

ROLA DWUSKŁADNIKOWYCH SYSTEMÓW REGULACYJNYCH W CHOROBTWÓRCZOŚCI I LEKOOPORNOŚCI BAKTERII

Marek Juda, Ewa Dadas, Anna Malm*

* Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej Akademii Medycznej im. Prof. F. Skubiszewskiego
ul. dr. W. Chodźki 1, 20-093 Lublin, e-mail: anna.malm@am.lublin.pl

Wpłynęło w lipcu 2006 r.

1. Wstęp. 2. Budowa dwuskładnikowych systemów regulacyjnych u bakterii. 3. Dwuskładnikowe systemy regulacyjne u bakterii Gram-dodatnich. 3.1. System AgrC/AgrA u *Staphylococcus* sp. 3.2. System BacR/BacS u *Bacillus* sp. 3.3. System VanS/VanR u *Enterococcus faecalis*. 3.4. System Kin/SpoOA u *Bacillus subtilis*. 4. Dwuskładnikowe systemy regulacyjne u bakterii Gram-ujemnych. 4.1. Systemy AlgB/KinB i AlgR/AlgZ u *Pseudomonas aeruginosa*. 4.2. System BvgS/BvgA u *Bordetella pertussis*. 4.3. System EnvZ/OmpR u *Escherichia coli*. 5. Dwuskładnikowe systemy regulacyjne u bakterii jako nowe potencjalne miejsca działania leków przeciwdrobnoustrojowych. 5.1. Naturalne inhibitory dwuskładnikowych systemów regulacyjnych. 5.2. Syntetyczne inhibitory dwuskładnikowych systemów regulacyjnych. 6. Podsumowanie

Significance of two-component regulatory systems in pathogenicity and drug resistance of bacteria

Abstract: Two-component regulatory systems are central elements of bacterial cell metabolism which recognize and respond to a variety of environmental stimuli like temperature, pH, osmolarity, Fe^{3+} concentration. This is accompanied by expression of genes including those encoding virulence factors and antibiotic resistance. These systems are composed of two basic elements – a histidine kinase and a response regulator. Histidine kinase, the integral membrane protein which recognizes environmental signals, catalyzes an ATP-dependent autophosphorylation of histidine residue (His). Subsequently the phosphoryl group is transferred to asparagine residue (Asp) of the cognate response regulator being a cytoplasmic protein. This is followed by activation or repression of genes being under the control of a given two-component regulatory system. Moreover, some of these systems are composed of additional proteins sequentially phosphorylated (His → Asp → His → Asp) between histidine kinase and response regulator. The integral role of two-component regulatory systems in bacterial cells suggests that these systems may be novel, promising targets for antibacterial agents. Two steps – the autophosphorylation of histidine kinase and the interaction between histidine kinase and response regulator can be considered as targets for action of chemical compounds. The conserved domains of the response regulator may represent the best target for inhibition. In recent years, various chemical compounds showing potential ability to inhibit two-component regulatory systems have been described.

1. Introduction. 2. Structure of two-component regulatory systems in bacteria. 3. Two-component regulatory systems in Gram-positive bacteria. 3.1. AgrC/AgrA system in *Staphylococcus* sp. 3.2. BacR/BacS system in *Bacillus* sp. 3.3. VanS/VanR system in *Enterococcus faecalis*. 3.4. Kin/SpoOA system in *Bacillus subtilis*. 4. Two-component regulatory systems in Gram-negative bacteria. 4.1. AlgB/KinB and AlgR/AlgZ systems in *Pseudomonas aeruginosa*. 4.2. BvgS/BvgA system in *Bordetella pertussis*. 4.3. EnvZ/OmpR system in *Escherichia coli*. 5. Two-component regulatory systems as new, potential targets for antimicrobial agents. 5.1. Natural inhibitors of two-component regulatory systems. 5.2. Synthetic inhibitors of two-component regulatory systems. 6. Summary

Słowa kluczowe: dwuskładnikowy system regulacyjny, kinaza histydynowa, regulator odpowiedzi, regulacja ekspresji genów
Key words: two-component regulatory systems, histidine kinase, response regulator, regulation of gene expression

1. Wstęp

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne występują powszechnie w komórkach bakterii i odgrywają bardzo ważną rolę w regulacji procesów życiowych, takich jak: kompetencja, koniugacja, sporulacja, bioluminescencja, synteza antybiotyków, ruchliwość, tworzenie biofilmu oraz synteza czynników chorobotwórczości; uczestniczą również w regulacji szlaków metabolicznych oraz transportu substancji odżywczych i jonów [27]. Systemy te umożliwiają adaptację komórek do zmieniających się warunków środowiskowych (temperatura, pH, ciśnienie osmotyczne, stęże-

nie jonów Fe^{3+}), regulując ekspresję określonych genów [8, 30]. Dotychczas opisano kilkaset tego typu systemów, przy czym funkcja wielu z nich nie została jeszcze poznana [21].

Badania ostatnich lat wykazały, że dwuskładnikowe systemy regulacyjne mogą stanowić nowe potencjalne miejsca dzielenia leków przeciwdrobnoustrojowych, co potwierdziły pierwsze próby ingerencji w ich funkcje [2, 10, 55, 56, 59]. Ma to szczególne znaczenie w erze narastającej lekooporności drobnoustrojów i pojawiania się szczepów wielolekoopornych, niewrażliwych na wszystkie obecnie znane antybiotyki i chemioterapeutyki.

2. Budowa dwuskładnikowych systemów regulacyjnych

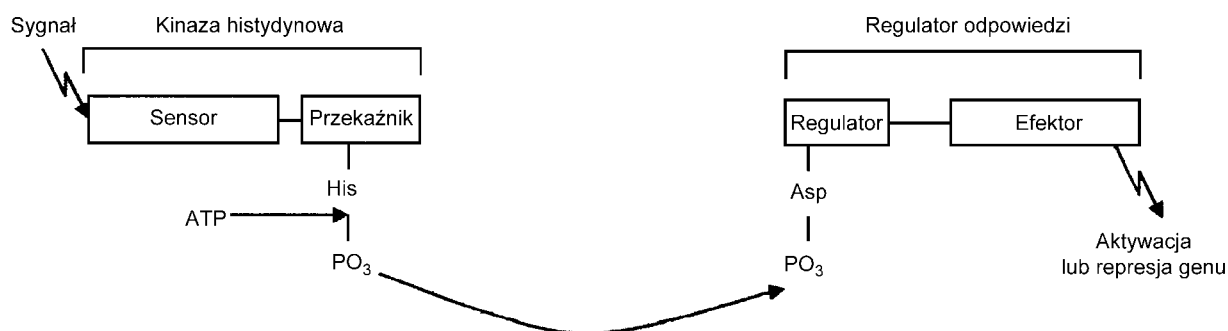
Dwuskładnikowe systemy regulacyjne tworzą dużą rodzinę spokrewnionych białek. Systemy te składają się z dwóch elementów: kinazy histydynowej i regulatora odpowiedzi. Ogólny schemat budowy dwuskładnikowych systemów regulacyjnych w komórkach bakterii przedstawia się podobnie (Rys. 1). Kinaza histydynowa jest białkiem wbudowanym w błonę cytoplazmatyczną bakterii, natomiast regulator odpowiedzi jest białkiem znajdującym się w cytoplazmie komórki. W budowie kinazy histydynowej wyróżnia się domenę N-kończową, zwaną sensorem i domenę C-kończową o aktywności kinazy, zwaną przekaźnikiem [8, 16, 24, 47]. Sygnały ze środowiska zewnętrznego są odbierane bezpośrednio przez część sensorową kinazy histydynowej, co powoduje autofosforylację pierścienia imidazolowego reszty histydyny (His) w obrębie domeny przekaźnika przy udziale ATP z wytworzeniem wysokoenergetycznego wiązania fosforoamidowego. Należy dodać, że domena przekaźnika może mieć również aktywność fosfatazy, a więc odpowiadać za defosforylację His [8, 16, 24].

Dokładna analiza budowy kinaz histydynowych pozwoliła na wyodrębnienie dwóch klas tych białek w oparciu o organizację przestrzenną poszczególnych elementów, takich jak: H-box (akceptor reszty fosforanowej) i region wiązania ATP – CA (catalytic ATP-binding domain) [12, 16]. Należy zaznaczyć, że sekwencje aminokwasowe w obrębie regionu H-box są wysoce konserwatywne, charakterystyczne dla całej rodziny kinaz histydynowych. Pierwszą grupę tworzą kinazy typu EnvZ, najbardziej rozpowszechnione wśród dwuskładnikowych systemów regulacyjnych [12, 16, 24, 47, 55]. Region H-box znajduje się w bardzo bliskim sąsiedztwie regionu CA. Bardzo często domena przekaźnikowa może być związana z dodatkową podjednostką, tzw. Hpt (histidine phosphotransfer). Stanowi

ona donor grupy fosforanowej dla reszty asparaginowej regulatora odpowiedzi [12, 16]. W niektórych kinazach podjednostka Hpt może funkcjonować jako osobne białko pośredniczące w przekazywaniu reszty fosforanowej [16].

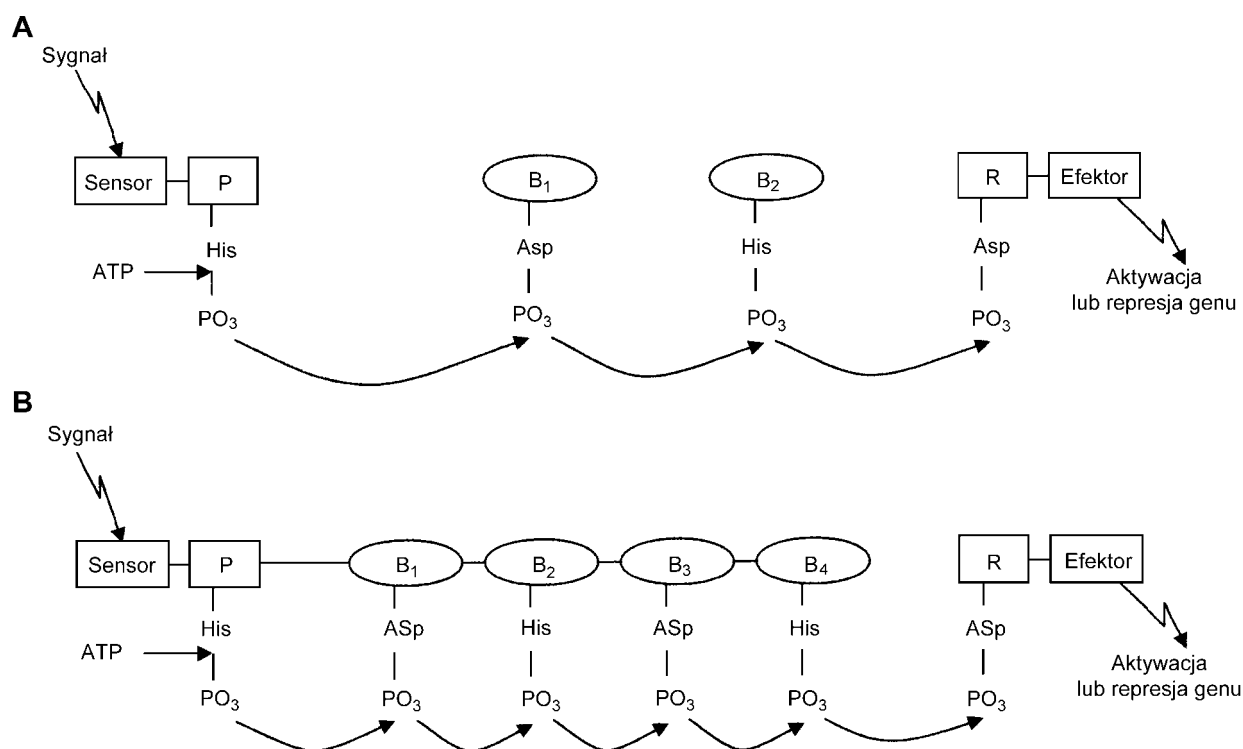
W kinazach typu CheA, stanowiących drugą klasę enzymów, regiony H-box oraz CA znajdują się w większej odległości od siebie i są oddzielone dodatkowymi domenami, a podjednostka Hpt zlokalizowana jest w bezpośrednim sąsiedztwie H-box. Kinaza histydynowa zbudowana z wielu takich domen nosi nazwę kinazy hybrydowej [12].

W następnym etapie przepływu informacji w obrębie dwuskładnikowego systemu regulacyjnego dochodzi do przeniesienia grupy fosforanowej z reszty His z domeny przekaźnikowej kinazy histydynowej na resztę asparaginową (Asp) regulatora odpowiedzi z wytworzeniem wysokoenergetycznego wiązania acylofosforanowego. To ufosforylowane białko funkcjonując jako regulator transkrypcji, decyduje o ekspresji genów, a tym samym o stopniu nasilenia produkcji białek zarówno strukturalnych jak i enzymatycznych [8, 16, 24]. W budowie regulatora odpowiedzi można wyróżnić część N-kończową i C-kończową. Część N-kończowa, zwana również domeną regulatorową lub odbiornikiem zawiera resztę Asp ulegającą fosforylacji. Domena efektorowa zlokalizowana w części C-końcowej posiada zdolność wiązania się z sekwencjami promotorowymi łańcucha DNA odpowiednich genów wpływając na poziom ich ekspresji. Przykładem takiej podjednostki jest sekwencja HTH (helix-turn-helix) [18]. Należy zaznaczyć, że po utworzeniu kompleksu pomiędzy regulatorem odpowiedzi a miejscem jego docelowego działania dochodzi do defosforylacji tego białka [16]. Różne regulatory odpowiedzi w swojej strukturze zawierają domenę akceptorową dla reszty fosforanowej typu CheY [18]. Podobnie jak w przypadku kinaz histydynowych również w obrębie regulatora odpowiedzi możemy wyodrębnić różne klasy



Rys 1. Schemat przedstawiający ogólny mechanizm działania dwuskładnikowych systemów regulacyjnych

Sygnały ze środowiska odbierane przez część N-kończową kinazy histydynowej (sensor), przekazywane są na część C-kończową (przeźnik), powodując autofosforylację reszty histydyny w domenie przekaźnikowej. Następnie reszta fosforanowa przenoszona jest na resztę asparaginy w części N-końcowej regulatora odpowiedzi, co powoduje łączenie się części C-końcowej, czyli efektora z sekwencjami promotorowymi odpowiednich genów wpływając na poziom ich transkrypcji (szczegóły w tekście).



Rys. 2. Schemat działania dwuskładnikowych systemów regulacyjnych działających w tzw. systemie sztafetowym

A) przykład dwuskładnikowego systemu regulacyjnego, w skład którego wchodzi dodatkowo, oddzielne białka przenoszące resztę fosforanową z kinazy histydynowej na regulator odpowiedzi,

B) przykład dwuskładnikowego systemu regulacyjnego zbudowanego z kinazy histydynowej oraz kompleksu białek przenoszących resztę fosforanową z kinazy na regulator odpowiedzi (szczegóły w tekście).

P – przekaźnik, R – regulator, B₁₋₄ – kolejne białka stanowiące dodatkowe elementy dwuskładnikowych systemów regulacyjnych.

białek, różniących się budową regionu odpowiedzialnego za wiązanie z DNA [55]. Najczęściej występują regulatory odpowiedzi należące do klasy OmpR, NarL i NtrC, obejmujące prawie 60% wszystkich opisanych regulatorów [18].

Niektóre dwuskładnikowe systemy regulacyjne wykazują nieco bardziej złożoną budowę. Charakteryzuje je obecność wielu białek przekazujących sobie kolejno grupę fosforanową. Poszczególne elementy tego ciągu mogą stanowić indywidualne białka (Rys. 2A) lub być połączone w wielodomenowe układy (Rys. 2B) [16]. Przenoszenie grup fosforanowych przebiega w porządku: His → Asp → His → Asp. Białka przenoszące grupy fosforanowe pełnią funkcję jedynie pośredniczącą, a właściwym regulatorem odpowiedzi w tym systemie jest ostatnie białko tego szeregu. Taki wielobiałkowy układ nosi nazwę „sztafety” i reguluje ekspresję genów białek uczestniczących w bardziej skomplikowanych szlakach metabolicznych [18]. Zidentyfikowano je m.in. w komórkach *Bacillus subtilis*, gdzie regulują ekspresję genów, odpowiedzialnych za wytwarzanie form przetrwalnych. Ponadto decydują o ekspresji genów kodujących czynniki chorobotwórczości u wielu drobnoustrojów, jak np. u *Bordetella pertussis*, *Candida albicans* czy *Aspergillus fumigatus* [53].

Zarówno w przypadku prostych dwuskładnikowych systemów regulacyjnych, jak i tzw. „sztafet”, regulator odpowiedzi jest czynnikiem regulującym transkrypcję, bezpośrednio kontrolując ekspresję genów pojedynczych lub zorganizowanych w operony. Pobudzenie dwuskładnikowego systemu regulacyjnego prowadzi do „włączenia” lub „wyłączenia” transkrypcji odpowiednich genów. Istotny jest fakt, że efekt kontroli pobudzonego systemu prowadzi zawsze do optymalnej modyfikacji metabolizmu bakterii w określonym środowisku, np. w organizmie gospodarza [53]. Należy dodać, że regulator odpowiedzi może również bezpośrednio uczestniczyć w regulacji innych procesów życiowych komórek bakterii. Przykładem jest regulator odpowiedzi CheY, który w połączeniu z kinazą CheA oraz fosfatazą CheZ, reguluje proces chemotaksji u *Escherichia coli* oraz *Salmonella enterica*, uwarunkowany ukierunkowanym ruchem bakterii; najprawdopodobniej białko CheY wchodzi w interakcję z „motorami” rzęsek [18, 50].

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne wykryto u licznych gatunków bakterii chorobotwórczych, zarówno Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych oraz prątków. Dotychczas nie wykazano występowania tych systemów u mykoplazm [17, 18]. Lista kinaz histydynowych i regulatorów odpowiedzi dostępna w bazie

danych National Center for Biotechnology Information (NCBI) jest prezentowana na stronie internetowej http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes [22].

3. Dwuskładnikowe systemy regulacyjne u bakterii Gram-dodatnich

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne wykryto m.in. u *Staphylococcus* sp. (systemy ArlS/ArlR, AgrC/AgrB), *Streptococcus pneumoniae* (systemy ComD/ComE i CiaH/CiaR), *Enterococcus faecalis* (system kodowany przez operon *fsrABC*), *Lactococcus lactis* (system NisK/NisR), *Streptomyces lividans* (system CutS/CutR) czy *Bacillus subtilis* (system Kin/SpoOA) [15, 35, 43]. Należy wspomnieć, że *B. subtilis* jest obiektem intensywnych badań nad tego typu systemami. Możliwe jest to dzięki poznaniu sekwencji całego genomu tego drobnoustroju [13].

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne w komórkach bakterii Gram-dodatnich biorą udział w tzw. systemie *quorum sensing*, regulującym ekspresję genów w populacji bakterii w odpowiedzi na zmiany liczby komórek (gęstości populacji) żyjących w określonej niszy. Komórki bakterii wytwarzają specyficzne cząsteczki sygnałowe wydzielane do środowiska, które wiążą się ze specyficznymi sensorami w błonie cytoplazmatycznej, co powoduje transmisję sygnału na odpowiednie białko efektorowe i w konsekwencji skoordynowaną zmianę ekspresji genów kontrolujących ważne procesy życiowe w całej populacji komórek. W przypadku bakterii Gram-dodatnich funkcję takich cząsteczek sygnałowych pełnią oligopeptydy, np. peptyd AIP (autoinducing peptide), związany z dwuskładnikowym systemem regulacyjnym AgrC/AgrA u *S. aureus* [27].

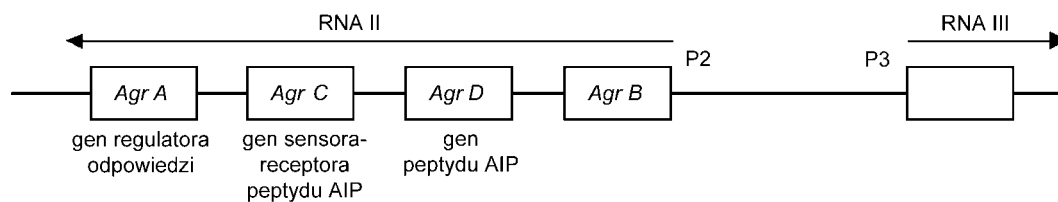
Poniżej opisane są przykłady dwuskładnikowych systemów regulacyjnych biorących udział w regulacji ekspresji genów warunkujących chorobotwórczość oraz lekooporność wybranych gatunków bakterii Gram-dodatnich, jak również system Kin/SpoOA u *B. subtilis*.

3.1. System AgrC/AgrA u *Staphylococcus* sp.

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne zostały opisane u *S. aureus*, a ostatnio również u *S. epidermidis* [41, 57, 63]. Jednym z pierwszych opisanych jest system AgrC/AgrA, który wpływa na ekspresję genów warunkujących syntezę egzotoksyn m. in. takich jak: hemolizyny a, b, d i g, czy toksyna wstrząsu toksycznego TSST-1 (toxic shock syndrome toxin-1); które stanowią ważne czynniki chorobotwórczości *S. aureus* [26, 31, 41, 60, 63]. Jest to, jak wspomniano, przykład systemu zaangażowanego w proces *quorum sensing* [63]. Region *agr* składa się z dwóch operonów, P2 i P3. Operon P2 koduje dwuskładnikowy system regulacyj-

ny i jednocześnie stanowi jednostkę tzw. autoindukcji, a operon P3 odpowiada za syntezę transkrypty RNA III. W skład operonu P2 wchodzi cztery geny, kolejno oznaczane jako *agrB*, *agrD*, *agrC* i *agrA*. Gen *agrD* koduje peptyd sygnałowy AIP w postaci propeptydu pro-AIP, *agrB* – białko odpowiedzialne za przetwarzanie pro-AIP i jego sekrecję na zewnątrz komórki bakteryjnej w postaci o pełnej aktywności (AIP), *agrC* – transbłonową kinazę histydynową, stanowiącą jednocześnie receptor dla peptydu AIP, *agrA* – regulator odpowiedzi. Peptyd AIP, wydzielany na zewnątrz komórki bakteryjnej, łączy się z kinazą sensora AgrC, co prowadzi do autofosforylacji tego białka [26, 31, 41, 57, 63]. Prawdopodobnie możliwa jest również fosforylacja regulatora odpowiedzi bez udziału połączenia receptor/AIP. W następnym etapie dochodzi do fosforylacji regulatora odpowiedzi AgrA. Białko to wraz z białkiem SarA (staphylococcal accessory regulator) aktywuje promotory operonów P2 i P3 [60, 63]. W momencie aktywacji dwuskładnikowego systemu regulacji AgrC/AgrA, obok wzrostu ekspresji i w konsekwencji biosyntezy białek operonu P2, dochodzi również do wzrostu poziomu wewnątrzkomórkowego efektor RNAIII – produktu transkrypcji operonu P3, który działa jako efektor aktywujący transkrypcję wielu genów determinujących czynniki chorobotwórczości, w tym genu *hld* kodującego δ -hemolizynę oraz genów odpowiedzialnych za syntezę TSST-1 [26, 27, 38, 41, 50, 52, 63]. Rys. 3 przedstawia regulację operonów P2 i P3 przez system AgrC/AgrA u bakterii *Staphylococcus aureus*.

System AgrC/AgrA u *S. epidermidis* wpływa na zdolność tworzenia biofilmu, jednego z bardzo ważnych czynników chorobotwórczości tego drobnoustroju, „ubogiego” w produkcję zewnątrzkomórkowych enzymów. Okazało się, że mutanty w regionie *agr* mają znacznie większą zdolność do tworzenia tej struktury niż szczepy z prawidłową funkcją tych genów [41, 60, 63]. Jednocześnie stwierdzono, iż izolaty *S. epidermidis* O-47 (drobnoustrój wzorcowy w badaniu zdolności tworzenia struktury biofilmu), posiadają zmutowane i tym samym nieaktywne geny *agr*. V u o n g i wsp. [41, 60] wykazali, że system AgrC/AgrA nie wpływa na zdolność do szybkości podziałów komórkowych oraz kształt komórek bakteryjnych, a jedynie może mieć znaczenie we wczesnym etapie tworzenia struktury biofilmu, jakim jest adhezja drobnoustrojów do powierzchni biomateriałów. Dalsze badania wykazały, iż ekspresja genów *agr* nie ma żadnego wpływu na ekspresję regionu *icaADBC* warunkującego syntezę komórkowego antygeny PIA (polysaccharide intracellular antigen) – ważnego czynnika chorobotwórczości gronkowców koagulazo-ujemnych, biorącego udział w tworzeniu struktury biofilmu na etapie oddziaływań swoistych drobnoustrojów/biomateriał. Jednocześnie stwierdzono, że nawet wysoki poziom białka PIA nie



Rys. 3. Schemat regulacji operonów P2 i P3 przez system AgrC/AgrA u bakterii *Staphylococcus aureus*

Aktywacja systemu AgrC/AgrA powoduje zwiększenie syntezy peptydu AIP (produkt genu *agrD*, modyfikowany przez białko genu *agrB*); AIP po sekrecji na zewnątrz komórki bakteryjnej łączy się z sensorem, co prowadzi do aktywacji kinazy histydynowej AgrC i w konsekwencji regulatora odpowiedzi AgrA. Białko AgrA wraz z białkiem SarA aktywuje promotory operonów P3 i P2 (szczegóły w tekście).

jest wystarczający do tworzenia struktury biofilmu w przypadku braku mutacji w regionie *agr* [41, 60]. Uzyskane wyniki wskazują, że mutacje w obrębie genów *agr* i ekspresja regionu *ica* może doprowadzić do utworzenia szczepów o silnych właściwościach tworzenia struktury biofilmu [41, 60, 61, 63].

3.2. System BacR/BacS u *Bacillus* sp.

Bacytracyna należąca do grupy antybiotyków polipeptydowych jest wytwarzana przez szczepy *Bacillus subtilis* i *Bacillus licheniformis*, a operonem odpowiedzialnym za syntezę tego antybiotyku jest *bacABC* [29, 39]. Jednocześnie komórki syntetyzujące ten lek wykazują na niego oporność. Związane jest to m.in. z obecnością operonu *bcrABC*, który koduje białka transportowe BcrABC odpowiedzialne za aktywny transport antybiotyku poza komórkę macierzystą. W obrębie genomu *B. licheniformis*, pomiędzy operonem *bacABC* i *bcrABC*, zidentyfikowano dodatkowe geny *bacRS*, które kodują typowy dwuskładnikowy system regulujący ekspresję genów *bcrABC*. System ten składa się z regulatora odpowiedzi BacR (gen *bacR*) i kinazy histydynowej BacS (gen *bacS*) [39].

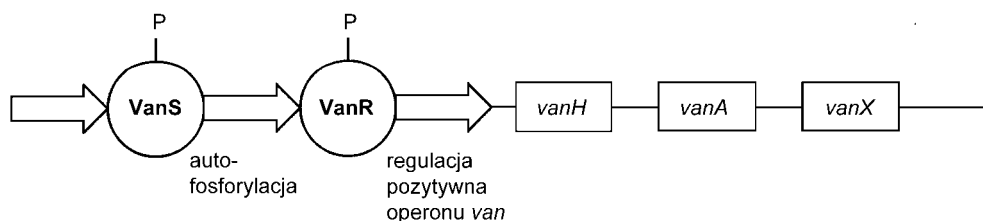
Badania poparte analizami Western-blot wykazały, że produkcja jednego z białek transportujących (BacA) jest regulowana w dodatnim sprzężeniu zwrotnym w stosunku do ilości wytwarzanej bacytracyny [39, 44]. Szczepy posiadające zmutowane geny *bacRS* wykazywały produkcję tego białka transportowego na stałym, wysokim poziomie, niezależnie od stężenia antybiotyku w środowisku, ale były wrażliwe na bacytracynę

[39, 44, 45]. Sugeruje to, iż ekspresja białek BcrABC może pozostawać pod ścisłą kontrolą genów *bacRS*, a prawidłowo działający system BacRS jest niezbędnym czynnikiem w autooporności bakterii z rodzaju *Bacillus* na wytwarzaną bacytracynę [39].

3.3. System VanS/VanR u *Enterococcus faecalis*

Pierwsze szczepy wykazujące niewrażliwość na wankomycynę pojawiły się wśród drobnoustrojów z rodzaju *Enterococcus* [46]. Wyróżnia się kilka typów oporności na antybiotyki glikopeptydowe wśród tej grupy bakterii. Jednym z nich jest fenotyp VanA charakteryzujący się wysoką opornością enterokoków zarówno na wankomycynę jak i teikoplaninę [9, 36, 46]. Geny *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA* i *vanX* tworzą operon *vanA* [8]. Zlokalizowany on jest na plazmidach lub transpozonach [9, 46]. Oporność na antybiotyki glikopeptydowe związana jest z zamianą jednego z końcowych elementów mostków pentapeptydowych peptydoglikanu, D-ala-D-ala (miejsce wiązania antybiotyków glikopeptydowych poprzez utworzenie pięciu wiązań wodorowych), na D-ala-D-lactate i tym samym zmniejszenia powinowactwa antybiotyku do peptydoglikanu około 1000-krotnie [9, 36, 48]. Za utratę wrażliwości komórek enterokoków na antybiotyki glikopeptydowe odpowiada kilka enzymów:

- ligaza (gen *vanA*), która odpowiada za syntezę D-ψ-peptydów z prekursorów D-ala-D-lac,
- dehydrogenaza (gen *vanH*), która redukuje pirogronian, w wyniku czego dochodzi do utworzenia D-mleczanu,



Rys. 4. Schemat regulacji operonu *van* u *Enterococcus* sp.

Sygnal środowiskowy (wankomycyna) powoduje autofosforylację kinazy histydynowej (VanS), a w dalszej kolejności regulatora odpowiedzi (VanR). W konsekwencji prowadzi to do aktywacji genów dla białek odpowiedzialnych za fenotyp oporności typu VanA, takich jak: ligaza (*vanA*), dehydrogenaza (*vanH*), dipeptydaza (*vanX*) (szczegóły w tekście).

- dipeptydaza (gen *vanX*), odpowiadająca za hydrolizę wiązań amidowych D-ala-D-ala,
- karboksypeptydaza (gen *vanY*), która odczepia C-końcowe reszty D-alaniny (D-ala) od późniejszych prekursorów peptydoglikanu [1, 9, 36, 48, 49].

W dalszych badaniach prowadzonych głównie u *E. faecalis*, udowodniono, iż za ekspresję fenotypu oporności VanA odpowiada dwuskładnikowy system regulacyjny, kodowany przez geny *vanR* i *vanS*, również zlokalizowane w operonie *van*. Kinaza histydynowa VanS w odpowiedzi na obecność antybiotyku w środowisku ulega autofosforylacji, co w następnym etapie prowadzi do fosforylacji regulatora odpowiedzi VanR [9]. W konsekwencji powoduje to aktywację ekspresji genów *vanHAX* oraz syntezę wyżej opisanych enzymów, warunkujących oporność typu VanA szczepów *E. faecalis* na antybiotyki glikopeptydowe [36]. Schemat regulacji operonu *van* u *Enterococcus* sp. przedstawia Rys. 4.

3.4. System Kin/SpoOA u *Bacillus subtilis*

W niekorzystnych warunkach środowiska laseczki z rodzaju *Bacillus* są zdolne do tworzenia przetrwalników (endospor). Badania nad mechanizmem tworzenia endospor u *Bacillus subtilis* wykazały, jak bardzo złożony jest to proces. W tym procesie istotną rolę odgrywa m.in. dwuskładnikowy system regulacyjny Kin/SpoOA, kontrolujący ekspresję genów odpowiedzialnych za proces sporulacji oraz syntezę tzw. czynników sigma – białek, będących podjednostkami polimerazy RNA, które po połączeniu się z rdzeniem enzymu umożliwiają prawidłowe rozpoznanie sekwencji promotorowej [13, 28].

W skład dwuskładnikowego systemu regulacyjnego wchodzi cztery kinazy histydynowe: KinA (gen *kinA*), KinB (gen *kinB*), KinC (gen *kinC*) i ComP (gen *comP*). Aktywacja odpowiedniej kinazy powoduje proces fosforylacji reszty Asp kolejno trzech regulatorów odpowiedzi: SpoOF, SpoOB i SpoOA. Jest to przykład wielobiałkowego dwuskładnikowego systemu regulacyjnego – „sztafety”. Poziom ufosforylowanej formy białka SpoOA jest istotnym czynnikiem regulującym wzrost form wegetatywnych lub też inicjację procesu sporulacji, a tym samym warunkującym „decyzję” komórki, czy ma zacząć sporulację. To ufosforylowane białko hamuje ekspresję genu *abrB*, kluczowego w procesie inicjacji sporulacji, którego produkt – białko AbrB jest represorem genów odpowiedzialnych za sporulację. Zatem zahamowanie ekspresji genu *abrA* powoduje aktywację transkrypcji genów zaangażowanych w proces sporulacji [23, 54]. Należy dodać, że ufosforylowane białko SpoOA odpowiada również za aktywację genów zaangażowanych w późniejsze fazy procesu sporulacji, takich jak: *spoIIA*, *spoIIE*, *spoIIG*.

Produktami ekspresji tych genów są odpowiednio czynniki sigma: s^F , s^E i s^G . Te alternatywne czynniki są syntetyzowane tylko wtedy, gdy istnieje zapotrzebowanie na produkty będące pod ich kontrolą [13, 24, 28].

4. Dwuskładnikowe systemy regulacyjne u bakterii Gram-ujemnych

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne są również rozpowszechnione wśród bakterii Gram-ujemnych. Wykazano ich obecność m.in. u: *Neisseria meningitidis* (system MisS/MisR), *Salmonella enterica* (system BarA/SirA), *Pseudomonas aeruginosa* (systemy CbrA/CbrA, PhoP/PhoQ), *E. coli* (system EnvZ/OmpR) czy *Agrobacterium tumefaciens* (system VirA/VirS).

Najlepiej poznany dwuskładnikowy system regulacyjny wśród bakterii Gram-ujemnych jest system EnvZ/OmpR u *E. coli*, warunkujący syntezę białek porynowych w odpowiedzi na zmieniające się ciśnienie osmotyczne środowiska zewnętrznego (omówienie w rozdz. 4.3). Budowa kinazy sensora (EnvZ) oraz regulatora odpowiedzi (OmpR) stały się jednocześnie „wzorcowymi” modelami do wyodrębnienia różnych klas w obrębie tych białek (rozdz. 2). Stwierdzono homologię pomiędzy regulatorami odpowiedzi klasy OmpR wśród takich drobnoustrojów jak, np. *B. subtilis* (SpoOF), *S. pneumoniae* (Spy), *E. faecalis* (Efa), *Mycobacterium tuberculosis* (Mtu) i *Salmonella* Typhimurium (Sty) [55]. Podobną homologię możemy odnaleźć wśród kinaz sensora typu EnvZ u *Enterococcus* sp. (VanA), *B. subtilis* (KinA), *E. coli* (ArcB) [47].

Poniżej opisane są przykłady dwuskładnikowych systemów regulacyjnych warunkujących chorobotwórczość wybranych gatunków bakterii Gram-ujemnych oraz system EnvZ/OmpR u *E. coli*.

4.1. System AlgB/KinB i AlgR/AlgZ u *Pseudomonas aeruginosa*

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne u *P. aeruginosa* należą do jednych z najlepiej poznanych. Do dnia dzisiejszego opisano około 60 takich systemów u tego drobnoustroju, m.in. system CbrA/CbrB, zaangażowany w regulację ekspresji genów kodujących szlaki metaboliczne wykorzystujące argininę, histydyne, prolinę jako źródła węgla i azotu (podobnie jak system NtrB/NtrC); system PprB/PprA, regulujący przepuszczalność błony komórkowej i wrażliwość na antybiotyki jak również wytwarzanie laktonu N-acylohomoseryny, biorącego udział w systemie *quorum sensing* u bakterii Gram-ujemnych; system PhoP/PhoQ, zaangażowany w regulację oporności na polimiksynę w odpowiedzi na stężenie jonów Mg^{2+} w środowisku zewnętrznym [11, 34, 37, 40].

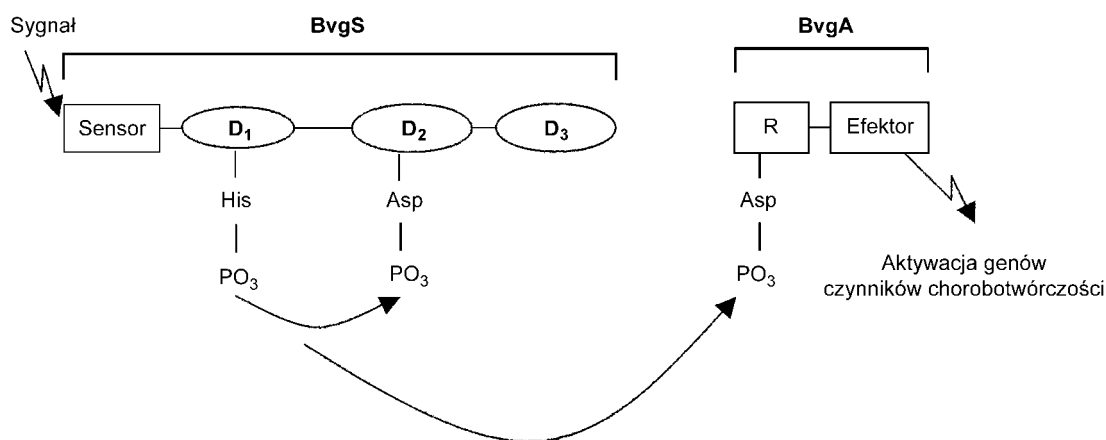
P. aeruginosa jest jednym z czynników etiologicznych przewlekłych zakażeń płuc, przede wszystkim u chorych z mukowiscydozą (CF – cystis fibrosis) [32, 33, 62]. Większość szczepów *P. aeruginosa* izolowanych od pacjentów z CF są to izolaty posiadające zdolność wytwarzania egzopolisacharydu, zwanego alginianem, sprzyjającego tworzeniu biofilmu [32, 33]. Wysoki poziom syntezy alginianu związany jest z syntezą alternatywnego czynnika sigma (σ^{22}) kodowanego przez gen *algT* (*algU*). Czynniki te indukują ekspresję co najmniej 4 genów lub operonów niezbędnych w syntezie alginianu, m.in. takich jak: gen *algD*, warunkujący syntezę kluczowego enzymu – dehydrogenazy GDP-mleczanowej, czy też operonów *algB* i *algR*, kodujących dwuskładnikowe systemy regulacyjne [32, 33, 62, 64].

W systemach tych rolę kinaz histydynowych spełniają białka KinB i AlgZ, a regulatorów odpowiedzi białka AlgB (dla kinazy KinB) i AlgR (dla kinazy AlgZ). Oba te systemy kontrolują syntezę alginianu, poprzez aktywację procesu transkrypcji genu *algD* [32, 33, 62, 64]. Okazuje się jednak, iż w przypadku tych systemów kontrola ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę egzopolisacharydu nie może być rozpatrywana jako klasyczny proces zależny od reakcji fosforylacji poszczególnych domen [32]. Badania przeprowadzone przez Ma i wsp. [32] wskazują, że w warunkach *in vitro* defekt w fosforylacji regulatora odpowiedzi AlgB nie wpływa na syntezę alginianu i komórki te nadal produkują ten związek. W przypadku systemu AlgZ/AlgR wysunięto hipotezę, iż nieufosforylowana forma regulatora odpowiedzi AlgR może odgrywać rolę w nasileniu syntezy alginianu, natomiast postać ufosforylowana może mieć wpływ na inne funkcje komórki [32]. Przypuszcza się, że proces autofosforylacji kinaz histydynowych KinB i AlgZ może być uzależniony od obecności pewnych czynni-

ków *in vivo*, jakie występują m.in. u pacjentów z CF, np.: odwodnienie, wysoka osmolalność, zmniejszona zawartość związków odżywczych czy też obecność antybiotyków [33]. W konsekwencji może to pobudzać komórki do syntezy alginianu. Dlatego też zahamowanie procesów fosforylacji zachodzących w tych systemach może zapobiegać syntezie egzopolisacharydu w komórkach *P. aeruginosa* inicjując proces zasiedlenia organizmu gospodarza [32].

4.2. System BvgS/BvgA u *Bordetella pertussis*

B. pertussis jest czynnikiem etiologicznym krztuśca. Chorobotwórczość tego drobnoustroju jest uwarunkowana syntezą toksyn (toksyna krztuścowa, cyklaza adenylowa, cytotoksyna tchawicza, endotoksyna) oraz adhezyn (fimbrie otoczkowe). Synteza tych czynników, kontrolowana jest przez dwuskładnikowy system regulacyjny BvgS/BvgA. Białko BvgS (gen *bvgS*) spełnia rolę kinazy histydynowej, a białko BvgA (gen *bvgA*) – regulatora odpowiedzi. Kinaza BvgS stanowi przykład kinazy hybrydowej. Zbudowana jest z czterech podjednostek: sensora, przekaźnika, odbiornika zwanego regulatorem kinazy oraz części C-końcowej o nieznannej funkcji, oddzielonych krótkim i fragmentami bogatymi w reszty alanina/prolina. Część C-końcowa nie wykazuje homologii do innych znanych kinaz [58]. W przypadku kinazy BvgS dochodzi do autofosforylacji reszty His w domenie przekaźnika, a następnie reszty Asp w domenie odbiornika. Każda z tych ufosforylowanych reszt aminokwasowych może być donorem grup fosforanowych dla białka BvgA [58]. Białko to powoduje aktywację genu *ptx* kodującego toksynę krztuścową oraz genów *vir*, takich jak: gen *cyoA* – kodujący cyklazę adenylanową, czy geny *fim-1*, *fim-2*, *fimX*, kodujące fimbrie [6]. Należy dodać, iż w przypadku *Bordetella bronchoseptica* w odróżnieniu



Rys. 5. Schemat działania systemu BvgS/BvgA u *Bordetella pertussis*

Sygnał środowiskowy powoduje autofosforylację hybrydowej kinazy histydynowej (BvgS), a w dalszej kolejności regulatora odpowiedzi (BvgA). W konsekwencji prowadzi to do aktywacji genów dla białek warunkujących chorobotwórczość tego drobnoustroju (szczegóły w tekście).

D₁ – domena przekaźnika, D₂ – domena odbiornika (regulatora kinazy), D₃ – część C-końcowa, R – regulator.

od *B. pertussis*, proces fosforylacji systemu BvgS/BvgA prowadzi do zahamowania wydzielania toksyn [55]. Rys. 5 przedstawia działanie systemu BvgS/BvgA u *B. pertussis*.

4.3. System EnvZ/OmpR u *Escherichia coli*

Jednym z najlepiej zbadanych dwuskładnikowych systemów regulatorowych jest wspomniany system EnvZ/OmpR u *E. coli*, odpowiedzialny za regulację syntezy białek porynowych w błonie zewnętrznej w odpowiedzi na zmieniające się ciśnienie osmotyczne środowiska zewnętrznego. Białko EnvZ (gen *envZ*) w systemie tym spełnia rolę kinazy histydynowej, a białko OmpR (gen *ompR*) – regulatora odpowiedzi. Ufosforylowana forma białka OmpR odpowiada za poziom ekspresji genów *ompC* i *ompF*, warunkujących syntezę białek porynowych w błonie zewnętrznej [5, 7, 20]. Białka te odpowiedzialne są za dyfuzję małych cząstek o masie cząsteczkowej mniejszej niż 650 Da i posiadających charakter hydrofilny. Regulacja odpowiednich białek porynowych uzależniona jest od wartości ciśnienia osmotycznego w środowisku życia bakterii. Stwierdzono, że niska osmoralność lub wysokie pH powodują fosforylację tylko ok. 3,5% białka OmpR w stosunku do całej jego zawartości w komórce bakteryjnej, a w konsekwencji powoduje to aktywację genu białka porynowego OmpF. W przypadku wysokich wartości ciśnienia osmotycznego lub niskiego pH, dochodzi do procesu fosforylacji ponad 10% całkowitego poziomu regulatora odpowiedzi i aktywacji syntezy białka porynowego OmpC oraz represji syntezy poriny OmpF [5, 7, 20].

5. Dwuskładnikowe systemy regulacyjne u bakterii jako nowe potencjalne miejsca działania dla leków przeciwdrobnoustrojowych

Sprawne funkcjonowanie dwuskładnikowych systemów regulacyjnych w komórkach bakterii pozwala im odpowiednio reagować na czynniki środowiska zewnętrznego. Również w sytuacji zasiedlania tkanek organizmu gospodarza, drobnoustroje są poddawane działaniu szeregu jego mechanizmów obronnych [57]. Obecność w komórkach bakterii dwuskładnikowych systemów regulacyjnych, umożliwia patogenom pokonać te bariery, sprzyja podziałom komórkowym w tkankach gospodarza, prowadząc w ten sposób do rozwoju infekcji, obejmujących czasem cały organizm. Badania dwuskładnikowych systemów potwierdziły ich integralną rolę w patogenezie chorób infekcyjnych. Od kilku lat trwają więc w laboratoriach próby syntezy związków hamujących ich aktywność [2, 3, 56].

Skuteczny i bezpieczny środek przeciwdrobnoustrojowy powinien ingerować specyficznie w procesy życiowe bakterii, tzn. powinien wykazywać możliwie niską toksyczność w stosunku do komórek człowieka (gospodarza), a tym samym maksymalną wybiórczość działania. Powinien niszczyć komórkę bakteryjną i nie być toksyczny dla komórek gospodarza. Niektóre cechy dwuskładnikowych systemów czynią z nich godne uwagi potencjalne miejsca działania leków przeciwdrobnoustrojowych [56]. Ważnymi cechami tych systemów są:

- powszechne występowanie, czasami nawet w dużych ilościach, w komórkach patogenów, jak to ma miejsce w komórkach bakterii, na przykład *P. aeruginosa* gdzie zidentyfikowano ich ok. 60,
- funkcjonowanie jako integralna część mechanizmów odpowiedzialnych za metabolizm komórki drobnoustroju,
- nieobecność podobnych systemów w komórkach organizmów należących do królestwa zwierząt, a więc również i człowieka,
- wysoka konserwatywność kinaz sensora i regulatora odpowiedzi, zwłaszcza w obrębie miejsc aktywnych, co nasuwa wniosek, że środek przeciwdrobnoustrojowy ingerujący w dwuskładnikowe systemy regulacyjne decydujące o zjadliwości, wykazywać będzie szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego [56].

Mechanizm działania dwuskładnikowego systemu regulacyjnego wskazuje na kilka potencjalnych punktów dla ingerencji inhibitora: etap odbioru sygnału, autofosforylacja sensora, interakcja pomiędzy sensorem a regulatorem oraz wiązanie regulatora do promotora regulowanego genu [2, 56].

Ponadto, jeśli określone dwuskładnikowe systemy regulacyjne odpowiadają za antybiotykooporność, to ingerencja w ich działanie pozwoli zwiększyć wrażliwość szczepów na antybiotyki. Jeśli systemy te warunkują właściwości chorobotwórcze bakterii, to zahamowanie ich aktywności może przeciwdziałać kolonizacji organizmu gospodarza i rozwojowi choroby infekcyjnej.

5.1. Naturalne inhibitory dwuskładnikowych systemów regulacyjnych

Drobnoustroje z rodzaju *Streptomyces* mają zdolność produkcji wtórnych metabolitów o dużej aktywności przeciwbakteryjnej. W procesie fermentacji przebiegającej z udziałem *Streptomyces rimosus* otrzymano serię halogenowanych pirolo-benzoksazyn, tzw. streptopiroli [56]. Charakteryzują się szerokim zakresem działania przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybiczego, a co istotne wykazują aktywność przeciwko wieloopornym szczepom *S. aureus* i *E. coli*. Mechanizm ich

działania polega na hamowaniu procesu autofosforylacji kinazy histydynowej. Jednocześnie sugeruje się, że obserwowana aktywność streptopiroli może być skutkiem również innych niespecyficznych efektów, takich jak proces agregacji [55, 56].

Wśród naturalnych inhibitorów dwuskładnikowych systemów regulacyjnych znane są nienasycone kwasy tłuszczowe, które są inhibitorami zależnej od ATP autofosforylacji kinazy histydynowej, biorącej udział w tworzeniu form przetrwalnych przez *B. subtilis*. Znana jest też zdolność bromowych pochodnych związków fenolowych do hamowania aktywności systemu dwuskładnikowego u *A. tumefaciens* pozwalającego na infekowanie rośliny w miejscach zranienia [2].

5.2. Syntetyczne inhibitory dwuskładnikowych systemów regulacyjnych

Do syntetycznych inhibitorów dwuskładnikowych systemów regulacyjnych możemy zaliczyć takie związki jak: salicylanilidy, sole imidazolu, bis-fenole, halo-fenylotiazolony, trityl czy benzimidazole i diarylotriazole [56].

Badania mechanizmu działania wykazały, że niektóre spośród najsilniej działających inhibitorów, jak na przykład salicylanilid czy benzimidazol, powodują hemolizę erytrocytów, nie naruszając jednocześnie błon komórkowych *S. aureus*. Fakt, iż wpływają destrukcyjnie na komórki zarówno prokariotyczne, jak i eukariotyczne, świadczy o tym, że obserwowana inhibicja wzrostu niektórych szczepów bakterii nie jest skutkiem wybiórczego hamowania systemów regulatorowych, ale również zaburzeń o innym charakterze [56]. Nie eliminuje to jednak znanych już syntetycznych inhibitorów jako potencjalnych skutecznych leków hamujących dwuskładnikowe systemy regulacyjne. Bis-fenole wykazują działanie hamujące kinazę histydynową VanS u enterokoków i metycylinoopornych szczepów gronkowca złocistego. Podobne właściwości wykazują izotiazolony, hamując system VanS/VanR [3, 56, 59].

Otrzymano również syntetyczne inhibitory systemu AgIR/AlgZ w komórkach *P. aeruginosa* kontrolujących syntezę alginianu. Substancje te nie działają bakterio-bójczo, ale hamują wytwarzanie alginianu przez mukoidalne szczepy *P. aeruginosa*, zwiększając tym samym wrażliwość tej bakterii na działanie antybiotyków i aktywność systemu immunologicznego gospodarza [2].

Przeglądanie bibliotek związków chemicznych umożliwia odnalezienie inhibitorów dwuskładnikowych systemów regulacyjnych ale o niskiej selektywności i różnych mechanizmach działania. W poszukiwaniu skutecznych inhibitorów tych systemów korzystniejsze jest projektowanie nowych związków z uwzględnieniem struktury kinazy sensora i regulatora odpowiedzi jako punktu uchwytu [56].

6. Podsumowanie

Badania prowadzone w celu poznania działania dwuskładnikowych systemów regulacyjnych, potwierdziły ich integralną rolę w adaptacji bakterii do zmieniających się czynników środowiskowych, w tym również skutecznej kolonizacji organizmu człowieka. Systemy te są też zaangażowane w regulację produkcji czynników chorobotwórczości bakterii oraz ekspresję oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki. Ten właśnie fakt czyni je godnymi zainteresowania elementami w komórkach bakterii z punktu widzenia medycznego i farmakologicznego.

W dobie narastającej lekooporności drobnoustrojów i pojawiania się szczepów wielolekoopornych, wykazujących oporność na obecnie dostępne antybiotyki i chemioterapeutyki, ważnym staje się zagadnienie poszukiwania nowych leków przeciwdrobnoustrojowych. Poznanie działania dwuskładnikowych systemów regulacyjnych, ich funkcji dla życia komórki bakteryjnej oraz pierwsze badania nad związkami hamującymi ich działanie, stwarza nowe możliwości w poszukiwaniu nowych i skutecznych leków przeciwdrobnoustrojowych.

Piśmiennictwo

1. Arthur M., Depardieu F., Cabanié L., Reynolds P., Courvalin P.: Requirements of the VanY and VanX D, D-peptidase for glycopeptide resistance in enterococci. *Mol. Microbiol.* **30**, 819–830 (1998)
2. Baj J.: Perspektywy walki z bakteriami chorobotwórczymi (w:) Z. Markiewicz, Z. Kwiatkowski, Bakterie, antybiotyki, lekooporność. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2001, s. 199–228
3. Barrett J.F., Hoch J.A.: Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1529–1536 (1998)
4. Beier D., Schwarz B., Thilo M., Gross R.: *In vivo* characterization of the unorthodox BvgS two-component sensor protein of *Bordetella pertussis*. *J. Mol. Biol.* **248**, 596–610 (1995)
5. Bergstrom L.C., Qin L., Harlocker S.L., Egger L.A., Inouye M.: Hierarchical and co-operative binding of OmpR to a fusion construct containing the *ompC* and *ompF* upstream regulatory sequences of *Escherichia coli*. *Genes Cells*, **3**, 777–788 (1998)
6. Bogdan J.A., Nazario-Larrieu J., Sarwar J., Alexander P., Blake M.S.: *Bordetella pertussis* autoregulates toxin production through the metabolism of cysteine. *Infect. Immun.* **69**, 6823–6830 (2001)
7. Cai S.J., Inouye M.: EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 24155–24161 (2002)
8. Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W., Greenberg E.P.: The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacteria biofilm. *Science*, **280**, 295–298 (1998)

9. Depardieu F., Bonora M.G., Reynolds P.E., Courvalin P.: The *vanG* glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. *Mol. Microbiol.* **50**, 937–948 (2003)
10. Domagala J.M., Wold S. i wsp.: Bacterial two-component signalling as a therapeutic target in drug design. Inhibition of NRII by the diphenolic methanes (bisphenoles). *Adv. Exp. Med. Biol.* **456**, 269–286 (1998)
11. Dong Y.H., Zhang X.F., Soo H.M., Grenberg E.P., Zhang L.H.: The two-component regulatory PprB modulates quorum-sensing signal production and global gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **56**, 1287–1301 (2005)
12. Dutta R., Qin L., Inouye M.: Histidine kinase: diversity of domain organization. *Mol. Microbiol.* **34**, 633–640 (1999)
13. Fabret C., Feher V.A., Hoch J.A.: Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J. Bacteriol.* **181**, 1975–1983 (1999)
14. Fournier B., Hooper D.C.: A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **182**, 3955–3964 (2000)
15. Fournier B., Klier A., Rapoport G. The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **41**, 247–261 (2001)
16. Foussard M., Cabantous S., Pédelacq J.D., Guillet V., Tranier S., Mourey L., Birck C., Samama J.P.: The molecular puzzle of two-component signaling cascades. *Microbes Infect.* **3**, 417–424 (2001)
17. Galperin M.Y.: A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: Bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol.* **5**, 35, <http://www.biomedcentral.com.1471-2180/5/35> (27 lipca 2006 r.)
18. Galperin M.Y.: Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domain combinations. *J. Bacteriol.* **188**, 4169–4182 (2006)
19. Galperin M.Y., Niskolskaya A.N., Koonin E.V.: Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction system. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**, 11–21 (2001)
20. Heyde M., Laloli P., Portalier R.: Involvement of karbon source and acetyl phosphate in the external-pH-dependent expression of porin genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**, 198–202 (2000)
21. <http://www.expasy.org/cgi-bin/get-entries?KW=Two-component%20regulatory%20system> (27 lipca 2006 r.)
22. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes (27 lipca 2006 r.)
23. Hoch J.A.: Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev. Microbiol.* **47**, 441–465 (1993)
24. Hoch J.A.: Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 165–170 (2000)
25. Iuschi S.: Phosphorylation/dephosphorylation of the receiver module at the conserved aspartate residue controls transphosphorylation activity of histidine kinase in sensor protein ArcB of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**, 23972–23980 (1993)
26. Jaworski A., Dobrowolska A., Stączek P.: RNA kontroluje aktywność wielu ważnych genów i procesów życiowych w komórkach bakterii. *Post. Mikrobiol.* **44**, 89–98 (2005)
27. Jaworski A., Serwecińska L., Stączek P.: Quorum sensing – komunikowanie się komórek w populacji bakterii przy udziale chemicznych cząsteczek sygnałowych. *Post. Biol. Kom.* **32**, 231–256 (2005)
28. Koide A., Peregó M., Hoch J.A.: ScoC regulates peptide transport and sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**, 4114–4117 (1999)
29. Konz D., Klens A., Schörgendorfer K., Marahiel M.A.: The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthesis. *Chem. Biol.* **4**, 927–937 (1997)
30. Krajewska-Pietrasik D., Różalska B.: Znaczenie czynników środowiska zewnętrznego w regulacji ekspresji właściwości chorobotwórczych bakterii. *Post. Mikrobiol.* **34**, 435–451 (1995)
31. Lina G., Jarraud S., Ji G., Greenland T., Pedraza A., Etienne J., Novick R.P., Vandenesch F.: Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the *agr* signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **28**, 655–662 (1998)
32. Ma S., Selvaraj U., Ohman D.E., Quarless R., Hassett D.J., Wozniak D.J.: Phosphorylation-independent activity of the response regulators AlgB and AlgR in promoting alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **180**, 956–968 (1998)
33. Ma S., Wozniak D.J., Ohman D.E.: Identification of the histidine protein kinase KinB in *Pseudomonas aeruginosa* and its phosphorylation of the alginate regulator AlgB. *J. Biol. Chem.* **272**, 17952–1960 (1997)
34. Macfarlane E.L., Kwasnicka A., Ochs M.M., Hancock R.E.: PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol. Microbiol.* **34**, 305–316 (1999)
35. Mascher T., Zähler D., Merai M., Balelle N., de Saizieu A.B., Hakenbeck R.: The *Streptococcus pneumoniae* *cia* regulation: CiaR target sites and transcription profile analysis. *J. Bacteriol.* **185**, 60–70 (2003)
36. McKessar S.J., Berry A.M., Bell J.A., Turindge J.D., Paton J.C.: Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3224–3228 (2000)
37. McPhee J.B., Bains M., Winsor G., Lewenza S., Kwasnicka A., Brazas M.D., Brinkman F.S., Hancock R.E.: Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory systems to Mg²⁺ induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**, 3995–4006 (2006)
38. Morfeldt E., Panova-Sapundijeva I., Gustafsson B., Arvidsson S.: Detection of the response regulator AgrA in the cytosolic fraction of *Staphylococcus aureus* by monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol. Lett.* **143**, 195–201 (1996)
39. Neumüller A.M., Konz D., Marahiel M.A.: The two-component regulatory system BacRS is associated with bacitracin “self-resistance” of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3180–3189 (2001)
40. Nishijyo T., Haas D., Itoh Y.: The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **40**, 917–731 (2001)
41. Novick R.P.: Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* **48**, 1429–1449 (2003)
42. Papakyriacou H., Vaz D., Sikor A., Louie M., McGavin M.J.: Molecular analysis of the accessory gene regulatory (*agr*) locus and balance of virulence factor expression in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **181**, 990–1000 (2000)
43. Peregó M., Hoch J.A., Barrett J.F.: Functional genomics of Gram-positive microorganisms. *J. Bacteriol.* **186**, 903–909 (2004)
44. Podlesek Z., Comino A., Herzog-Valikonja B., Grabnar M.: The role of the bacitracin ABC transporter in bacitracin resi-

- stance and collateral detergent sensitivity. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**, 103–106 (2000)
45. Podlessek Z., Herzog B., Comino A.: Amplification of bacitracin transporter genes in the bacitracin producing *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**, 201–205 (1997)
46. Plessis P., Lamy T., Donnio P.Y., Autuly F., Grulois I., Le Prise P.Y., Avril J.L.: Epidemiologic analysis of glycopeptide-resistant *Enterococcus* strains in neutropenic patients receiving prolonged vancomycin administration. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**, 959–963 (1995)
47. Pirrung M.C.: Histidine kinases and two-component signal transduction systems. *Chem. Biol.* **6**, R167–R175 (1999)
48. Reynolds P.E.: Control of peptidoglycan synthesis in vancomycin-resistant enterococci: D, D-peptidase and D, D-carboxypeptidase. *Cell Mol. Life Sci.* **54**, 325–331 (1998)
49. Reynolds P.E., Depardieu F., Dutka-Malen S., Arthur M., Courvalin P.: Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon *Tn1546* requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Mol. Microbiol.* **13**, 1065–1070 (1994)
50. Sagi Y., Khans S., Eisenbach M.: Binding of the chemotaxis response regulator CheY of the isolated, intact switch complex of the bacterial flagellar motor. *J. Biol. Chem.* **278**, 25867–25871 (2003)
51. Schwan W.R., Langhorne M.H., Ritchie H.D., Stover C.K.: Loss of hemolysin expression in *Staphylococcus aureus agr* mutants correlates with selective survival during mixed infections in murine abscesses and wounds. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **38**, 23–28 (2003)
52. Shenkman B., Varon D., Tamarin I., Dardik R., Peisachov M., Savion N., Rubinstein E.: Role of *agr* (RNAIII) in *Staphylococcus aureus* adherence to fibrinogen, fibronectin, platelets and endothelial cells under static and flow conditions. *J. Med. Microbiol.* **51**, 747–754 (2002)
53. Soncini F.C., Groisman E.A.: Two-component regulatory system can interact to process multiple environmental signals. *J. Bacteriol.* **178**, 6796–6801 (1996)
54. Stephens C.: Bacterial sporulation: A question of commitment? *Curr. Biol.* **8**, R45–R48 (1998)
55. Stephenson K., Hoch J.A.: Two-component and phosphorelay signal-systems as therapeutic targets. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2**, 1–6 (2002)
56. Stephensen K., Hoch J.A.: Virulence- and antibiotic resistance associated signal transduction system of Gram-positive pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy. *Pharmacol. Ther.* **93**, 293–305 (2002)
57. Tegmark K., Karlsson A., Arvidson S. Identification and characterization of SarH1, a new global regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **37**, 398–409 (2000)
58. Uhl M.A., Miller J.F.: Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1163–1167 (1994)
59. Ulijasz A.T., Weisblum B.: Dissecting the VanRS signal transduction pathway with specific inhibitors. *J. Bacteriol.* **181**, 627–631 (1999)
60. Vuong C., Gerke C., Somerville G.A., Fidcher E.R., Otto M.: Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* **188**, 706–718 (2003)
61. Vuong C., Götz F., Otto M.: Construction and characterization of an *agr* deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **68**, 1048–1053 (2000)
62. Wozniak D.J., Ohman D.E.: Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* genes *algR*, *algB*, and *algD* reveals a hierarchy of alginate gene expression which is modulated by *algT*. *J. Bacteriol.* **176**, 6007–6014 (1994)
63. Yarwood J.M., Schlievert P.M.: Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J. Clin. Invest.* **112**, 1920–1925 (2003)
64. Yu H., Mudd M., Boucher J.C., Schurr M.J., Deretic V.: Identification of the *algZ* gene upstream of the response regulator *algR* and its participation in control of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **197**, 187–193 (1997)