálních drah zprostředkovaných c-di-GMP s mechanismem *quorum sensing* (*Vibrio cholerae*, *Xanthomonas campestris*). Důležitý objev na poli malých efektorových molekul byla signalizace prostřednictvím c-di-AMP u bakterie *Bacillus subtilis*. Nové mechanismy regulace byly rovněž prokázány u nejlépe prozkoumané malé efektorové molekuly cAMP, v kontextu propojení signálních drah (*Vibrio cholerae*). Recentní studie pojednávající o integraci intracelulárních a extracelulárních signalizací směřují k představě informačních sítí pokrývajících celé bakteriální populace, což přispívá k pohledu na bakterie jako na mnohobuněčný organizmus.

Klíčová slova: ppGpp, iNTPs, cdiGMP, cAMP, cdiAMP, adaptace na stres, quorum sensing

Abstract

Small effector molecules play an important role in bacterial physiology. There are many types of them in the bacterial cell. One group are small signalling molecules which participate in *quorum sensing*, enabling bacterial cell-cell communication as part of an extracellular signalling. These molecules mediate information about the cell density and different qualities of the extracellular matrix. Next group of small effector molecules are modified nucleotides. They participate in intracellular signalling pathways which regulate the switch of bacterial lifestyle according to changing environment. Best studied are signalling pathways using the molecules – c-di-GMP and (p)ppGpp. Detail studies were done in case of gram positive (*Bacillus subtilis*) and gram negative (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*) bacteria, where was proved the connection between c-di-GMP signalling pathways and *quorum sensing* (*Vibrio cholerae*, *Xanthomonas campestris*). Important discovery in field of small effector molecules is the c-di-AMP signalling pathway in *Bacillus subtilis*. New regulatory mechanisms were determined in well-known small effector molecule cAMP, regarding the signalling pathways connections (*Vibrio cholerae*). Recent studies considering the cooperation of the extracellular and intracellular signalization pathways brings the concept of information networks covering the whole bacterial population, which contributes to thinking about bacteria as a multicellular organism.

Key words: ppGpp, iNTPs, cdiGMP, cAMP, cdiAMP, stress adaptation, quorum sensing

Obsah

1	Úvod.....	1
2	<i>Quorum sensing</i>	3
2.1	Malé signální molekuly účastníci se přenosu signálu v mechanismu <i>quorum sensing</i>	3
2.2	Role mechanismu <i>quorum sensing</i> v životě bakterií.....	4
2.3	<i>Quorum sensing</i> u Gram negativních bakterií.....	5
2.3.1	Malé signální molekuly u gram negativních bakterií – acyl homoserin laktony.....	5
2.3.2	<i>Vibrio fisheri</i> – dráha LuxI-LuxR, iniciace bioluminiscence	6
2.4	<i>Quorum sensing</i> u gram pozitivních bakterií	7
2.4.1	Malé signální molekuly u gram pozitivních bakterií –modifikované oligopeptidy.....	7
2.4.2	<i>Bacillus subtilis</i> – navození stavu přirozené kompetence	7
3	Modifikované nukleotidy jako malé efektorové molekuly.....	9
3.1	Signalizace prostřednictvím cyklického dinukleotidu – c-di-GMP	10
3.1.1	Metabolismus c-di-GMP	10
3.1.1.1	Syntéza c-di-GMP: Diguanylát cyklázy (DGC).....	10
3.1.1.2	Degradace c-di-GMP: Fosfodiesterázy (PDE)	11
3.1.1.3	Další funkce proteinů metabolismu c-di-GMP.....	11
3.1.2	Efaktorové proteiny v c-di-GMP zprostředkované signalizaci	12
3.1.3	Efaktorové riboswitch RNA vázající c-di-GMP jako ligand.....	13
3.1.4	Signalizace c-di-GMP u gram negativních bakterií – <i>Vibrio cholerae</i>	13
3.1.5	Signalizace pomocí c-di-GMP u gram pozitivních bakterií - <i>Bacillus subtilis</i>	15
3.1.6	Propojení signalizace zprostředkované c-di-GMP a mechanismu <i>quorum sensing</i>	15
3.1.6.1	Nepřímé ovlivnění signalizace prostřednictvím c-di-GMP drahami quorum sensing - <i>Vibrio cholerae</i>	16
3.1.6.2	Přímé ovlivnění metabolismu c-di-GMP působením AI – <i>Xanthomonas campestris</i> 18	
3.2	Modifikovaný nukleotid (p)ppGpp – signalizace hladovění	19
3.2.1	Metabolismus (p)ppGpp	20
3.2.2	Funkce (p)ppGpp v bakteriální buňce	20
3.2.2.1	Signalizace nutričního stresu prostřednictvím (p)ppGpp u <i>Escherichia coli</i>	21
3.2.2.1.1	Zahájení produkce (p)ppGpp - RelA a SpoT – závislé dráhy	21
3.2.2.1.2	Mechanismy účinku (p)ppGpp v <i>Escherichia coli</i>	22
3.2.2.1.2.1	Přímý vliv (p)ppGpp na regulaci transkripce rRNA u <i>Escherichia coli</i>	22
3.2.2.2	Regulace pomocí (p)ppGpp u <i>Bacillus subtilis</i>	23

3.2.2.2.1	Nepřímý vliv (p)ppGpp na regulaci transkripce rRNA u <i>Bacillus subtilis</i>	24
3.3	Nově objevený cyklický dinukleotid – c-di-AMP	25
3.3.1	Mechanismus fungování c-di-AMP u <i>Bacillus subtilis</i>	25
3.4	Nové informace o známé molekule cAMP	26
3.4.1	Primární represe katabolismu uhlíku u <i>Escherichia coli</i> – Crp/CRA	26
3.4.2	Propojení signalizace prostřednictvím cAMP s mechanizmy <i>quorum sensing</i> u bakterie <i>Vibrio cholerae</i>	27
3.5	Eukaryotní analog u prokaryot – cGMP	28
4	Závěr	28
5	Seznam použité literatury	30

Seznam použitých zkratek

ACP	<i>acyl carrier protein</i>
AHL	acyl homoserin lakton
AI	autoinduktor (<i>autoinducer</i>)
AMK	aminokyselina
ATP	adenosin trifosfát
CAI-1	<i>cholera autoinducer 1</i>
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
Cap	<i>catabolite activator protein</i>
c-di-AMP	cyklický diadenosin monofosfát
c-di-GMP	cyklický diguanosin monofosfát
cGMP	cyklický guanosin monofosfát
CRA	aktivátor katabolické represe (<i>catabolite repressor/activator</i>)
Crp	receptorový cAMP protein (<i>cAMP receptor protein</i>)
CSF	faktor kompetence a sporulace (<i>competence and sporulating faktor</i>)
DAC	diadenylát cykláza
DGC	diguanylát cykláza
DNA (ss,ds,ch)	2' deoxyribonukleová kyselina (jednořetězcová, dvouřetězcová, chromozomální)
DSF	<i>difusible signal factor</i>
GTP	guanosin trifosfát
IMP	Inosin 5' monofosfát
iNTP	iniciační nukleotid trifosfát
NTP	nukleotid trifosfát
pApA	5'- Phosphoadenylyl- (3' -> 5')- adenosine
PDE	fosfodiesteráza
pGpG	5'- Phosphoguananylyl- (3' -> 5')- guanosine
ppGpp	guanosin 3',5' - bispyrofosfát
pppGpp	guanosin 3' - difosfát, 5' - trifosfátu
RBS	vazebné místo pro ribozom (<i>ribosome binding site</i>)
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA/mRNA	ribosomální RNA, messenger RNA
RNAP	RNA polymeráza
RSH	<i>Rel Spo homolog</i>
SD	Shine - Delgarnova sekvence
vps	<i>Vibrio polysacharid</i>

1 Úvod

Podle Stephana J. Goulda žijeme v „době bakterií“, antropocentrický pohled na svět jakožto „doba lidí“ přeceňuje ekologickou roli člověka v biosféře. Země byla již od vzniku života v „době bakterií“ a tyto organismy nadále dominují. Bakterie jsou nejpočetnější formou života na planetě Zemi. Nejen že v počtu jedinců pravděpodobně převyšují součet všech ostatních organismů, dokonce i v množství biomasy bakterie překonávají veškerou flóru a faunu na Zemi dohromady. To je velice silný argument pro nutnost studovat tyto všudypřítomné organismy (Gould 1996).

Rozmanitost prostředí, na které se bakterie v průběhu času přizpůsobily, je značná. S tím souvisí jejich schopnost využívat různé zdroje energie a látky pro získání základních stavebních kamenů bakteriální buňky. Vzhledem k jejich intenzivní komunikaci s vnějším prostředím a nutnosti koordinace s okolními buňkami, se musí bakterie umět rychle adaptovat – vypořádat se se stresem, který na ně proměnlivé okolí neustále vyvíjí. Bakteriální buňka reaguje na změny pomocí komplexní regulace exprese genů, určené pro konkrétní podnět (např. limitace zdrojů uhlíku, či hladovění na AMK). Je známo několik globálních stresových odpovědí (např. stringentní odpověď, katabolická represe, sporulace), které se napříč bakteriálními druhy nemění (Krämer a Jung 2010).

Moderní mikrobiologie přestává vnímat bakterii převážně jako jednobuněčný organizmus. Soustředí se na přirozenou formu, v níž se bakterie v přírodě vyskytují – biofilmy. V rámci těchto komplexních společenstev existují rozmanité sociální struktury, vyžadující vysoký stupeň komunikace a signalizace. Hovoří se o potenciální mnohobuněčnosti bakterií. Je evidentní, že se v přírodě vyskytují bakterie jako samostatné buňky ojedinele, výjimkou mohou být patogenní bakterie žijící určitou část svého života v hostiteli. V kolonii příbuzných jedinců lze totiž reagovat na stres přicházející z prostředí mnohem efektivněji. Důkazem může být např. odolnost biofilmů vůči antibiotikům při infekčních onemocněních (Li a Tian 2012).

Přenos signálů u bakterií probíhá na extracelulární nebo intracelulární úrovni. Ty jsou propojeny, což umožňuje integraci signálů z vnějšího prostředí s náležitou reakcí bakteriální buňky. Signalizační dráhy bakteriálních buněk jsou velice komplexní, jejich společným znakem je však použití malých molekul pro přenos signálů. Tyto molekuly jsou společné všem bakteriím, některé byly zatím prokázány jen u určité skupiny bakterií (např. cAMP u gram negativních bakterií). Často mají důležitou signalizační funkci i u eukaryot (např. (p)ppGpp, cAMP).

Pojem „malá molekula“ charakterizuje organickou sloučeninu s nízkou molekulární hmotností (menší než 800 Da), kterou syntetizuje bakteriální buňka. Podkategorie malých molekul jsou „malé efektorové molekuly“, které interagují s proteiny, nebo riboswitch RNA a ovlivňují jejich funkci.

Další důležitý pojem je „malá signální molekula“, to je efektorová molekula, která umožňuje přenos informace mezi jednotlivými buňkami v populaci jednoho, či více bakteriálních druhů.

V první části této práce popíšu malé signální molekuly působící v rámci mechanismu *quorum sensing*, který je pro bakteriální buňku velice důležitý při mezibuněčné komunikaci a pro vnímání změn vnějšího prostředí. Ve druhé části této práce se budu věnovat malým efektorovým molekulám odvozeným od nukleotidů. Jejich pole působení je široké, signalizují změny ve vlastnostech vnějšího prostředí, a následně spouštějí signální kaskády regulující procesy vedoucí k fenotypové adaptaci buněk.

Jelikož studium malých efektorových molekul odhaluje mnoho různých propojení mezi signálními kaskádami, zaměřím se na integraci intracelulárních a extracelulárních signalizačních drah zprostředkovaných vybranými efektorovými molekulami. Cílem mé práce je podat souhrn recentních poznatků a fungování těchto molekul a prokázat jejich esenciální úlohu v rámci životní strategie bakterií.

2 *Quorum sensing*

Tento fenomén byl poprvé pozorován u mořské bioluminiscenční bakterie *Vibrio fischeri*, která žije v symbióze s některými mořskými organismy, například s medúzou *Euprymna scolopes* (Engebrecht et al. 1983). V průběhu dospívání jedinců medúzy tvoří *V.fischeri* ve speciálním světelném orgánu persistentní kolonie. Výsledkem je populace bakterií emitující světlo, což je pro přežití medúzy velice důležité. Díky světlu pocházejícímu ze svého světelného orgánu brání tvorbě stínů, a tak se vyhýbá predaci. Pro bakterii je výhodou prostředí ve světelném orgánu, které je relativně stálé a bohaté na živiny. Původní zjištění bylo, že tyto bakterie produkují malou signální molekulu, jejíž koncentrace roste se zvětšující se hustotou populace. Jakmile koncentrace této molekuly dosáhne určité prahové hodnoty, spustí se kaskáda reakcí signalizační dráhy pozitivně regulující expresi operonu, kódujícího mimo jiné luciferázu. To je enzym, který katalyzuje reakci, při které dochází ke světelné emisi (Visick et al. 2000).

Quorum sensing znamená doslova „vycítit kvorum“, to je zaznamenat takový počet členů populace, aby byla tato „skupina“ bakterií usnášení schopná. V praxi to znamená dosáhnout dostatečného počtu jedinců pro zahájení realizace konkrétní životní strategie, která by při menší populační hustotě pozbyla smyslu tak jak je tomu u bioluminiscence, „swarmingu“, nebo exprese virulencních faktorů. Tímto se přibližujeme k vnímání populace bakterií jakožto mnohobuněčného organismu s tendencí využívat výhody skupinové koordinace jedinců.

2.1 Malé signální molekuly účastníci se přenosu signálu v mechanismu *quorum sensing*

V populacích bakterií, a to nejen v populaci složené z jedinců téhož druhu, existuje konstitutivní produkce malých signálních molekul na určité úrovni. Rozlišuje se několik typů těchto molekul, používaných v rámci mechanismu *quorum sensing*, všeobecně se nazývají „autoinduktory“ (*autoinducers* – AI). Jedna z jejich funkcí je informovat buňku o hustotě populace, v závislosti na této informaci jsou následně ovlivněny určité buněčné regulační procesy. Bakteriální buňka AI produkuje, exportuje do okolního prostředí a zároveň vnímá jeho celkovou koncentraci. AI mohou být difusní, to znamená, že procházejí buněčnou membránou a následně interagují s transkripčními faktory. Nebo jsou odkázané na trans membránové přenašeče, předávající signál dále po směru informačního toku. Charakteristické AI pro gram negativní bakterie jsou molekuly typu acyl-homoserin lakton, volně difundující cytoplasmatickou membránou. Pro gram pozitivní bakterií je typické použití modifikovaných oligopeptidů, které pro přechod cytoplasmatickou membránou potřebují specifické trans membránové přenašeče. Dále existuje malá molekula zvaná AI-2 (*autoinducer* – 2, *diester*

furanozyl borátu), kterou pravděpodobně používají všechny bakterie, je totiž určená pro mezidruhovou komunikaci. Slouží jako univerzální jazyk ve „světě bakterií“, což opět zdůrazňuje výskyt složitých sociálních interakcí, nejen mezi bakteriemi stejného druhu, ale také mezi různými bakteriálními druhy (Li a Tian 2012).

2.2 Role mechanismu *quorum sensing* v životě bakterií

Quorum sensing se aktivně podílí na regulaci tvorby biofilmu, expresi virulencních faktorů, již zmíněné bioluminiscenci a dalších procesů ovlivňujících jak samotnou bakteriální buňku, tak především chování celé dílčí populace.

Moderní přístup ke studiu mechanismů *quorum sensing* přestává zdůrazňovat jejich funkci jako zprostředkovatele informace o hustotě populace. Zabývá se možností získání širšího spektra informací o vlastnostech vnějšího prostředí, které buňka obdrží díky těmto signalizačním mechanismům (Li a Tian 2012).

Na příklad termín *diffusion sensing*, popisuje schopnost bakterie analyzovat propustnost a tok média, ve kterém se vyskytuje. Tuto informaci buňka obdrží na základě koncentraci AI ve vnějším prostředí. Pokud je propustnost a tok média vysoký, detekce AI bude slabá a naopak. Takto bakterie získá důležitou informaci, kterou využije při sekreci různých extracelulárních proteinů (proteázy, sekundární metabolity), jejichž účinnost je závislá na konkrétních vlastnostech vnějšího prostředí. Dále buňka získá informaci o struktuře svého okolí, kdy na příklad pevná překážka může způsobit akumulaci AI. Následně může dojít k pozitivní regulaci exprese genů kódujících pohybový aparát buňky (Redfield 2002).

Moderní medicína se zabývá otázkou interference (*quenching* = uhašení). Zkoumá molekuly zabraňující bakteriím v komunikaci, s cílem omezit tvorbu biofilmů a zabránit exprese virulencních faktorů (Li a Tian 2012).

Mechanismus *quorum sensing* poskytuje bakteriím možnost přizpůsobit se změnám vnějšího prostředí, dokonce tyto změny také částečně předvídat (van Gestel et al. 2012). Aktuální poznatky na toto téma prokazují propojení s vnitrobuněčnými signalizačními dráhami. Důležité je regulační propojení se signalizací prostřednictvím c-di-GMP, které popíšu v následujících kapitolách. Dále byla prokázána propojení signalizací v rámci mechanismu *quorum sensing* se stresovou odpovědí reagující na hladovění bakteriální buňky (*starvation-sensing pathways*), která směřuje buněčný cyklus do stacionární fáze. To je často doprovázeno vysokou hustotou populace. U nesporulujících bakterií (*Escherichia coli*) se přechod do stacionární fáze projevuje zvýšením odolnosti vůči různým typům

stresu z prostředí, například vysoká osmolarita, oxidativní agens a vysoká teplota (Ishihama, 1997; cit. dle Lazazzera 2000). U sporulujících bakterií, jako je například *Bacillus subtilis*, je indukována tvorba resistantní spory. Tyto změny jsou ovlivněny informacemi o hustotě populace zprostředkované mechanismem *quorum sensing*, vlastní regulace převážně na transkripční úrovni je následně zajištěna specifickými transkripčními faktory (Lazazzera, 2000).

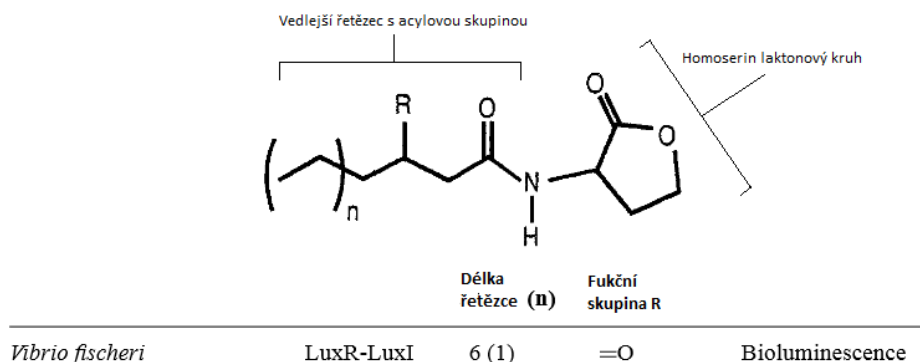
Pro demonstraci role malých signálních molekul v mezibuněčné komunikaci zprostředkované mechanismy *quorum sensing* popíšu příklady konkrétních signalizačních drah u zástupce gram pozitivních a gram negativních bakterií. Zároveň zdůrazním, jak AI ovlivňují stresovou odpověď sporulující bakterie *B. subtilis*.

2.3 *Quorum sensing* u Gram negativních bakterií

Jeden ze specifických typů AI, které používají tyto bakterie, souhrnně označujeme jako Acyl-homoserin lakton. Pro demonstraci použití těchto malých molekul a také jako modelový příklad pro mezibuněčnou komunikaci u gram negativních bakterií uvedu signální kaskádu vedoucí k iniciaci bioluminiscence u *V. fischeri*.

2.3.1 Malé signální molekuly u gram negativních bakterií – acyl homoserin laktony

Všechny malé signální molekuly tohoto typu sdílí identický homoserin laktonový kruh. Rozdíly jsou však ve struktuře vedlejšího řetězce s acylovou skupinou, ten se může lišit délkou, stupněm substituce na R řetězci a saturací. Toto uspořádání lze názorně vidět na **Obrázku 1**, jehož součástí jsou specifika variabilních prvků AHL u bakterie *V. fischeri*, který figuruje v tzv. LuxRI dráze regulující bioluminiscenci.

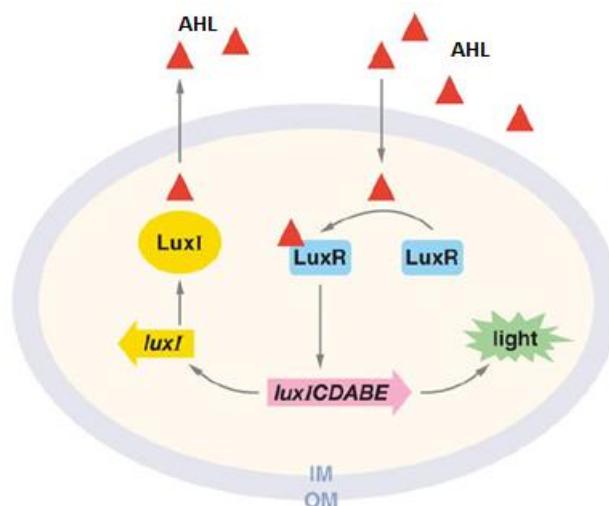


Obrázek 1: Struktura AHL, převzato a upraveno z (Fuqua, Greenberg, 2002)

Jedna z unikátních vlastností AHL je, že jsou amfipatické. Laktonový prsteneček je spíše hydrofilní, kdežto vedlejší řetězec s acylovou skupinou je hydrofobní. To má za následek schopnost AHL procházet cytoplasmatickou membránou. Celková délka a chemická modifikace acylového řetězce poskytuje vysokou specificitu mechanismu *quorum sensing* v rámci odlišných druhů bakterií, anebo při výskytu více typů signalizačních drah v rámci jedné bakteriální buňky. Specifické struktury jsou vyžadovány zejména při interakcích AHL s receptorovými proteiny, což je velice důležité pro správné fungování celé signalizační dráhy (Fuqua a Greenberg 2002)

2.3.2 *Vibrio fischeri* – dráha LuxI-LuxR, iniciace bioluminiscence

Jakožto malá signální molekula zde vystupuje specifická varianta AHL – *N*-(3-oxohexanoyl)-homoserin lakton (viz. **Obrázek 1**). Ústřední proteiny signalizační kaskády jsou pojmenovány LuxI a LuxR. Jejich alternativy pozorujeme u různých, gram negativních bakteriálních druhů. LuxI je enzym syntetizující AHL. Zatímco LuxR je cytoplasmatický receptor AHL, s DNA vazebnou doménou, který funguje také jako transkripční faktor (Engebrecht et al. 1983). Ústřední roli v této signalizační dráze má operon *lux* (*luxICDAB*). Ten obsahuje geny



Obrázek 2: Quorum sensing u *V. fischeri*, vysvětlení viz text, převzato z (Waters, Bassler 2005).

kódující důležité proteiny účastníci se bioluminiscenční reakce, včetně enzymu luciferázy (*luxCDAB*). Také obsahuje gen *luxI* kódující protein LuxI. Čím je hustota populace vyšší, tím je větší koncentrace AHL ve vnějším prostředí. Po překročení prahové hodnoty, AHL difundující cytoplasmatickou membránou asociuje s receptorovým proteinem LuxR. Ten aktivuje transkripci operonu *lux*, který je exprimován a výsledkem je bioluminiscenční reakce produkující světlo. V rámci této kanonické signalizace existuje příklad typické pozitivní zpětné vazby. Součástí luciferázového operonu je také gen kódující protein LuxI, jak jsem již zmínil výše. Tudíž při expresi operonu *lux* dochází k syntéze syntetázy AHL - LuxI, což znamená další zvýšení produkce AHL a následné zaplavení vnějšího prostředí touto signální molekulou. To zajišťuje rozšíření informace o iniciaci bioluminiscence skrz celou populaci bakterií (Waters a Bassler 2005). Celý proces názorně demonstruje **Obrázek 2**.

2.4 Quorum sensing u gram pozitivních bakterií

V rámci různých druhů mechanismu *quorum sensing* u gram pozitivních bakterií je typické využití modifikovaných oligopeptidů jakožto AI. Jako příklad uvedu poměrně komplikovanou signalizační dráhu regulující změnu bakteriálních buněk *B. subtilis* na buňky kompetentní.

2.4.1 Malé signální molekuly u gram pozitivních bakterií - modifikované oligopeptidy

Struktura a vlastnosti tohoto typu AI se výrazně liší od předchozí skupiny. Modifikované oligopeptidy nejsou schopny volné difúze přes membránu. Dvou komponentové, na membránu vázané, sensorové histidin kinázy slouží jako receptory pro jejich detekci. Vnitrobuněčný přenos signálu je zprostředkován kaskádou fosforylací, která ve výsledku ovlivní funkci transkripčního faktoru regulujícího aktivitu určité skupiny genů. V rámci tohoto systému je rovněž vysoká druhová specifita signálu, kdy každý druh bakterie používá jiný typ AI a receptor na něj dokonale přizpůsobený. Délka primární sekvence oligopeptidu je většinou v rozsahu 5 – 17 aminokyselin. Na **Obrázku 3** je struktura modifikovaného peptidu ComX, který figuruje v signalizační dráze u bakterie *B. subtilis*. Tryptofan je zde modifikován isoprenylovou skupinou (Camilli a Bassler 2006).



Obrázek 3: Modifikovaný oligopeptid ComX bakterie *B. subtilis*, převzato z (Okada et al. 2005)

2.4.2 *Bacillus subtilis* – navození stavu přirozené kompetence

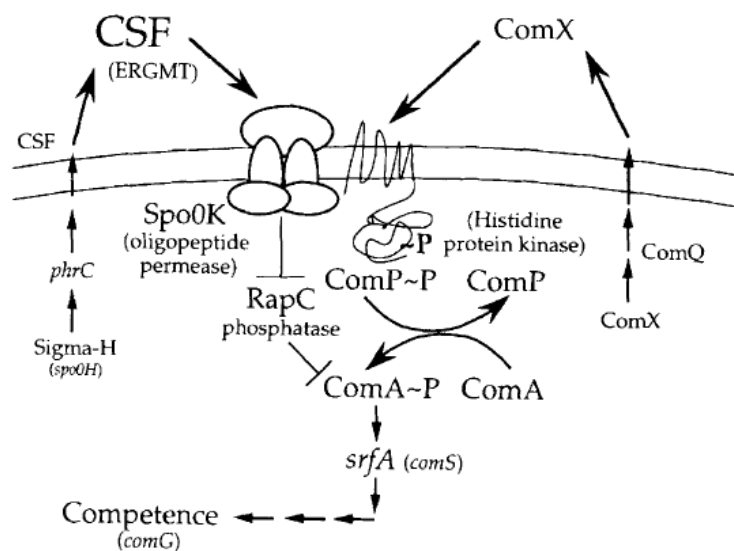
U modelové gram pozitivní bakterie *B. subtilis* je prokázána signalizace pomocí 2 AI ze skupiny modifikovaných oligopeptidů – ComX (viz. **Obrázek 3**) a CSF (*competence and sporulating factor*). Pomocí těchto molekul a jimi indukovaných signálních kaskád, bakterie reguluje expresi mnoha genů, což vyústí mimo jiné ve vývoj přirozené kompetence. Obě tyto regulační dráhy ovlivňují fosforylační stav ústředního transkripčního faktoru ComA, který reguluje příslušnou skupinu genů.

Molekula ComX slouží převážně pro detekci populační hustoty bakterií. S rostoucí hustotou populace se zvyšuje její koncentrace v médiu, při dosažení prahové hodnoty se váže na protein kinázu ComP. Ta předá fosfát na ComA, což vyústí v pozitivní regulaci exprese genů nutných k indukci kompetence.

Druhá signální dráha využívající malou signální molekulu CSF má komplikovanější průběh. V závislosti na její intracelulární koncentraci reguluje minimálně dva různé proteiny. Při nízké koncentraci stimuluje aktivitu ComA inhibicí fosfatázy RapC. Ve vyšších koncentracích CSF interaguje nejspíše s proteinem ComP, tím zamezí fosforylaci ComA a inhibuje expresi příslušných genů (Solomon et al. 1996). Na **Obrázku 4** jsou obě signální dráhy znázorněny, zkratky AI a proteinů korespondují s textem.

Jedna z hypotéz předpokládá, že produkce CSF je regulována hladověním. Podložena je faktem, že jeden z promotorů genu kódujícího tuto malou molekulu je kontrolován sigma faktorem σ^H , jehož exprese je stimulována hladověním a v maximální koncentraci je tento sigma faktor přítomen během přechodu bakterie do stacionární fáze (Healy, 1991; cit. dle Lazazzera 2000). To dokazuje, že hladovění a přechod do stacionární fáze zvyšuje produkci CSF. Za těchto podmínek je pozitivně regulovaná odpověď kvora i při nízké buněčné hustotě. CSF je tedy nejen detektor hustoty populace ale také indikátor hladovění. Proto se předpokládá, že skupina genů, pozitivně regulovaných signalizací prostřednictvím CSF,

musí obsahovat geny kódující enzymy využitelné i při nízké populační hustotě. Za těchto podmínek byla prokázána exprese proteinů zasahujících do využití alternativních zdrojů uhlíku a manifestace změn na buněčném povrchu. Zároveň se předpokládá, že tyto geny hrají roli při přechodu do stacionární fáze. Signalizace pomocí CSF informuje buňku o růstovém potenciálu prostředí, monitoruje hustotu populace a souběžně vnímá signály hladovění (Lazazzera 2000).



Obrázek 4: Quorum sensing u *B. subtilis* převzato z (Solomon et al. 1996).

Recentní studie dokládá vliv mechanismu *quorum sensing* na aktivitu transkripčního faktoru Spo0A, který je zodpovědný za iniciaci sporulace. V této práci je prokázáno, že pokud buňka dokáže odhadnout množství živin v jejím okolí, signalizací prostřednictvím AI může na základě této informace „vypočítat“ množství živin na jednu buňku. Díky tomu je schopna udělat jistá adaptivní rozhodnutí, například určit kdy začít sporulovat (van Gestel et al. 2012).

3 Modifikované nukleotidy jako malé efektorové molekuly

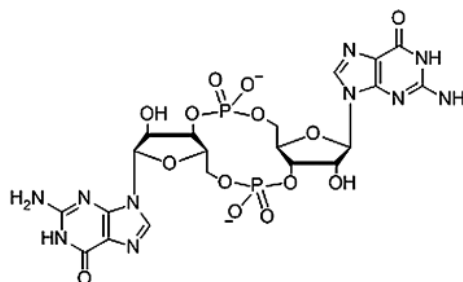
Základní stavební kameny těchto molekul jsou nukleotidy, které podléhají různým úpravám. Může se jednat o cyklizaci molekuly nukleotidtrifosfátu (např. cAMP), dále cyklizaci dvou molekul nukleotid trifosfátu/difosfátu (např. c-di-GMP), nebo přidání zbytků kyseliny fosforečné k molekule nukleotid trifosfátu/difosfátu (např. (p)ppGpp). Jakožto součást signalizační transdukční kaskády, modifikované nukleotidy zprostředkují přenos signálů informující o změně vnějšího prostředí a následně regulují mechanismy umožňující buňce přizpůsobit se na tyto změny. Působení modifikovaných nukleotidů je ovlivněno jejich vlastní koncentrací, která se mění v závislosti na aktivitě enzymů účastnících se jejich metabolismu. Výsledný efekt těchto signalizací je například tvorba biofilmu, exprese virulenčních faktorů, a další důležité změny v životní strategii bakteriální buňky či celé bakteriální populace. Studium těchto malých efektorových molekul průběžně rozšiřuje jejich počet, odhaluje nová pole působení a také další možnosti propojení signalizací.

V souvislosti s modifikovanými nukleotidy jako malými efektorovými molekulami se často používá pojem „*second messengers*“ (druzí poslové). Zde se však omezím na použití tohoto pojmu pouze u efektorových molekul cAMP a cGMP jakožto klasických zástupců skupiny *second messengers*, které přenášejí signál z receptorových proteinů na membráně do cílových molekul uvnitř buňky. U ostatních modifikovaných nukleotidů by použití tohoto pojmu mohlo být zavádějící, jelikož často fungují na principu různých mechanismů přenosu signálu.

V této práci popíšu dva modelové příklady těchto malých efektorových molekul (c-di-GMP a (p)ppGpp), jejich metabolismus a mechanismy signalizací. Ostatním malým efektorovým molekulám z této kategorie se budu věnovat méně podrobně, ať už z důvodů nedostatku dostupných informací (c-di-AMP, cGMP), nebo kvůli omezenému rozsahu práce (cAMP). Současně zdůrazním možnosti propojení vnitrobuněčných signalizací modifikovanými nukleotidy s mezibuněčnou komunikací zprostředkovanou mechanismy *quorum sensing* a uvedu konkrétní příklady.

3.1 Signalizace prostřednictvím cyklického dinukleotidu – c-di-GMP

Regulační funkce této malé molekuly byla poprvé pozorována roku 1987 u bakterie *Gluconacetobacter xylinus*. Při zkoumání dráhy syntézy celulózy měla význam jako pozitivní alosterický aktivátor enzymu syntázy celulózy. Tehdy byla tato molekula popsána jako „neobvyklý cyklický nukleotid“ (Ross et al. 1987). Dnes je již známo, že c-di-GMP v bakteriální buňce plní nezastupitelnou funkci malé efektorové molekuly v řadě signálních drah a regulačních procesů. Má důležitou úlohu při změně životní strategie bakterie – mobilní versus sesilní forma života. Ovlivňuje expresi genů zajišťujících tvorbu biofilmů, bičičků, faktorů virulence, stresové odpovědi a dalších. Nejnovější studie prokazují propojení signalizace prostřednictvím c-di-GMP s mechanismy signálních drah *quorum sensing*.



Obrázek 5: Struktura c-di-GMP, převzato z (Kalia et al. 2013)

3.1.1 Metabolismus c-di-GMP

Jak jsem již zmínil výše, u signalizačních drah, které používají modifikované nukleotidy, záleží v prvé řadě na koncentraci těchto molekul. Syntézu c-di-GMP katalyzují enzymy s diguanylát cyklázovou aktivitou. Zatímco degradační reakci katalyzují enzymy s fosfodiesterázovou aktivitou. Tyto proteiny se vyskytují u gram pozitivních i gram negativních bakterií. Ovlivnění funkce těchto dvou enzymatických aktivit způsobuje změny v koncentraci c-di-GMP a další přenos signálu. Po charakterizaci obecných principů v metabolismu c-di-GMP budou následovat kapitoly popisující fungování signalizace prostřednictvím této malé efektorové molekuly u konkrétních bakterií.

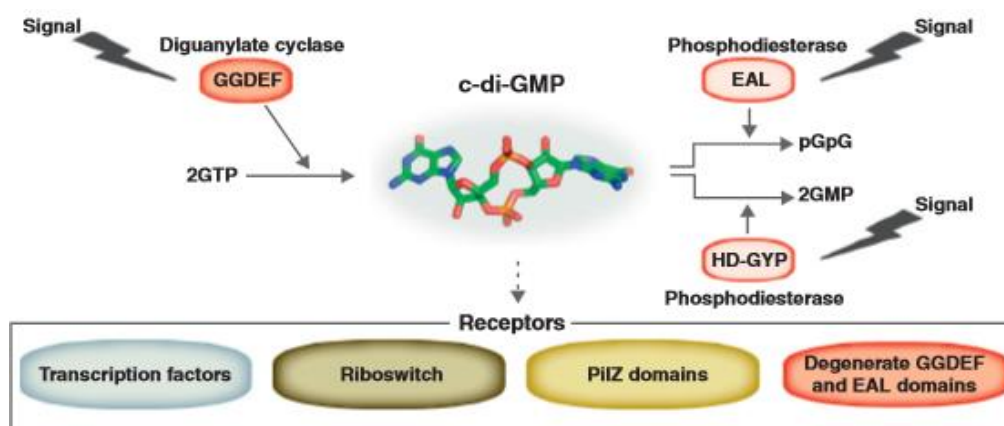
3.1.1.1 Syntéza c-di-GMP: Diguanylát cyklázy (DGC)

Dvě molekuly GTP reagují na c-di-GMP za katalýzy enzymem diguanylát cyklázou (DGC), jde o protein skládající se přibližně ze 170 AMK, s konzervovanými motivy v aktivním místě enzymu (*A-site*): GGDEF (Gly – Gly – Asp – Glu – Phe), nebo GGEEF (Gly – Gly – Glu – Glu – Phe). DGC většinou navíc obsahují tzv. inhibiční místo (*I-site*), sloužící k alosterické inhibici syntézy c-di-GMP, což umožňuje kontrolu nadměrné spotřeby GTP a zároveň omezuje produkci cyklického nukleotidu.

Inhibiční místo obsahuje motiv „*argininových prstů*“: RxxxR (Arg-x-x-x-Arg), kde „x“ znamená jakoukoli AMK. Díky tomuto motivu dochází k vazbě molekuly c-di-GMP (Kalia et al. 2013).

3.1.1.2 Degradace c-di-GMP: Fosfodiesterázy (PDE)

Degradaci c-di-GMP katalyzuje enzym fosfodiesteráza (PDE), ta štěpí esterové vazby cyklického dinukleotidu. Tento enzym je tvořen přibližně 250 AMK se dvěma druhy konzervovaných motivů v aktivním místě (*A-site*): EAL (Glu, Ala, Leu) a HD-GYP (His, Asp – Gly, Tyr, Pro).



Obrázek 6: Metabolismus c-di-GMP a efektorové proteiny ("receptors") převzato z (Sondermann et al. 2012)

Produkt degradace c-di-GMP se liší v závislosti na konzervovaném motivu PDE, proteiny s motivem EAL degradují cyklický nukleotid nejprve na pGpG a následně na GMP, zatímco proteiny s motivem HD-GYP jej štěpí za vzniku 2 molekul GMP, bez meziprojektu (Ross et al. 1987). Tyto reakce shrnuje schéma na horní polovině **Obrázku 6**. Mechanismus hydrolýzy fosfodiesterové vazby, katalyzovaný PDE doposud nebyl objasněn (Kalia et al. 2013)

3.1.1.3 Další funkce proteinů metabolismu c-di-GMP

Bakterie většinou syntetizují několik druhů těchto enzymů, dokonce existují proteinové komplexy s PDE a zároveň DGC aktivitou. Většinou jsou to trans membránové, nebo s membránou asociované proteiny. Výše zmíněné konzervované motivy v aktivních místech enzymů jsou společné pro všechny PDE a DGC nejen v bakteriální buňce ale zároveň u různých druhů gram pozitivních a gram negativních bakterií. Jednotlivé proteiny s aktivitou PDE a DGC se však liší senzoricými

doménami na N konci, které odpovídají na specifické podněty z prostředí (Srivastava a Waters 2012). Tyto senzorké domény často obsahují dobře známé regulační motivy, jako například REC doména (*phosphorylation reciever domain*), PAS domény (*oxygen/redox potential/light sensor domain*) reagující na změny v koncentraci kyslíku, redoxním potenciálu a intenzitě světelného záření. Aktivací, nebo inhibicí PDE a DGC aktivity těchto enzymů, v důsledku změn registrovaných senzorkými doménami, je ovlivněna distribuce a množství c-di-GMP v buňce (Kalia et al. 2013). Na změny jeho koncentrace v rámci konkrétní signální dráhy reagují efektorové proteiny a riboswitch RNA, které posléze regulují expresi určitého fenotypu na různých úrovních (zobrazeno na spodní části **Obrázku 6**). Cílem je integrování signálů z vnějšího prostředí, tak aby bakterie správně reagovala na měnící se podmínky (Srivastava a Waters 2012).

Otázkou zůstává, jak jsou jednotlivé komponenty signalizace využívající c-di-GMP v rámci buňky uspořádány, aby bylo docíleno přenosu konkrétního signálu. Byly navrženy různé typy dočasného odloučení (sequestration) PDE/DGC enzymů, tvoření mikrokompartmentů a kolokalizace enzymů v rámci konkrétních signalizačních drah (Pesavento a Hengge 2009).

3.1.2 Efektorové proteiny v c-di-GMP zprostředkované signalizaci

Jedna z hlavních skupin efektorových proteinů jsou degenerované proteiny DGC a PDE s motivy GGDEF, respektive EAL. Jsou katalyticky inaktivní, ale zachovaly si schopnost vázat c-di-GMP, což je v případě proteinů s DGC aktivitou způsobeno zachováním inhibičního místa (*I – site*). Další jejich vlastností, kterou si tyto degenerované proteiny zachovaly, je možnost tvořit oligomery (Sondermann et al. 2012). Asociace c-di-GMP s degenerovanými DGC, nebo PDE způsobí konformační změny umožňující protein – proteinové interakce, nebo modifikace těchto proteinů (fosforylace, štěpení, atd...), což umožní předání signálu.

Další skupinou efektorových proteinů jsou transkripční faktory, regulující transkripci genů důležitých pro specifickou odpověď na změny v prostředí, které jsou integrovány signalizací prostřednictvím c-di-GMP. Cyklický nukleotid v tomto případě asociuje s konkrétním transkripčním faktorem a modifikuje jeho aktivitu (Hickman a Harwood 2008).

Na post-translační úrovni účinkují proteiny, které obsahují tzv. PilZ domény. Protein PilZ, od kterého se tato skupina efektorových proteinů odvozuje, byl objeven u bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, kde reguluje formaci pili a zahájení procesu „*twitching motility*“ (Alm et al. 1996). Tyto proteiny nemají vlastní katalytickou aktivitu, přenos signálu tudíž probíhá přes protein-proteinové interakce. Například mohou ovlivňovat aktivitu proteinů figurujících v metabolismu c-di-GMP (PDE, DGC) (Kalia et al. 2013). Společným znakem všech PilZ domén je několik N-koncových smyček –

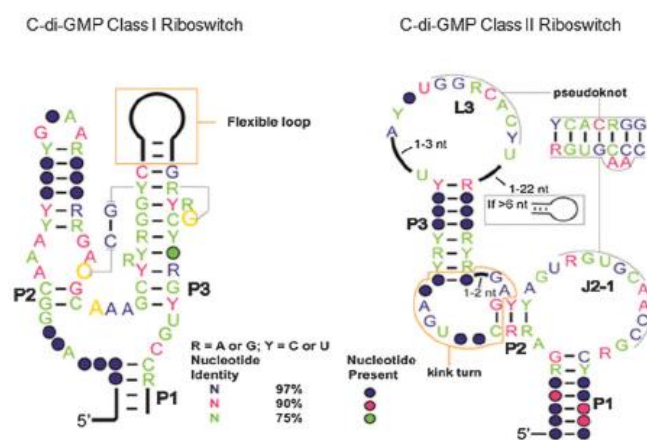
„*c-di-GMP switch*“ – které podléhají konformačním změnám při vazbě *c-di-GMP*. Vazebné místo má konzervovaný motiv tzv. „*argininových prstů*“ vyskytující se rovněž u inhibičního místa DGC: RxxxR (Arg-x-x-x-Arg) (Habazettl et al. 2011).

3.1.3 Efektorové riboswitch RNA vázající *c-di-GMP* jako ligand

Poslední z doposud objevených efektorů v rámci signalizačních drah používajících *c-di-GMP* jsou tzv. riboswitch RNA. Jsou to nekódující úseky mRNA s charakteristickou sekundární strukturou, které selektivně váží metabolity a

regulují genovou expresi na úrovni transkripce, nebo translace (Mandal a Breaker 2004). Byly prokázány dva typy riboswitch RNA, vázající *c-di-GMP*, které se však liší sekundární strukturou (viz. **Obrázek 7**). Jsou kódovány společně s geny metabolismu *c-di-GMP*, nebo s

jinými geny, které podléhají regulaci tímto cyklickým dinukleotidem (Sudarsan et al. 2008).



Obrázek 7: Riboswitch RNA vázající *c-di-GMP* třídy I a II, převzato z (Kalia et al. 2013)

Běžný mechanismus regulace transkripce pomocí riboswitch RNA je založený na ovlivnění terminace transkripce. Navázání ligandu (*c-di-GMP*) většinou způsobí formaci sekundárních struktur rušících funkci terminátoru a tím pádem zamezují terminaci transkripce. Při regulaci na úrovni translace, je díky nově vzniklým sekundárním strukturám po navázání ligandu ovlivněna afinita k úseku RBS (*ribosom binding site*) se sekvencí Shine - Delgarno (SD) (Mandal a Breaker 2004).

3.1.4 Signalizace *c-di-GMP* u gram negativních bakterií – *Vibrio cholerae*

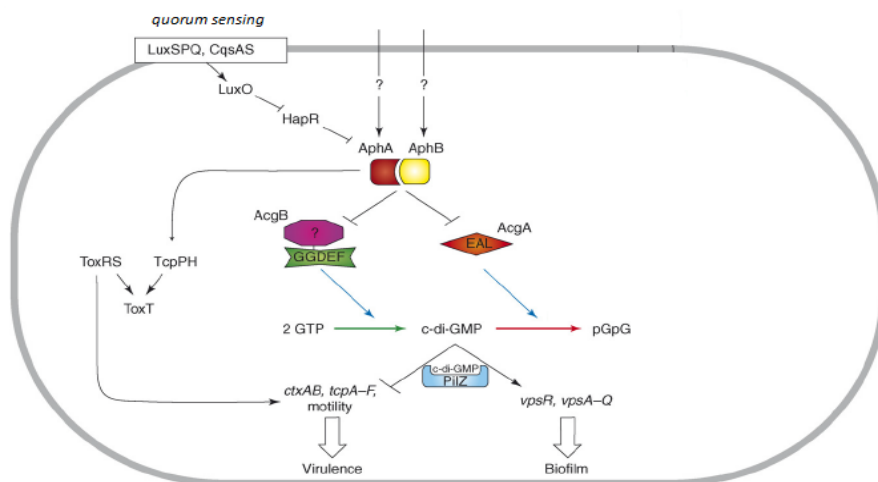
Vibrio cholerae mění životní formu v závislosti na prostředí, ve kterém se vyskytuje. Na povrchu zooplanktonu a fytoplanktonu ve vodním prostředí tvoří biofilmy, kdežto jakmile se dostane do střev svého hostitele (savce), mění se v planktonickou bakterii uplatňující spíše individuální formu života. Změny v morfologii a chování těchto bakterií byly pozorovány během kolonizace tlustého

střeva savců. Sekvence genomu *V. cholerae* prokázala přítomnost 61 proteinů ze skupiny PDA/DGC vyskytujících se u tohoto mikroorganismu.

Byly objeveny dva regulační systémy ovlivňující aktivitu nebo expresi proteinů PDA a DGC. Kromě regulace tvorby biofilmů ovlivňují také expresi virulenčních faktorů. V následujícím odstavci popíšu pouze jeden z těchto systémů, u něhož bylo prokázáno propojení se signálními mechanizmy *quorum sensing*, což lze vidět na **Obrázku 8**. Jako zdroj informací pro popis signalizace pomocí c-di-GMP u *V. cholerae* jsem zvolil článek, který doposud neuvádí komplexní propojení s mechanizmy *quorum sensing*. Těto problematice se budu věnovat v nadcházejících kapitolách. Cílem je zdůraznit vývoj názoru na tyto signální dráhy a jejich vzájemné propojení.

Ústřední efektorové proteiny této dráhy jsou transkripční faktory AphA a AphB. V tomto bodě hraje roli mechanismus *quorum sensing*, který reguluje expresi genu *aphA*, kódujícího protein AphA. Dle studie (Cotter a Stibitz 2007) AphA negativně reguluje aktivitu proteinů AcgA a AcgB, které mají domény GGDEF respektive EAL. Ty ovlivňují koncentraci c-di-GMP. Při vysoké koncentraci cyklického dinukleotidu se tato molekula váže na efektorový protein s PilZ doménou, který v tomto případě pozitivně reguluje tvorbu biofilmu a negativně expresi virulenčních faktorů. Schéma této signální dráhy je zobrazeno na **Obrázku 8**.

Jako vedlejší regulační mechanismus působí dráha kde interakcí AphA s AphB vznikne proteinový komplex s regulačními vlastnostmi aktivující expresi operonu *tcpPH*. Ten kóduje regulační systém TcpPH, který spolu s analogním regulačním systémem ToxRS regulují transkripční aktivátor ToxT. TcpPH a ToxRS jsou na membránu vázané transkripční regulátory. ToxT následně aktivuje transkripci genů kódujících pilus (*toxin co-regulated pilus tcpA-F*) a dále společně s ToxRS aktivují expresi genů kódujících cholera toxin (*ctxAB*). Tyto dvě dráhy regulují tvorbu biofilmu a expresi virulenčních faktorů. Pro sofistikovanější vysvětlení těchto regulací chybí inkorporace mechanismu *quorum sensing* (viz kapitola **3.1.6.1**). (Cotter a Stibitz 2007).



Obrázek 8: Signalizace pomocí c-di-GMP u *V. cholerae*, převzato z (Cotter, Stibitz 2007)

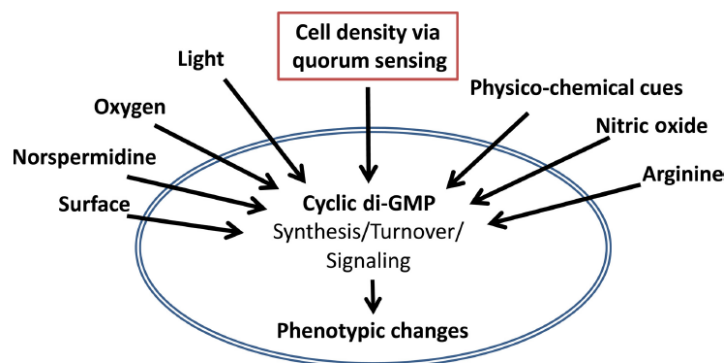
3.1.5 Signalizace pomocí c-di-GMP u gram pozitivních bakterií - *Bacillus subtilis*

I přes skutečnost, že většina studií c-di-GMP byla provedena na gram negativních bakteriích, prokázalo se, že *B. subtilis*, jakožto zástupce gram pozitivních bakterií využívá podobné signalizační dráhy založené na c-di-GMP. Bylo bioinformaticky předpovězeno, že *B. subtilis* produkuje 5 proteinů s motivem GGDEF, 2 proteiny s motivem EAL (např. YuxH) a 1 protein s oběma motivy. Byl prokázán jeden efektorový protein s doménou PilZ, pojmenovaný YpfA.

Protein s doménou EAL – YuxH společně s efektorovým proteinem YpfA ovlivňují motilitu. YpfA nejspíše váže a inhibuje aktivitu flagelárního proteinu MotA, kdežto YuxH pravděpodobně ovlivňuje tvorbu biofilmu. YuxH nemá regulační doménu a je regulován na úrovni svého genu, který je pod negativní kontrolou regulátoru sporulace Spo0A-P. Fosforylace Spo0A je regulována kaskádou fosforylací zprostředkovanou histidin kinázami a fosforylázami, které odpovídají na rozmanité podněty vnějšího prostředí. Tímto se opět přibližujeme k propojení extracelulární a intracelulární signalizace, které hraje důležitou roli při zpracování informací o změně vlastností prostředí a spouští příslušnou odpověď regulačních mechanismů (Chen et al. 2012).

3.1.6 Propojení signalizace zprostředkované c-di-GMP a mechanismu *quorum sensing*

Tyto dvě signalizační strategie, původně chápány jako samostatné, regulují stejné buněčné procesy. Jejich pole působení se překrývá například při tvorbě biofilmu a expresi virulencních faktorů. Proto existovaly domněnky a určité informace vedoucí k možnosti propojení těchto dvou typů signalizačních drah. První hypotézy navrhovaly ovlivnění exprese nebo aktivity enzymů syntetizujících AI prostřednictvím efektorových proteinů reagujících na změny v koncentraci c-di-GMP a tím následně ovlivnění celého procesu *quorum sensing* (Camilli a Bassler 2006).



Obrázek 9: Hustota populace, jako jeden z podnětů pro signalizaci pomocí c-di-GMP, převzato z (Srivastava, Waters 2012)

Recentní studie tyto hypotézy potvrzují a přicházejí s elegantním řešením propojení, které například u již zmíněného *V. cholerae* osvětluje průběh signalizace prostřednictvím c-di-GMP. Na **Obrázku 9** je znázorněna jedna z hypotéz, která nahlíží na *quorum sensing*, respektive informaci o hustotě bakteriální populace, jako na jeden z mnoha podnětů, které integrují signalizační dráhy používající molekulu c-di-GMP (Srivastava a Waters 2012).

V následujících kapitolách uvedu dva typy signalizačních drah vyskytující se u gram negativních bakterií. Tyto dráhy zpracovávají informaci o hustotě populace zprostředkovanou AI, a dále ji vyhodnocují použitím signalizace prostřednictvím c-di-GMP. Výsledkem je produkce sofistikované odpovědi na změny okolního prostředí. U gram pozitivních bakterií nejsou zatím prokázány žádné podobné signalizační dráhy. Ale vzhledem k tomu, že se u nich vyskytuje jak mechanismus *quorum sensing* tak efektorová molekula c-di-GMP, můžeme předpokládat brzké odhalení jejich propojení u konkrétních bakterií.

3.1.6.1 Nepřímé ovlivnění signalizace prostřednictvím c-di-GMP drahami *quorum sensing* - *Vibrio cholerae*

U *V. cholerae* podléhá exprese genů kódujících enzymy metabolismu c-di-GMP (PDE, DGC) regulaci mechanismem *quorum sensing*, neexistuje zde však přímá interakce mezi AI a těmito enzymy.

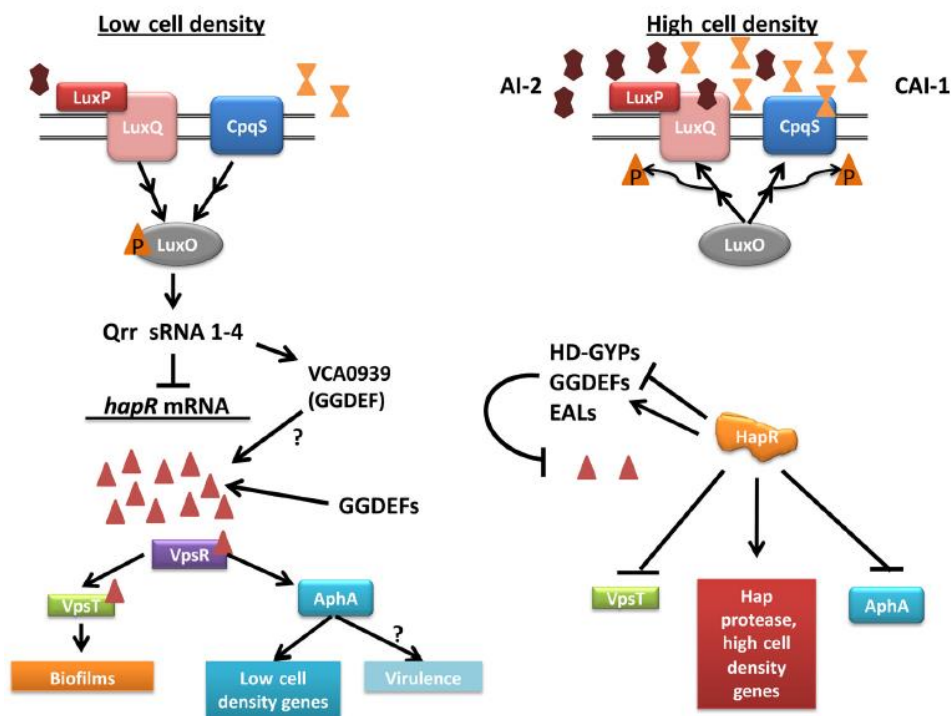
Signalizační kaskáda začíná monitorováním koncentrace 2 AI – AI-2 a CAI-1 (Higgins et al. 2007). K tomu slouží senzorové proteiny: LuxP, LuxQ a CpqS. Protein LuxP se vyskytuje v periplasmatickém prostoru a protein LuxQ je trans membránový protein, tyto dva reagují na přítomnost AI-2. Další trans membránový protein CpqS reaguje na výskyt CAI-1. Ústřední protein je regulátor LuxO jehož fosforylace/defosforylace udává průběh signalizace. Efektorový protein HapR, jakožto transkripční faktor genů vysoké hustoty populace, reguluje skupinu genů kódujících extracelulární proteázy a aktivaci kompetence (Tu a Bassler 2007). Další efektorový protein s funkcí transkripčního faktoru je již výše zmíněný AphA, tzv. hlavní regulátor genů nízké hustoty populace, aktivující mimo jiné expresi genů kódujících virulenční faktory (Rutherford et al. 2011). Další transkripční faktor: *vps* (*vibrio polysacharid*) – aktivuje expresi genů pro tvorbu biofilmu. Všechny tyto komponenty jsou společně s průběhem signalizace znázorněny na **Obrázku 10**.

Při nízké hustotě populace fungují receptory AI (LuxP/Q, CpsS) jako kinázy a fosforylují regulátor LuxO. Tím se aktivuje exprese malých *qrr* sRNA, které aktivně destabilizují mRNA transkripčního faktoru HapR a inhibují jeho syntézu. Mimo jiné *qrr* sRNA aktivují expresi proteinu VCA0939 (s motivem GGDEF) fungující jako DGC, a syntetizující c-di-GMP. Transkripční faktor

VpsR váže c-di-GMP při jeho vysoké koncentraci a aktivuje expresi dalšího transkripčního faktoru vázajícího c-di-GMP – VpsT, který aktivuje expresi vps, respektive tvorbu biofilmu. VpsR také aktivuje expresi AphA aktivující expresi ostatních genů kódujících proteiny potřebné při nízké hustotě populace.

Při vysoké hustotě populace receptory vázající AI vykazují fosfatázovou aktivitu, defosforylují LuxO a tím zamezí expresi qrr sRNA. Transkripční faktor HapR je aktivní a pozitivně reguluje expresi genů a dalších PDE a DGC. Rovněž inhibuje aktivitu transkripčního faktoru AphA a VpsR. Nízká koncentrace c-di-GMP inhibuje tvorbu biofilmu, což je odůvodněno nutností expanze buněk a kolonizací přilehlého okolí za účelem snížení populační hustoty (Srivastava et al. 2011).

Tato dráha je jedna z mnoha, které se ve *V. cholerae* vyskytují. Integrace mechanismů *quorum sensing* do této konkrétní signalizace prostřednictvím c-di-GMP vedla k vytvoření uceleného názoru o propojení těchto signalizačních drah. A vedla k upřesnění nejasností o regulaci tvorby biofilmu a expresi virulenčních faktorů u této bakterie (Srivastava a Waters 2012).

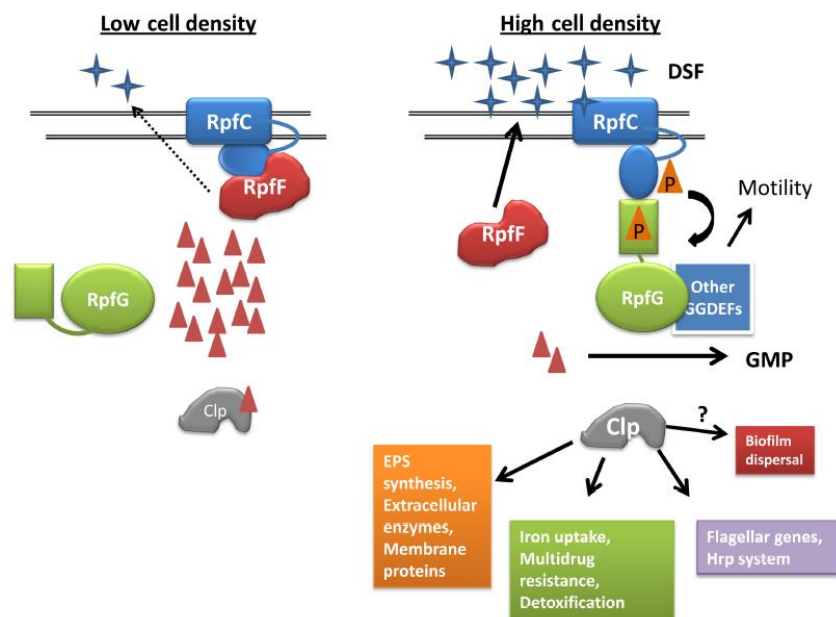


Obrázek 10: Propojení QS a signalizace pomocí c-di-GMP u *V. cholerae*, převzato z (Srivastava, Waters 2012)

3.1.6.2 Přímé ovlivnění metabolismu c-di-GMP působením AI – *Xanthomonas campestris*

U této gram negativní bakterie dochází k přímému ovlivnění aktivity enzymu PDE působením AI v rámci mechanismu *quorum sensing*, které vede ke snížení koncentrace c-di-GMP v konkrétní signální dráze. Důležitou komponentou této kaskády je AI DSF (*Difusible signal faktor*), který stojí na samém počátku signalizace (Wang et al. 2004). Jeho syntézu zajišťuje syntetáza RpfF. Další článkem je trans membránová sensorová kináza RpfC. Enzym s PDE aktivitou je pojmenován RpfG (motiv HD-GYP) (Slater et al. 2000). Efektorový protein ve formě transkripčního faktoru zastupuje protein Clp, který má 2 vazebné domény, jednu pro vazbu na DNA a druhou vázající c-di-GMP. Vazba c-di-GMP na Clp inhibuje jeho schopnost vazby DNA a tudíž aktivitu Clp jako transkripčního aktivátoru skupiny genů kódujících virulenční faktory, extracelulární enzymy a proteiny pohybového aparátu. Clp je homologický proteinu CAP (cAMP aktivátor protein).

Při nízké hustotě bakteriální populace je malá koncentrace DSF v extracelulární matrix. To způsobí asociaci proteinů RpfC a RpfF. Tímto dále klesá produkce DSF, jelikož jeho syntetáza RpfF je vazbou na trans membránový protein RpfC inaktivována. Receptorová doména PDE proteinu RpfG „REC“ je defosforylována a tudíž je tento protein inaktivní, není schopen katalyzovat reakci štěpení esterové vazby u c-di-GMP, jehož koncentrace je tudíž vysoká (He et al. 2006). Malá efektorová molekula c-di-GMP má v tomto případě inhibiční funkci, váže se na transkripční faktor Clp a tím omezí jeho schopnost vázat se na DNA, respektive aktivovat transkripci genů (Tao et al. 2010).



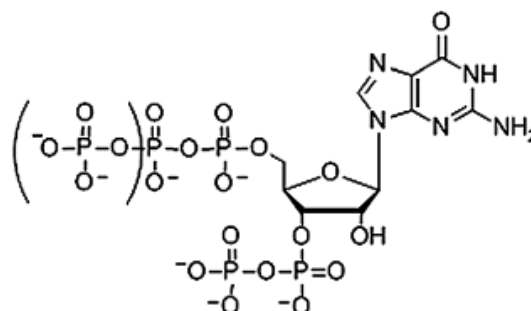
Obrázek 11: Propojení QS a signalizace pomocí c-di-GMP u *X. campestris*, převzato z (Srivastava, Waters 2012)

Při vysoké hustotě populace *X. campestris* se zvýší koncentrace DSF. Tato malá signální molekula se váže na protein RpfC, který zahájí fosforylační kaskádu sloužící k přenosu signálu (He et al. 2006). To způsobí disociaci RpfF a jeho aktivaci, respektive produkci DSF. Fosforylační kaskáda pokračuje z proteinu RpfC na REC doménu proteinu RpfG, aktivuje její PDE aktivitu a spustí degradační reakci c-di-GMP (He et al. 2006). Následně se snižuje koncentrace c-di-GMP, které se při nízké koncentraci neváže na Clp, ten tím pádem váže DNA a pozitivně reguluje expresi příslušné skupiny genů (Tao et al. 2010). Průběh této signalizační dráhy je znázorněn na **Obrázku 11**.

Ústřední enzymový tandem této signalizační kaskády RpfG/RpfC je 1 z 38 prokázaných proteinů s PDE/DGC aktivitou u *X. campestris* (Galperin 2004). Proto se odhaduje široký záběr primárních podnětů, na které bakterie tímto způsobem může reagovat, jelikož se u těchto proteinů předpokládá výskyt různých senzoričkových domén (Srivastava a Waters 2012).

3.2 Modifikovaný nukleotid (p)ppGpp – signalizace hladovění

Další vlastností prostředí, kterou bakterie vnímá a vyhodnocuje je množství živin v médiu. Při snížení koncentrace AMK, nebo zdrojů uhlíku bakteriální buňka začne hladovět, prožívá nutriční stres. Jako odpověď na tento druh stresu si bakterie vyvinuly komplexní regulační dráhu, tzv. stringentní odpověď. Většinou je zahájena na začátku stacionární fáze a jejím důsledkem je regulace exprese mnoha genů způsobujících zvýšenou odolnost vůči stresům z prostředí. Během stringentní odpovědi dochází ke změnám ve fenotypu skrze produkci více než 50 unikátních proteinů (Kim a Gadd 2008).

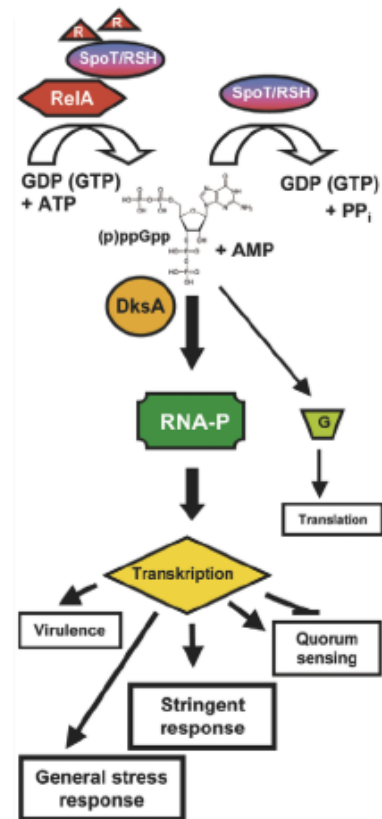


Obrázek 12: Struktura (p)ppGpp, převzato z (Kalia et al. 2013)

Jeden z typických znaků stringentní odpovědi je produkce malé efektorové molekuly *guanosin 3'-difosfát, 5'-trifosfátu* (pppGpp) z které je následně syntetizován *guanosin 3',5'-bispyrofosfát* (ppGpp). Tyto efektorové molekuly mají důležitou úlohu při signalizačních kaskádách v rámci stringentní odpovědi (označení „(p)ppGpp“ se používá pro obě molekuly, struktura viz **Obrázek 12**). Použitím (p)ppGpp je buňka schopná okamžitě reagovat na změny v prostředí, regulovat rychlost růstu a tím si zvýšit šance na přežití. Tato malá efektorová molekula byla objevena před více než 40-ti lety u bakterie *E. coli* jakožto inhibitor produkce a akumulace RNA v buňce, právě při hladovění na AMK (Cashel a Kalbacher 1970).

3.2.1 Metabolismus (p)ppGpp

V genomu všech osekvenovaných eubakterií se vyskytuje jedna nebo více variant genů *rsh* (homolog Rel/Spo). Tyto geny kódují proteiny RSH, zajišťující metabolismus (p)ppGpp. Nejvíce prostudované enzymy spadající do proteinů RSH jsou RelA a SpoT nacházející se primárně u *E. coli* a u různých β a γ proteobakterií. U většiny ostatních bakterií byl prokázán jeden RSH protein – Rel (ten je charakterizován druhovým jménem bakterie, u které se vyskytuje). C-terminální doména těchto proteinů má katalytickou funkci – hydrolytickou a syntetickou. Konkrétní proteiny RSH u různých bakteriálních druhů vykazují jednu z těchto katalytických funkcí, eventuálně obě dvě zároveň (Xiao et al. 1991). Regulace rovnováhy mezi těmito dvěma katalytickými funkcemi je esenciální pro správné fungování celé signalizační kaskády (Potrykus a Cashel 2008a). Syntéza (p)ppGpp probíhá z GDP (GTP) a ATP, hydrolyzou vznikají GDP (GTP) a PP_i (viz **Obrázek 13**, horní část)



Obrázek 13: Signalizace prostřednictvím (p)ppGpp, převzato z (Pesavento, Hengge 2009)

3.2.2 Funkce (p)ppGpp v bakteriální buňce

Tato malá efektorová molekula přispívá k regulaci mnoha aspektů mikrobiální buněčné biologie, které jsou citlivé na změny v dostupnosti živin. V současné době bylo prokázáno, že ovlivňuje růst, adaptace na změny vlastností vnějšího prostředí, sekundární metabolismus, buněčné dělení. Dále zasahuje do procesů tvorby biofilmů, exprese genů pohybového aparátu, vývoje kompetence a virulence (viz **Obrázek 13**, spodní část). To v průběhu historie studia této molekuly vyvolalo změny ve vnímání pojmu stringentní odpovědi. Tento jev původně znamenal reakci bakterie na nedostatek AMK v médiu, spojenou s produkcí (p)ppGpp. Nyní se pojmem stringentní odpověď označuje jakýkoli vnější impuls vyvolávající produkci (p)ppGpp v buňce (Potrykus a Cashel 2008b).

Vzhledem k mnoha aspektům života bakteriální buňky, které tyto dráhy ovlivňují je pravděpodobné jejich propojení se signalizací prostřednictvím c-di-GMP, které doposud nebylo prokázáno (Pesavento a Hengge 2009). Propojení signalizačních drah molekuly (p)ppGpp a mechanismu *quorum sensing* začíná vystupovat na povrch. Spekuluje se o ovlivnění produkce AI v závislosti na množství (p)ppGpp v buňce (Kalia et al. 2013).

Malá efektorová molekula (p)ppGpp má 2 mechanismy účinku při regulaci transkripce genů kódujících rRNA. U gram negativních bakterií působí (p)ppGpp přímo – vazbou na RNAP, kdežto u gram pozitivních bakterií působí nepřímo – ovlivněním hladin iNTP (konkrétně ATP a GTP) (Krásný a Gourse 2004).

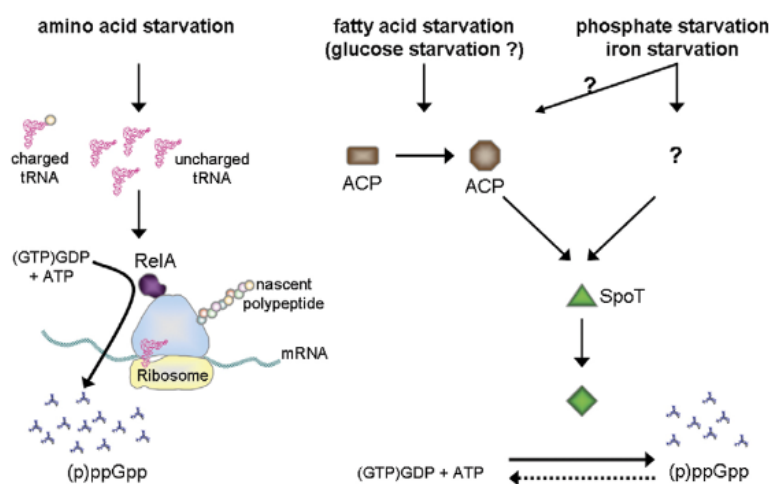
3.2.2.1 Signalizace nutričního stresu prostřednictvím (p)ppGpp u *Escherichia coli*

První konkrétní signalizační dráha zahrnující použití (p)ppGpp byla prokázána právě u této bakterie. Při nedostatku aminokyselin v médiu buňky *E. coli* okamžitě spustí stringentní odpověď. To se projeví mimo jiné snížením biosyntézy rRNA a celkově omezením produkce ribozomů.

3.2.2.1.1 Zahájení produkce (p)ppGpp - RelA a SpoT – závislé dráhy

V prvním případě se jedná o špatnou dostupnost aminokyselin v médiu. To způsobí, že se v buňce hromadí nenabitá tRNA (*uncharged tRNA*), které při asociaci s A místem ribozomu pozastaví translaci, která v tuto chvíli běží na „volnoběh“. Díky tomuto signálu je spuštěna syntéza (p)ppGpp, katalyzovaná enzymem RelA asociovaným s ribozomem (levá strana **Obrázku 14** – „*Amino acid starvation*“) (Srivatsan a Wang 2008).

Produkce (p)ppGpp může být indukovaná také dalšími stresovými faktory jako: nedostatek fosforu, železa, zdrojů uhlíku a mastných kyselin. Signál oznamující tyto nepříznivé podmínky je zprostředkován proteinem SpoT. Tento RSH protein má funkci syntetickou a zároveň degradační. Jako příklad této signalizační dráhy byla prokázána asociace SpoT



Obrázek 14: Regulace pomocí (p)ppGpp u *E. coli*, převzato z (Srivatsan, Wang 2008)

s kofaktorem syntézy mastných kyselin – ACP (*acyl carrier protein*) (Battesti a Bouveret 2006). Výsledek této interakce je nahromadění (p)ppGpp při hladovění na mastné kyseliny díky regulaci katalytické aktivity SpoT proteinu, favorizující syntézu (p)ppGpp. Uvažuje se o možné souvislosti

s hladověním na zdroje uhlíku, které ovlivňuje glykolýzu a tudíž následně i biosyntézu mastných kyselin. Zdá se, že SpoT je velice důležitý protein monitorující fyziologický stav buňky a následně upravující koncentrace (p)ppGpp v *E. coli* (Tato signální dráha je zobrazena na pravé straně **Obrázku 14**) (Srivatsan a Wang 2008).

3.2.2.1.2 Mechanizmy účinku (p)ppGpp v *Escherichia coli*

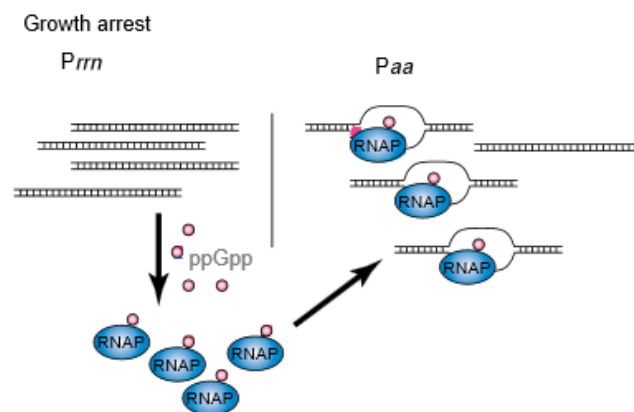
Tato malá efektorová molekula ovlivňuje několik biochemických procesů v bakteriální buňce (transkripce, translace, DNA replikace). V následujících kapitolách popíšu mechanismy regulace transkripce pomocí (p)ppGpp u modelových organismů skupin gram pozitivních a gram negativních bakterií. Vyústění těchto regulačních drah je v obou případech negativní regulace exprese genů kódujících rRNA (*rrn*). Geny kódující dráhy biosyntézy aminokyselin (*aa*), jsou naopak regulovány pozitivně. To vše za předpokladu vyvolání stringentní odpovědi s následným zvýšením koncentrace (p)ppGpp (viz **Obrázek 15**).

3.2.2.1.2.1 Přímý vliv (p)ppGpp na regulaci transkripce rRNA u *Escherichia coli*

Regulace transkripce probíhá v první řadě přímou interakcí (p)ppGpp s RNAP. Tento komplex (p)ppGpp – RNAP doplňuje protein DksA. Jeho funkce spočívá ve vazbě na RNAP a stabilizaci asociace (p)ppGpp a RNAP. Tímto zvyšuje efektivitu jak pozitivních, tak negativních regulací zprostředkovaných vazbou (p)ppGpp na RNAP (Potrykus a Cashel 2008b).

Konkrétní mechanismus působení celého komplexu RNAP/(p)ppGpp/DksA

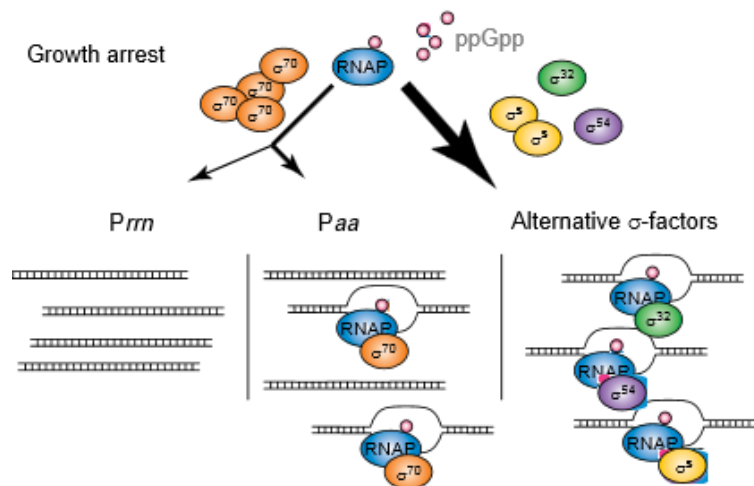
spočívá v ovlivnění stability tzv. „otevřeného komplexu“ (*open complex*). To je oddělení dsDNA v oblasti promotoru o délce 13 páru bází, kde po denaturaci dsDNA nasedne RNA polymeráza při iniciaci transkripce. Vazba (p)ppGpp/DksA na RNAP snižuje stabilitu všech „otevřených komplexů“. Patrné je to zvláště při negativní regulaci exprese genů kódujících rRNA. Komplexy RNAP-promotor



Obrázek 15: Regulace transkripce pomocí (p)ppGpp I, převzato z (Magnusson et al. 2005), protein DksA vynechán

u těchto genů jsou z vlastní podstaty nestabilní. Další snížení stability v tomto případě ruší formování komplexu RNAP-promotor a zamezí transkripci promotorů genů *rrn* – P *rrn* (neformují komplex s RNAP - levá strana **Obrázku 15**). Pozitivní regulace se projevuje v tom, že je k dispozici více RNAP a můžou se tvořit RNAP-promotor otevřené komplexy genů, které za běžných podmínek váží RNAP s menší afinitou než geny *rrn*. Jedná se o geny kódující enzymy nutné pro biosyntézu AMK. Tyto komplexy RNAP – promotor jsou stabilnější z vlastní podstaty, a tudíž dokáží zahájit transkripci i při snížení stability dané vazbou malé efektorové molekuly a kofaktorového proteinu DksA na RNAP. Syntéza AMK je tímto systémem pozitivně regulovaná (pravá strana **Obrázku 15**, P *aa* – promotor drah biosyntézy AMK) (Srivatsan a Wang 2008).

Další mechanismus, kterým (p)ppGpp ovlivňuje iniciaci transkripce je ovlivnění vazby různých σ faktorů na RNAP. Konkrétně snižuje afinitu RNAP k hlavnímu „housekeeping“ sigma faktoru σ^{70} , který zajišťuje expresi genů potřebných při růstu za příznivých podmínek, např. geny kódující rRNA – *rrn* (lze vidět na levé straně **Obrázku 16**). Tímto uvolňuje RNAP pro vazbu s ostatními alternativními σ faktory na RNAP, například se sigma faktorem σ^{32} aktivujícím syntézu skupiny proteinů nutných při tepelném šoku (*heat-shock response*), nebo sigma faktorem σ^S potřebným při vstupu bakteriální buňky do stacionární fáze (znázorněno na pravé straně **Obrázku 16**) (Potrykus a Cashel 2008b).



Obrázek 16: Regulace transkripce pomocí (p)ppGpp II, převzato z (Magnusson et al. 2005)

3.2.2.2 Regulace pomocí (p)ppGpp u *Bacillus subtilis*

U gram pozitivních bakterií je za metabolismus (p)ppGpp zodpovědný jeden hlavní protein RSH. Je to homolog RelA proteinu, který má syntetickou a hydrolytickou funkci (Wendrich a Marahiel 1997). Nedávné studie potvrdily přítomnost dvou dalších malých RSH proteinů strukturně podobných katalytické doméně RSH se syntetickou funkcí. Jsou označeny jako „*small alarmone synthetases*“, geny kódující tyto proteiny byly pojmenovány *yjbM*, *ywaC*. Kromě regulací společných pro gram pozitivní a gram negativní bakterie (stacionární fáze, hladovění,...) u *B. subtilis* (p)ppGpp

ovlivňuje také buněčnou diferenciaci (Nanamiya et al. 2007). Jelikož tyto signální dráhy nejsou doposud prostudovány do takové míry, jako je tomu u *E. coli* a dalších gram negativních bakterií, budu se soustředit na jeden z významných rozdílů v jejich fungování mezi gram pozitivními a gram negativními bakteriemi. Tímto rozdílem je mechanismus regulace transkripce rRNA.

3.2.2.2.1 Nepřímý vliv (p)ppGpp na regulaci transkripce rRNA u *Bacillus subtilis*

Zatímco u *E. coli* se jedná o přímé ovlivnění procesu iniciace transkripce za spolupráce DksA/(p)ppGpp/RNA. U *B. subtilis* probíhá regulace transkripce rRNA nepřímo, ovlivněním koncentrace tzv. iNTP. To je NTP vyskytující se na prvním místě v primární sekvenci transkriptu u promotorů vytvářejících nestabilní otevřený komplex, jako například jsou promotory genů kódujících rRNA (*P_{rrn}*). U genů rRNA *B. subtilis* je iniciační nukleotid GTP. Asociací GTP na +1 místo (-) ssDNA v otevřeném komplexu se vazba RNAP na promotor stabilizuje. Nedochozí k opakující se disociaci a asociaci enzymů nutných pro transkripci, jak by tomu bylo bez navázaného GTP. Touto stabilizací je umožněn vznik většího počtu molekul mRNA. Transkripce genů kódujících rRNA je tedy regulovaná změnami koncentrace GTP. Základní sloučenina pro syntézu (p)ppGpp je rovněž GTP. To znamená, že koncentrace těchto malých molekul v buňce spolu souvisí.

Při zahájení stringentní odpovědi stoupne v bakterii koncentrace ppGpp a zároveň klesne koncentrace GTP. Jeden z důvodů je ten, že GTP je přímo využito k syntéze ppGpp. S nižší koncentrací iNTP (GTP) klesá stabilita otevřeného komplexu RNAP – *P_{rrn}* a tudíž dojde k iniciaci transkripce pouze u malého zlomku genů kódujících rRNA. Zároveň dochází ke zvýšení koncentrace ATP, které je iNTP u genů, exprimujících se při stringentní odpovědi. Úroveň jejich transkripce se zvýší výše popsaným regulačním mechanismem (Krásný a Gourse 2004).

Navíc je známo, že ppGpp inhibuje aktivitu enzymu IMP dehydrogenázy, který je esenciálním článkem biosyntézy GTP (Lopez et al. 1981). Tyto regulační dráhy umožní docílit stejného výsledku jako u *E. coli* (snížení transkripce genů kódujících rRNA), liší se však mechanismem působení.

3.3 Nově objevený cyklický dinukleotid – c-di-AMP

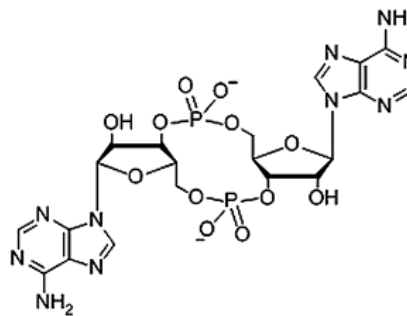
Jeden z nejnovějších objevů, co se týče malých signálních molekul, je cyklický dinukleotid c-di-AMP.

Ten byl objeven při strukturální a biochemické analýze proteinu DisA (*DNA integrity scanning protein*) u *B.subtilis*. Protein DisA reguluje iniciaci sporulace v závislosti na výskytu dvouřetězcových zlomů v DNA.

Je to oktamerní proteinový komplex, jehož monomer obsahuje helix-hairpirin-helix (HhH) nespecifickou DNA

vazebnou doménu a diadenylát cyklázovou doménu (DAC). Doména DAC má funkci c-di-AMP

syntázy, to znamená, že katalyzuje kondenzační reakci dvou molekul ATP za vzniku c-di-AMP (Witte et al. 2008).



Obrázek 17: Struktura molekuly c-di-AMP, převzato z (Kalia et al. 2013)

3.3.1 Mechanismus fungování c-di-AMP u *Bacillus subtilis*

Protein DisA se pohybuje po chromozomální DNA a přitom hledá již zmíněné dvouřetězcové zlomy. Pokud na takový zlom narazí, zastaví se a indukuje buněčnou odpověď, která zpozdí aktivaci Spo0A (hlavního aktivátoru sporulace) s výsledkem dočasného zastavení sporulace před asymetrickým dělením (Bejerano-Sagie et al. 2006). V situaci, kdy protein DisA skenuje chDNA je aktivní doména DAC, a tudíž se produkuje c-di-AMP, koncentrace této malé efektorové molekuly je vysoká.

Naopak pokud DisA narazí na zlom dsDNA, dochází k inhibici aktivity domény DAC, to znamená, že se zastaví syntéza c-di-AMP (Witte et al. 2008). Navíc dochází ke zvýšení exprese genů kódujících c-di-AMP hydrolázu – YybT (také GdpP). Protein YybT má fosfodiesterázovou aktivitu (PDE) a katalyzuje reakci, při níž se c-di-AMP hydrolyzuje na 5'-pApA-3'. Tyto procesy následně snižují koncentraci c-di-AMP v bakteriální buňce.

Fluktuace v koncentraci c-di-AMP, způsobené aktivitou domény DAC proteinu DisA, nebo domény PDE proteinu YybT, poskytují informaci o integritě genomu a následně ovlivňují rozhodnutí o iniciaci sporulace (Oppenheimer-Shaanan et al. 2011).

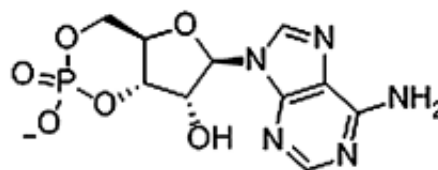
Další hypotézy popisují citlivost proteinu YybT na různé změny vlastností prostředí skrze jeho kofaktor – hem. Jsou to intenzita světla, redoxní potenciál a kyslík. Také bylo prokázáno, že je tento protein inhibován malou efektorovou molekulou ppGpp. To znamená, že jakmile buňka spustí

stringentní odpověď (následuje nárůst koncentrace ppGpp), PDE aktivita YybT je inaktivována, což zabrání poklesu koncentrace c-di-AMP a nedovolí potenciální inhibici iniciace sporulace (Rao et al. 2009). Doposud nebylo prokázáno propojení mezi signalizačními dráhami používajícími c-di-AMP s mechanizmy *quorum sensing*, což je dle mého názoru pouze otázka času.

3.4 Nové informace o známé molekule cAMP

Tento cyklický nukleotid působí jako druhý posel v mnoha regulačních procesech eukaryotických a prokaryotických buněk. Skupina enzymů s adenylát cyklázovou (AC) aktivitou je zodpovědná za syntézu cAMP z molekuly ATP. Specifické fosfodiesterázy (PDE) naopak katalyzují reakci, při které se štěpí fosfodiesterová vazba a z cAMP vznikne AMP.

Signalizace prostřednictvím této malé efektorové molekuly byla popsána hlavně u gram negativních bakterií. U modelové bakterie *B. subtilis*, reprezentující skupinu gram pozitivní bakterií, nebyly prokázány žádné enzymy metabolismu cAMP.



Obrázek 18: Struktura molekuly cAMP, převzato z (Kalia et al. 2013)

Nejznámější příklad signalizační dráhy, využívající cAMP jako druhého posla, je regulace operonu *lac* u *E. coli*. Kdy v rámci důležité stresové odpovědi – primární represe katabolismu uhlíku, dochází ke kontrole mnoha operonů skrz efektorové proteiny vázající cAMP. Ty jsou dvojího typu, Crp – *cAMP receptor protein* a CRA – *catabolite repressor/activator protein*.

3.4.1 Primární represe katabolismu uhlíku u *Escherichia coli* – Crp/CRA

Transport glukózy do buňky probíhá fosfotransferázovým systémem. Při transportu je glukóza zároveň fosforylována. Pokud je koncentrace glukózy nízká, zůstane jeden z proteinů účastnících se přenosu fosforylován. Díky tomu se aktivuje adenylát cykláza syntetizující cAMP z molekul ATP. Takto se zvýší koncentrace cAMP, tato malá efektorová molekula se váže na Cap protein (*catabolite gene activator protein*, ze skupiny Crp proteinů). Ten v komplexu s cAMP změní konformaci a tímto se aktivuje jeho DNA vazebná doména. Vazba komplexu Cap-cAMP na specifický úsek operonu *lac* u *E. coli* je jedna z podmínek aktivace exprese tohoto operonu, které poskytuje bakterii možnost utilizace laktózy jakožto alternativního zdroje uhlíku. Tato signalizační dráha umožňuje bakterii

vyhodnotit situaci tak, aby se syntetizovaly enzymy dráhy katabolismu laktózy jen za určitých specifických podmínek.

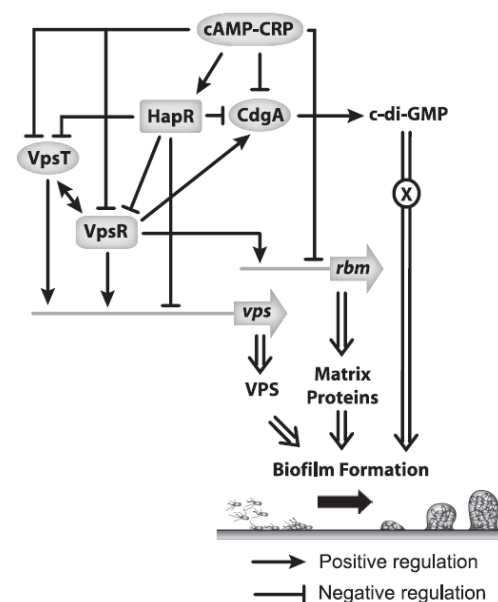
Další skupinou efektorových proteinů citlivých na změnu koncentrace cAMP jsou CRA proteiny (*Catabolite repressor/activator protein*). Opět váží cAMP a následně tvoří komplex CRP-cAMP, který reguluje expresi konkrétních operonů. Pozitivně jsou regulovány operony kódující dráhy katabolismu využívající alternativní zdroje uhlíku a negativně jsou regulovány dráhy glykolýzy (Kim a Gadd 2008).

Recentní studie se zabývají mechanismy, ve kterých je cAMP použito při regulaci tvorby biofilmu, nebo exprese genů virulence. Propojení signalizace prostřednictvím cAMP s mechanismy *quorum sensing*, a také s drahami využívajícími c-di-GMP bylo prokázáno u bakterie *V. cholerae* (Fong a Yildiz 2008).

3.4.2 Propojení signalizace prostřednictvím cAMP s mechanismy *quorum sensing* u bakterie *Vibrio cholerae*

Regulace tvorby biofilmu u této bakterie je ukázkou komplexní spolupráce několika signalizačních mechanismů. Jelikož jsem tento proces popsal již v kapitolách výše, omezím se pouze na stručný popis, zdůrazňující úlohu cAMP.

Při nedostatku glukózy v médiu dochází u *V. cholerae* k podobné reakci jako u *E. coli*, s výsledným zvýšením koncentrace cAMP. Ústřední úlohu má zde protein CRP, který při nedostatku glukózy vytvoří komplex CRP-cAMP. Tento komplex efektorového proteinu s cAMP následně negativně reguluje transkripci genů kódujících enzymy biosyntetické dráhy pro syntézu vps (*vibrio polysaccharide*) a geny kódující specifické proteiny pro matrix biofilmu. To vše skrze působení na transkripci VpsR a VpsT (viz **Obrázek 19**). Dále působí na skupinu genů kódujících proteiny s PDE a DGC doménami, a tím ovlivňuje koncentraci c-di-GMP (Fong a Yildiz 2008).

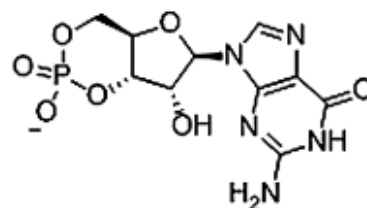


Obrázek 19: Model regulace tvorby biofilmu u bakterie *V. cholerae* pomocí cAMP-CRP, převzato z (Fong, Yildiz 2008)

Navíc bylo zjištěno, že komplex CRP-cAMP ovlivňuje expresi několika genů regulovaných transkripčním faktorem HapR, a také že je nezbytný pro tvorbu cholera auto induktoru 1 (CAI-1). To znamená, že rozhodnutí vytvořit biofilm u *V. cholerae* podléhá výstupu z vyhodnocení velkého množství informací integrovaných díky několika různým signalizačním mechanismům (Liang et al. 2007).

3.5 Eukaryotní analog u prokaryot – cGMP

Další ze skupiny druhých posílů, velice důležitý u eukaryotických organismů je cGMP. U prokaryot však doposud nebyly potvrzeny žádné konkrétní signalizační dráhy využívající tuto malou signalizační molekulu. Syntéza probíhá pomocí guanylyl cykláz a degradaci katalyzují specifické fosfodiesterázy (Kalia et al. 2013).



Obrázek 20: Struktura molekuly cGMP, převzato z (Kalia et al. 2013)

Byla prokázána jediná guanylyl cykláza syntetizující pouze cGMP, jejíž aktivita nemá dopad na hladinu cAMP. Je kódovaná genem *cya2* a vyskytuje se u bakterie *Synechocystis* (Ochoa de Alda et al. 2000). Objevení samostatné biosyntetické dráhy pouze pro syntézu cGMP otevřelo prostor pro další studie zabývající se využitím této molekuly u prokaryot.

4 Závěr

Malé efektorové molekuly regulující změny životních strategií bakterií jsou nyní velice rozšířeným tématem vědeckých studií. S rostoucím množstvím nových informací a doplňujících podrobností o mechanismech jejich působení získávají malé efektorové molekuly důležitější postavení v rámci intracelulární a extracelulární signalizace u bakterií. Jejich počet se neustále rozšiřuje, například recentní studie regulačních funkcí molekuly pGpG odhaluje další potenciální malou efektorovou molekulu v rámci metabolismu c-di-GMP (pGpG vzniká totiž degradací c-di-GMP) (Furukawa et al. 2012).

Skutečnost, že mnoho druhů signalizací je v bakteriální buňce zprostředkováno malými efektorovými molekulami, má určité důvody. Tyto molekuly rychle difundují v médiu, tudíž umožňují rychlejší tok informací. Další velkou výhodou je, že jejich syntéza není náročná, jako je například syntéza proteinů. U modifikovaných nukleotidů je zaručen dostatek prekurzorů pro jejich výrobu,

jelikož jsou to pro buňky esenciální nukleotidy. Tyto výhody upřednostňují použití malých efektorových molekuly před signalizací proteiny či jinými makromolekulami.

Signalizace zprostředkované malými efektorovými molekulami pokrývají široké spektrum vjemů z vnějšího okolí, které následně umožní integrovat a vyhodnotit. Díky těmto procesům je buňka schopná sofistikovaně adaptovat veškeré aspekty svého života na konkrétní podmínky a tím zvýšit šance přežití na maximum. Jak jsem již zmínil, pro bakteriální buňku je přirozené se vyskytovat ve formě biofilmu, to znamená v populaci bakterií stejného druhu, či různých druhů (*mixed – species biofilms*). Integrace a vyhodnocení signálů z vnějšího prostředí se tudíž netýká pouze samotné bakteriální buňky, nýbrž celé populace. Což lze pozorovat například při změně planktonického životního stylu na přisedlý (sesilní) způsob života celé bakteriální populace, a naopak. Z toho vyplývá vysoká komplexita těchto signalizačních drah, které musí umožnit tok informací skrze všechny členy bakteriální populace.

Recentní studie také přinášejí mnoho důkazů o komplikovaných propojeníh těchto signalizačních drah. Domnívám se, že je jen otázka času, kdy budeme schopni detailně popsat komplexní informační síť využívající doposud známé a nově objevené malé efektorové molekuly. Tato informační síť bude přesahovat omezení bakteriální buňky jakožto samostatného organismu a bude efektivně spojovat celou bakteriální populaci v celek schopný dynamicky se přizpůsobit okolnímu prostředí. Podle Camilli (Camilli a Bassler 2006) je velice pravděpodobné, že takové molekulární signalizační mechanismy tvoří základ kolektivnímu chování buněk ve vyšších organismech.

Studium malých efektorových molekul navíc poskytuje nové strategie v boji proti patogenním bakteriím. Což je velice užitečné zvláště v době, kdy široce rozšířená léčba pomocí antibiotik přestává být účinná, jelikož se u mnoha bakteriálních kmenů vyvinula resistance vůči těmto lékům. Malé efektorové molekuly rovněž poskytují nové zbraně při léčbě nemocí způsobených bakteriemi, které v těle pacienta tvoří biofilmy. Pochopení molekulárních detailů tvorby biofilmů umožní navrhnout léky zacílené na konkrétní procesy, znemožňující bakterii tuto životní strategii zaujmout. Detailní znalost signalizačních drah bakterií odkryje mnohé slabiny, které se budou nabízet jako místa útoku nově vytvořených léků, za cílem omezit jejich schopnosti adaptace, kterou bakteriím tyto signalizace poskytují. Recentní studie rovněž považují signalizace zprostředkované malými efektorovými molekulami jako modelový systém diferenciaci vyšších organismů.

5 Seznam použité literatury

- ALM, R A, A J BODERO, P D FREE a J S MATTICK, 1996. Identification of a novel gene, pilZ, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*. 1., roč. 178, č. 1. ISSN 0021-9193.
- BATTESTI, Aurélia a Emmanuelle BOUVERET, 2006. Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Molecular microbiology* [online]. 11., roč. 62, č. 4. ISSN 0950-382X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05442.x
- BEJERANO-SAGIE, Michal, Yaara OPPENHEIMER-SHAANAN, Idit BERLATZKY, Alex ROUVINSKI, Mor MEYEROVICH a Sigal BEN-YEHUDA, 2006. A Checkpoint Protein That Scans the Chromosome for Damage at the Start of Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Cell* [online]. 5., roč. 125, č. 4 [vid. 29. duben 2013]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2006.03.039
- CAMILLI, A. a Bonnie L. BASSLER, 2006. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. *Science* [online]. 24.2., roč. 311, č. 5764 [vid. 28. duben 2013]. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1121357
- CASHEL, M a B KALBACHER, 1970. The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. V. Characterization of a nucleotide associated with the stringent response. *The Journal of biological chemistry*. 10.5., roč. 245, č. 9. ISSN 0021-9258.
- COTTER, Peggy A a Scott STIBITZ, 2007. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2., roč. 10, č. 1 [vid. 29. duben 2013]. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2006.12.006
- ENGBRECHT, J, K NEALSON a M SILVERMAN, 1983. Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* [online]. 1.3., roč. 32, č. 3 [vid. 14. květen 2013]. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(83)90063-6
- FONG, J. C. N. a F. H. YILDIZ, 2008. Interplay between Cyclic AMP-Cyclic AMP Receptor Protein and Cyclic di-GMP Signaling in *Vibrio cholerae* Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology* [online]. 15.8., roč. 190, č. 20 [vid. 29. duben 2013]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.00466-08
- FUQUA, Clay a E. Peter GREENBERG, 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. roč. 3, č. 9.
- FURUKAWA, Kazuhiro, Hongzhou GU, Narasimhan SUDARSAN, Yoshihiro HAYAKAWA, Mamoru HYODO a Ronald R BREAKER, 2012. Identification of ligand analogues that control c-di-GMP riboswitches. *ACS chemical biology* [online]. 17.8., roč. 7, č. 8. ISSN 1554-8937. Dostupné z: doi:10.1021/cb300138n
- GALPERIN, Michael Y, 2004. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environmental microbiology* [online]. 6., roč. 6, č. 6. ISSN 1462-2912. Dostupné z: doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00633.x
- GOULD, Stephen Jay, 1996. Planet of the Bacteria. *Washington Post Horizon* [online]. roč. 119 (344). Dostupné z: http://www.stephenjaygould.org/library/gould_bacteria.html
- HABAZETTL, Judith, Martin G ALLAN, Urs JENAL a Stephan GRZESIEK, 2011. Solution structure of the PilZ domain protein PA4608 complex with cyclic di-GMP identifies charge clustering as molecular readout. *The Journal of biological chemistry* [online]. 22.4., roč. 286, č. 16. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110.209007

- HE, Ya-Wen, Chao WANG, Lian ZHOU, Haiwei SONG, J Maxwell DOW a Lian-Hui ZHANG, 2006. Dual signaling functions of the hybrid sensor kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* involve either phosphorelay or receiver domain-protein interaction. *The Journal of biological chemistry* [online]. 3.11., roč. 281, č. 44. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M606571200
- HICKMAN, Jason W a Caroline S HARWOOD, 2008. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular microbiology* [online]. 7., roč. 69, č. 2. ISSN 1365-2958. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06281.x
- HIGGINS, Douglas A., Megan E. POMIANEK, Christina M. KRAML, Ronald K. TAYLOR, Martin F. SEMMELHACK a Bonnie L. BASSLER, 2007. The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production. *Nature* [online]. 6.12., roč. 450, č. 7171 [vid. 10. květen 2013]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature06284
- CHEN, Y., Y. CHAI, J.-h. GUO a R. LOSICK, 2012. Evidence for Cyclic Di-GMP-Mediated Signaling in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* [online]. 20.7., roč. 194, č. 18 [vid. 28. duben 2013]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.01092-12
- KALIA, Dimpy, Gökçe MEREY, Shizuka NAKAYAMA, Yue ZHENG, Jie ZHOU, Yiling LUO, Min GUO, Benjamin T. ROEMBKE a Herman O. SINTIM, 2013. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chemical Society Reviews* [online]. roč. 42, č. 1 [vid. 29. duben 2013]. ISSN 0306-0012, 1460-4744. Dostupné z: doi:10.1039/c2cs35206k
- KIM, Byung Hong a Geoffrey Michael GADD, 2008. *Bacterial Physiology and Metabolism*. [online]. Leiden: Cambridge University Press [vid. 29. duben 2013]. ISBN 9780511393228 0511393229. Dostupné z: <http://public.eblib.com/EBLPublic/PublicView.do?ptiID=336079>
- KRÄMER, Reinhard a Kirsten JUNG, 2010. *Bacterial signaling*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. ISBN 978-3-527-32365-4.
- KRÁSNÝ, Libor a Richard L. GOURSE, 2004. An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *The EMBO journal*. roč. 23, č. 22.
- LAZZAZZERA, Beth A., 2000. Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Current opinion in microbiology*. roč. 3, č. 2.
- LI, Yung-Hua a Xiaolin TIAN, 2012. Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. *Sensors* [online]. 23.2., roč. 12, č. 12 [vid. 30. duben 2013]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s120302519
- LIANG, W., A. PASCUAL-MONTANO, A. J. SILVA a J. A. BENITEZ, 2007. The cyclic AMP receptor protein modulates quorum sensing, motility and multiple genes that affect intestinal colonization in *Vibrio cholerae*. *Microbiology* [online]. 1.9., roč. 153, č. 9 [vid. 29. duben 2013]. ISSN 1350-0872, 1465-2080. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.2007/006668-0
- LOPEZ, J M, A DROMERICK a E FREESE, 1981. Response of guanosine 5'-triphosphate concentration to nutritional changes and its significance for *Bacillus subtilis* sporulation. *Journal of bacteriology*. 5., roč. 146, č. 2. ISSN 0021-9193.
- MANDAL, Maumita a Ronald R BREAKER, 2004. Gene regulation by riboswitches. *Nature reviews. Molecular cell biology* [online]. 6., roč. 5, č. 6. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm1403
- NANAMIYA, Hideaki, Koji KASAI, Akira NOZAWA, Choong-Soo YUN, Takakuni NARISAWA, Kana MURAKAMI, Yousuke NATORI, Fujio KAWAMURA a Yuzuru TOZAWA, 2007. Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*.

Molecular Microbiology [online]. 7.12., roč. 67, č. 2 [vid. 29. duben 2013]. ISSN 0950382X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06018.x

OCHOA DE ALDA, J. A. G., G. AJLANI a J. HOUMARD, 2000. Synechocystis Strain PCC 6803 *cya2*, a Prokaryotic Gene That Encodes a Guanylyl Cyclase. *Journal of Bacteriology* [online]. 1.7., roč. 182, č. 13 [vid. 29. duben 2013]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.182.13.3839-3842.2000

OPPENHEIMER-SHAANAN, Yaara, Ezequiel WEXSELBLATT, Jehoshua KATZHENDLER, Eylon YAVIN a Sigal BEN-YEHUDA, 2011. c-di-AMP reports DNA integrity during sporulation in *Bacillus subtilis*. *EMBO reports* [online]. 13.5., roč. 12, č. 6 [vid. 29. duben 2013]. ISSN 1469-221X, 1469-3178. Dostupné z: doi:10.1038/embor.2011.77

PESAVENTO, Christina a Regine HENGGE, 2009. Bacterial nucleotide-based second messengers. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 4., roč. 12, č. 2 [vid. 28. duben 2013]. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2009.01.007

POTRYKUS, Katarzyna a Michael CASHEL, 2008a. (p)ppGpp: Still Magical? *. *Annual Review of Microbiology* [online]. 10., roč. 62, č. 1 [vid. 29. duben 2013]. ISSN 0066-4227, 1545-3251. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162903

POTRYKUS, Katarzyna a Michael CASHEL, 2008b. (p)ppGpp: Still Magical? *Annual Review of Microbiology* [online]. 10., roč. 62, č. 1 [vid. 29. duben 2013]. ISSN 0066-4227, 1545-3251. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162903

RAO, F., R. Y. SEE, D. ZHANG, D. C. TOH, Q. JI a Z.-X. LIANG, 2009. YybT Is a Signaling Protein That Contains a Cyclic Dinucleotide Phosphodiesterase Domain and a GGDEF Domain with ATPase Activity. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 9.11., roč. 285, č. 1 [vid. 29. duben 2013]. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M109.040238

REDFIELD, Rosemary J., 2002. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends in microbiology*. roč. 10, č. 8.

ROSS, P, H WEINHOUSE, Y ALONI, D MICHAELI, P WEINBERGER-OHANA, R MAYER, S BRAUN, E DE VROOM, G A VAN DER MAREL, J H VAN BOOM a M BENZIMAN, 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*. 15.1., roč. 325, č. 6101. ISSN 0028-0836.

RUTHERFORD, Steven T, Julia C VAN KESSEL, Yi SHAO a Bonnie L BASSLER, 2011. AphA and LuxR/HapR reciprocally control quorum sensing in vibrios. *Genes & development* [online]. 15.2., roč. 25, č. 4. ISSN 1549-5477. Dostupné z: doi:10.1101/gad.2015011

SLATER, H, A ALVAREZ-MORALES, C E BARBER, M J DANIELS a J M DOW, 2000. A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Molecular microbiology*. 12., roč. 38, č. 5. ISSN 0950-382X.

SOLOMON, J M, B A LAZAZZERA a A D GROSSMAN, 1996. Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes & Development* [online]. 15.8., roč. 10, č. 16 [vid. 30. duben 2013]. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.10.16.2014

SONDERMANN, Holger, Nicholas J SHIKUMA a Fitnat H YILDIZ, 2012. You've come a long way: c-di-GMP signaling. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 4., roč. 15, č. 2 [vid. 29. duben 2013]. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2011.12.008

- SRIVASTAVA, D. a C. M. WATERS, 2012. A Tangled Web: Regulatory Connections between Quorum Sensing and Cyclic Di-GMP. *Journal of Bacteriology* [online]. 1.6., roč. 194, č. 17 [vid. 29. duben 2013]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.00379-12
- SRIVASTAVA, Disha, Rebecca C HARRIS a Christopher M WATERS, 2011. Integration of cyclic di-GMP and quorum sensing in the control of vpsT and aphA in *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology* [online]. 11., roč. 193, č. 22. ISSN 1098-5530. Dostupné z: doi:10.1128/JB.05167-11
- SRIVATSAN, Anjana a Jue D WANG, 2008. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 4., roč. 11, č. 2 [vid. 28. duben 2013]. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2008.02.001
- SUDARSAN, N., E. R. LEE, Z. WEINBERG, R. H. MOY, J. N. KIM, K. H. LINK a R. R. BREAKER, 2008. Riboswitches in Eubacteria Sense the Second Messenger Cyclic Di-GMP. *Science* [online]. 18.7., roč. 321, č. 5887 [vid. 29. duben 2013]. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1159806
- TAO, Fei, Ya-Wen HE, Dong-Hui WU, Sanjay SWARUP a Lian-Hui ZHANG, 2010. The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *Journal of bacteriology* [online]. 2., roč. 192, č. 4. ISSN 1098-5530. Dostupné z: doi:10.1128/JB.01253-09
- TU, Kimberly C a Bonnie L BASSLER, 2007. Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Genes & development* [online]. 15.1., roč. 21, č. 2. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.1502407
- VAN GESTEL, Jordi, Martin A. NOWAK a Corina E. TARNITA, 2012. The Evolution of Cell-to-Cell Communication in a Sporulating Bacterium. *PLoS Computational Biology* [online]. 20.12., roč. 8, č. 12 [vid. 29. duben 2013]. ISSN 1553-7358. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pcbi.1002818
- VISICK, K. L., J. FOSTER, J. DOINO, M. MCFALL-NGAI a E. G. RUBY, 2000. *Vibrio fischeri* lux Genes Play an Important Role in Colonization and Development of the Host Light Organ. *Journal of Bacteriology* [online]. 15.8., roč. 182, č. 16 [vid. 29. duben 2013]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.182.16.4578-4586.2000
- WANG, Lian-Hui, Yawen HE, Yunfeng GAO, Ji En WU, Yi-Hu DONG, Chaozu HE, Su Xing WANG, Li-Xing WENG, Jin-Ling XU, Leng TAY, Rong Xiang FANG a Lian-Hui ZHANG, 2004. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Molecular microbiology*. 2., roč. 51, č. 3. ISSN 0950-382X.
- WATERS, Christopher M. a Bonnie L. BASSLER, 2005. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28.6., roč. 2005, č. 21. ISSN 1081-0706.
- WENDRICH, T M a M A MARAHIEL, 1997. Cloning and characterization of a relA/spoT homologue from *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*. 10., roč. 26, č. 1. ISSN 0950-382X.
- WITTE, Gregor, Sophia HARTUNG, Katharina BÜTTNER a Karl-Peter HOPFNER, 2008. Structural Biochemistry of a Bacterial Checkpoint Protein Reveals Diadenylate Cyclase Activity Regulated by DNA Recombination Intermediates. *Molecular Cell* [online]. 4., roč. 30, č. 2 [vid. 29. duben 2013]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2008.02.020
- XIAO, H, M KALMAN, K IKEHARA, S ZEMEL, G GLASER a M CASHEL, 1991. Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of relA null mutants can be eliminated by spoT null mutations. *The Journal of biological chemistry*. 25.3., roč. 266, č. 9. ISSN 0021-9258.