

# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

- i) Fosforylační systémy prokaryot
- ii) Modelový příklad studia fosforylační kaskády *S. pneumoniae*
- iii) Signalizace pomocí nízkomolekulárních molekul (quorum sensing) a muropeptidů

# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Fosforylační systémy prokaryot

- Příjem environmentálního stimulu
- Autofosforylace
- Transfosforylace substrátu

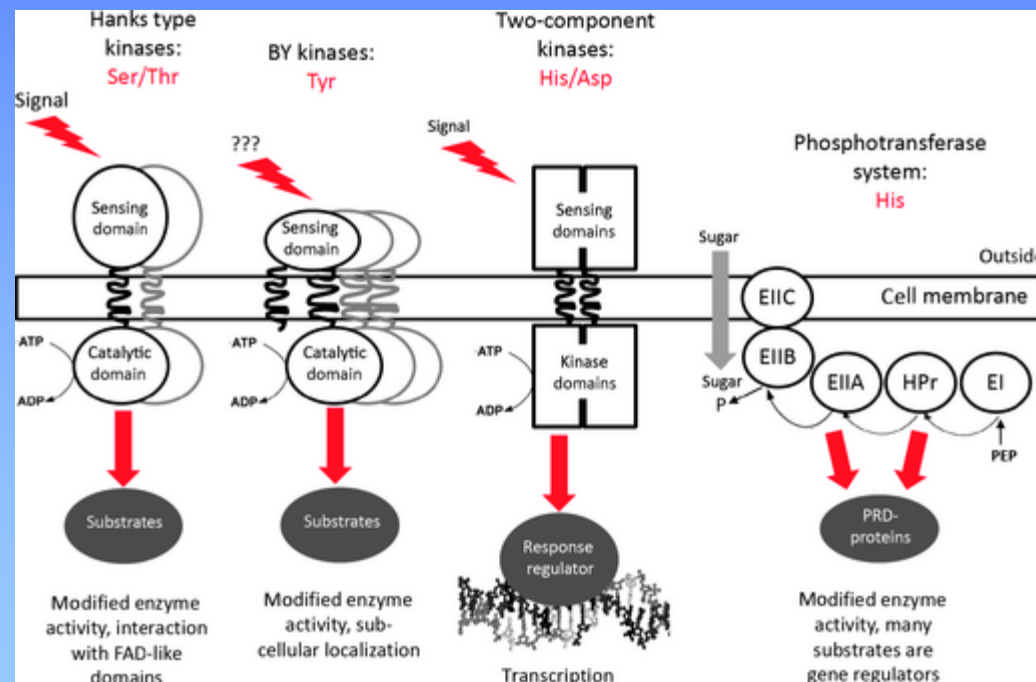
## Fosforylace reguluje aktivitu proteinů:

- i) přímo (indukce konformačních změn v aktivním místě)
- ii) nepřímo (regulace interakcí protein-protein, protein DNA)

# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

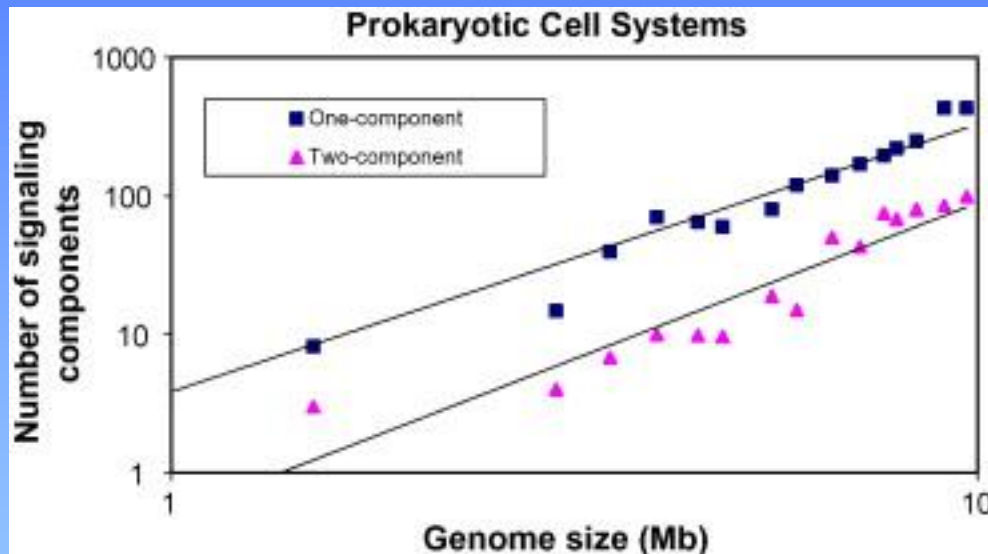
## Hlavní typy signálních systémů

- dvousložkové systémy
- PEP-dependentní fosfotransferázový systém (PTS)
- Serin/threoninové proteinkinázy
- Tyrosinové proteinkinázy
- Neobvyklé proteinkinázy



# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Dvousložkové systémy



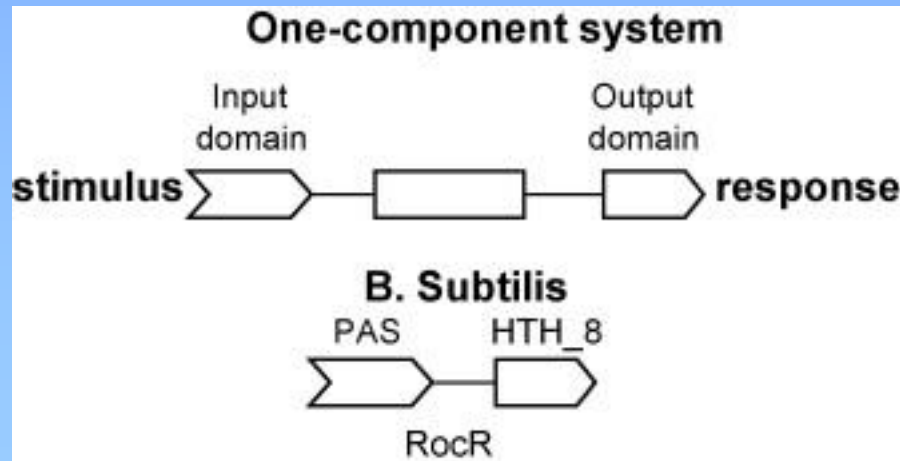
Existuje jednoznačná korelace mezi počtem signálních elementů kodovaných v genomu a jeho velikosti

# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Dvousložkové systémy

### i) Jednosložkové signální systémy (OCS):

- a) 1 cytosolický protein
- b) Alespoň 2 specializované domény: input – vazba signální molekuly, output – DNA vazebná HTH doména
- c) Aktivovaný regulátor odpovědi má většinou funkci transkripčního faktoru
- d) OCS postrádá fosfotransferázovou a TM doménu
- e) Většina signálních proteinů (80%) – evoluční prekurzory TCS

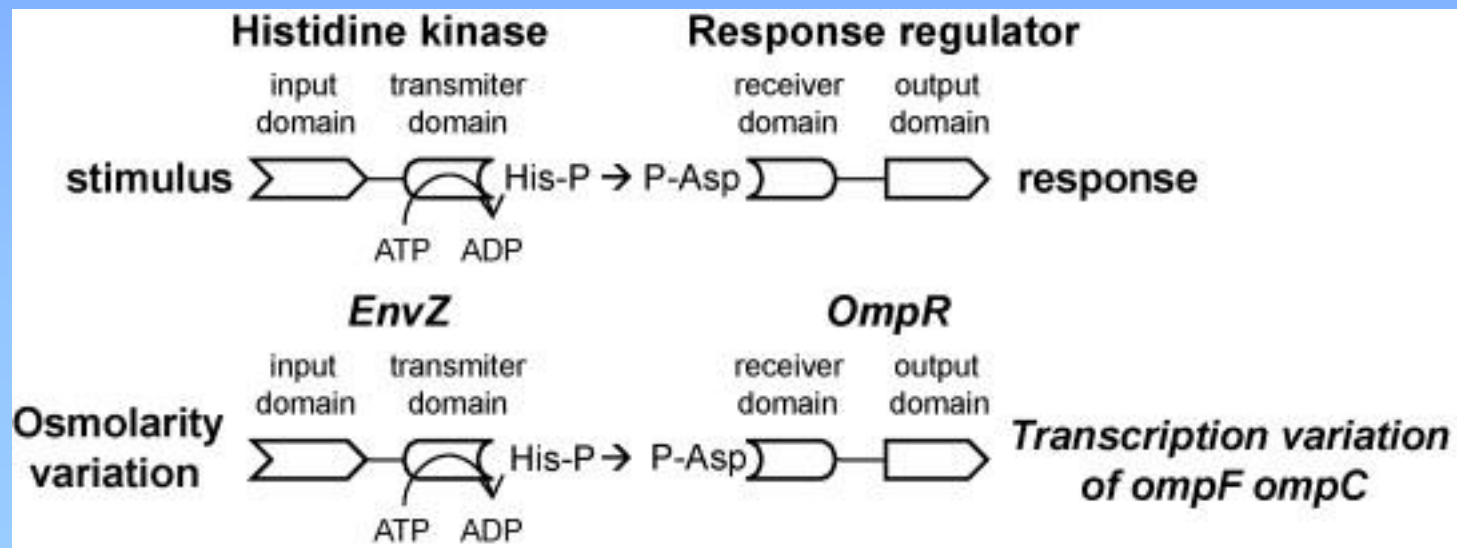


# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Dvousložkové systémy

### ii) Dvousložkové signální systémy (TCS), 1986, vlastnosti:

- Transmembránová sensorová proteinkináza – regulátor odpovědi (většinou transkripční faktor)
- Počet variabilní (Chlamydia 1, P. aeruginosa 63 HK, 64 RR), výjimečně esenciální
- Většinou je TCS dedikován specifickému signálu (pH, redox, O<sub>2</sub>, ionty, nízkomolekulární molekuly – aminokyseliny, peptidy)



# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Dvousložkové systémy

### Dvousložkové signální systémy (TCS):

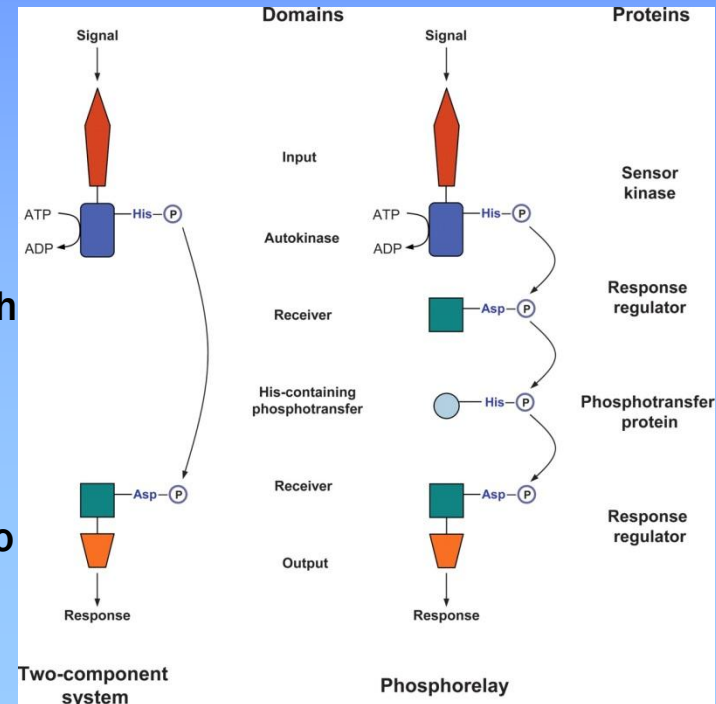
d) U většiny TCS His-kináza participuje jak při fosforylaci tak defosforylaci regulátoru odpovědi: specifický signál (stimulus) reguluje poměr fosforylační a defosforylační aktivity a tímto intenzitu fosforylace RR

e) TCS – jednotlivý přenos fosfátové skupiny

Fosforelays – „štafetový“ přenos fosfátové skupiny: kromě sensorové kinázy a terminálního regulátoru odpovědi

je zde navíc regulátor odpovědi bez output domény a His-fosfotransfér protein. Význam - zajištění dalších kontrolních míst. (sporulační kaskáda B. subtilis)

f) auregulace: fosforylovaný regulátor odpovědi často aktivuje transkripci vlastního genu a genu kodujícího sensorovou kinázu – pozitivní zpětná vazba



# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Dvousložkové systémy

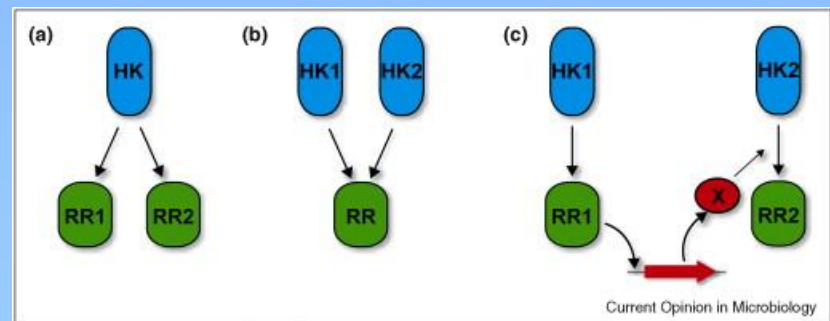
### Dvousložkové signální systémy (TCS):

g) Větvení signálních drah: one-to many, many-to-one

(quorum sensing *V. harveyi* – detekce 3 rozdílných autoinduktorů)

h) cross-regulace via pomocným (auxiliary) proteinem

(connector) – regulace aktivity HK nebo RR



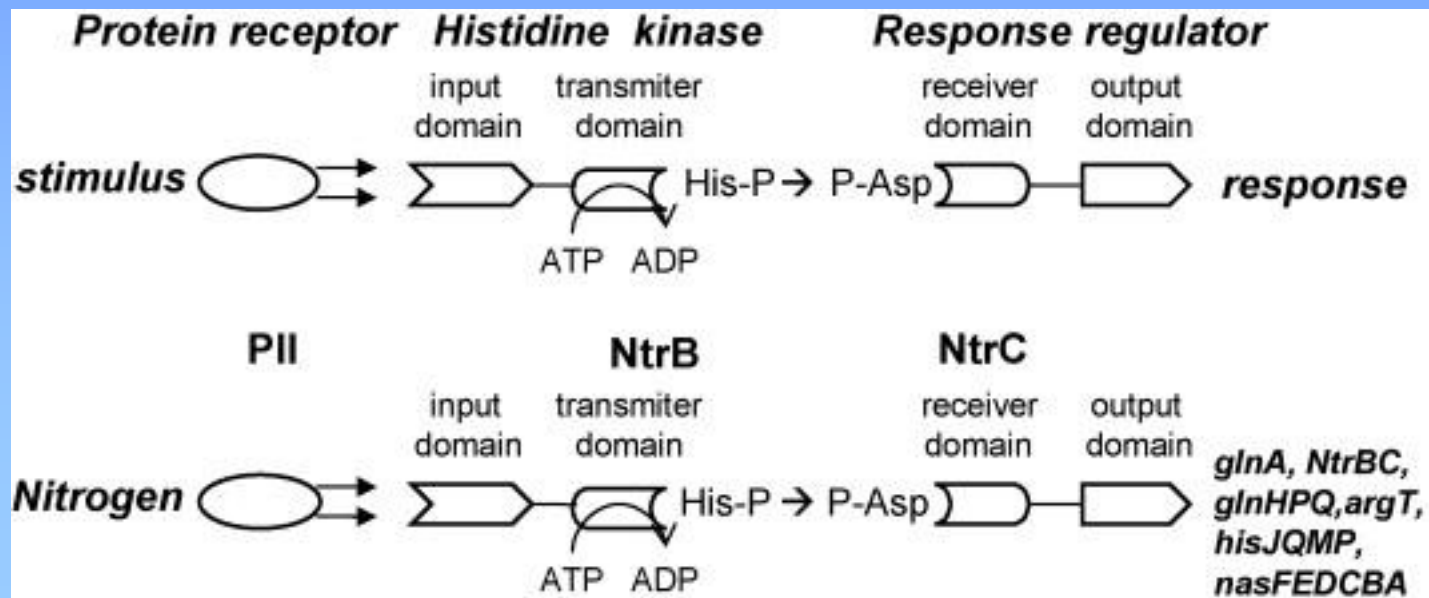


# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Třísložkové systémy

Třísložkové signální systémy (ThCS):

i) Přítomnost nezávislého receptoru, který aktivuje senzovou kinázu

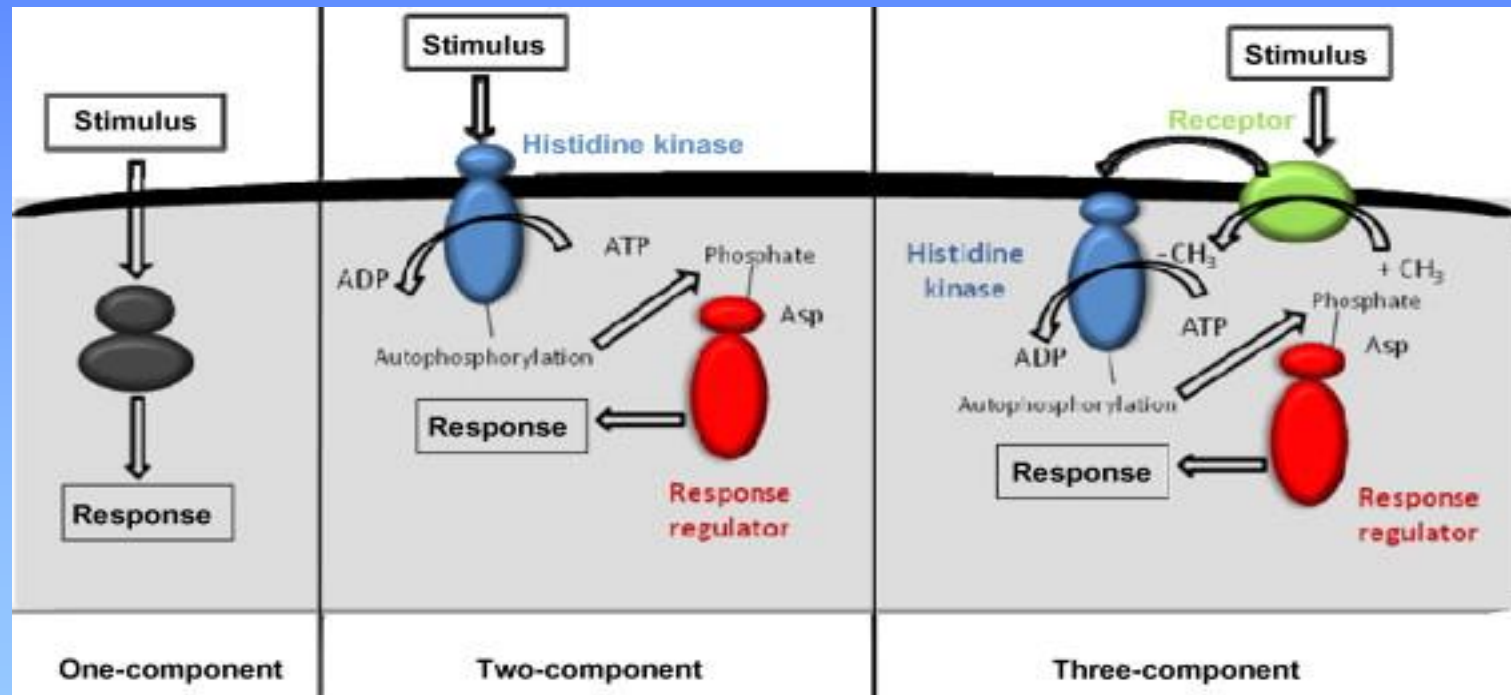


# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Třísložkové systémy

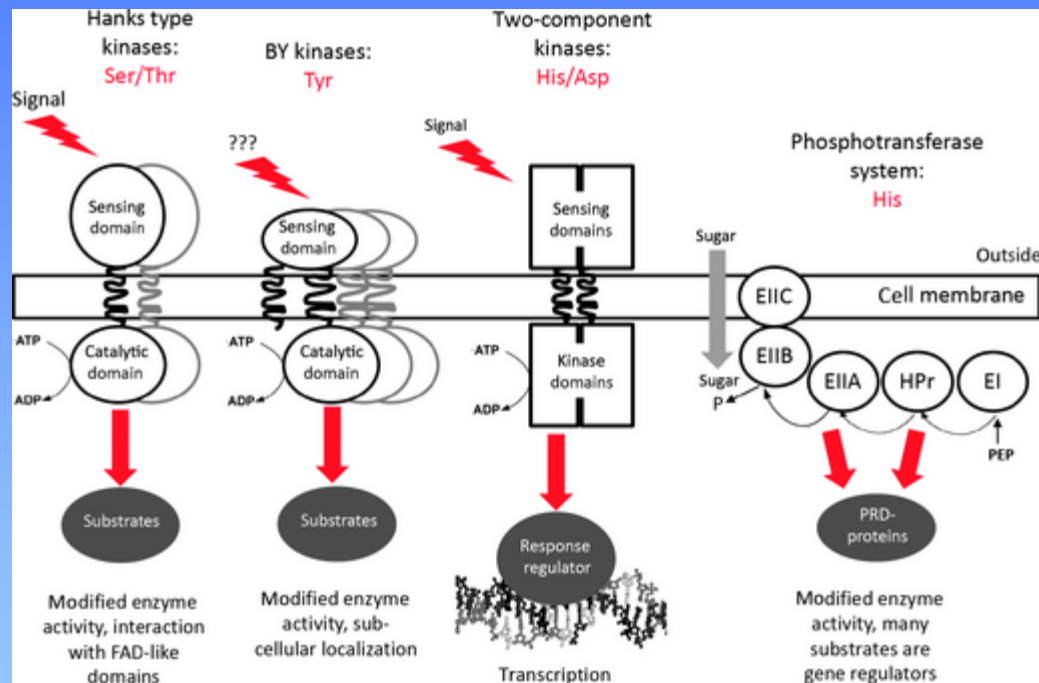
Třísložkové signální systémy (ThCS):

i)



# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## PEP-dependentní fosfotransferázový systém (PTS)



Aktivní transport sacharidů

Donor fosfátové skupiny: PEP

Kaskáda fosforylovaných proteinů na His

# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Bakteriální tyrosinové proteinkinázy

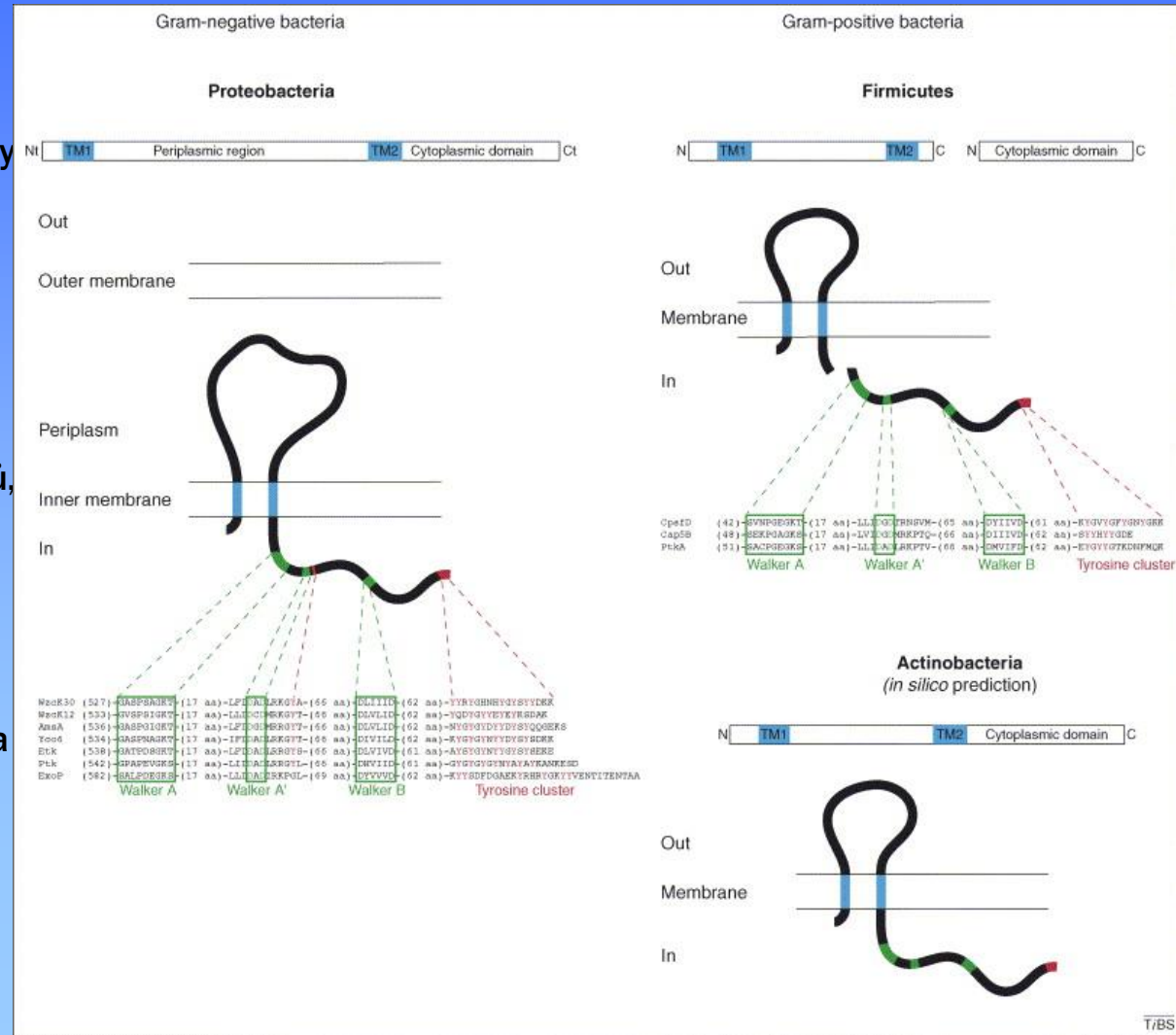
(BY kinázy)

i) unikátní struktura: nemají orthology u Eukarya, modulární struktura

ii) Oligomerní struktury

iii) Funkce: Syntéza exopolysacharidů, metabolismus DNA, subcelulární lokalizace substrátů

iv) Potenciál pro nová bakteriostatika



# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Neobvyklé proteinkinázy

### a) HPr kinasa/fosforylasa

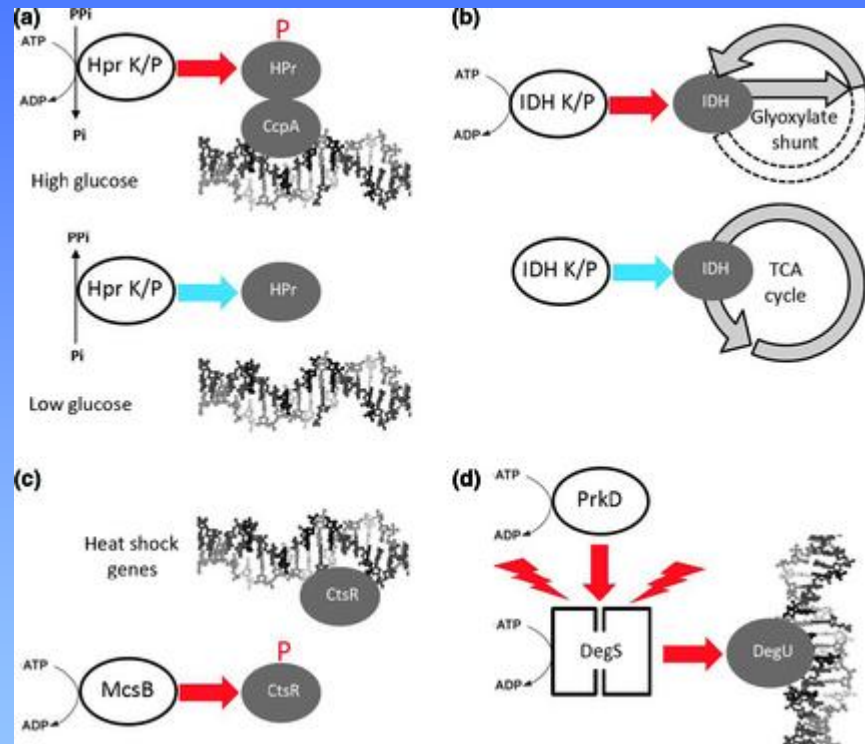
i) Bifunkční enzym

ii) Substrát: protein HPr PTS

iii) Funkce: defosforylační mechanismus - používá Pi jako akceptor fosfátu za vzniku PPI

iv) Funkce: ATP-dependentní fosforylace HPr (Ser) nebo PPI jako donor

v) Interakce HPr~P s globálním regulátorem CcpA – katabolická represe



# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Neobvyklé proteinkinázy

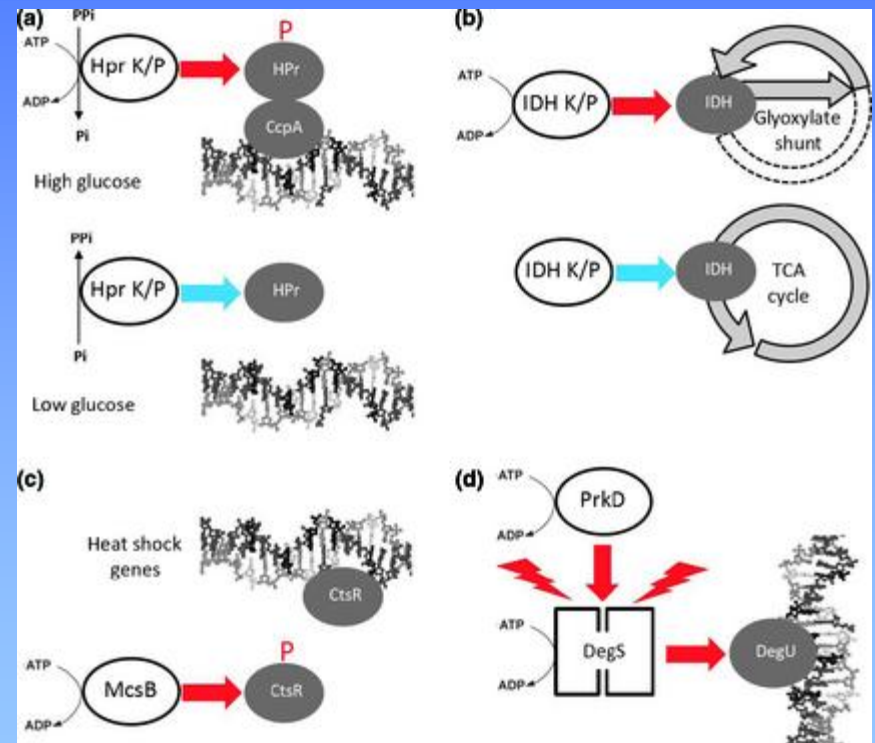
### b) Isocitrát-dehydrogenasa kinasa/fosforylasa AceK

i) Bifunkční enzym

ii) Substrát: isocitrát-dehydrogenasa IDH (TCA cyklus)

iii) Funkce: přepojení TCA cyklu na glyoxylatovou zkratku

iv) Defosforylovaná forma – TCA cyklus



# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Neobvyklé proteinkinázy

### c) Arginin fosfotransferasa McsB *B. subtilis*, Fuhrmann et al., 2009

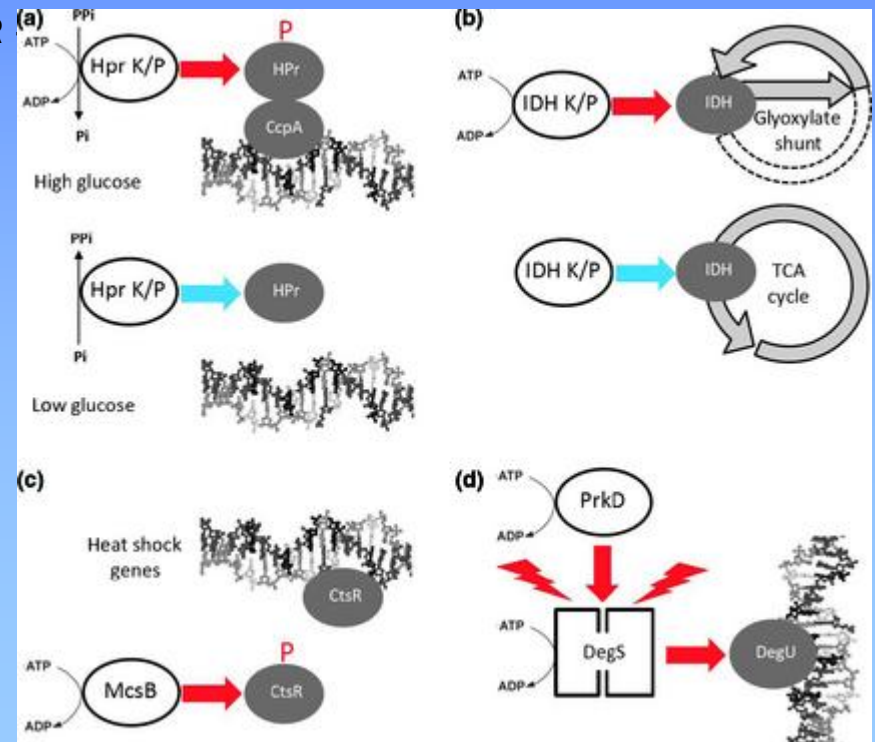
i) Fosforyluje represor genů teplotního šoku

CtsR na argininových zbytcích

ii) Tyto Arg jsou situovány v DNA-vazebné oblasti CtsR jejich fosforylace narušuje interakci represoru

iii) McsB je první popsanou Arg proteinkinásou

iv) V *B. subtilis* identifikovány desítky proteinů: regulace mnoha buněčných procesů: degradace proteinů, motilita, kompetence, stresové odpovědi

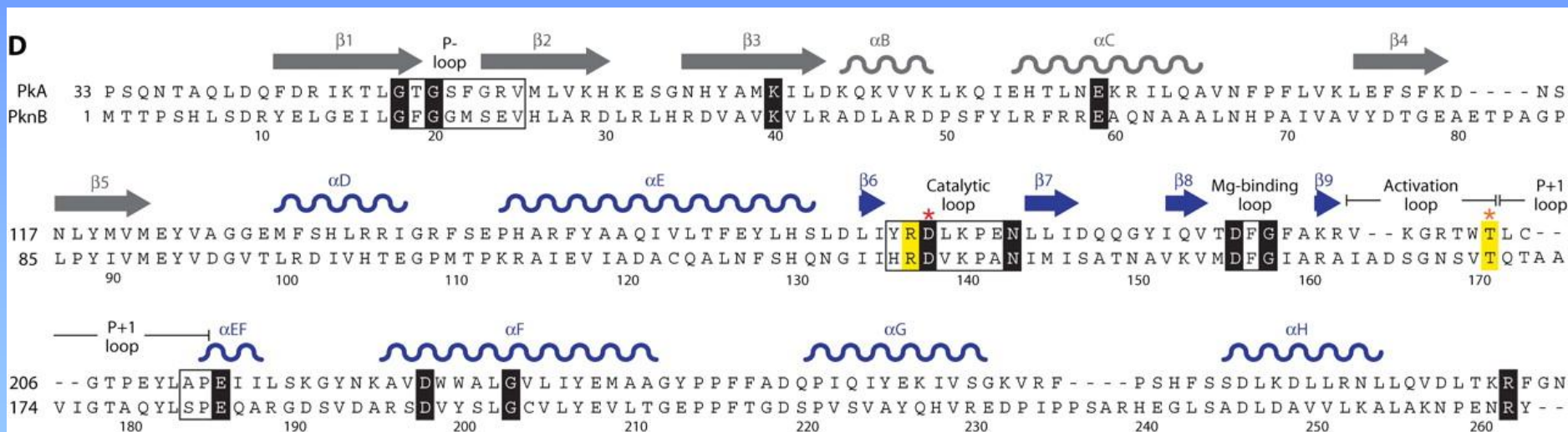


# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Bakteriální Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu (Hanks type)

### Vlastnosti proteinkináz

- i) Mimořádná konzervace molekulární struktury kinázové domény
- ii) Katalytická doména je definovaná přítomností 12 konzervovaných motivů
- iii) a 12 aa zbytků, které se podílejí na prostorové orientaci ATP a substrátu



(D) Primary sequence alignment between the PKA (residues 33 to 283) and PknB (residues 1 to 266) catalytic domains. The N- and C-terminal lobes of PKA are shown in gray and blue, respectively. Conserved motifs are shown in boxes, and the invariant residues are depicted in black. Other important residues are highlighted and/or shown in bold. Red and orange asterisks indicate the catalytic Asp and phosphorylated Thr residues, respectively.  
Pereira et al., 2011

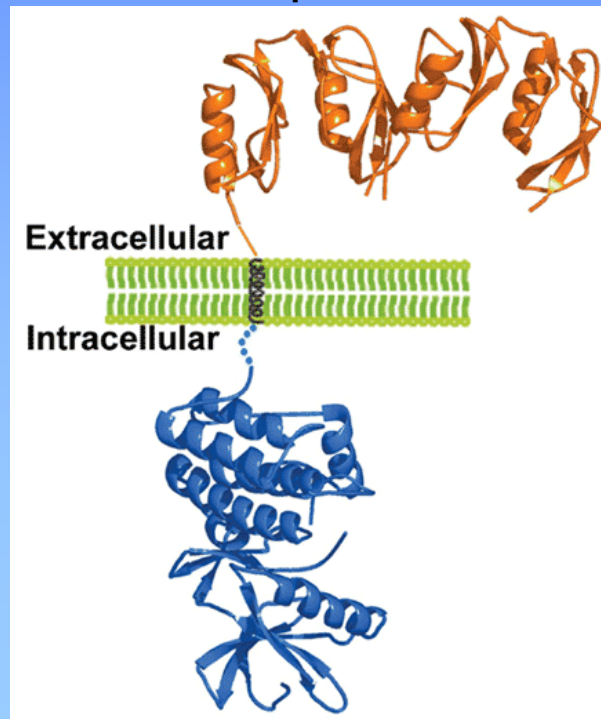


# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Bakteriální Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu (Hanks type)

### Vlastnosti proteinkináz

- i) Katalytická doména je často asociována s přídatnými doménami
- ii) Funkce přídatných domén: enzymatická, vazba ligandu, interakce protein-protein
- iii) Téměř všechny G<sup>+</sup> bakterie obsahují alespoň 1 transmembránovou PK s extracelulární doménou s variabilním počtem tzv. PASTA motivů



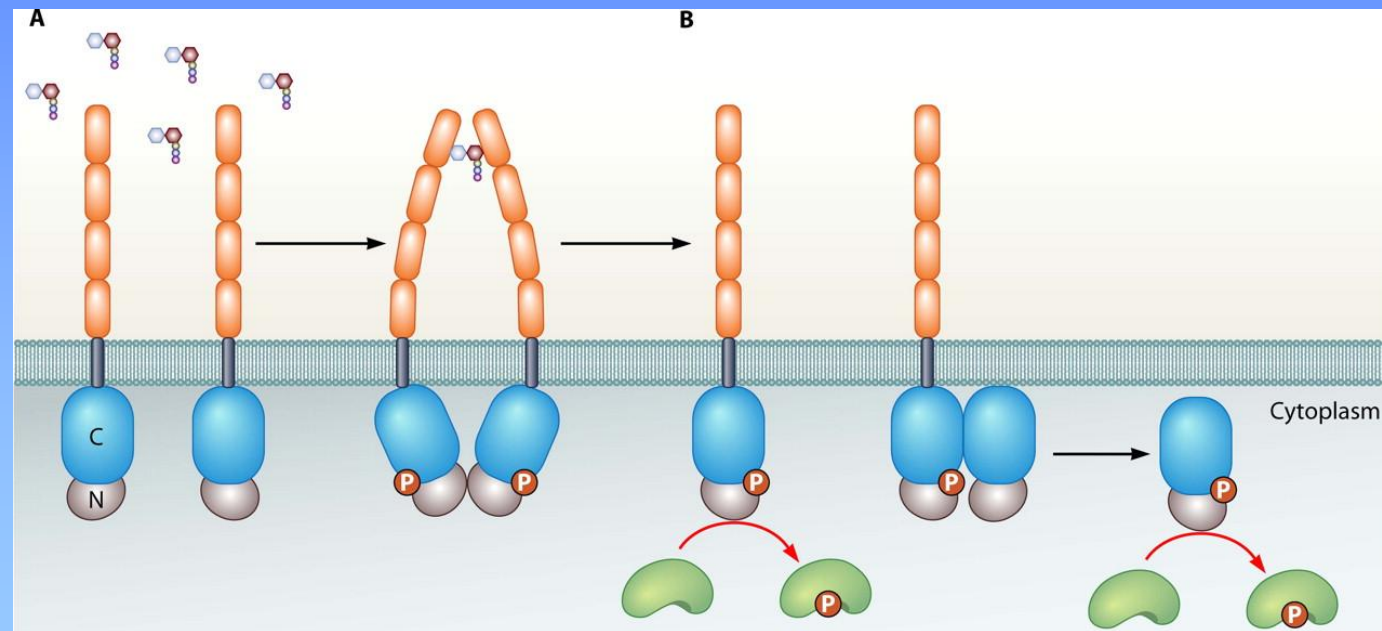
# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Bakteriální Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu (Hanks type)

### Vlastnosti proteinkináz

Aktivace: off-on stav – funkce molekulárního přepínače

- Vazba alosterického efektoru
- Subcelulární lokalizace
- Dimerizace
- Autofosforylace



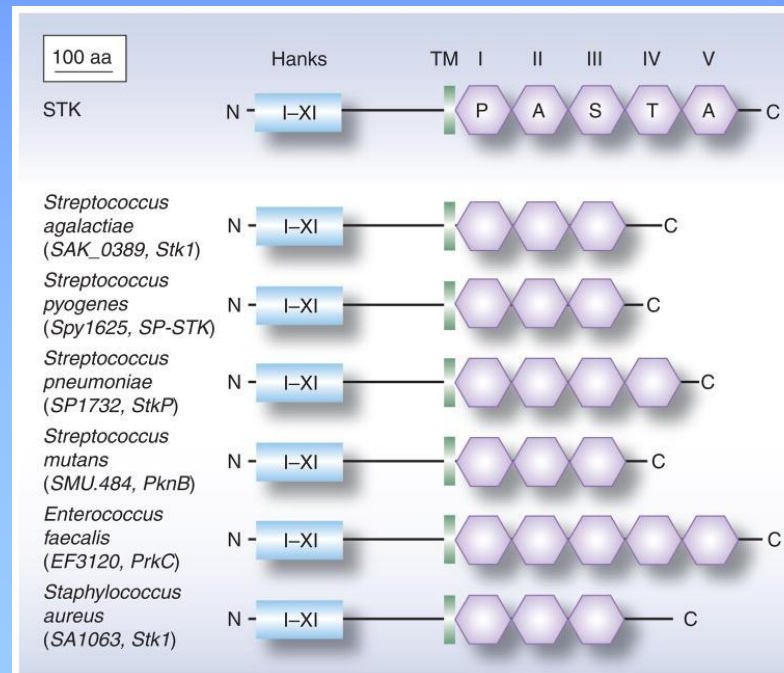
Activation model for eSTKs. (A) In the presence of a ligand, two or more PknB monomers bind to a single ligand molecule through their extracellular domains. This brings the intracellular catalytic domains closer, resulting in the formation of a symmetric back-to-back dimer and in the consequent activation of the kinases by autophosphorylation (see text for details). (B) An activated kinase can directly phosphorylate a downstream protein target or activate a soluble kinase through the formation of an asymmetric front-to-front dimer, which will then phosphorylate downstream targets as part of a signaling pathway

# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Bakteriální Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu (Hanks type)

### Vlastnosti proteinkináz

- i) Extracelulární doména PASTA (penicillin binding protein and Ser/Thr kinase -associated) – zejména u G+ bakterií
- ii) Trojrozměrná struktura PASTA domény – PBP2X *S. pneumoniae* – vazba  $\beta$ -laktamového antibiotika cefuroximu
- iii) Počet PASTA domén je variabilní:

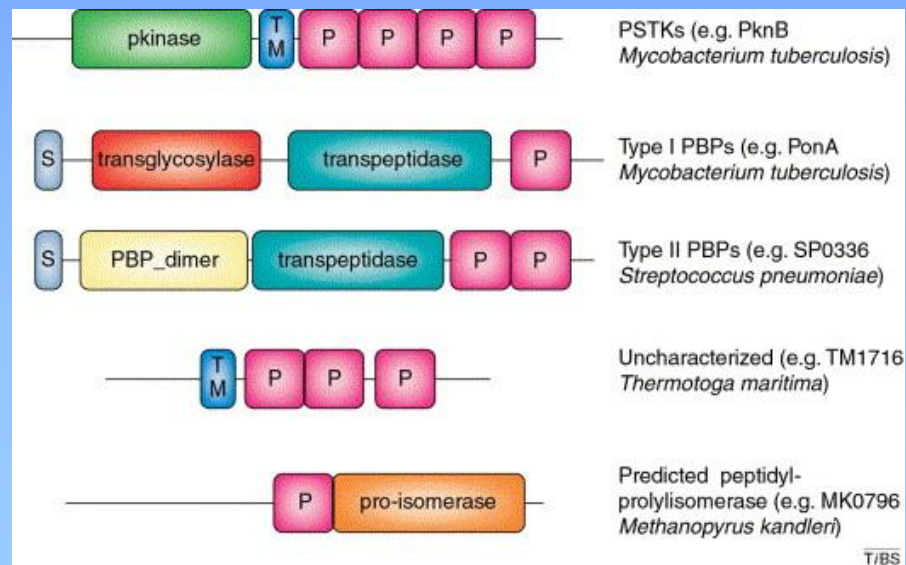


# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Bakteriální Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu (Hanks type)

### Vlastnosti proteinkináz

- iv)  $\beta$ -laktamový kruh je analogní s volnou molekulou peptidoglykanu- hypotéza o subjednotce peptidoglykanu jako ligandu PASTA domén bakteriálních STK (D-Ala-D-Ala motiv stem peptidu PGN)



# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Bakteriální Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu (Hanks type)

### Vlastnosti proteinkináz

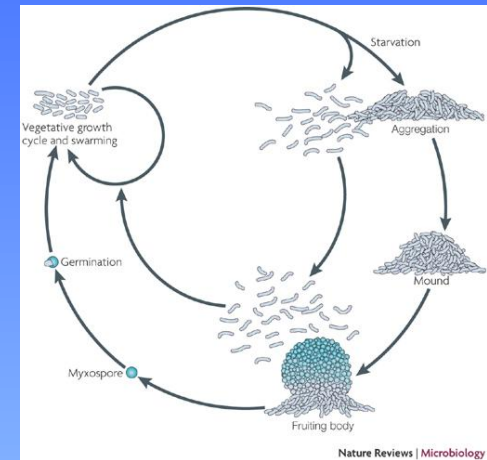
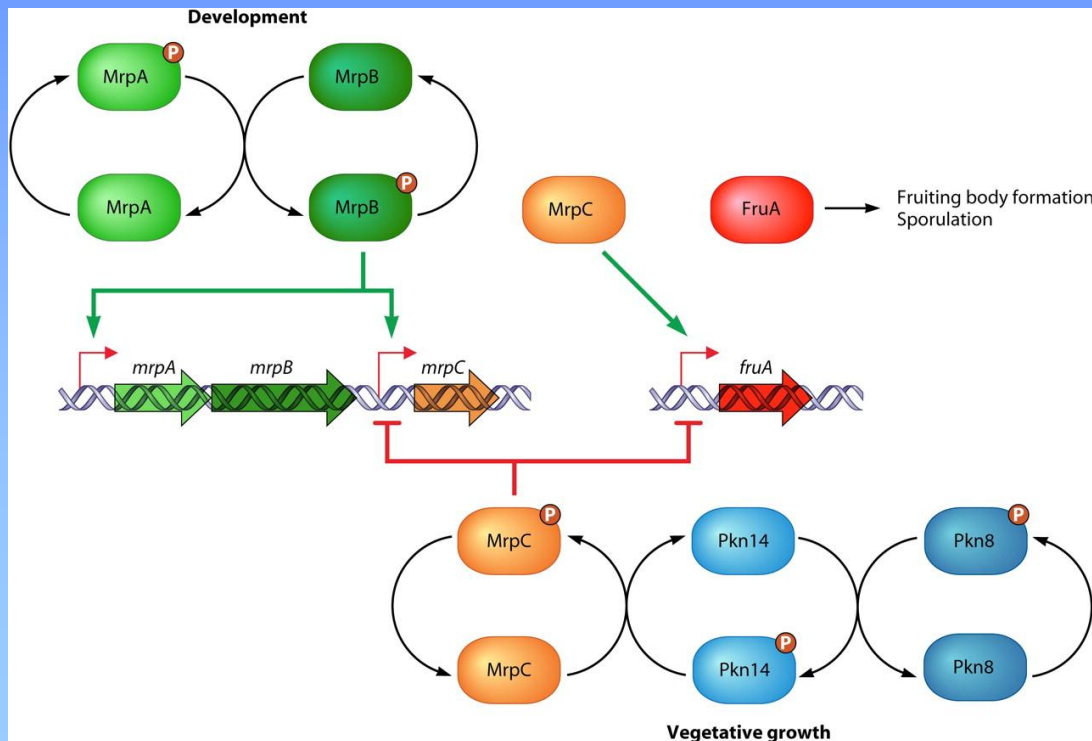
- Rozšíření: pkn1 *M. xanthus* (Munoz.Dorado et al, 1991)
- Redundance (zvláště u diferencujících druhů) *Myxococcus* (>100), *Streptomyces* (>30), *Mycobacterium* (11) – substrátová promiskuita
- sekvenčně homologní s eukaryotickými enzymy
- Cross-talk mezi TCS a STPK (fosforylace transkripčních faktorů)
- Funkce: odvozena od analýzy mutantů:
  - i) regulace vývojových procesů (diferenciace, germinace)
  - ii) stresová odpověď (senzitivita)
  - iii) tvorba biofilmu
  - iv) sekundární metabolismus (biosyntéza atb)
  - v) regulace buněčného dělení (aberrantní morfologie mutantů)
  - vi) regulace virulence (*Yersinia*, *M. tuberculosis*, streptococci, *P. aeruginosa*)

# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

Bakteriální Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu (Hanks type)

Funkce proteinkináz

i) regulace vývojových procesů: diferenciace hlenky *Myxococcus xanthus*



FruA – klíčový transkripční faktor pro tvorbu plodničky a sporulaci

MrpC – kontrola exprese FruA

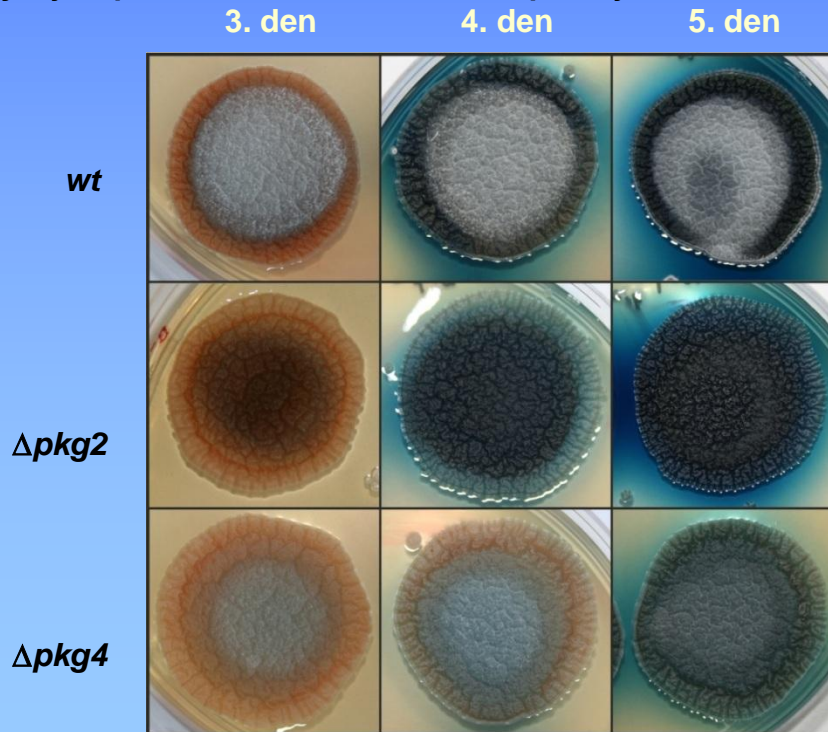
duální regulace Pkn8/Pkn14  
STK signální kaskádou s  
MrpA/MrpB TCS

# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Bakteriální Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu (Hanks type)

### Funkce proteinkináz

- i) regulace vývojových procesů: germinace *Bacillus subtilis*: peptidoglykan jako efektor signální dráhy proteinkinasy PrkC vedoucí ke germinaci spor
- ii) regulace vývojových procesů: diferenciaci *Streptomyces coelicolor*



modifikovaný R3 agar (mR3 agar)

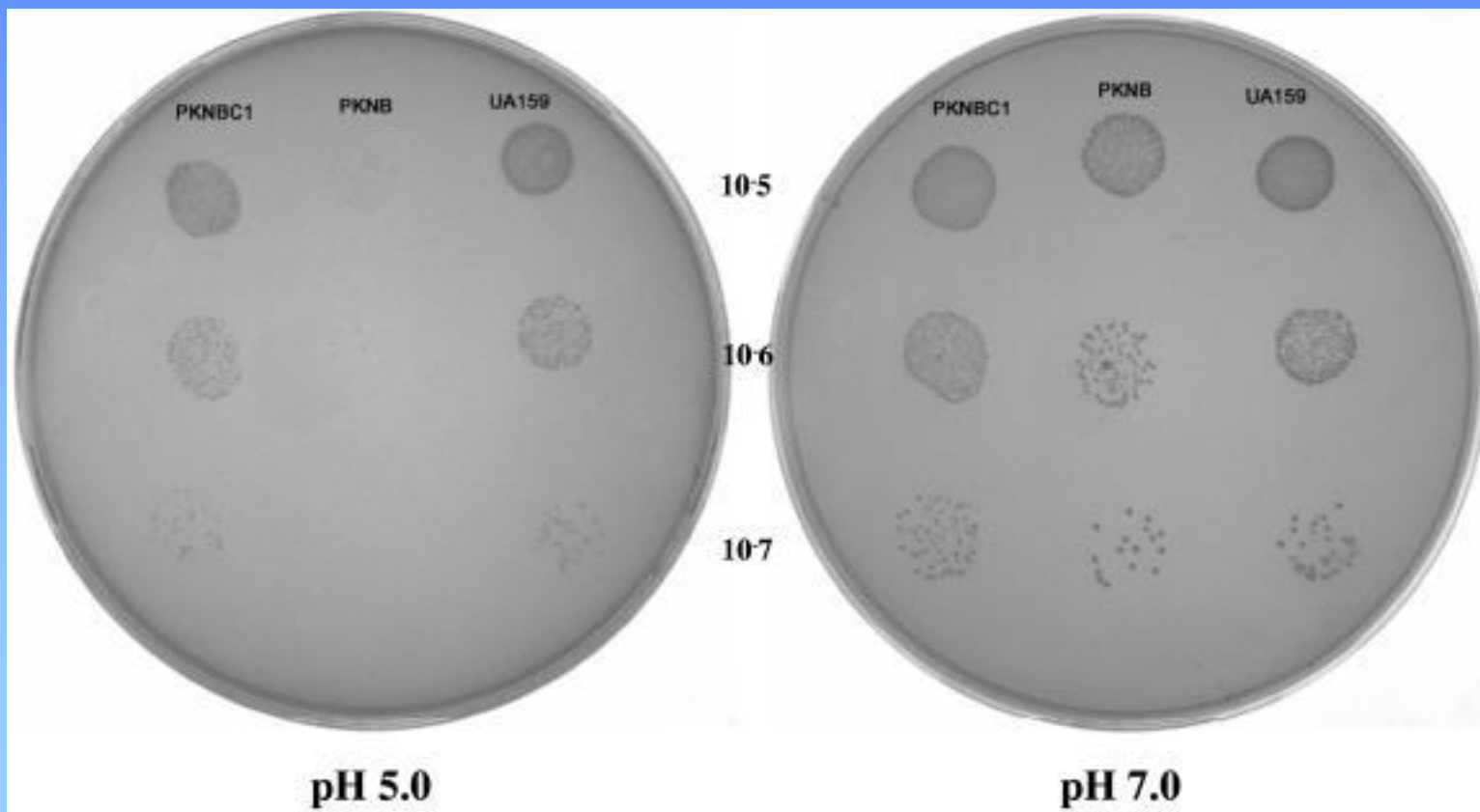
# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

Bakteriální Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu (Hanks type)

Funkce proteinkináz

iii) Regulace stresové odpovědi

*Streptococcus mutans*





# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

Bakteriální Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu (Hanks type)

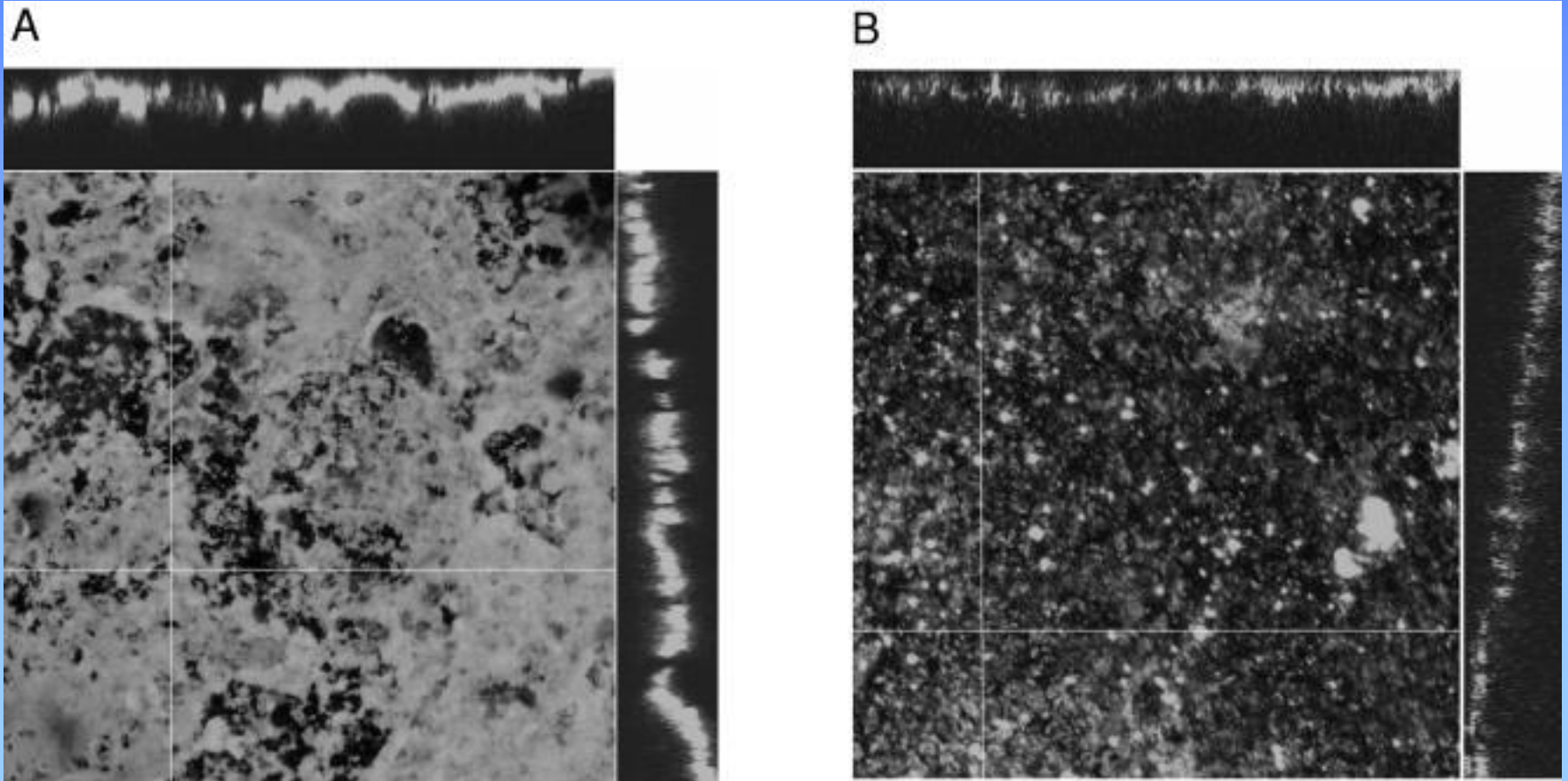
Funkce proteinkináz

iii) Tvorba biofilmu

*wt*

*Streptococcus mutans*

*pknB*

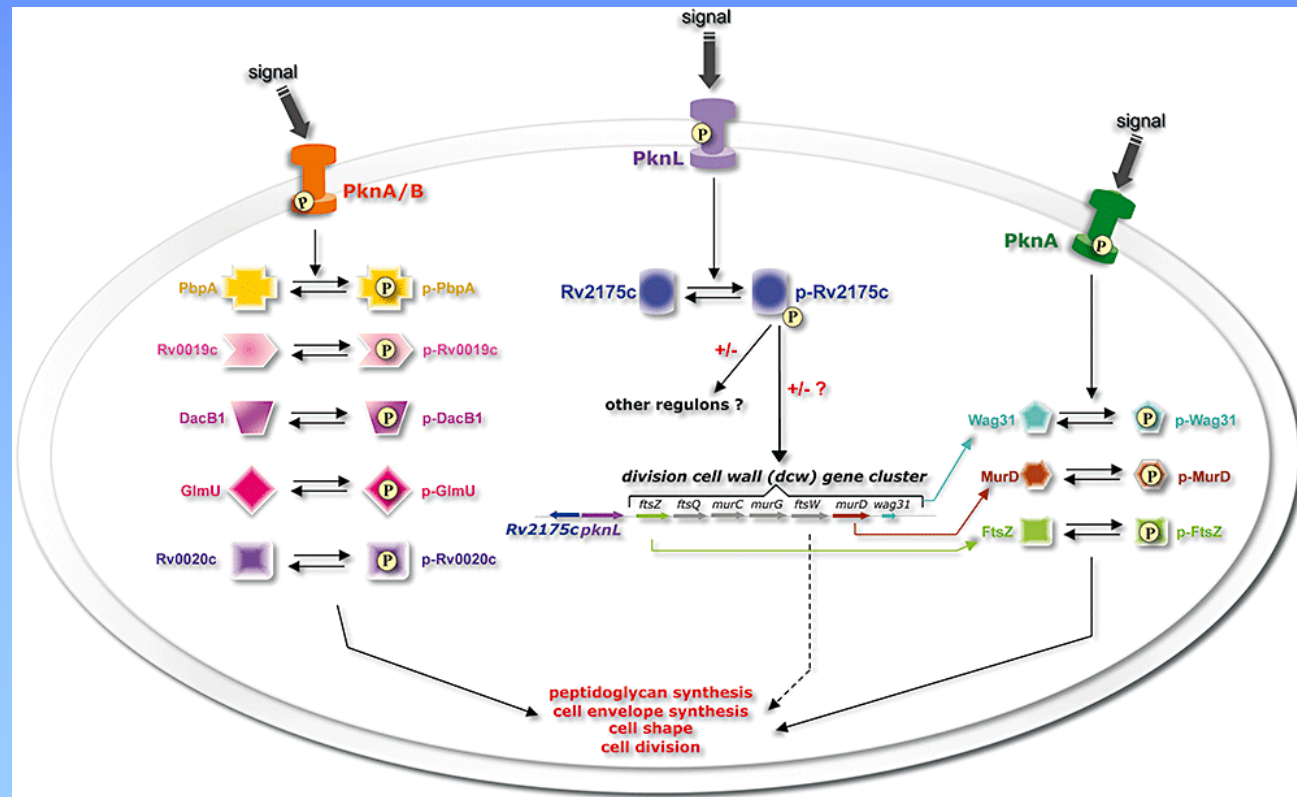


# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

Bakteriální Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu (Hanks type)

Funkce proteinkináz

v) Regulace buněčného dělení a biosyntézy buněčné stěny



# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

Bakteriální Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu (Hanks type)

## Funkce proteinkináz

vi) Regulace virulence:

**Yersinia pseudotuberculosis:** historicky první popsaná PK esenciální pro virulenci, YpkA je aktivovaná po sekreci do hostitelské buňky, disrupce cytoskeletu, inhibice funkce makrofágů

**Staphylococcus aureus:** PknB je sekretována do externího prostředí, potenciál fosforylace proteinů hostitele

**Mycobacterium tuberculosis:** pravděpodobná účast na regulaci dormantního stavu

# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Bakteriální Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu (Hanks type)

### Substráty proteinkináz

- Fosfoproteomika: i) 2-D gel approach  
ii) gel-free approach
- substráty Ser/Thr proteinkináz: široké spektrum proteinů:
- biosyntéza buněčné stěny (MurC, MurD, GlmM, PBP)
- buněčné dělení (FtsZ, DivIVA)
- transkripční regulace (RitR, CovR, EmbR)
- translační faktory (EF-Tu, EF-Ts)
- ribozomální proteiny
- chaperony (GroEL)
- základní metabolické dráhy (enzymy glykolýzy)

Většina substrátů byla identifikována v *in vitro* podmínkách: pravděpodobnost výskytu tzv. sekundárních fosforylačních míst

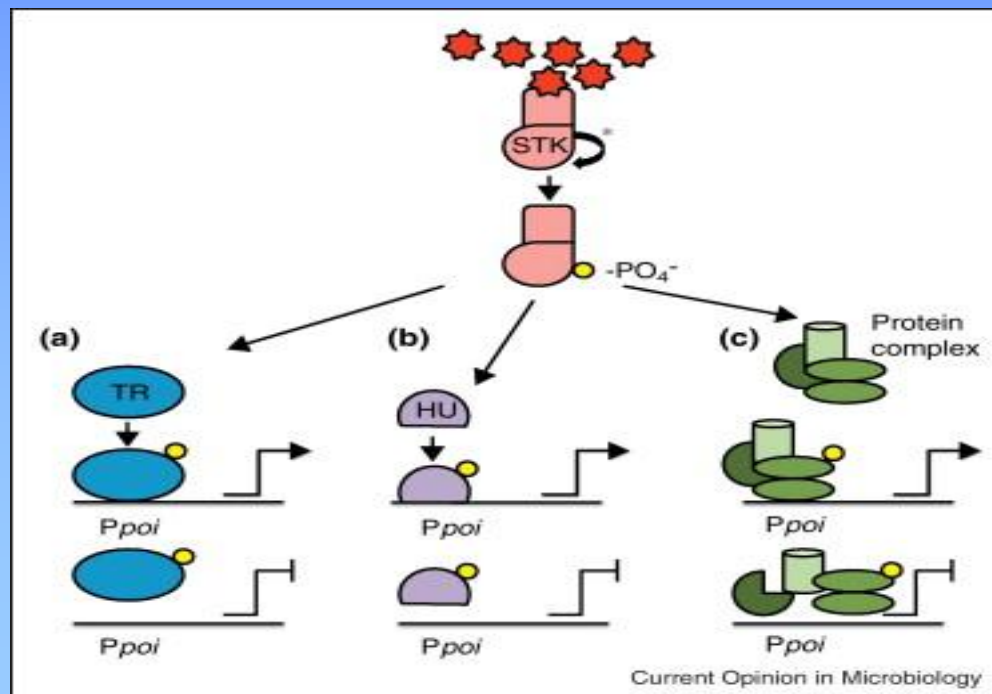
Vliv fosforylace na funkci a aktivitu jednotlivých proteinů studován výjimečně

# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

Bakteriální Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu (Hanks type)

Transkripční regulace pomocí proteinkináz

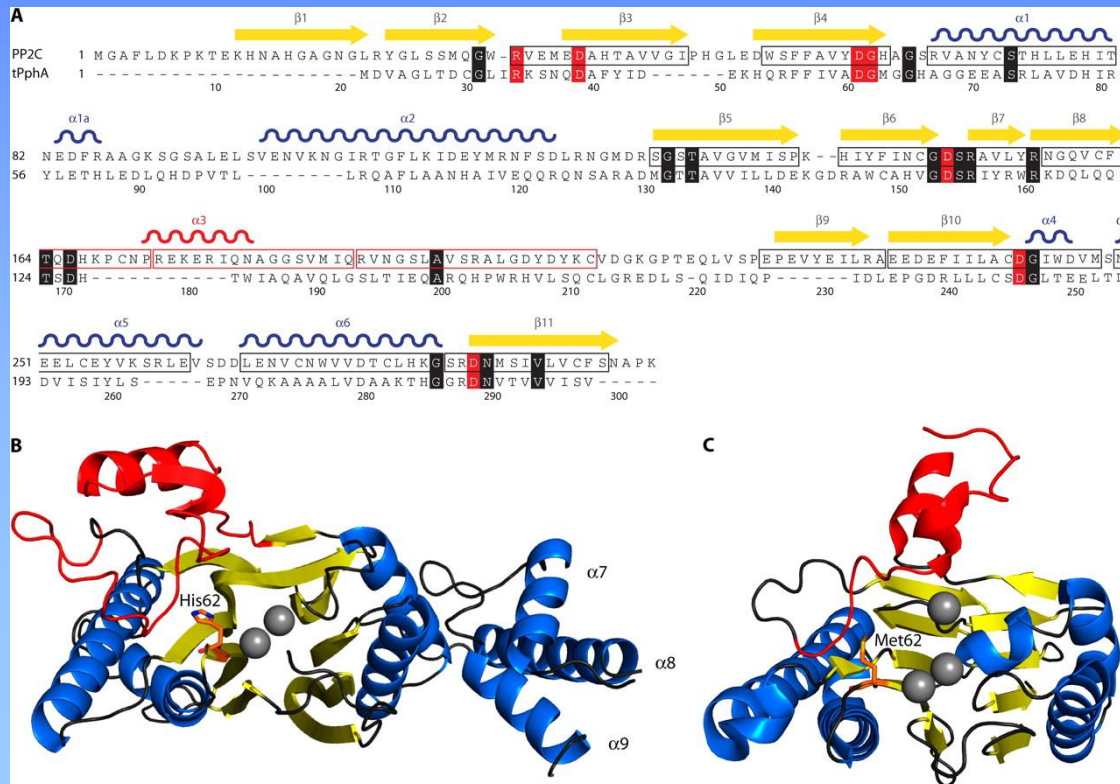
- i) Interakce proteinkináz s transkripčními regulátory TCS a transkripčními faktory
- ii) Interakce proteinkináz s histon-like (HU) proteiny
- iii) Interakce se složkami transkripčního/translačního systému



# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

## Bakteriální Ser/Thr proteinfosfatázy eukaryotického typu

- i) Rodina PP2C: 11-13 konzervovaných motivů
- ii) Většinou 1 eSTP/1 eSTK, výjimka např. *M. tuberculosis*
- iii) Funkce málo prozkoumány, defosforylace substrátů včetně kognátní kinázy



# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

Bakteriální Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu

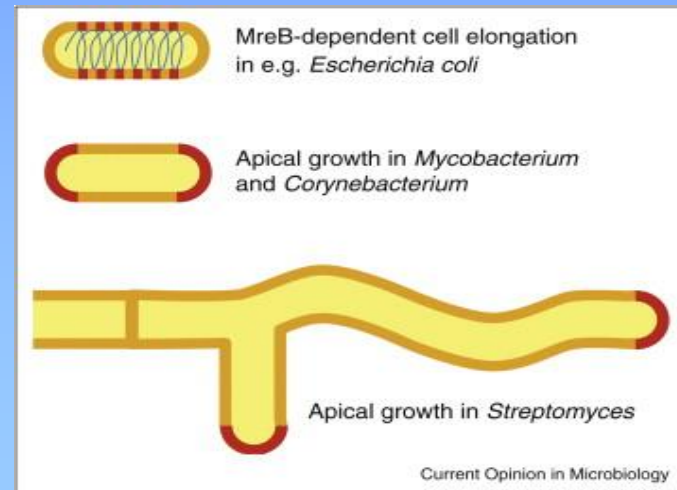
Příklad vlivu fosforylace na buněčnou funkci: DivIVA *Streptomyces coelicolor*

AfsK reguluje polární růst a větvení hyf *S. coelicolor*

DivIVA: protein buněčného dělení, tvar buňky, biosyntéza septa, segregace chromozómů; lokalizace: septum, buněčné póly, oligomerizace, interakce s jinými proteiny bun. dělení

Růst tyčinkovitých bakterií (*E. coli*, *B. subtilis*) – interkalace PG v laterální b. stěně: proces je řízen proteinem MreB

Růst streptomycet – apikální růst a větvení hyf: proces řízen DivIVA, který je lokalizován ve špičkách hyf



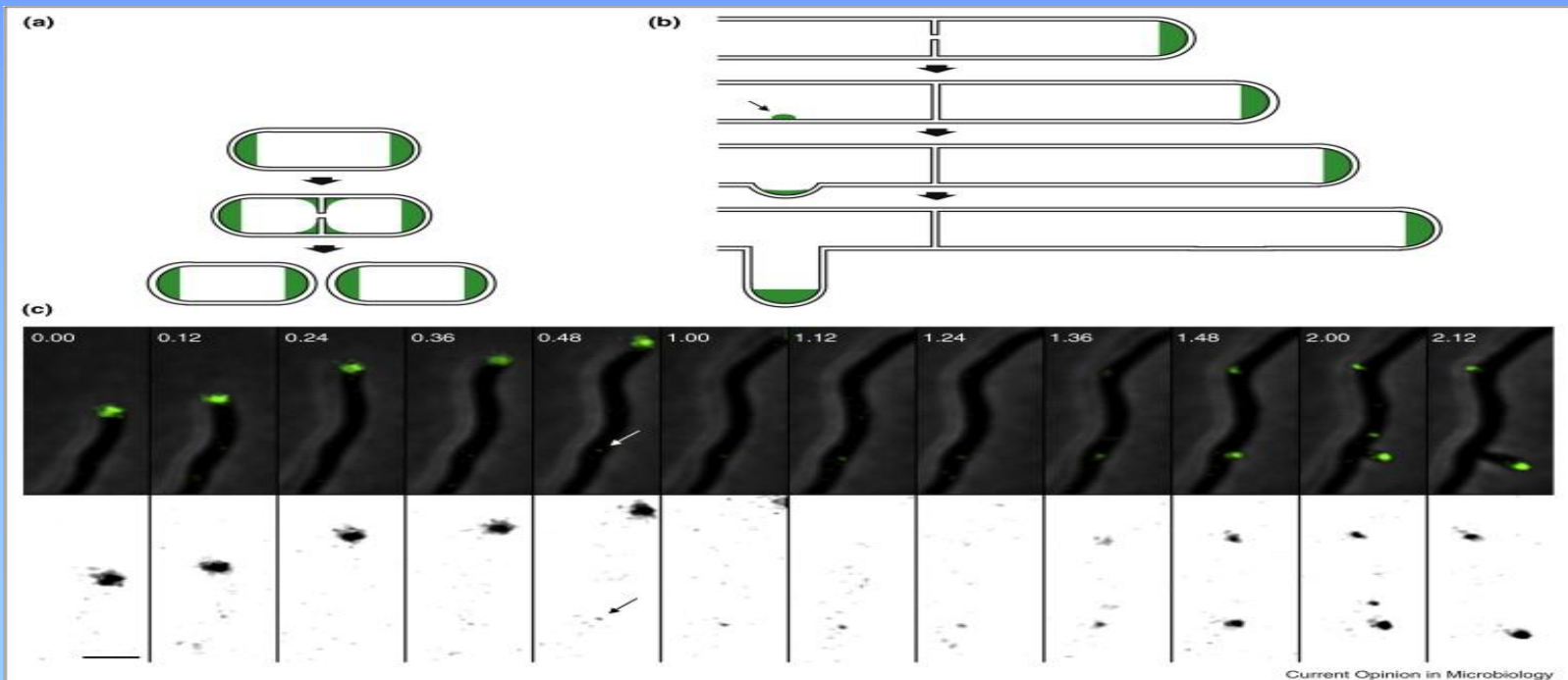
# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

Bakteriální Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu

Příklad vlivu fosforylace na buněčnou funkci: DivIVA *Streptomyces coelicolor*

DivIVA je esenciální, lokalizace - špičky hyf a místa větvení, overexprese je postačující k tomu, aby došlo k hypervětvění hyf -

DivIVA je klíčovou determinantou polárního růstu *Streptomyces*, vytváří apikální multiproteinový komplex tzv. bakteriální polarisom





# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

Příklad vlivu fosforylace na buněčnou funkci: DivIVA *Streptomyces coelicolor*

Interference antibiotika se syntézou buněčné stěny indukuje fosforylací DivIVA:

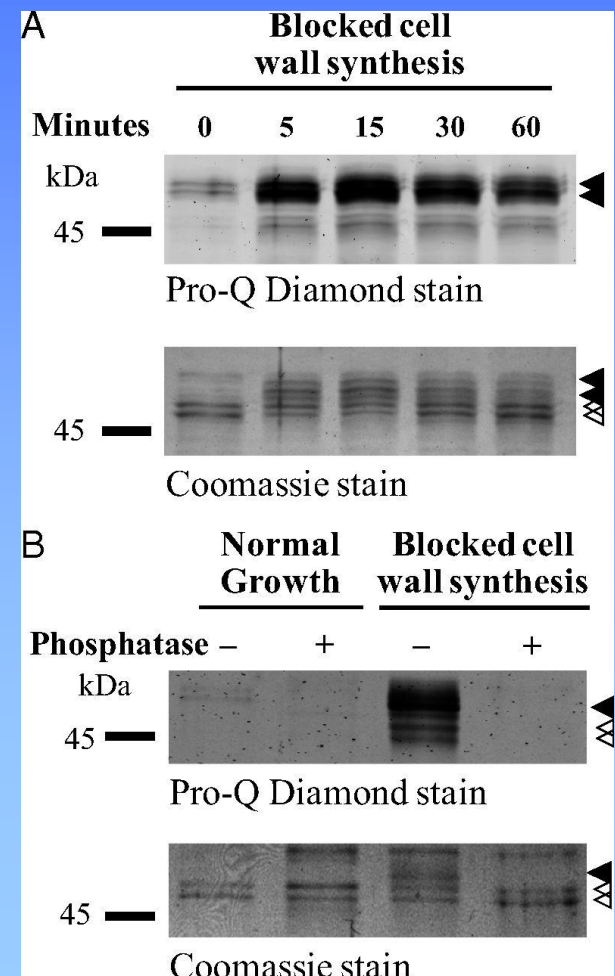
Bacitracin blokuje syntézu buněčné stěny a indukuje změnu mobility DivIVA

Posun mobility proteinu může být způsoben posttranslační Modifikací

Pro-Q Diamond detekuje fosforylované proteiny

Bazální hladina fosforylace během vegetativního růstu

Intenzivní fosforylace DivIVA během blokace biosyntézy b. stěny

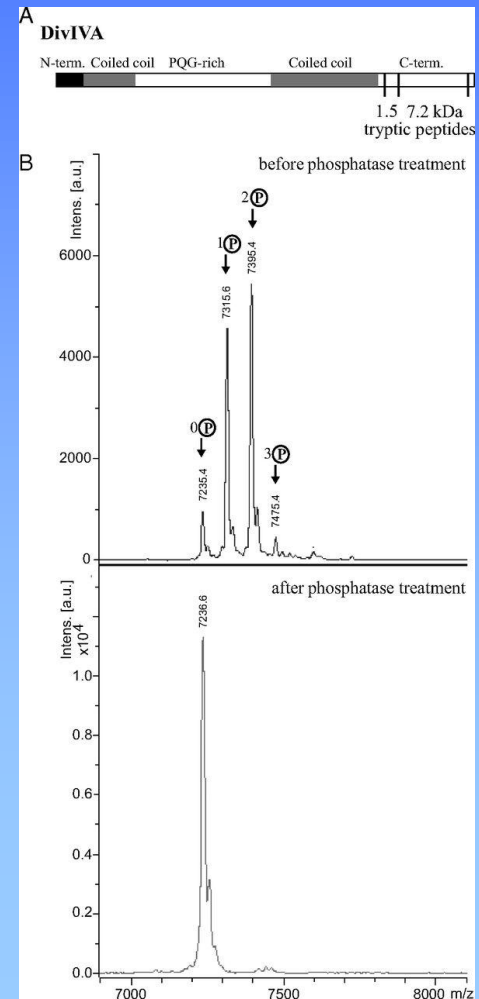


# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

Příklad vlivu fosforylace na buněčnou funkci: DivIVA *Streptomyces coelicolor*

C-terminální oblast DivIVA je místem mnohočetné fosforylace:

MS analýza tryptických peptidů DivIVA prokázala přítomnost četných fosfátových zbytků v C-terminální oblasti proteinu



# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

Příklad vlivu fosforylace na buněčnou funkci: DivIVA *Streptomyces coelicolor*

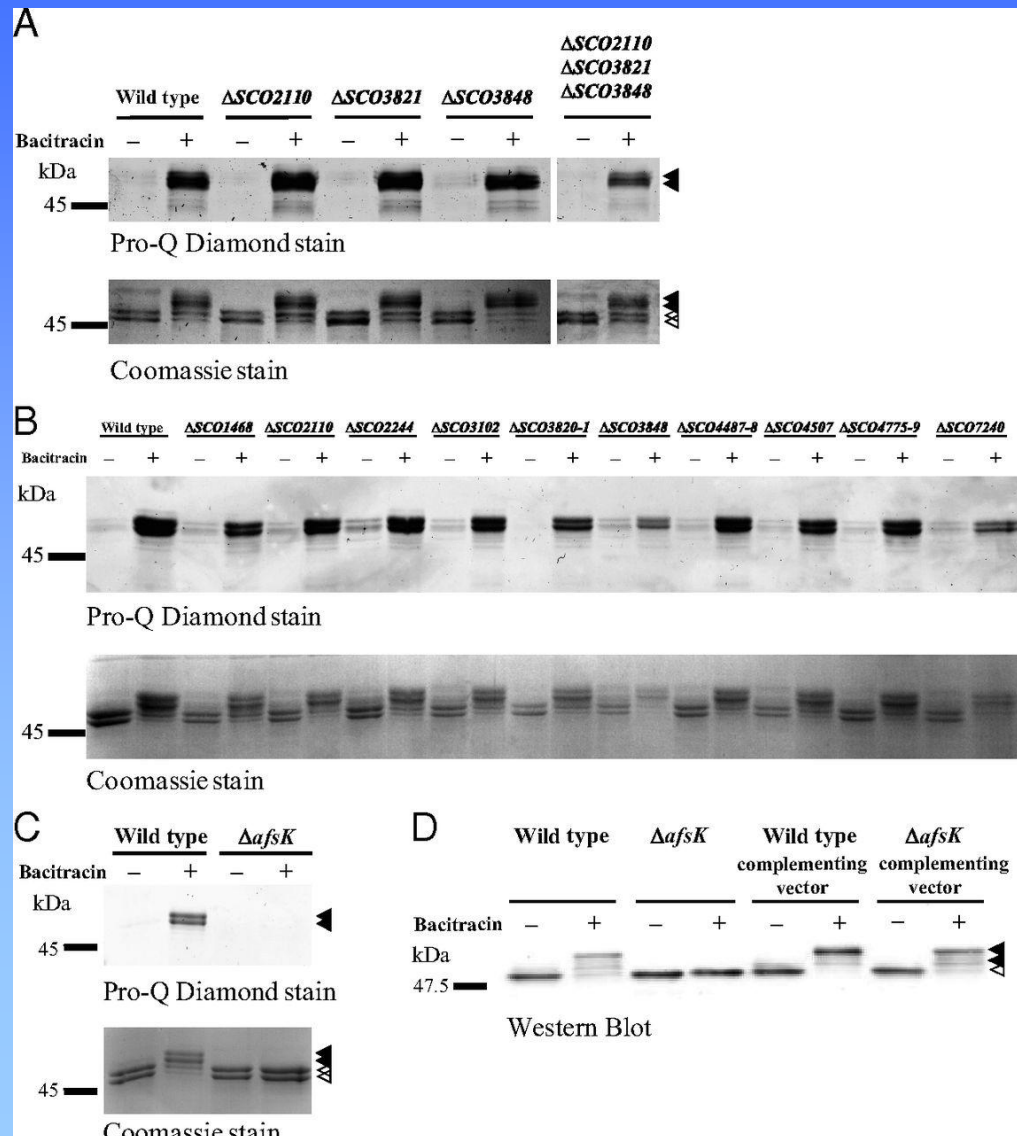
Proteinkináza AfsK fosforyluje DivIVA:

A. Fosforylační stav DivIVA v mutantech s inaktivovanými geny STK obsahujícími PASTA

B. Fosforylační stav DivIVA s delecemi dalších genů STK

C. Fosforylační stav DivIVA kmene s delecí proteinkinázy AfsK

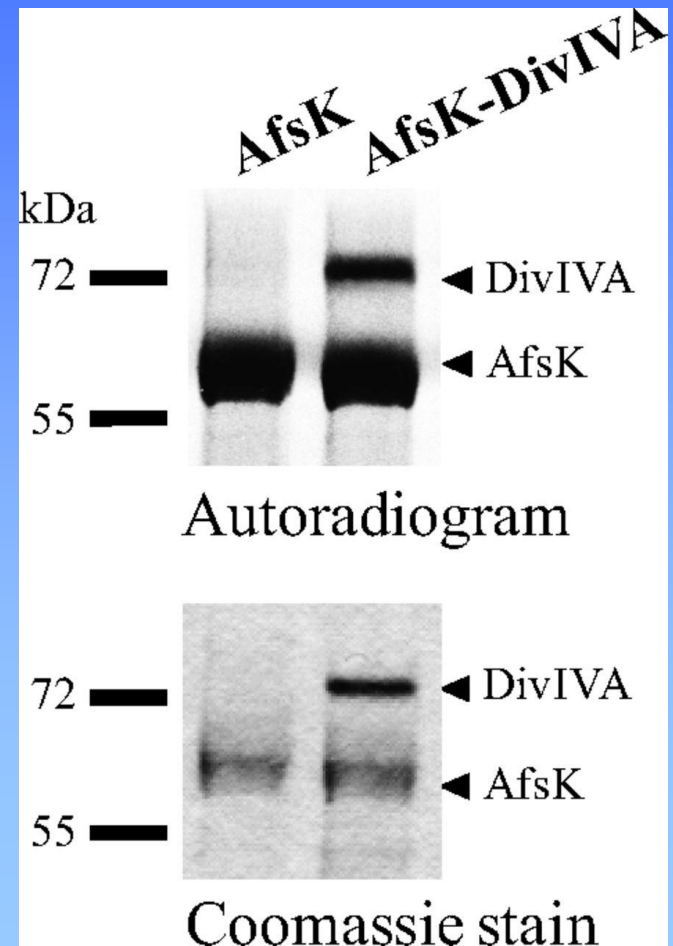
D. Fosforylační stav DivIVA komplementovaného kmene s delecí genu AfsK



# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

Příklad vlivu fosforylace na buněčnou funkci: DivIVA *Streptomyces coelicolor*

Fosforylace in vitro DivIVA proteinkinázou AfsK:

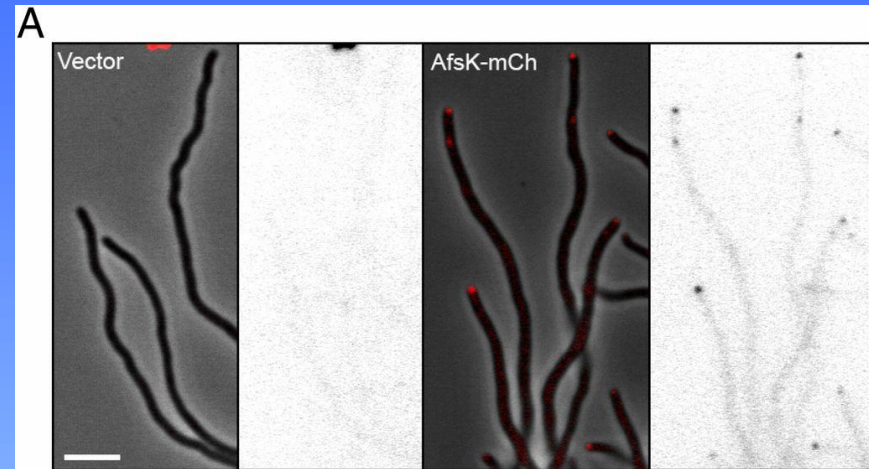


# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

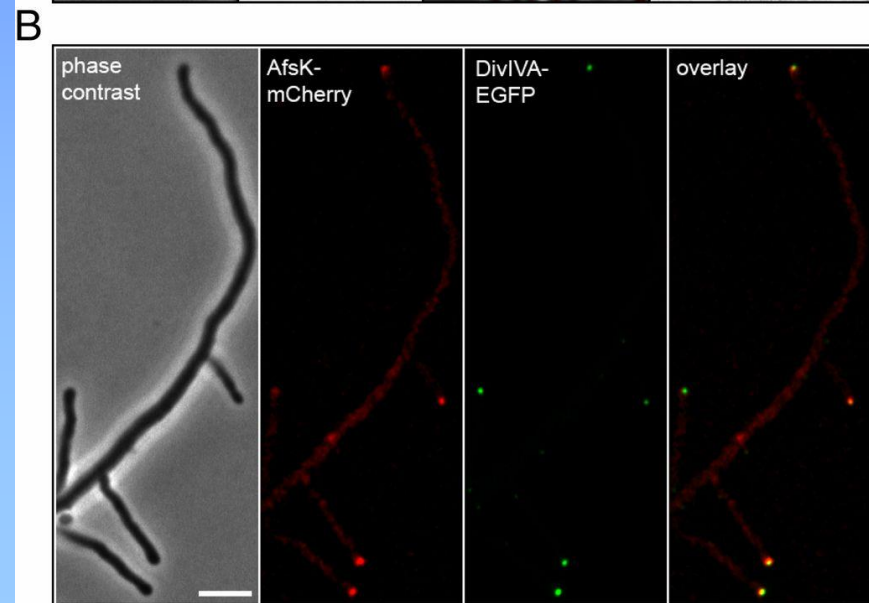
Příklad vlivu fosforylace na buněčnou funkci: DivIVA *Streptomyces coelicolor*

Proteinkináza AfsK kolokalizuje s DivIVA na špičkách rostoucích hyf:

## A. Buněčná lokalizace AfsK



## B. Kolokalizace AfsK a DivIVA

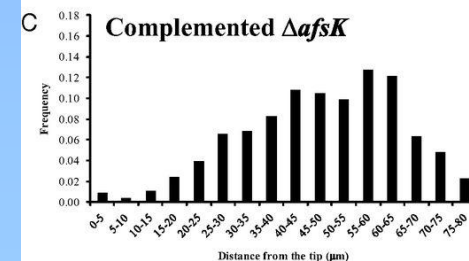
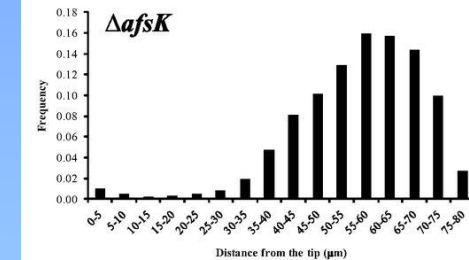
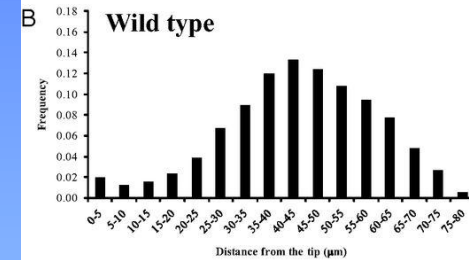
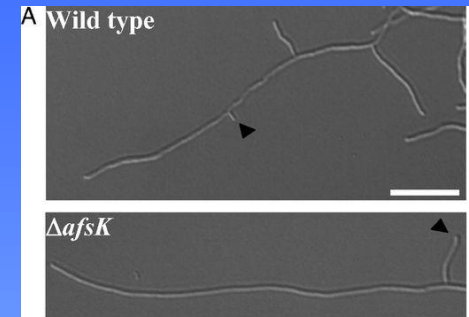


# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

Příklad vlivu fosforylace na buněčnou funkci: DivIVA *Streptomyces coelicolor*

Proteinkináza AfsK reguluje větvení rostoucích hyf:

A. Mutant AfsK prokazuje méně četné větvení hyf



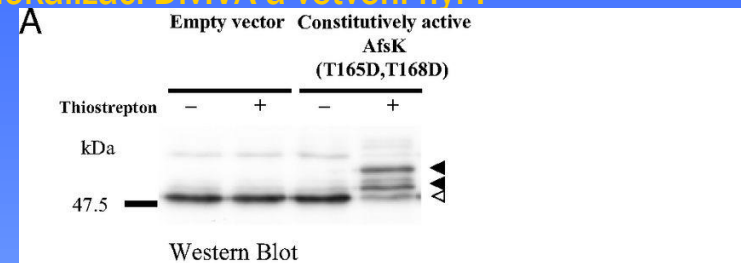
B. Histogramy četnosti vzdáleností větvení hyf od konců (špiček) hyf

# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

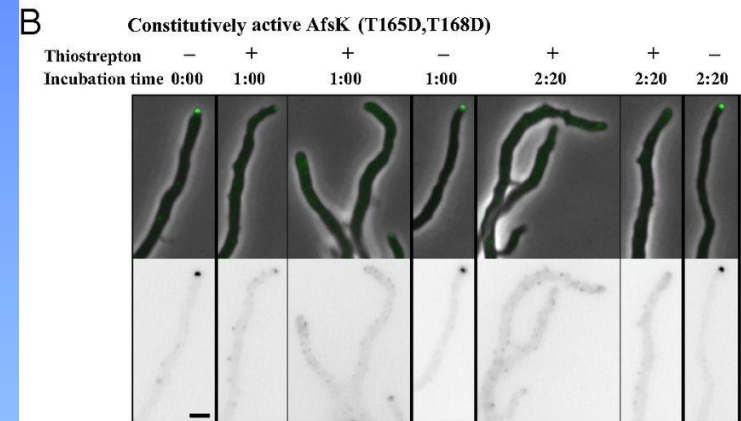
Příklad vlivu fosforylace na buněčnou funkci: DivIVA *Streptomyces coelicolor*

Konstitutivně aktivní proteinkináza AfsK ovlivňuje apikální růst, lokalizaci DivIVA a větvení hyf :

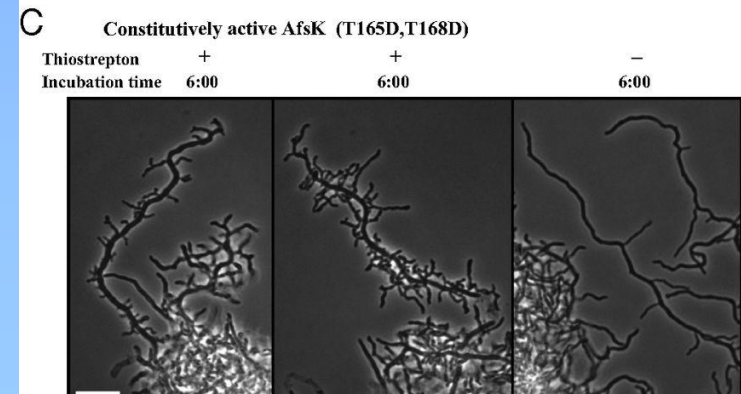
A. Inducibilní exprese konstitutivně aktivní AfsK vede k fosforylaci DivIVA



B. Inducibilní exprese konstitutivně aktivní AfsK vede k delokalizaci DivIVA z vrcholů hyf



C. Inducibilní exprese konstitutivně aktivní AfsK vede k hypervětvění hyf.



# Přenos signálu reverzibilní fosforylací proteinů

Příklad vlivu fosforylace na buněčnou funkci: DivIVA *Streptomyces coelicolor*

Duální role proteinkinázy AfsK:

- i) Během vegetativního růstu kontroluje větvení hyf a vznik dceřiných polarisomů
- ii) Inhibice biosyntézy buněčné stěny má za následek aktivaci AfsK a fosforylaci substrátu DivIVA: ta má za následek delokalizaci DivIVA, inhibici růstu vrcholů hyf a jejich větvení.
- iii) Obecně lze říci, že komunikace mezi determinantou buněčné polarity DivIVA a biosyntetickým aparátem buněčné stěny je dvousměrná:
  - 1) DivIVA určuje místo biosyntézy buněčné stěny
  - 2) Biosyntetický aparát komunikuje zpět k DivIVA prostřednictvím fosforylace AfsK

