

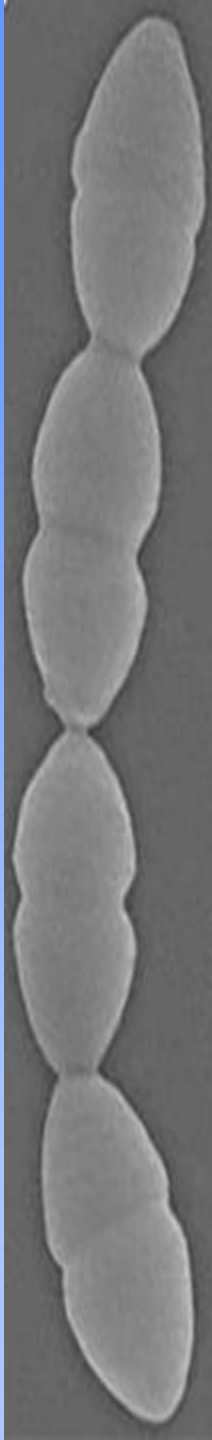
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Modelový organismus: *Streptococcus pneumoniae*

- Gram-pozitivní extracelulární lidský patogen
- virulentní formy způsobují neinvazivní infekce: záněty nosohltanu, zánět středního ucha nebo invazivní infekce: pneumonie, endokarditida, meningitidy, sepse
- v nevirulentní formě kolonizuje horní cesty dýchací (komensál)
- hlavními virulenčními faktory jsou polysacharidové pouzdro (90 serotypů), neuraminidáza (exoglykozidáza) a pneumolyzin (cytoplazmatický toxin)
- přirozená kompetence pro genetickou transformaci

časné kompetenční geny – regulace navození stavu kompetence

pozdní kompetenční geny – příjem cizorodé DNA a rekombinace

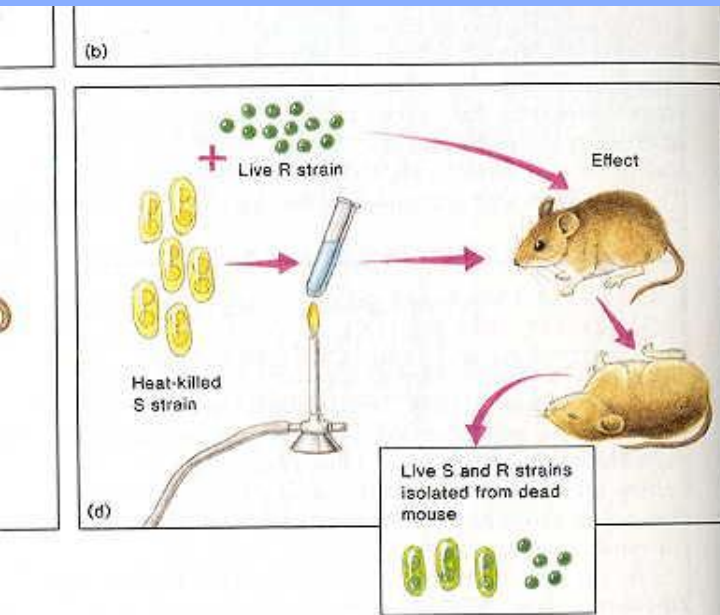
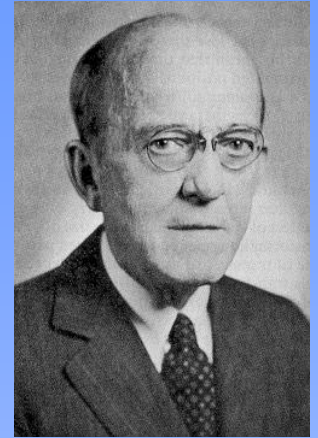


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

přirozená kompetence pro genetickou transformaci

➤Griffith, 1928 – transformační princip

➤Avery, 1944 - DNA



mixture of strain R and heat-killed strain S bacteria kills the mouse. The killed virulent (S) bacteria have transformed the avirulent (R) bacteria to virulent (S).

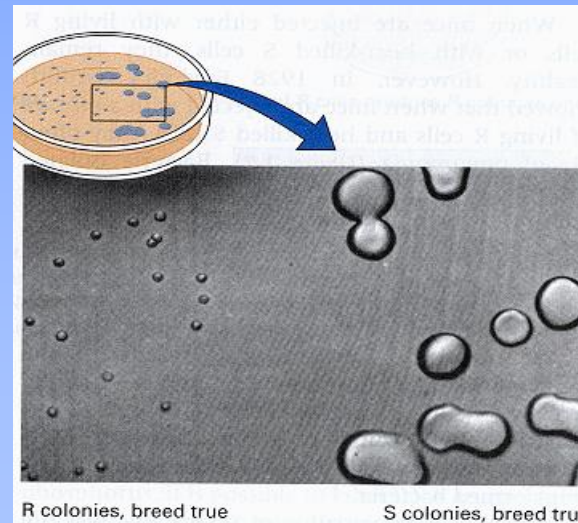
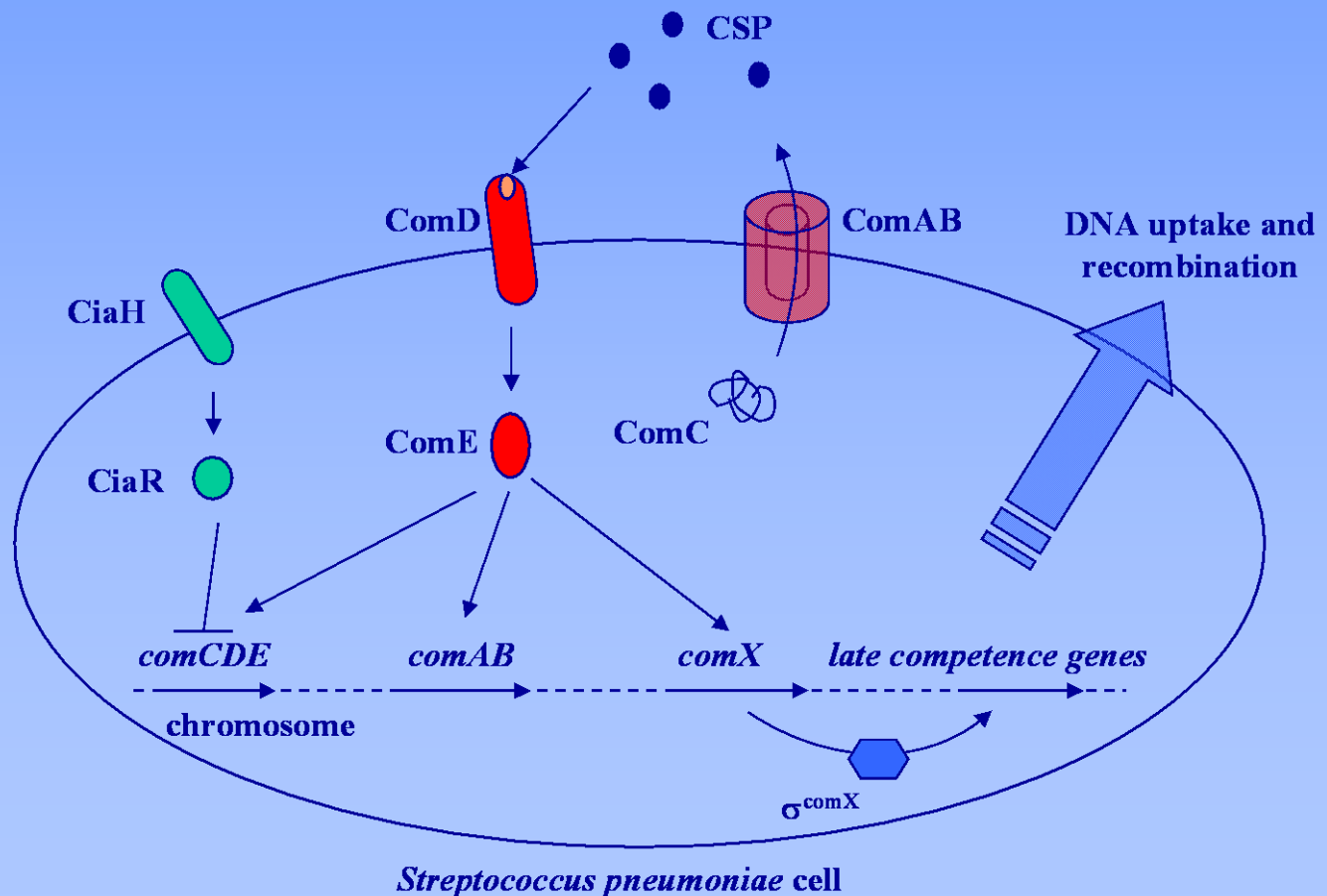


Figure 1.1 Colonies of *Streptococcus pneumoniae*. The small colonies on the left are from a rough (R) strain, and the large colonies on the right are from a smooth (S) strain. The S colonies are larger because of the capsule on the S cells. [Photograph from O. T. Avery, C. M. MacLeod, and M. McCarty. 1944. *J. Exp. Med.* 79: 137.]

Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

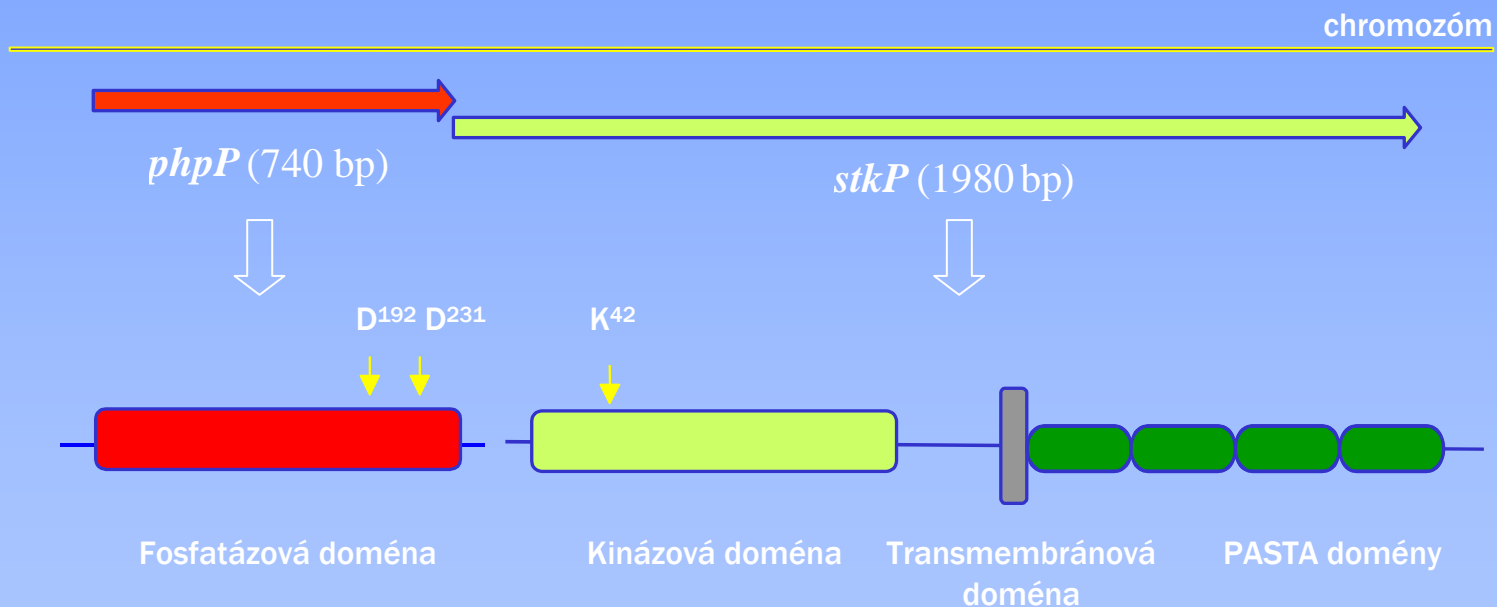
- přirozená kompetence pro genetickou transformaci: regulace systémem quorum sensing



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

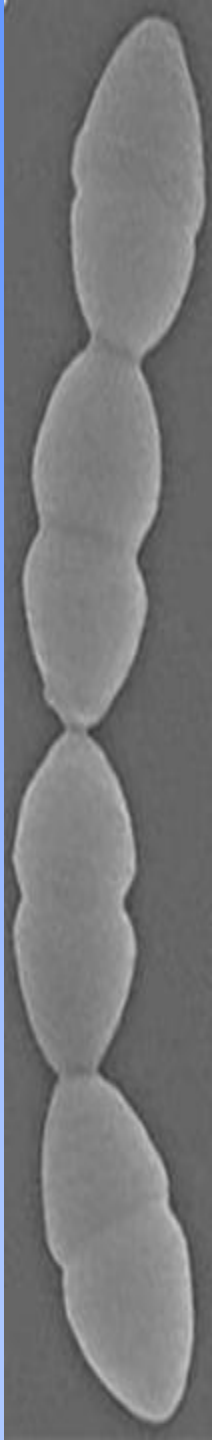
Modelový organismus: *Streptococcus pneumoniae*

jeden pár genů kodujících proteinkinázu StkP a proteinfosfatázu PhpP



Ser/Thr proteinfosfatáza PhpP

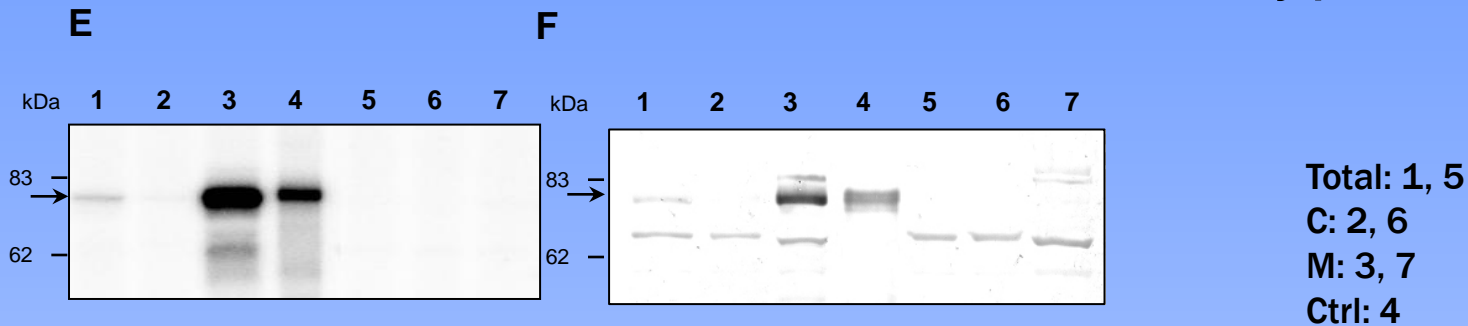
Ser/Thr proteinkináza StkP



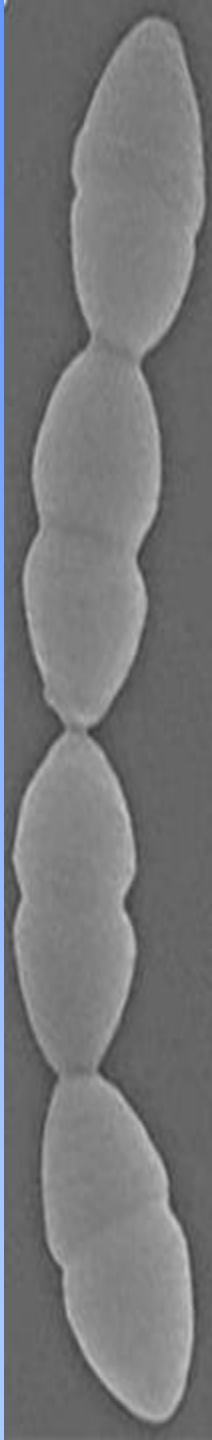
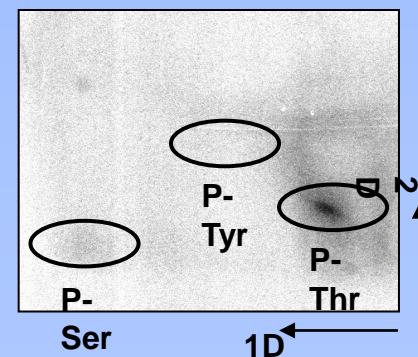
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Modelový organismus: *Streptococcus pneumoniae*

Biochemická charakterizace StkP: membránový protein



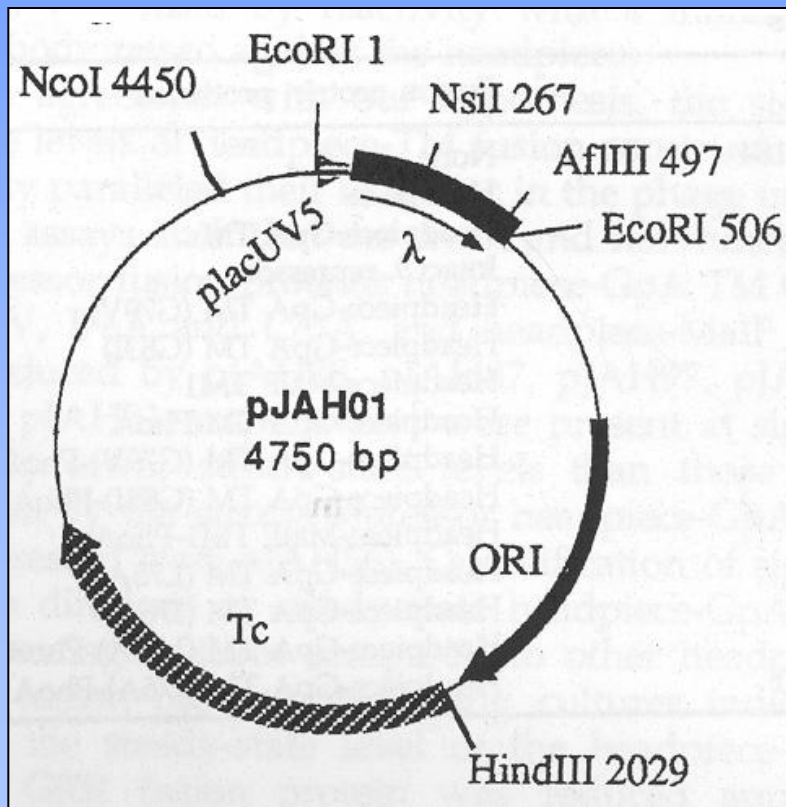
Biochemická charakterizace StkP: Ser/Thr specifická proteinkináza



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Modelový organismus: *Streptococcus pneumoniae*

In vivo důkaz existence dimeru StkP



ci repressor:

N terminální doména → vazba k DNA

C terminální doména → dimerizace

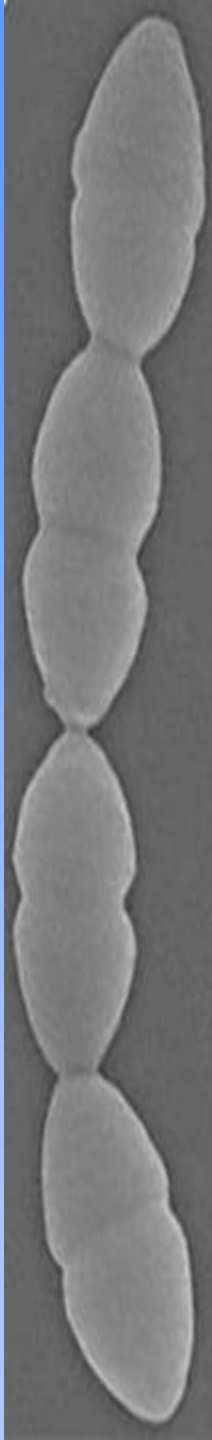
Aktivní pouze ve formě dimeru

Fúzní konstrukty:

λ ci N terminální doména + KD

λ ci N terminální doména + KDTM

λ ci N terminální doména + C-terminální doména StkP



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Modelový organismus: *Streptococcus pneumoniae*

In vivo důkaz existence dimeru StkP

Plazmid	Fúzní konstrukt	Efektivita výsevu *
pJAH56	cl N-terminální doména + GpA TM	$\leq 10^{-6}$
pJAH91	cl N-terminální doména + MalF TM1	0,830 0,079
pJAH-kd	cl N-terminální doména + StkP-KD	0,925 0,075
pJAH-kdtm	cl N-terminální doména + StkP-KDTM	$< 10^{-6}$
pJAH-C-term	cl N-terminální doména + StkP-C-terminální doména	$\leq 10^{-6}$

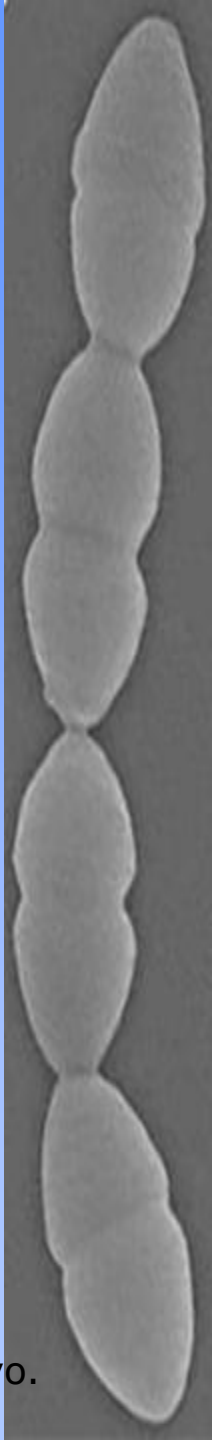
*Efektivita výsevu (počet plaků/počet fágových partikulí \pm standardní odchylka) je uvedena jako průměrná hodnota získaná ze čtyř nezávislých experimentů.

pJAH56- pozitivní kontrola

pJAH91- negativní kontrola

transmembránová a C-terminální doména proteinkinasy StkP tvoří dimery

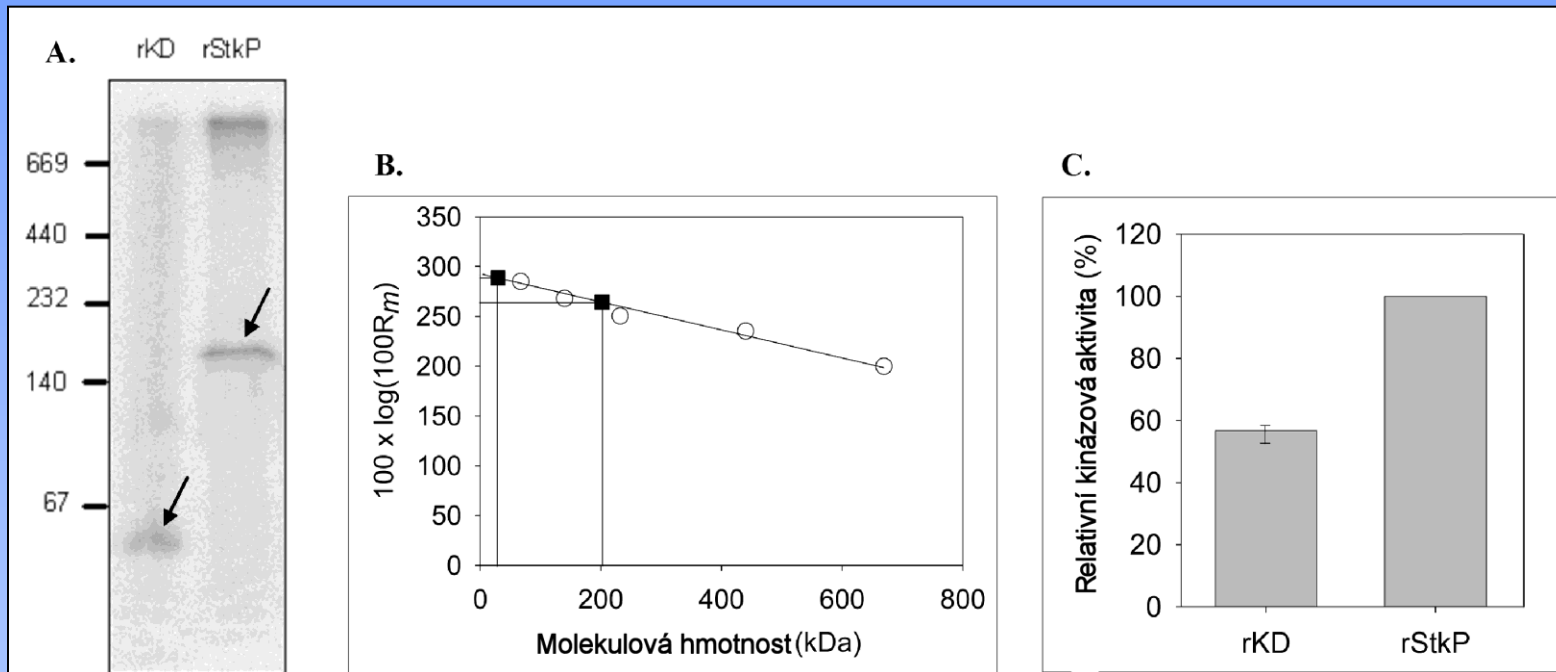
Pallová, P., Hercík, K., Sasková, L., Nováková, L., and Branny, P. A eukaryotic serine/threonine protein kinase StkP of *Streptococcus pneumoniae* acts as a dimer in vivo. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. **355**: 526-530



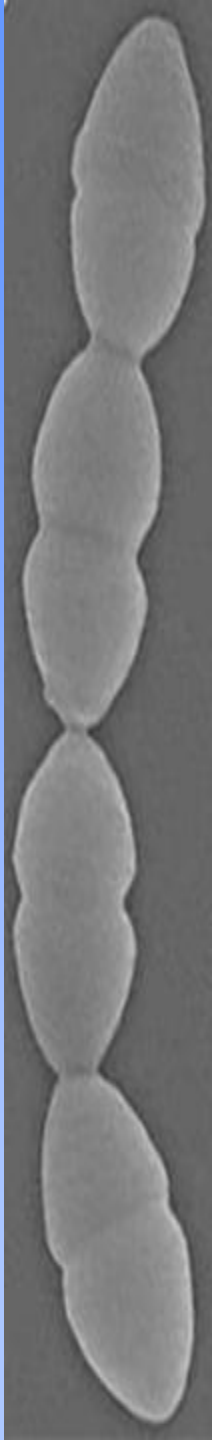
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Modelový organismus: *Streptococcus pneumoniae*

Důkaz existence dimeru StkP pomocí nativní elektroforézy



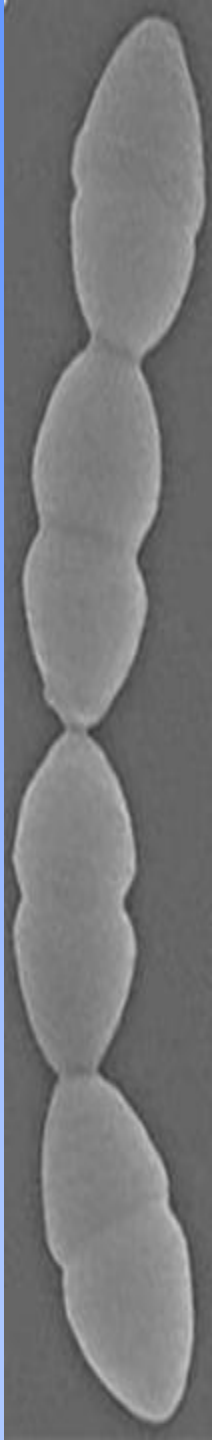
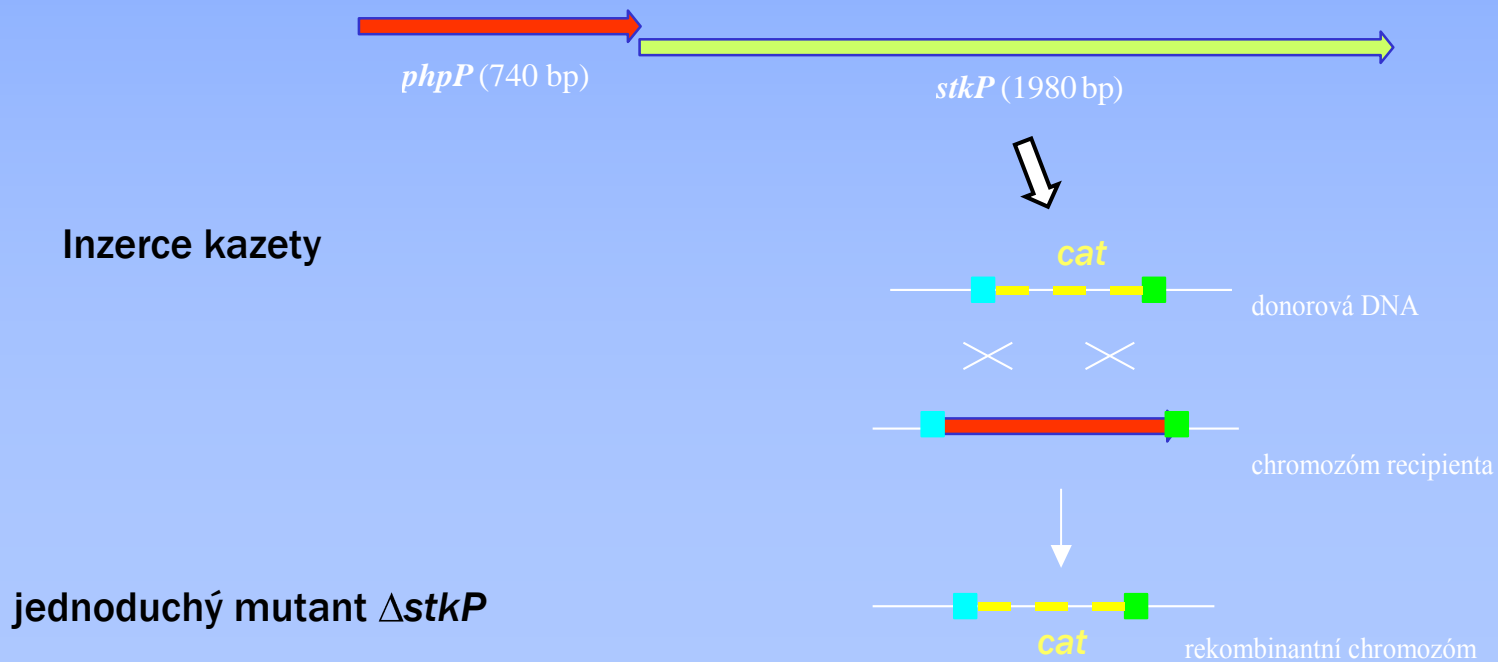
Proteinkinasa StkP se *in vivo* vyskytuje ve formě dimeru a dimerizace je nutným předpokladem její autofosforylační aktivity. Protein kódující kinázovou doménu postrádající transmembránovou doménu není funkční, neboť není schopen dimerizace a podléhá degradaci.



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Modelový organismus: *Streptococcus pneumoniae*

deleční mutagenese genu *stkP*:



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Modelový organismus: *Streptococcus pneumoniae*

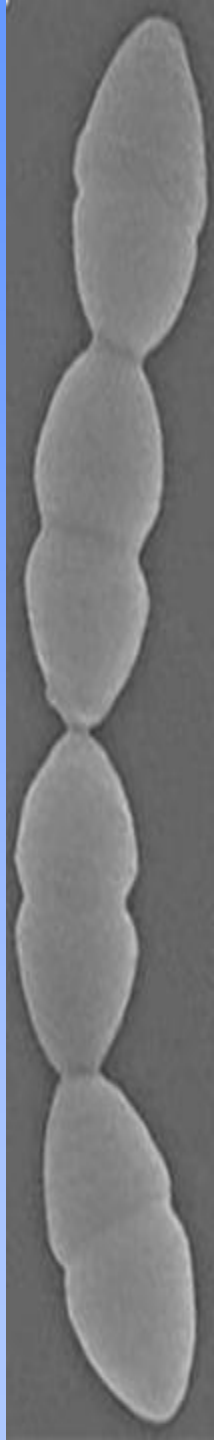
fenotyp mutanta stkP:

1) snížení kompetence pro genetickou transformaci

<i>S. pneumoniae</i> kmen	Celkový počet buněk (CFU/ml)	Počet transformantů (CFU/ml)	Účinnost transformace (%)
WT	$1,1 \times 10^7$	$4,0 \times 10^5$	3,580
Δ stkP	$9,5 \times 10^6$	$2,1 \times 10^3$	0,022
Δ phpPstkP	$1,3 \times 10^7$	$3,1 \times 10^5$	2,420

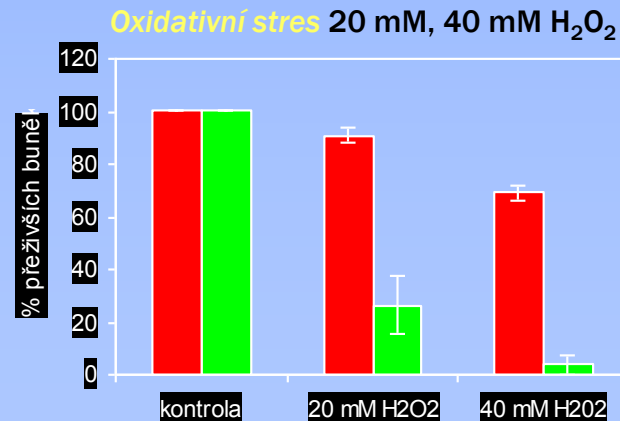
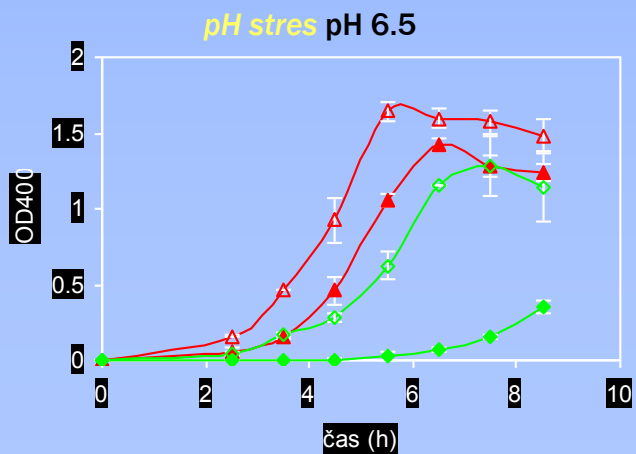
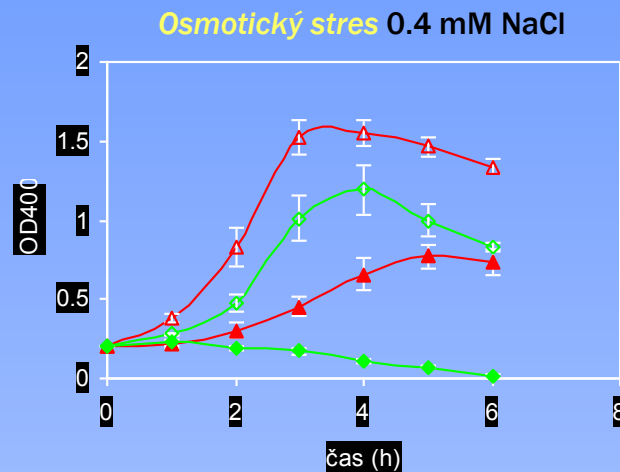
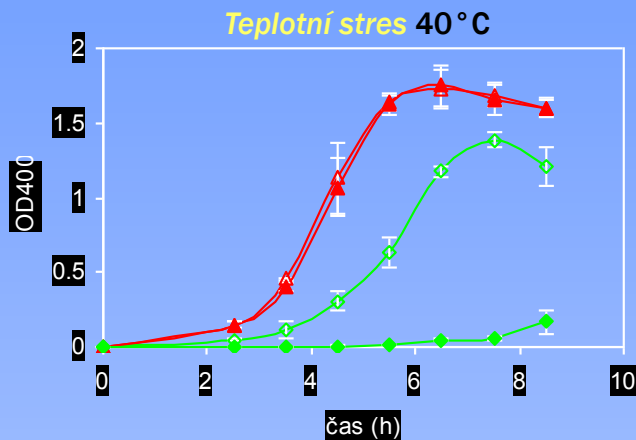
2) atenuace virulence v myším modelu infekce

Echenique et al., 2004

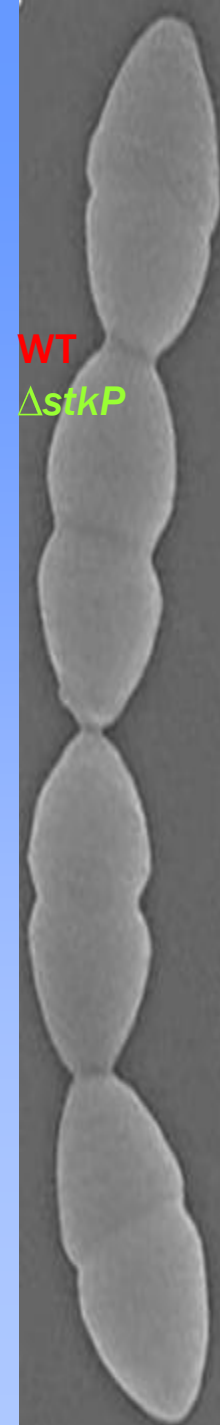


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

StkP se účastní regulace odpovědi buňky na vnější stresové podmínky



WT
 Δ stkP



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

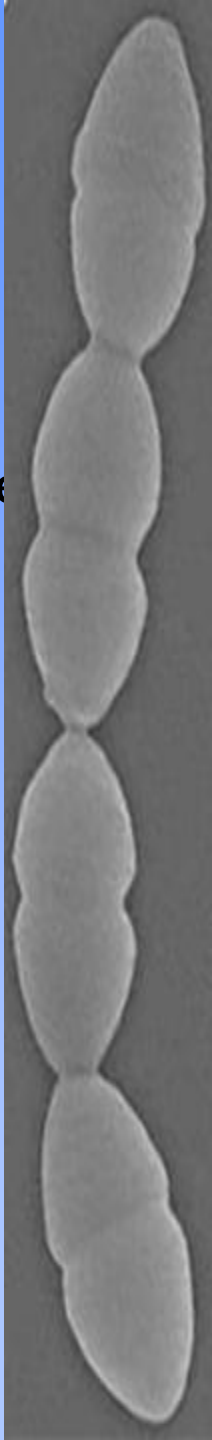
Identifikace genů regulovaných StkP Transkriptomová studie

- celogenomové DNA čipy *S. pneumoniae* (Eurogentec)
- standardní podmínky: komplexní médium, 37 ° C, exponenciální fáze růstu
- 3 nezávislé izolace RNA

Výsledky:

celkem identifikováno 95 genů, jejichž exprese byla v mutantním kmenu $\Delta stkP$ ovlivněna více než dvojnásobně

ověření výsledků metodou kvantitativní PCR v reálném čase



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

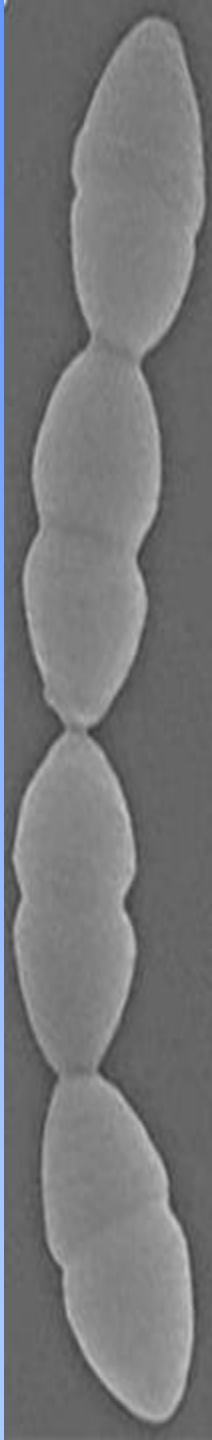
Transkriptomová studie

Geny se sníženou expresí:

- geny metabolismu buněčné stěny (LysM-domain protein, glukozaminidáza LytB, mureinhydroláza PcsB)
- geny pro pyrimidinový metabolismus (10)
- geny pro transport železa (Pit1 operon)
- DNA oprava (4)
- oxidativní stres (3)
- ostatní a hypotetické geny (spr1053 – „house-cleaning“ nukleotidáza)

Geny se zvýšenou expresí:

- časně kompetenční geny (7)
- pozdní kompetenční geny (8)
- CSP indukovatelné geny (17)
- hypotetické geny (12)

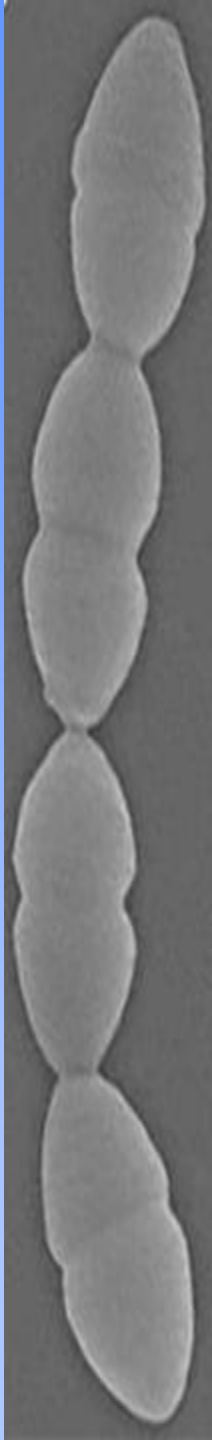


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Transkriptomová studie

? 1. Jaký je skutečný nárůst exprese *com* genů během stavu kompetence *S. pneumoniae*?

2. Je zvýšená transkripce *com* genů u mutantního kmene dostatečně vysoká pro navození stavu přirozené kompetence? **?**



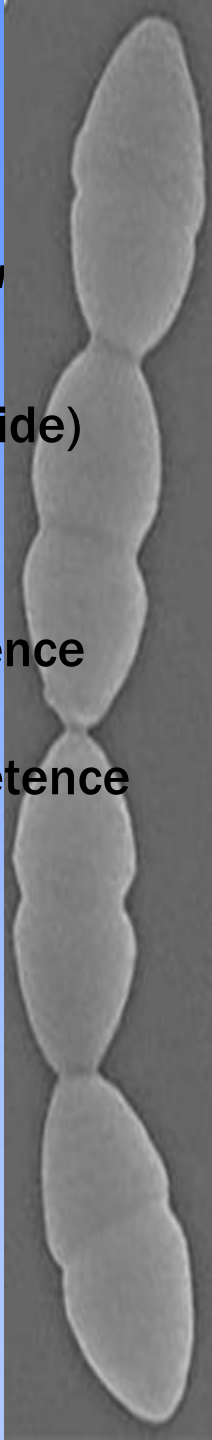
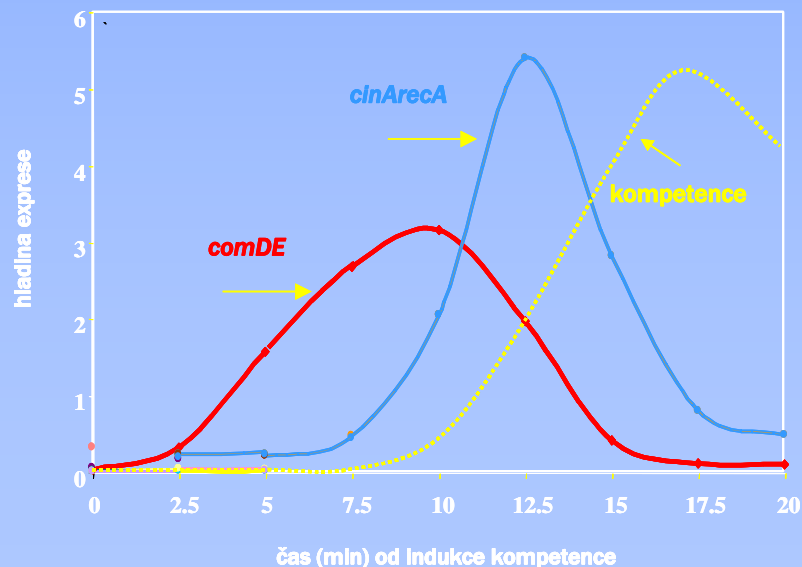
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Stanovení hladiny exprese kompetenčních genů po indukci kompetence u *S. pneumoniae*

- kvantitativní PCR v reálném čase
- indukce kompetence syntetickým CSP (competence stimulation peptide)

časné kompetenční geny: *comE*, *comC*, *comA*, *comX*, *comW*;
maximální exprese 8 min od indukce kompetence

pozdní kompetenční geny: *cglA*, *celB*, *ssbB*;
maximální exprese 13 min od indukce kompetence

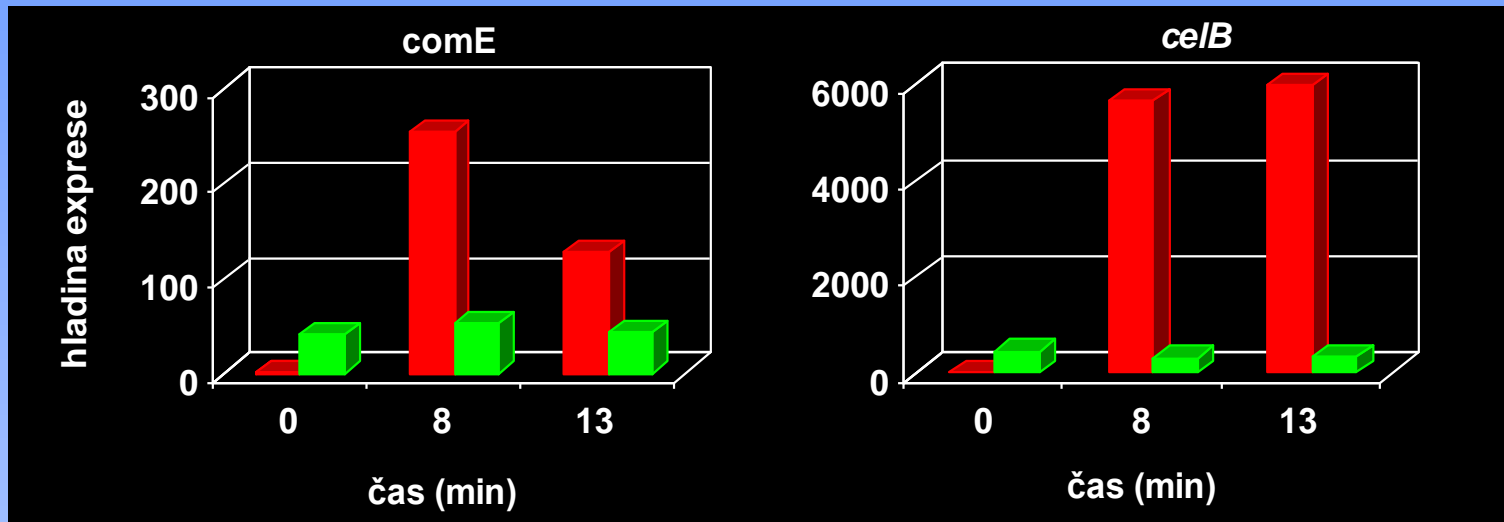


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Expresa kompetenčních genů po indukci kompetence syntetickým CSP

časné geny

pozdní geny



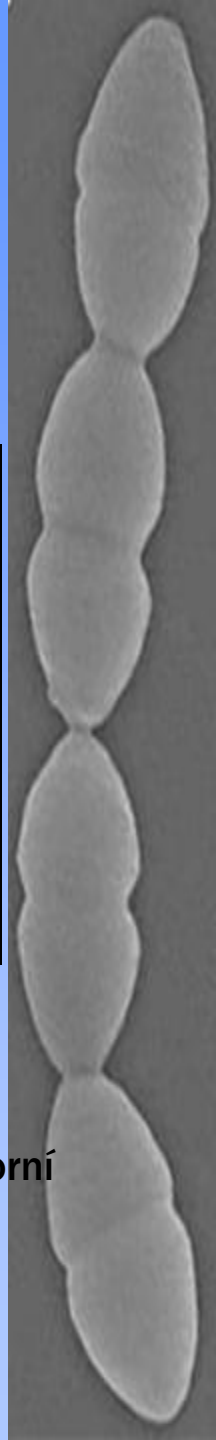
WT

Δ stkP

⇒ snížená transformabilita Δ stkP mutantního kmene je důsledkem nedostatečné exprese kompetenčních genů

⇒ za neschopnost reagovat na CSP není u Δ stkP mutantního kmene odpovědná tzv. refraktorní fáze kultury

⇒ Δ stkP mutantní kmen má expresi kompetenčních genů zvýšenou po celou dobu růstu

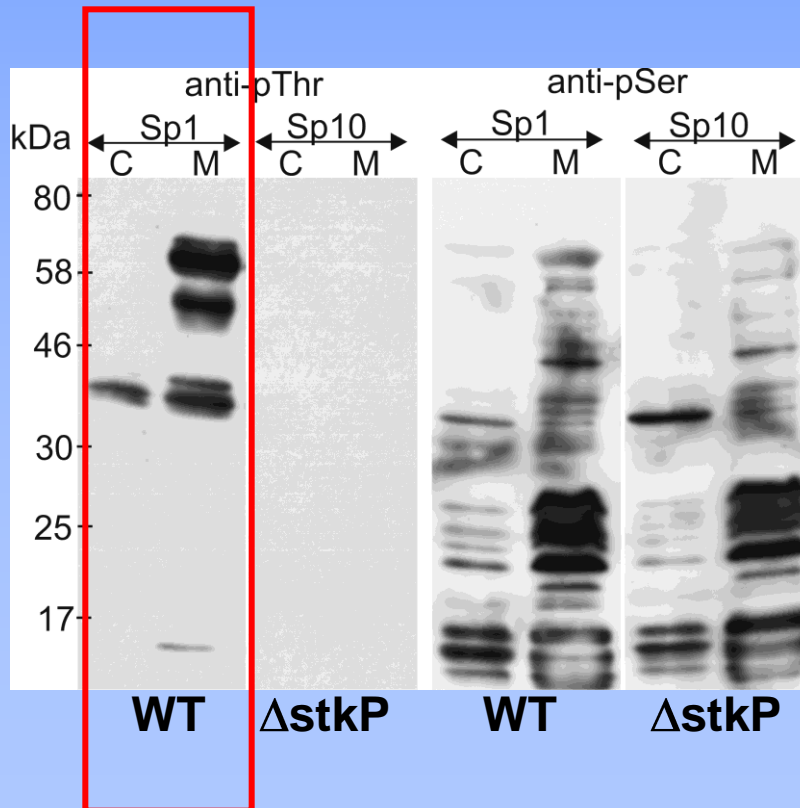


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

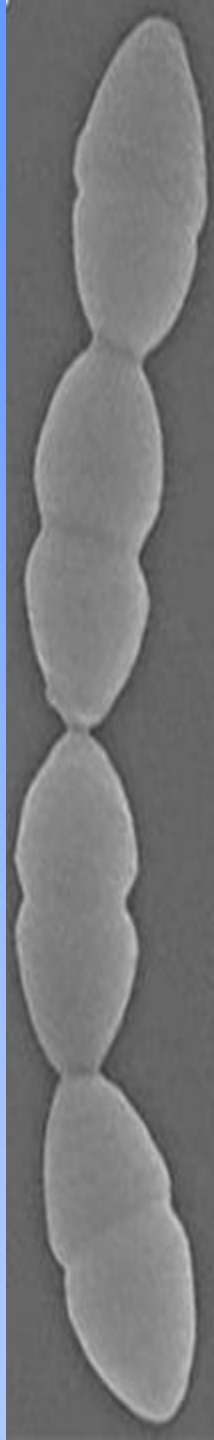
Identifikace substrátů StkP

Fosforylace proteinů na Thr je závislá na aktivitě StkP

- StkP specificky fosforyluje několik membránových a cytoplasmatických proteinů na Thr zbytcích
- Detekce fosfo-Ser zbytků neprokázala významné rozdíly mezi WT a mutantem



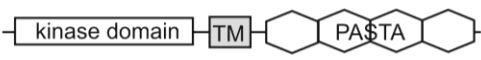
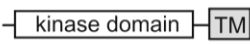
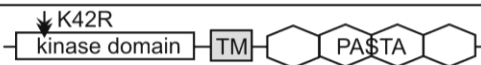
2-D SDS PAGE
detekce a lokalizace
proteinů pomocí specif.
anti-P-Thr Ab
radiolabeling
MS analýza

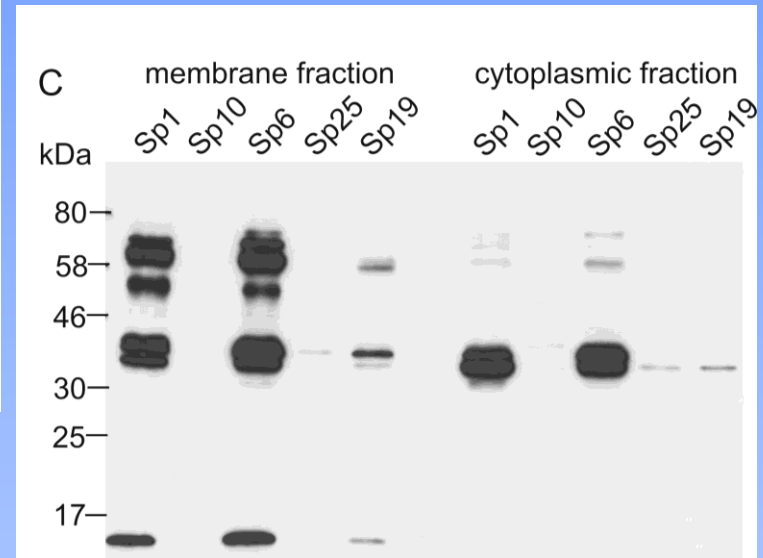


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

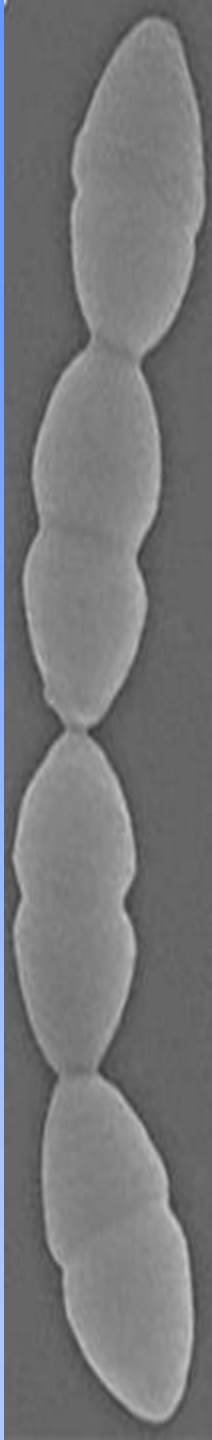
Identifikace substrátů StkP

Fosforylace proteinů na Thr je závislá na aktivitě StkP

strain	genotype	StkP structure
Sp1, Sp6	wt Rx1, wt D39	
Sp10	Δ stkP	<i>deleted</i>
Sp25	stkP Δ 372-659	
Sp19	stkPK42R	



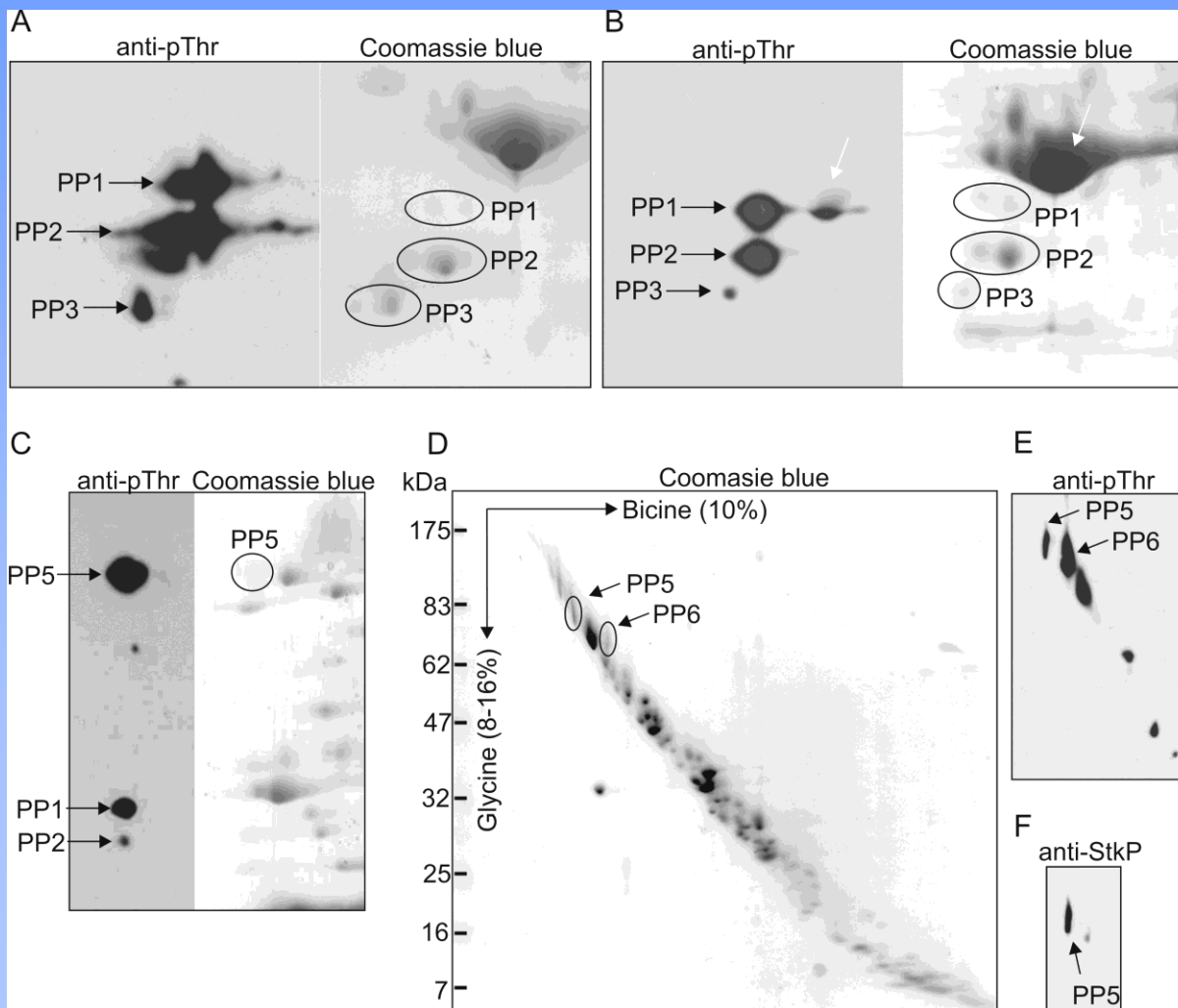
Detekce anti-pThr Ab



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot. od signální molekuly po buněčné funkce

Identifikace substrátů StkP

Hledání substrátů StkP pomocí analýzy fosfoproteomů (detekce fosfoproteinů protilátkou anti fosfo-Thr).



A-cytoplazma

B-membrány

C-membrány

D-dSDS-PAGE

PP1: DivIVA

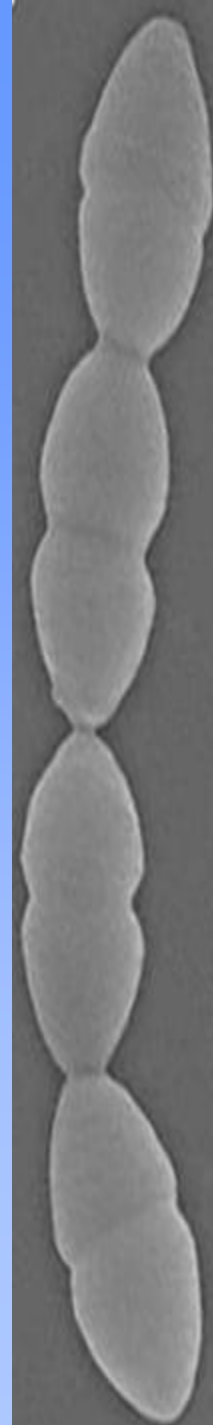
PP2: RpoA

PP3: PpaC

PP4: Spr0334

PP5: StkP

PP6: Spr0334



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Identifikace substrátů StkP

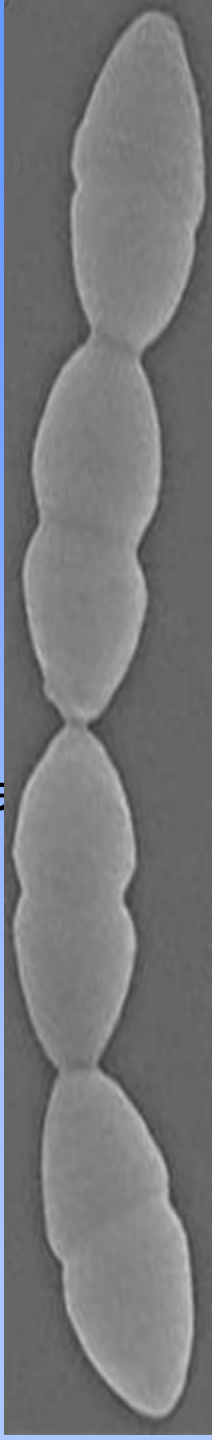
Funkce identifikovaných substrátů:

GlmM: přeměna *GlcN-6P* a *GlcN-1P*, esenciální krok v biosyntéze UDP-N-acetylglukosaminu, UDP-N-acetylglukosamin – prekurzor složek buněčné stěny

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

PpaC: Mn-dependentní anorg. pyrofosfatáza: katalýza hydrolýzy *PPi* vznikajícího při jiných biosynt. reakcích (metabolismus cukrů, hydrolýza *ATP*, syntéza *AK* a nukleotidů) *PPi* má vliv na aktivitu mnoha enzymů

Spr0334: hypotetický membránový protein

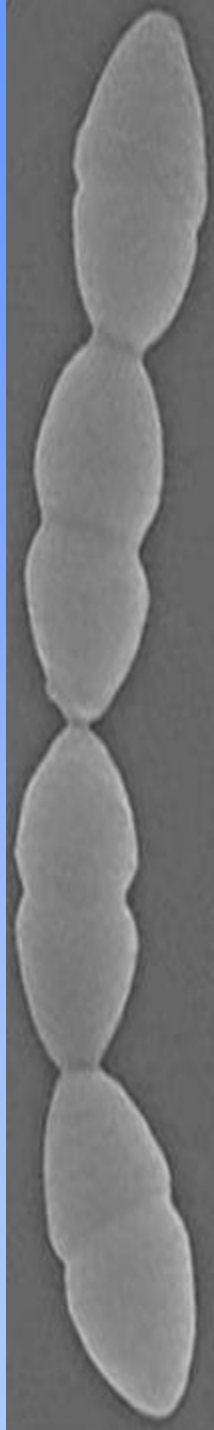


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Morfologie mutantů stkP

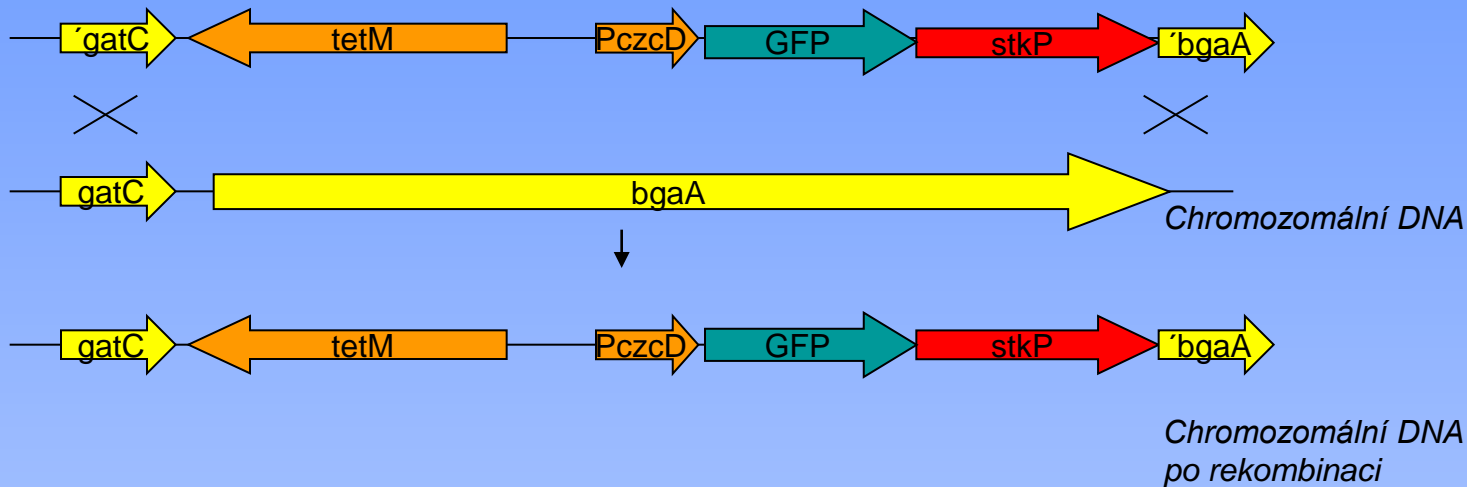
Sp1(WT)	Sp10(Δ stkP)	Sp19(stkPK42R)	Sp25(stkP Δ 372-659)
kinase activity YES	kinase activity NO	kinase activity VERY LOW	kinase activity NO

Aberantní fenotyp je přímým důsledkem ztráty fosforylační aktivity
 PASTA domény jsou zásadním strukturálním prvkem aktivace
 fosforylační kaskády – **hypotéza o septální lokalizaci StkP**

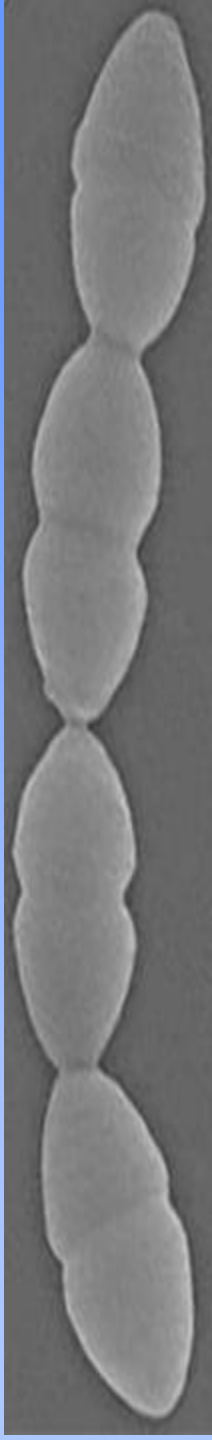


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

*Linearizovaný plasmid
pZn-His-StkP-GFP*



Merodiploid s ektopicky exprimovanou fúzí

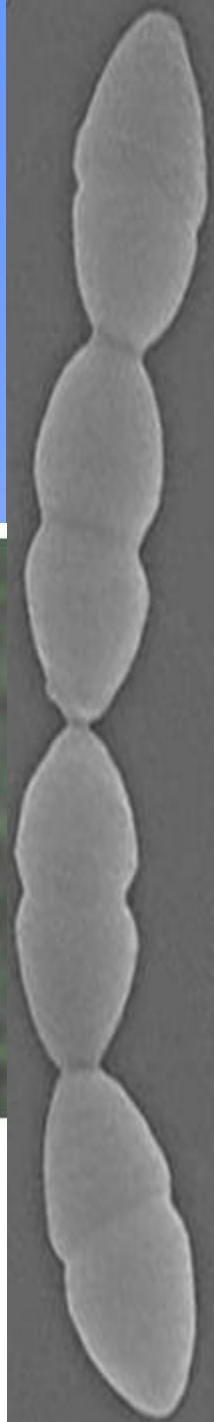
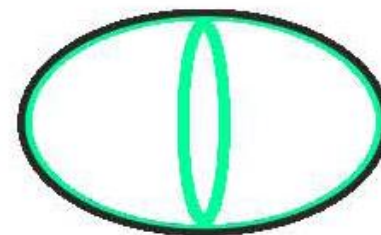
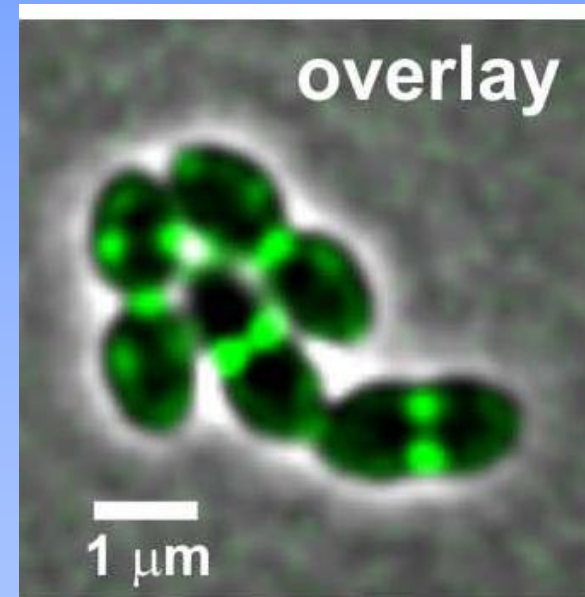


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Buněčná lokalizace proteinkinázy StkP

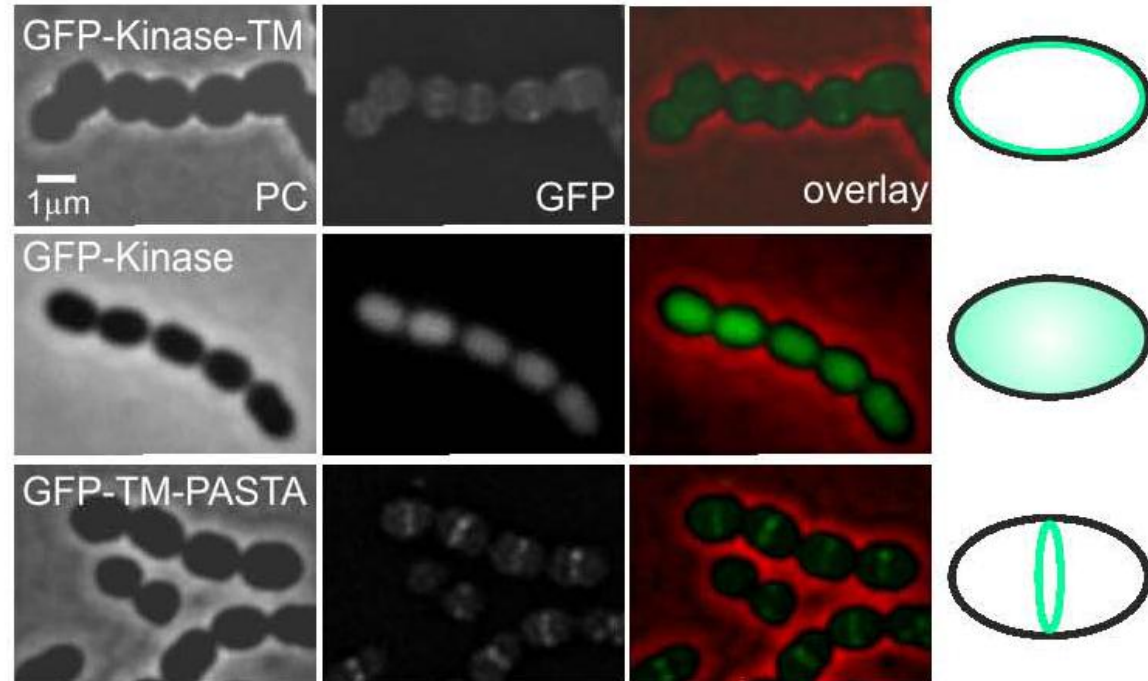
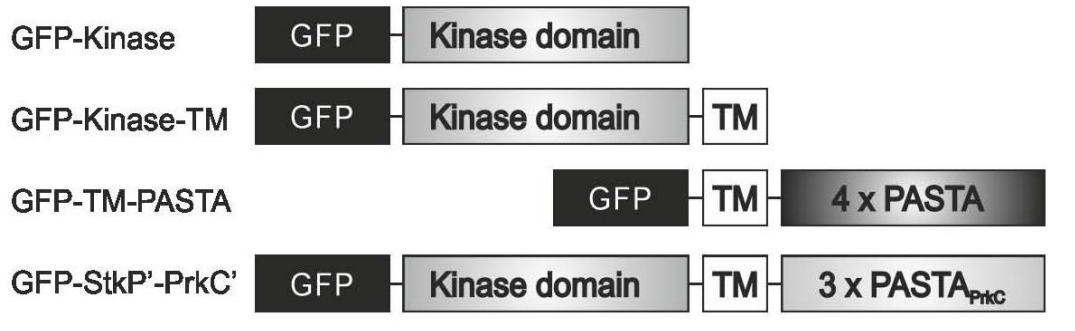


StkP lokalizuje v buněčných přepážkách (septech)

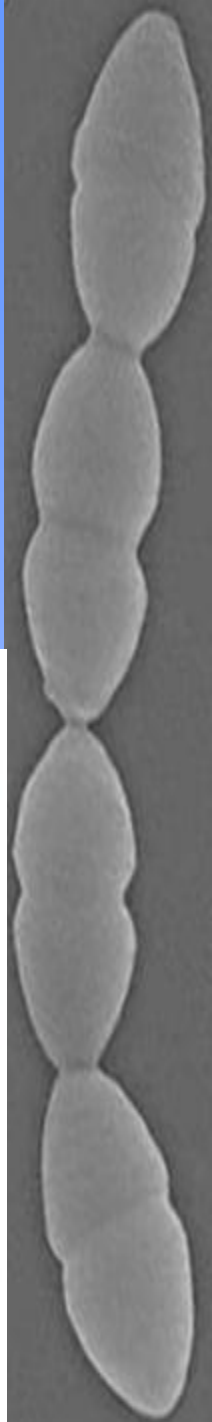


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Které elementy molekuly StkP determinují septální lokalizaci?



PASTA domény –
determinanta
buněčné lokalizace



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Které elementy molekuly StkP determinují septální lokalizaci?

GFP-StkP'-PrkC'

GFP

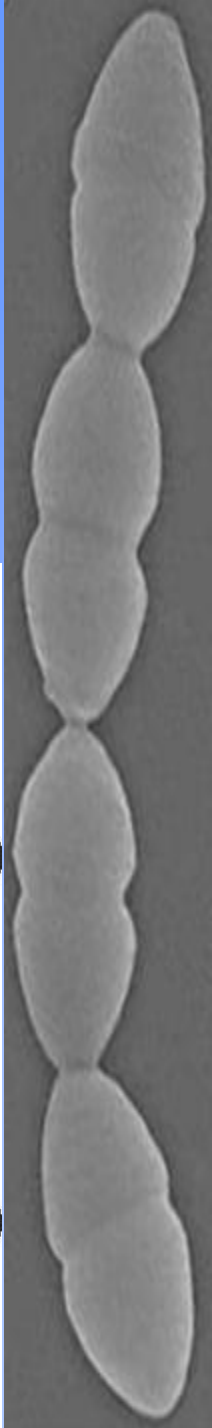
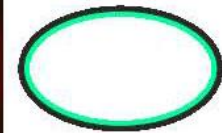
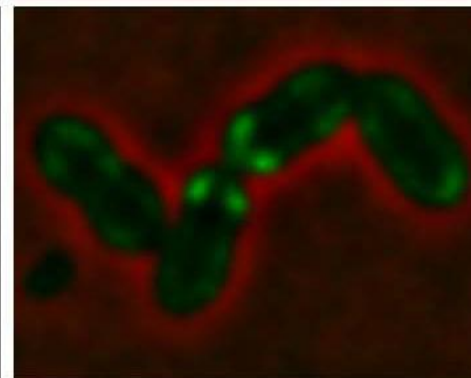
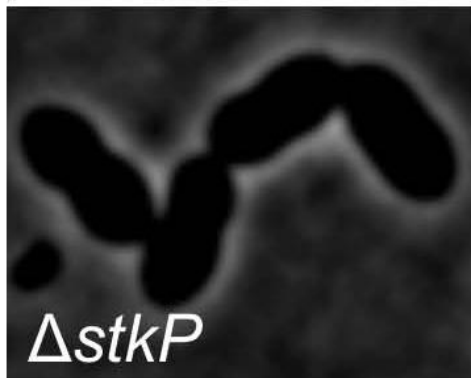
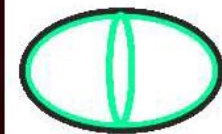
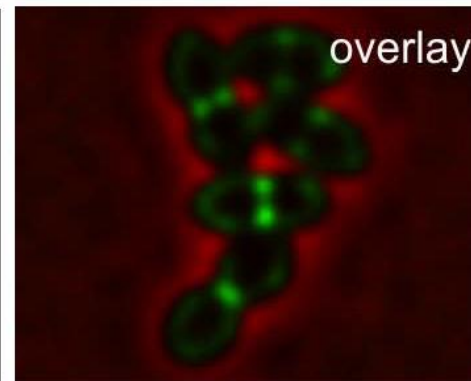
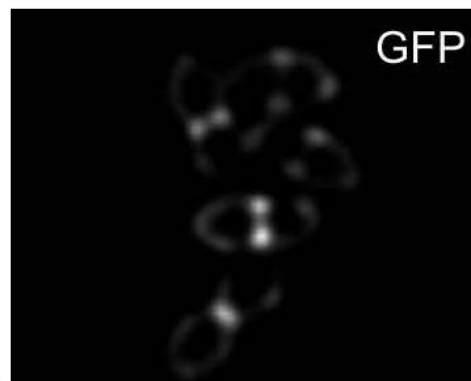
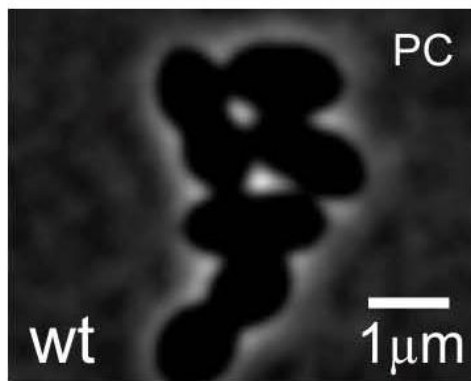
Kinase domain

TM

3 x PASTA_{PrkC}

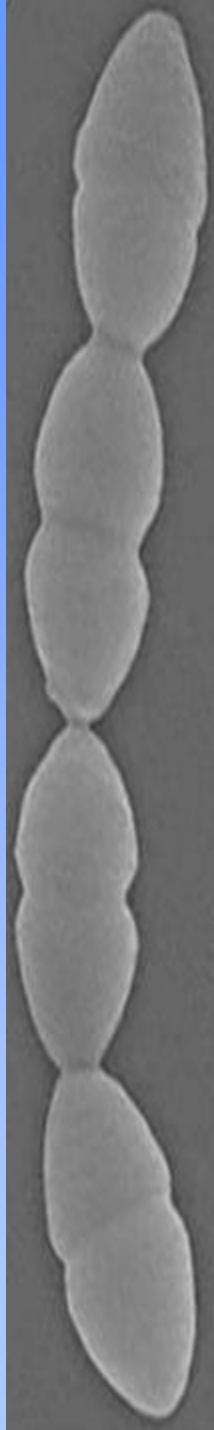
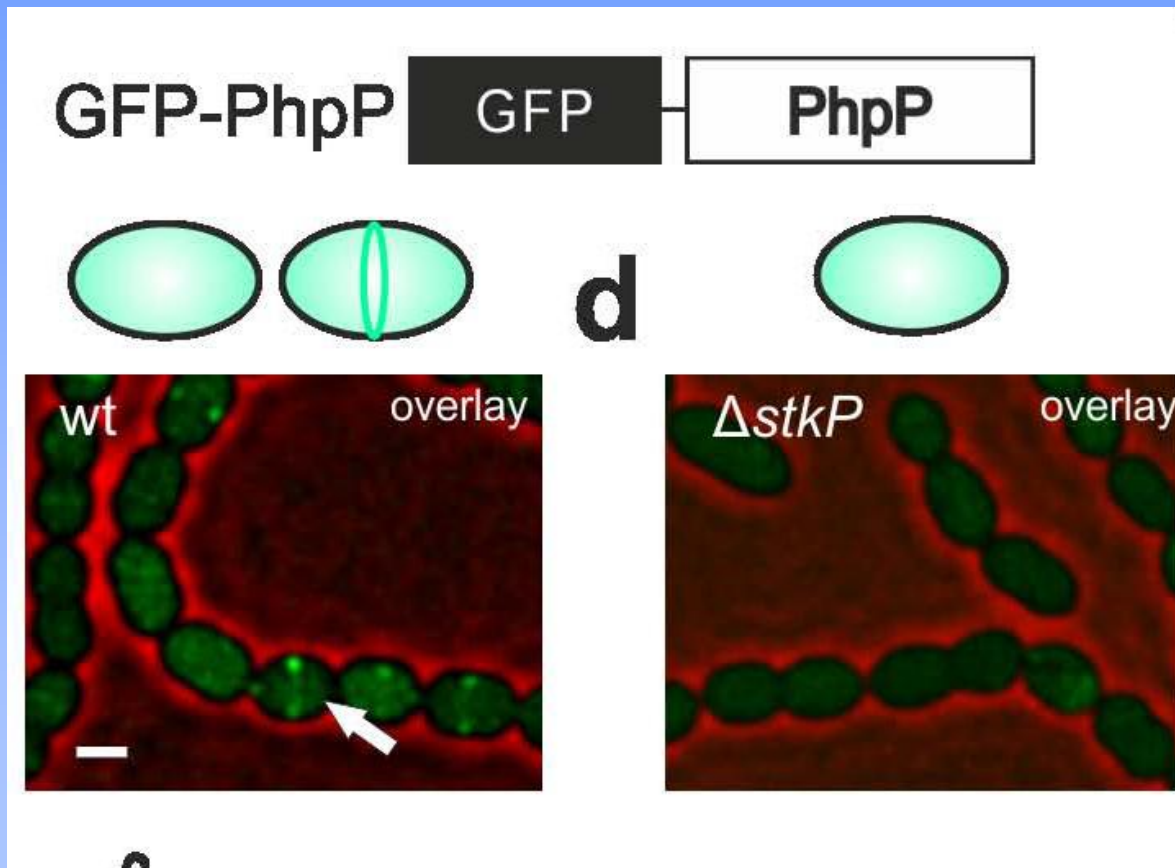
d

GFP-StkP'PrkC



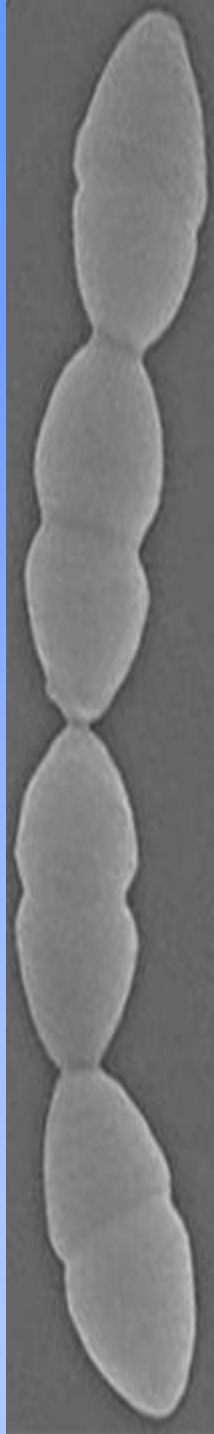
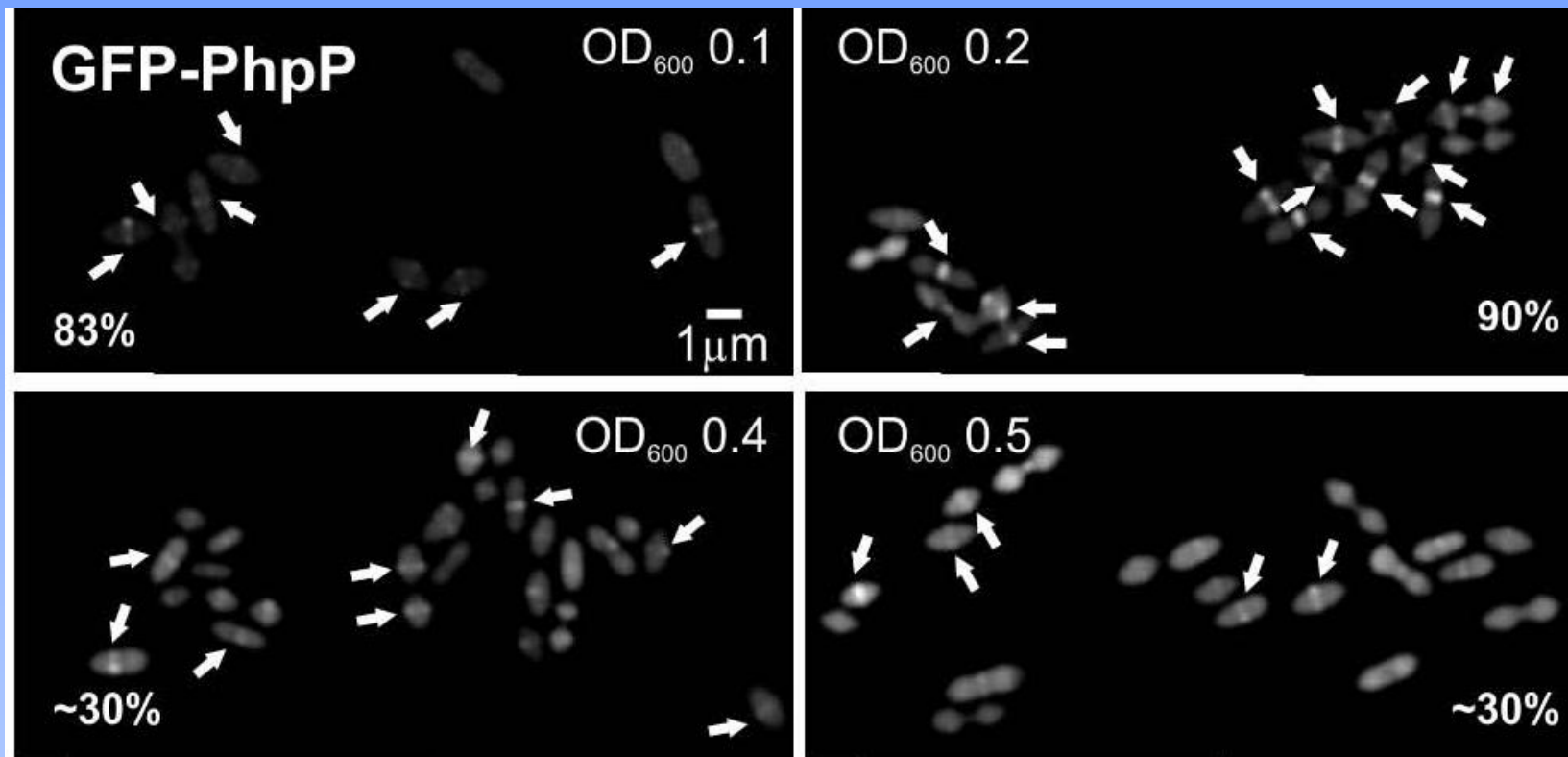
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Kognátní fosfatáza proteinkinázy StkP, PhpP, kolokalizuje s StkP



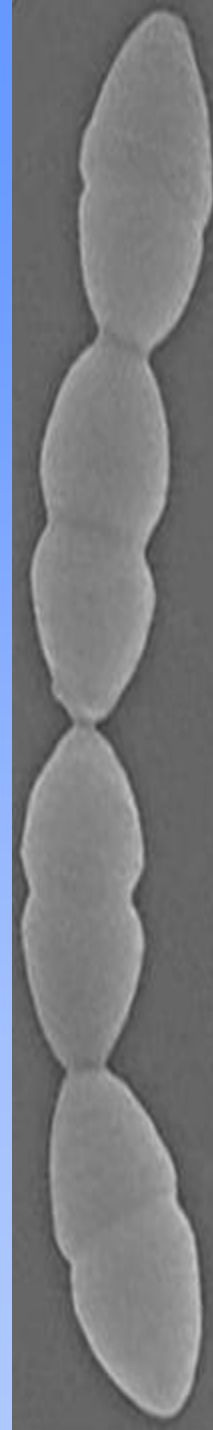
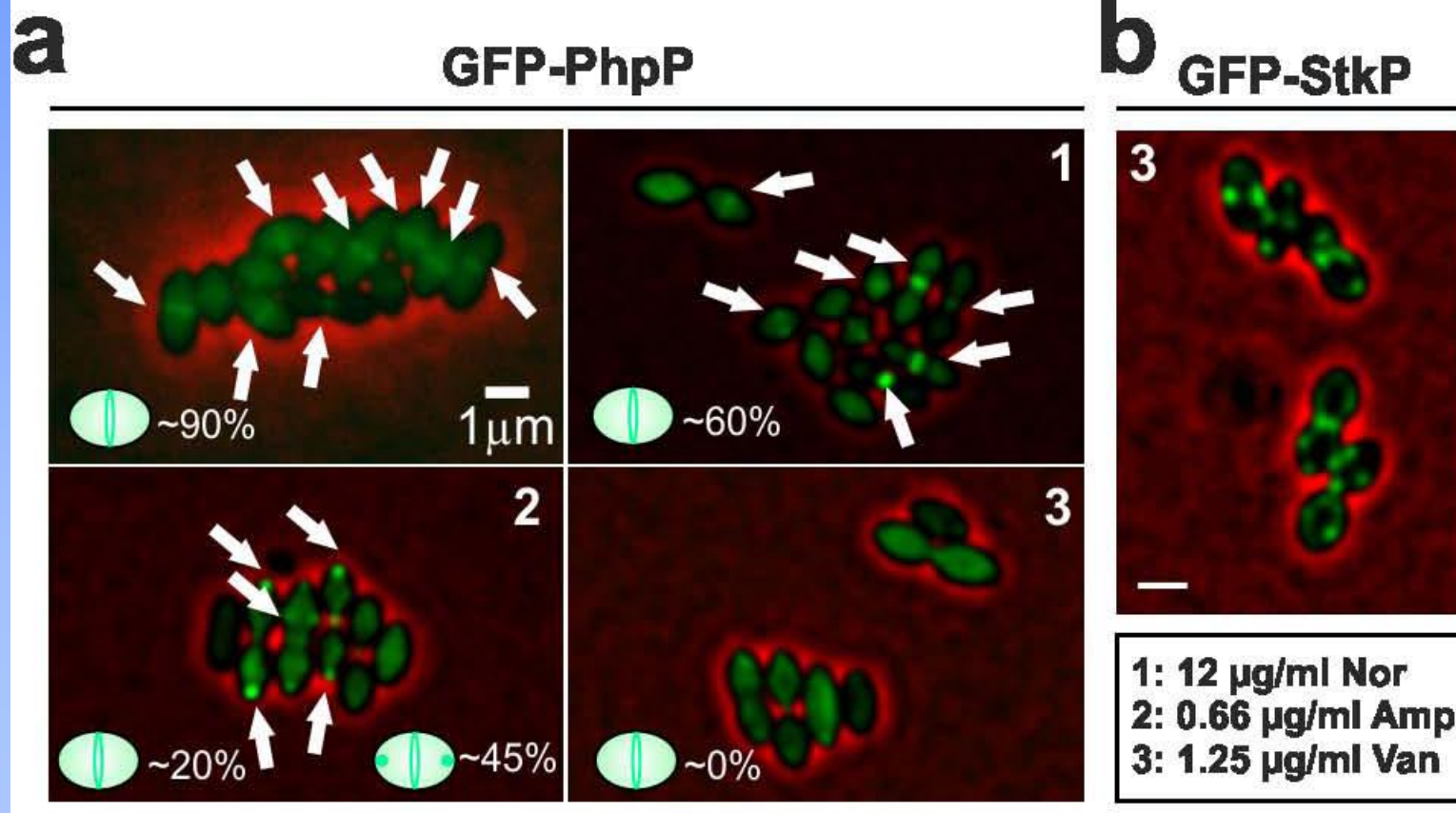
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Četnost kolokalizace PhpP s StkP v septu v závislosti na růstové fázi



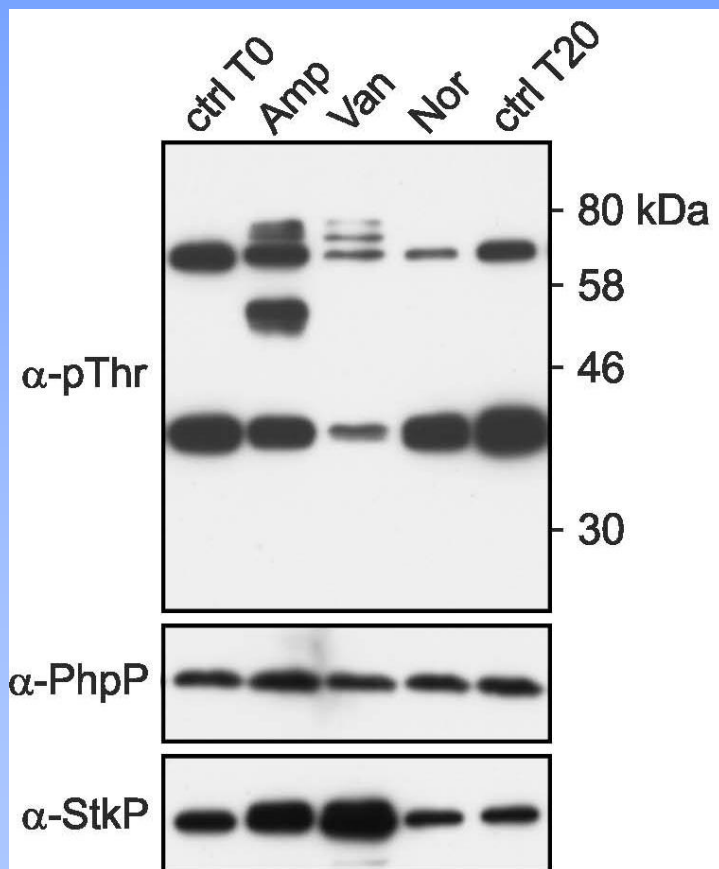
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Lokalizace PhpP (StkP) v septu v závislosti na dostupnosti ligandu (nekroslinkovaného NAG-NAM-pp) – v místech aktivní syntézy buněčné stěny



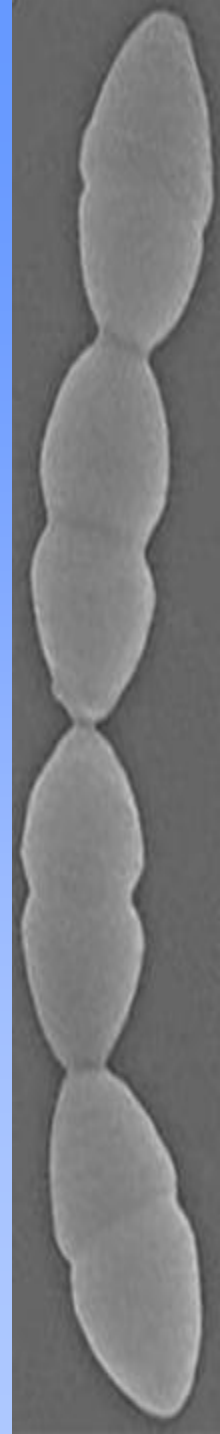
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Ovlivňuje stres buněčné stěny vyvolaný přítomností antibiotik aktivitu StkP?



Amp – inhibice transpept. aktivity PBPs
- zvýšení konc. nekroslinkovaného PG

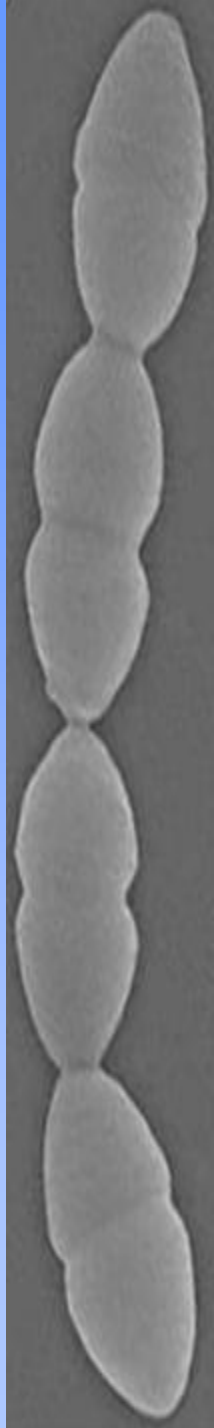
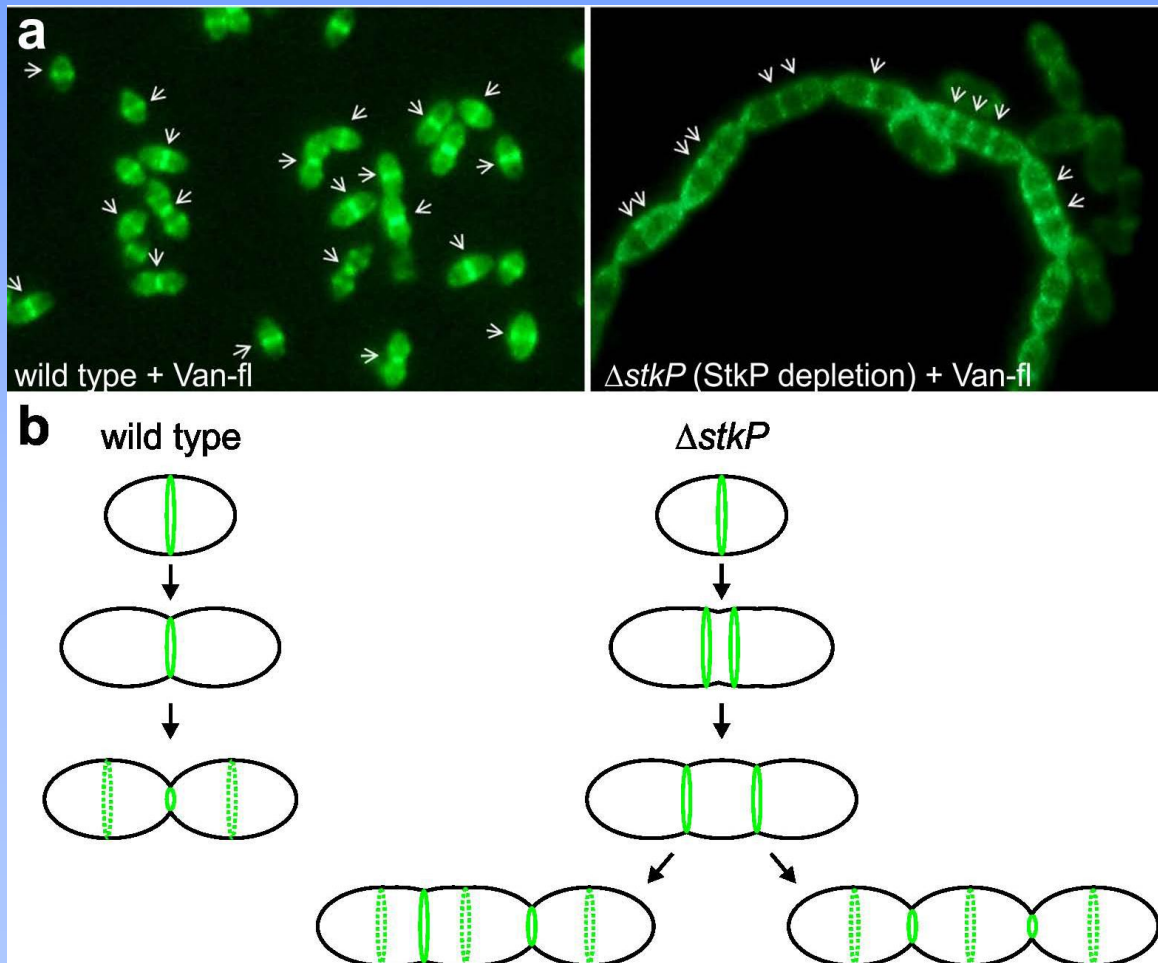
Van – vazba nekroslinkovaného PG
(D-Ala-D-Ala) – snížení koncentrace



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

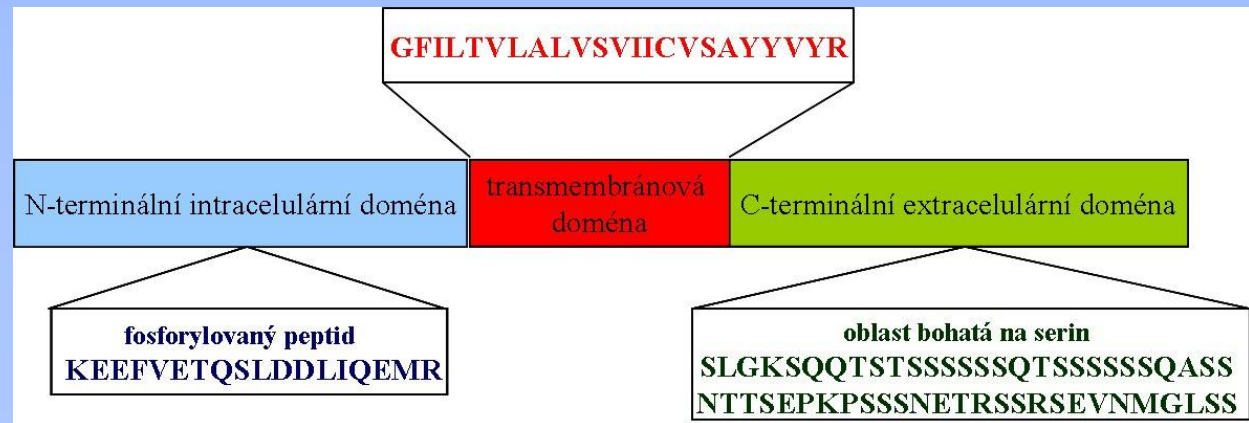
Model

StkP kontroluje načasování septální syntézy PGN



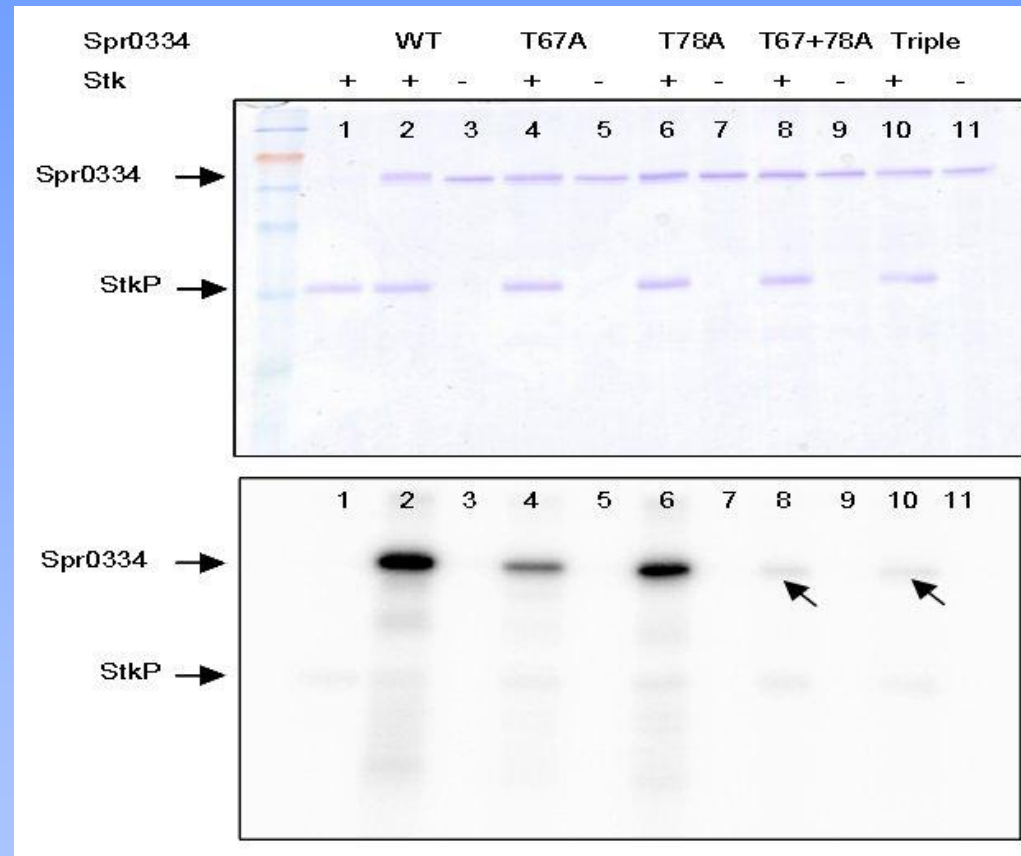
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot:

- membránový protein spr0334 o velikosti 51,5 kDa
- výskyt u streptokoků a dále u *Lactococcus lactis* a *Enterococcus faecalis*
- patří mezi substráty StkP *S. pneumoniae*
- homolog SAK_0375 *S. agalactiae* – též substrát Stk1
- Spr0334 složen z:
 - N-terminální intracelulární domény – fosforylovaný peptid
 - transmembránové domény
 - C-terminální extracelulární domény – oblast bohatá na serin – neznámá funkce



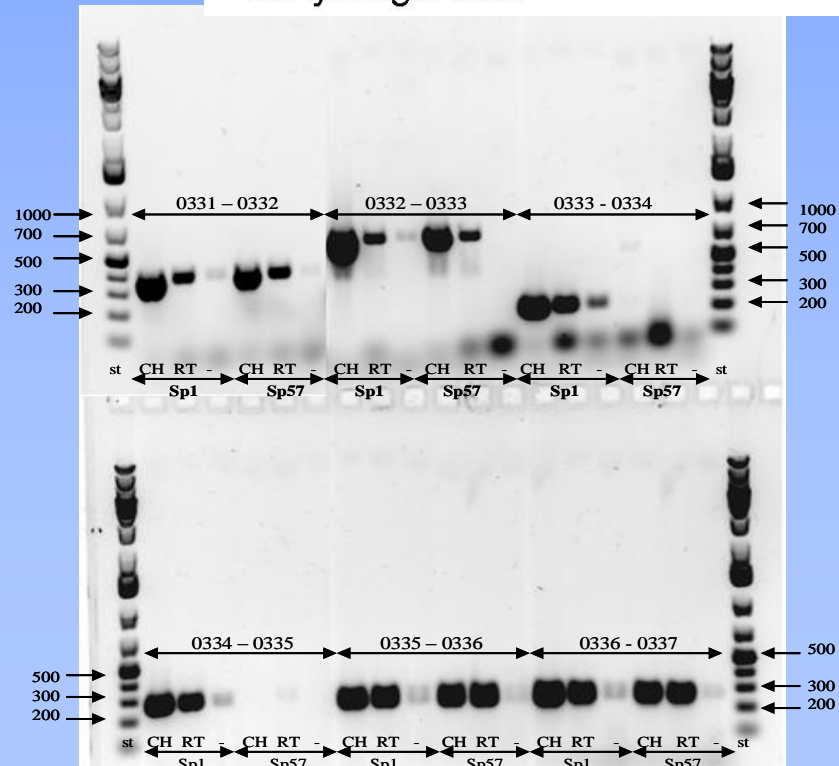
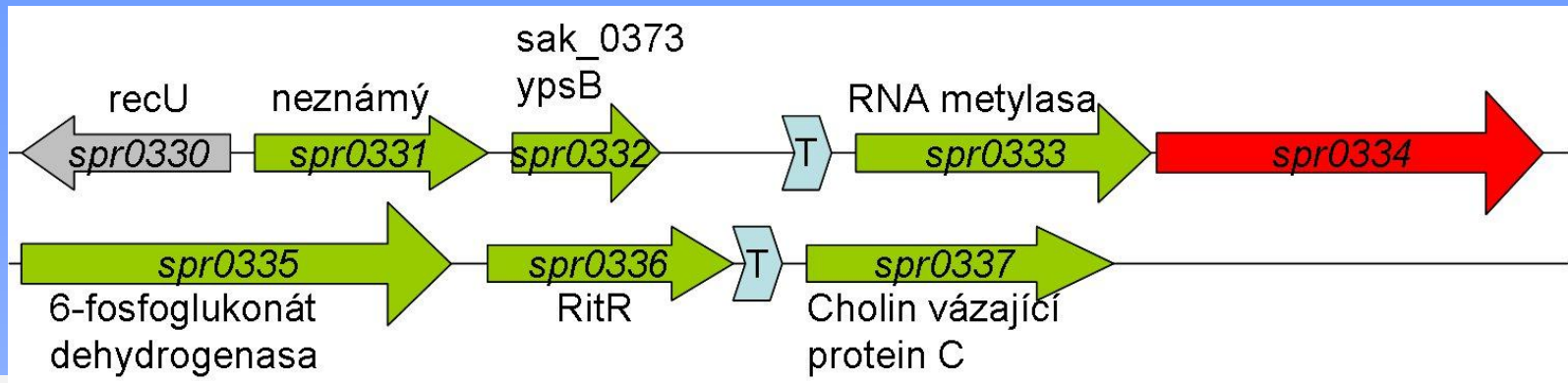
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot:

- *in vivo* a *in vitro* studie fosforylace Spr0334
 - identifikace tří fosforylovaných AMK zbytků T67, T78 a S80
 - mutageneze T67, T78, S80 na A - *in vitro* kinázová reakce



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot:

Analýza transkripce genů v předpokládaném operonu *spr0331 - spr0337*



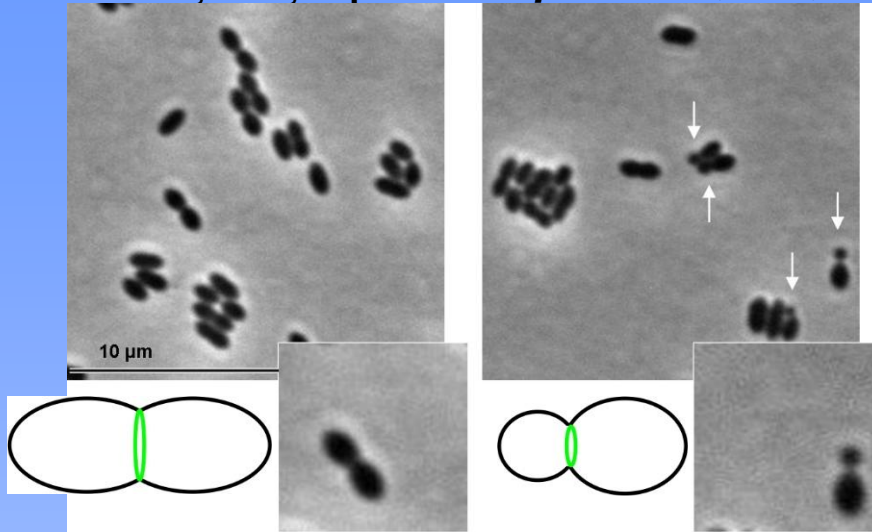
geny *spr0331-spr0337* v divokém kmeni jsou přepisovány ve formě jedné polycistronní mRNA

Nekonvenční signální dráhy u prokaryot:

Morfologie kmene $\Delta spr0334$

WT $1,36 \pm 0,23 \mu\text{m}$

$\Delta spr0334$ $1,29 \pm 0,30 \mu\text{m}$

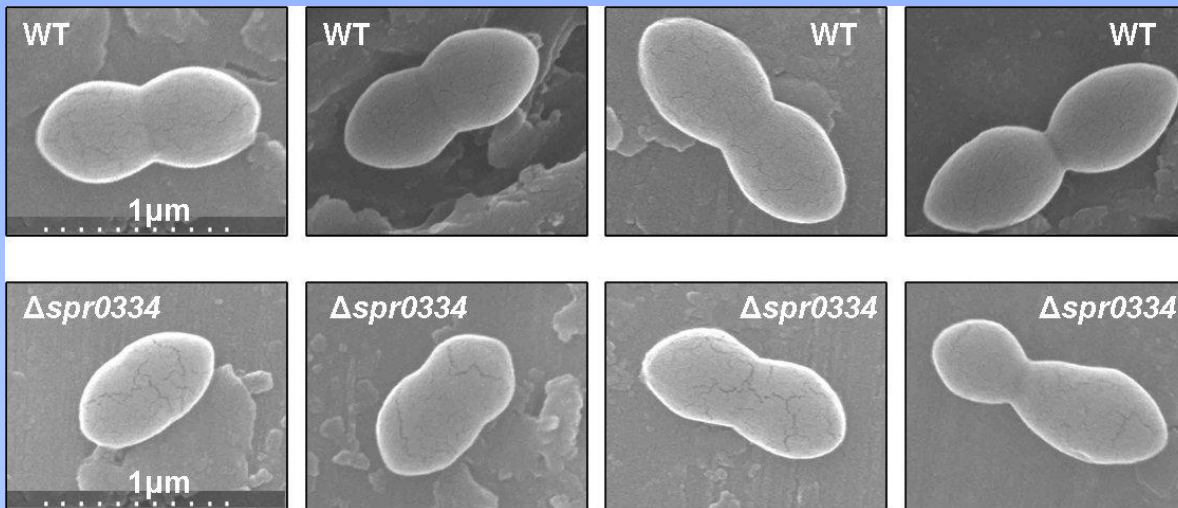


divoký kmen (WT): tvoří lancetovité diplokoky

mutantní kmen $\Delta spr0334$: tvoří menší kulatější buňky a často pozorujeme výskyt minibuněk (na obrázku označeny šipkou)

měření velikosti buněk: software MatLab

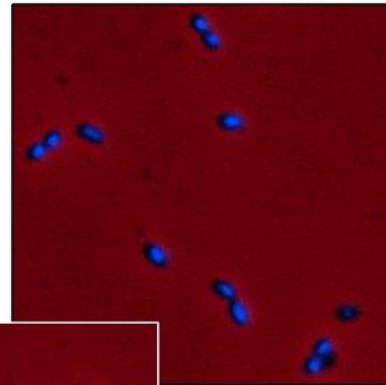
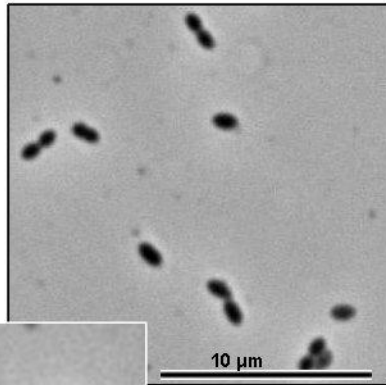
statistika: program Prism



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot:

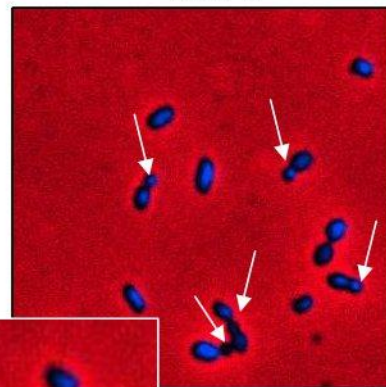
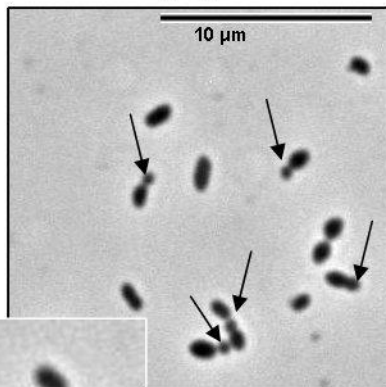
Morfologie kmene $\Delta spr0334$: barvení DNA

PH WT DAPI



divoký kmen (WT): tvoří lancetovité diplokoky obsahující ve všech buňkách DNA

PH $\Delta spr0334$ DAPI



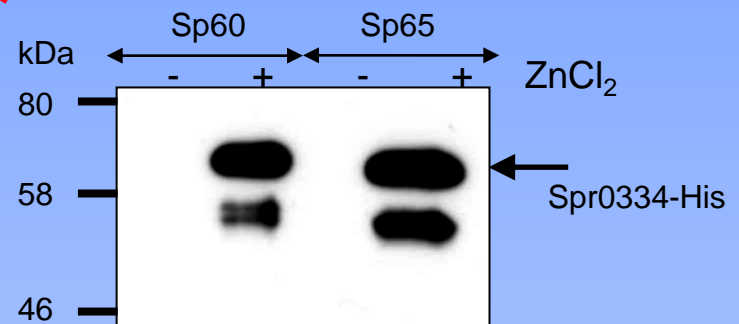
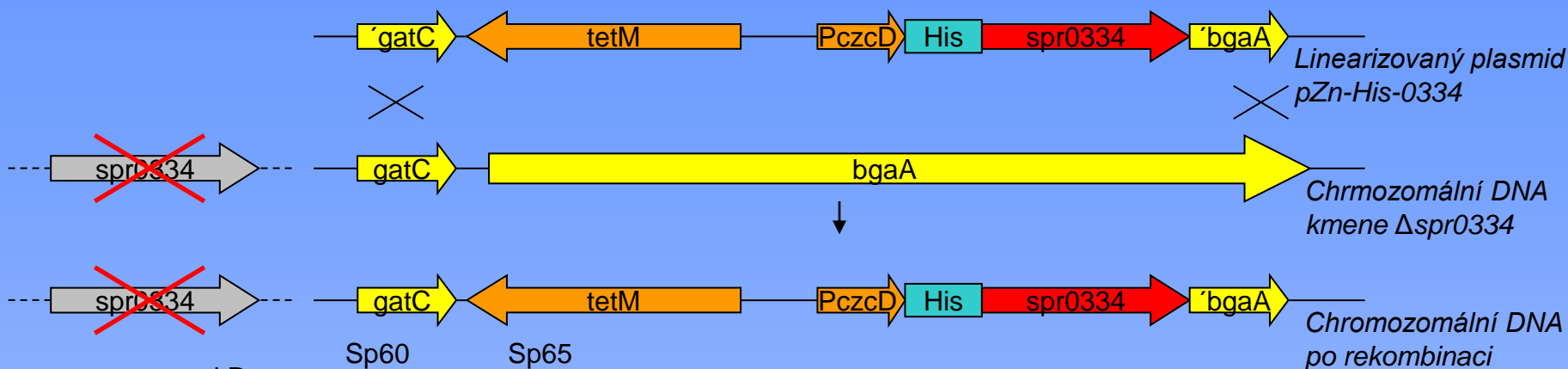
mutantní kmen $\Delta spr0334$: tvoří menší kulatější buňky a minibuňky, ve kterých často zcela chybí DNA

šipky označují minibuňky

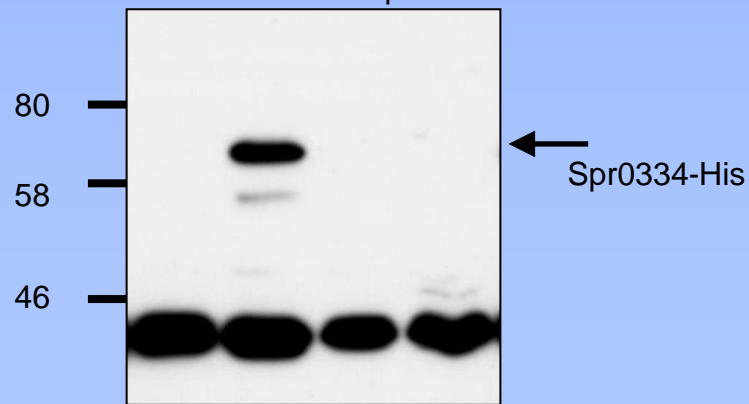
PH – fázový kontrast

DAPI – překryv fázového kontrastu a DAPI

Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: Expres a fosforylace proteinů His-Spr0334 a His-Spr0334-T67A+T78A



detekce anti-His protilátkou



detekce anti-pThr protilátkou

proteiny His-Spr0334 a His-Spr0334-T67A+T78A jsou specificky exprimovány v přítomnosti induktoru v médiu

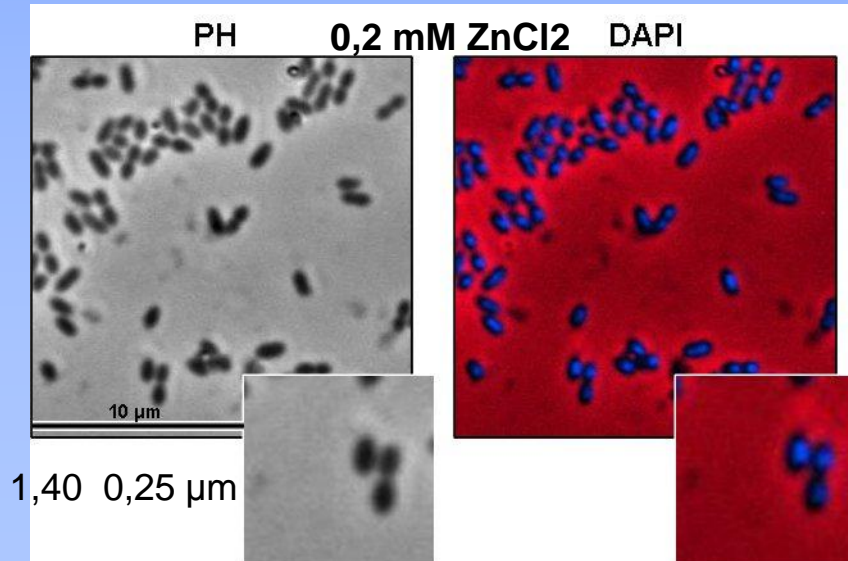
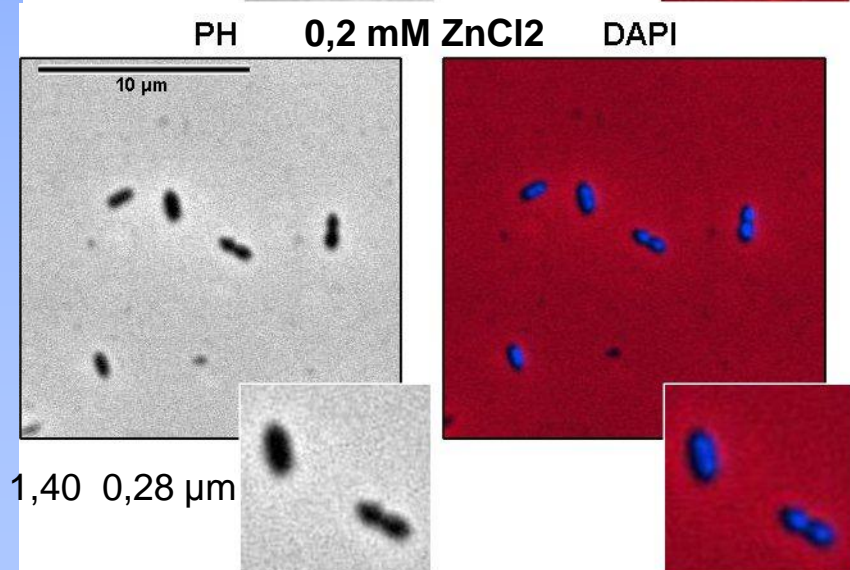
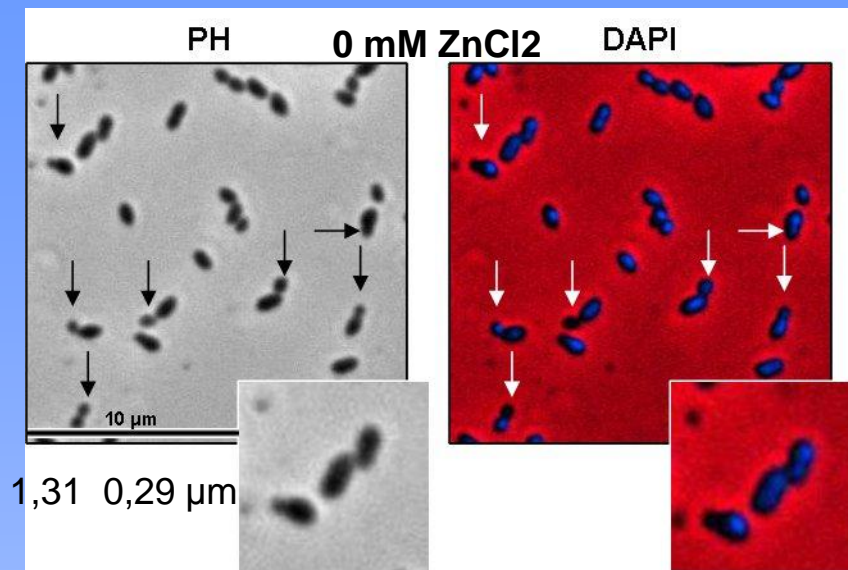
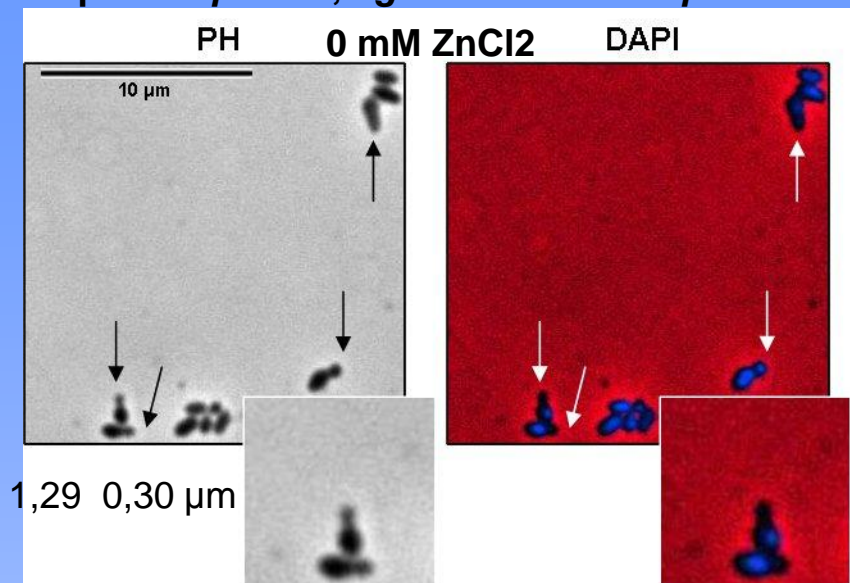
T67 a T78 jsou místy fosforylace proteinu Spr0334 *in vivo*

Nekonvenční signální dráhy u prokaryot:

Morfologie kmenů Sp60 a Sp65

Sp60: $\Delta spr0334$, *bgaA::PczcD-his-spr0334*

Sp65: $\Delta spr0334$, *bgaA::PczcD-his-spr0334*+ T67A+T78A



KOMPLEMENTACE MUTACE

NEFOSFOROVANÝ PROTEIN KOMPLEMENTACE MUTACE

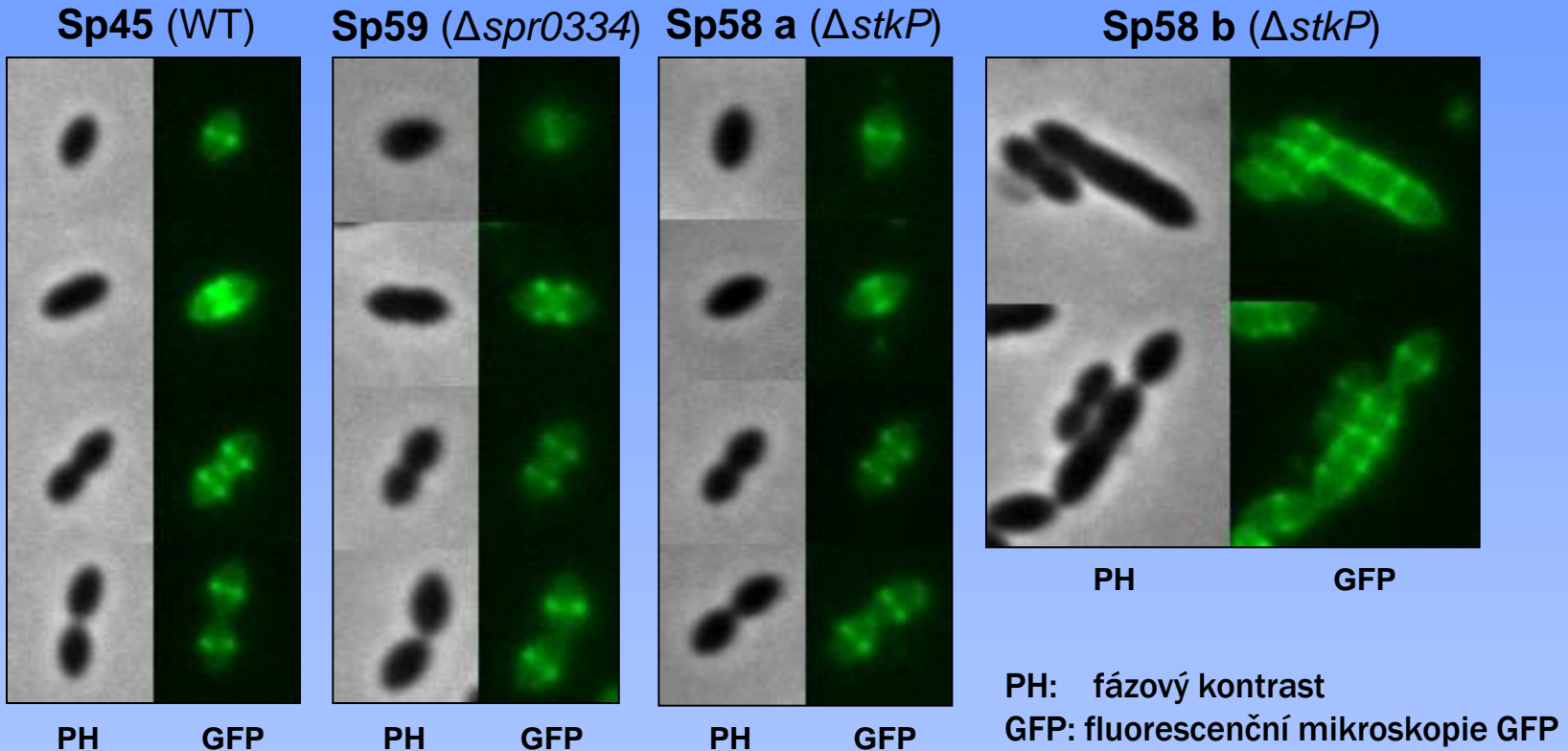
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot:

Lokalizace GFP-Spr0334 v buňce *S. pneumoniae*

Sp45: Rx1; *bgaA::gfp-spr0334*

Sp59: Δ *spr0334*; *bgaA::gfp-spr0334*

Sp58: Δ *stkP*; *bgaA::gfp-spr0334*

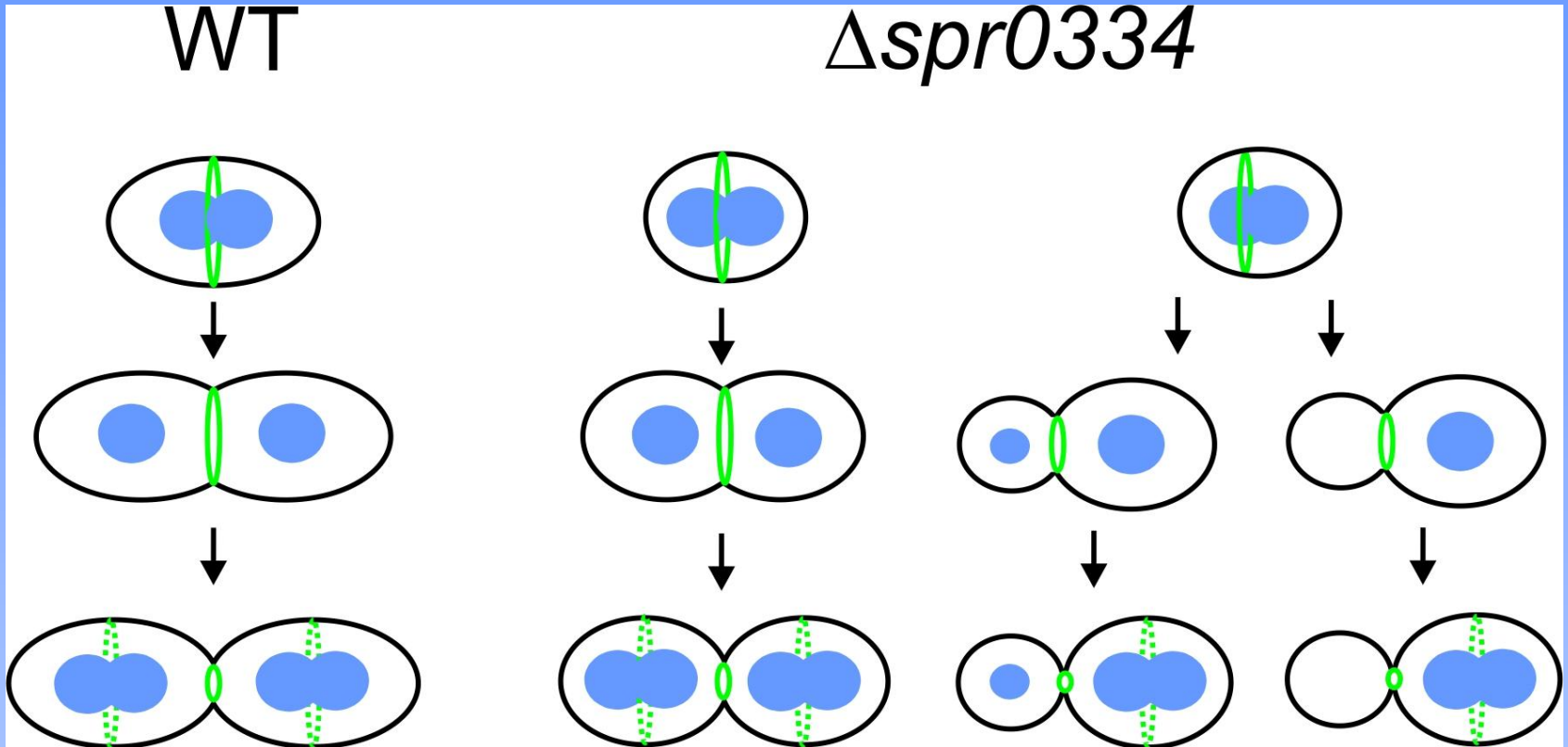


Protein GFP-Spr0334 je ve všech třech kmenech lokalizován převážně v buněčné prepážce.

Lokalizace se významně nemění v závislosti na stavu fosforylace proteinu Spr0334.

Nekonvenční signální dráhy u prokaryot:

Schématické znázornění buněk kmene $\Delta spr0334$



Protein Spr0334 je proteinem buněčného dělení, který ovlivňuje morfologii buněk a nejspíše se účastní výběru budoucího místa dělení či segregace chromosomů u *S. pneumoniae* dosud neznámým mechanismem.

Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Shrnutí:

StkP se účastní regulace odpovědi buňky na vnější stresové podmínky

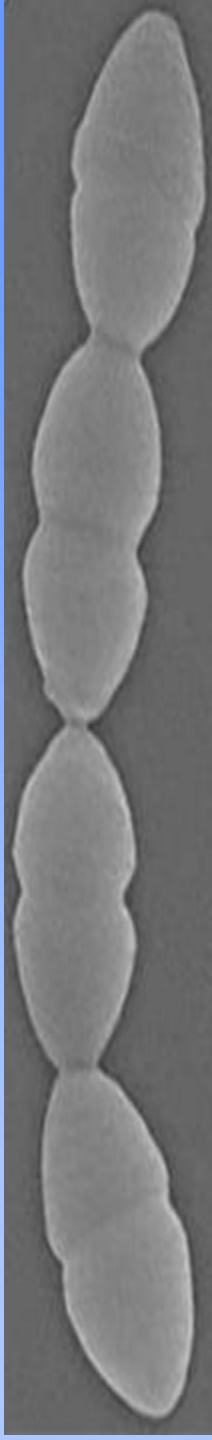
StkP ovlivňuje expresi celé řady genů, z nichž některé kódují proteiny důležité pro virulenci, stresovou odpověď nebo navození stavu kompetence

StkP je transmembránovou Ser/Thr proteinkinázou, která vytváří dimery

PASTA domény jsou determinantou buněčné lokalizace a interagují s ligandem NAG-NAM-pp

StkP kolokalizuje v buněčné přepážce společně s proteinfosfatázou PhpP a proteinem buněčného dělení DivIVA

Spr0334 je substrátem StkP a je proteinem buněčného dělení a segregace chromosomu.



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Poděkování

Laboratoř:

Spolupráce:

Linda Nováková

Jésus Sanz

Lenka Sasková

Jan-Willem Veening

Petra Pallová

Orietta Masidda

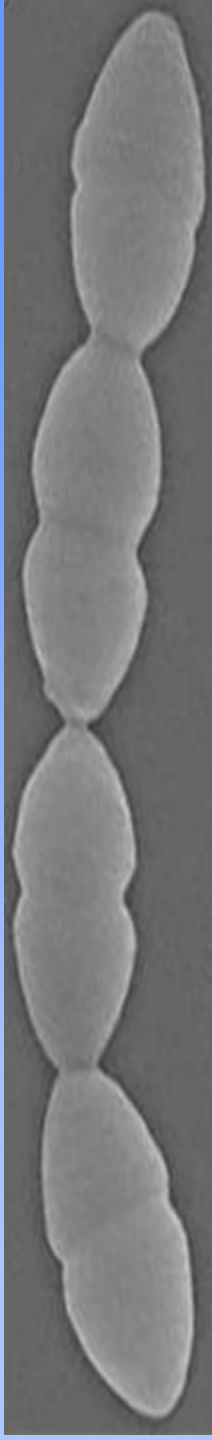
Nela Štekerová

Virginie Molle

Eliška Malíková

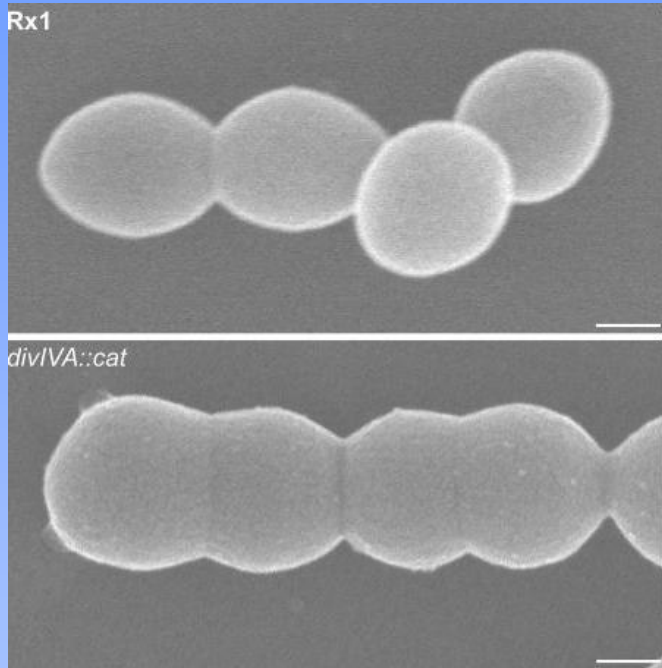
Shahriar Mobashery

GA ČR, GA AV



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

DivIVA, protein buněčného dělení a substrát StkP



Vysoce konzervovaný v G+ bakteriích

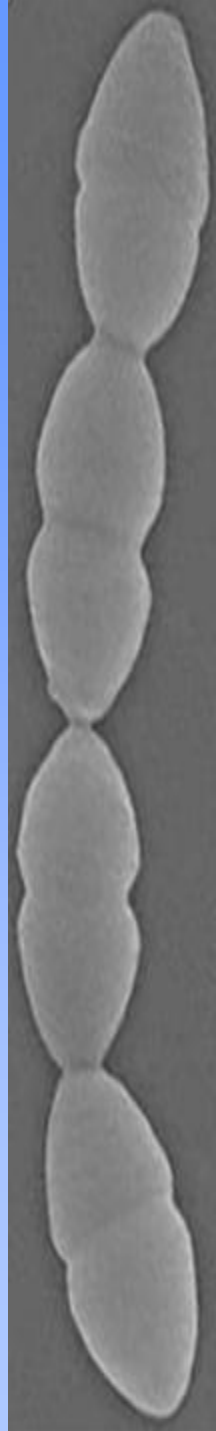
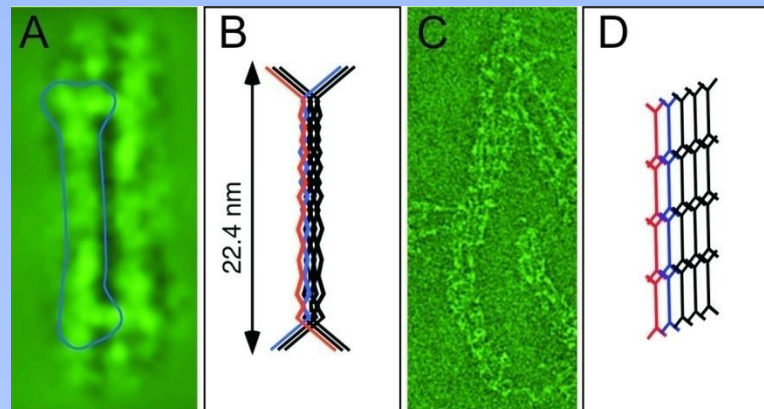
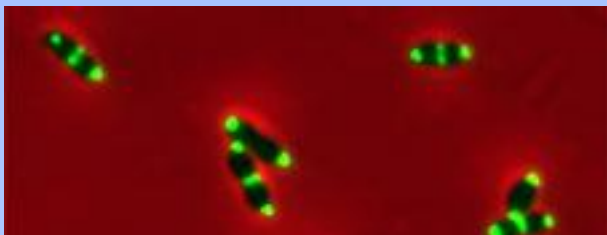
B. subtilis: lokalizován v septu a na b. pólech

S. pneumoniae: morfologie, tvorba septa, segregace chromozómu

Lokalizace: septa a buněčné póly

Interaguje s dalšími proteiny bun. dělení

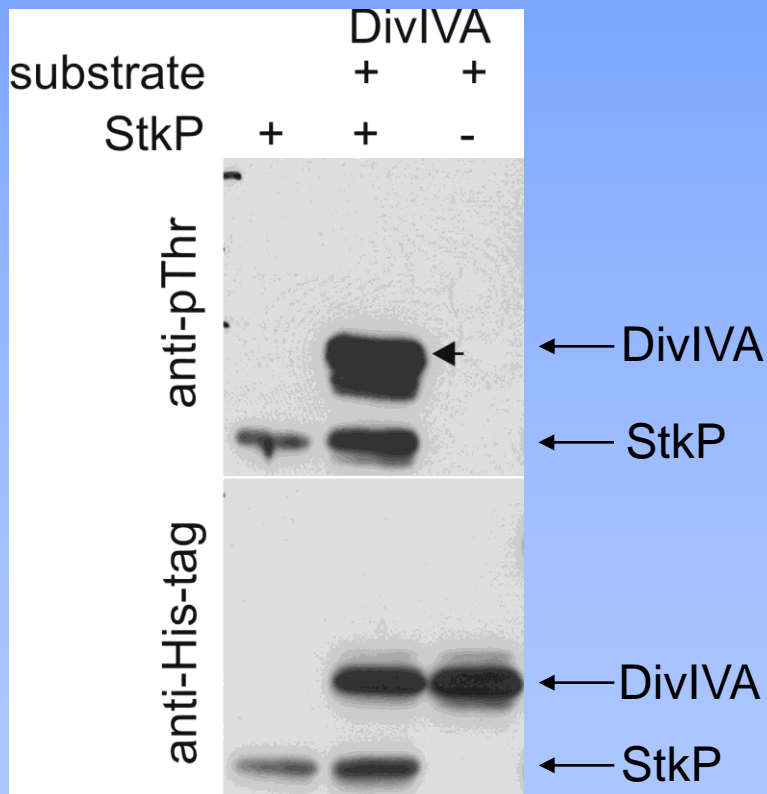
Oligomerizace



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

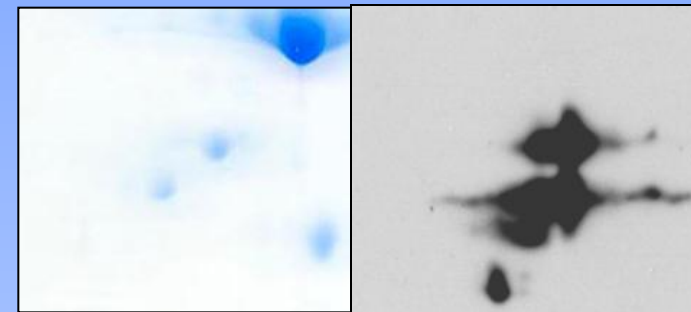
DivIVA, protein buněčného dělení a substrát StkP

In vitro fosforylace

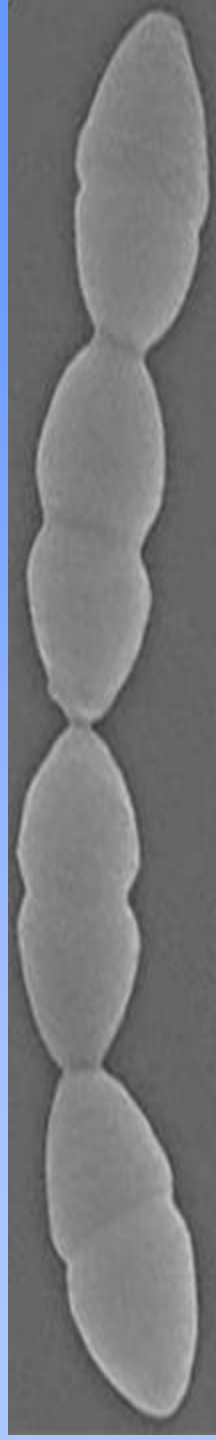


In vivo fosforylace

2D SDS-PAGE a-pThr



MALDI-TOF analýza: DivIVA



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

DivIVA, protein buněčného dělení a substrát StkP

Identifikace fosforylovaných aminokyselinových zbytků

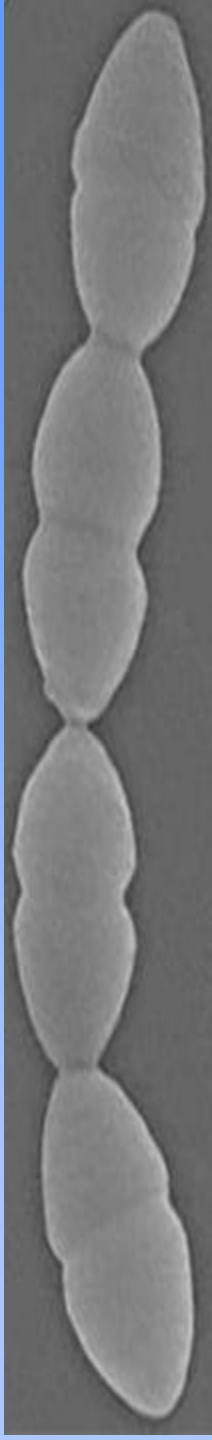
IN VITRO: Thr15

IN VIVO: fosfoproteom *S. pneumoniae* (Sun et al.): S5 and T201

Fosforylace DivIVA v dalších mikroorganismech:

M. tuberculosis (Thr73)

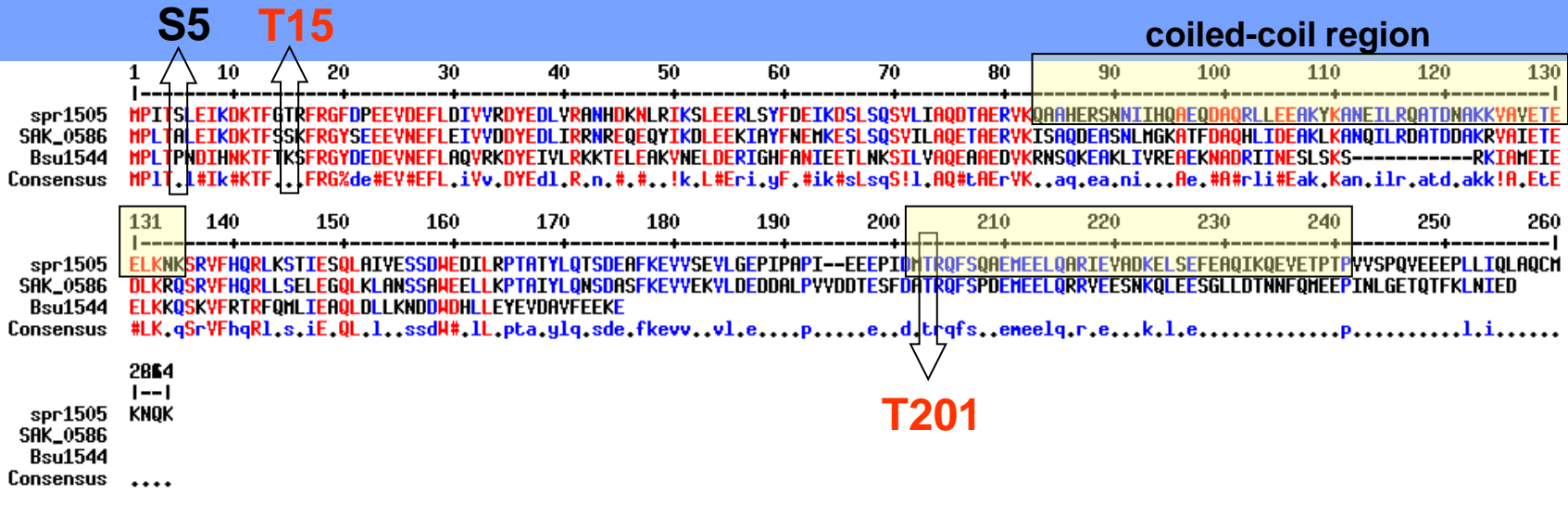
S. agalactiae (Thr201)



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

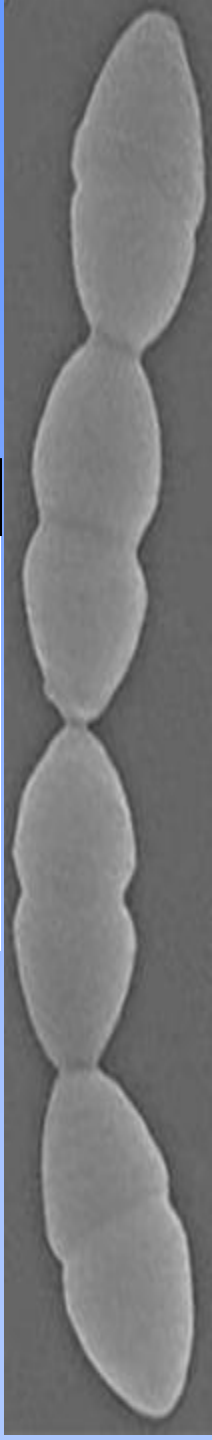
DivIVA, protein buněčného dělení a substrát StkP

Porovnání sekvencí DivIVA: *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *B. subtilis* a výběr zbytků pro mutagenезi



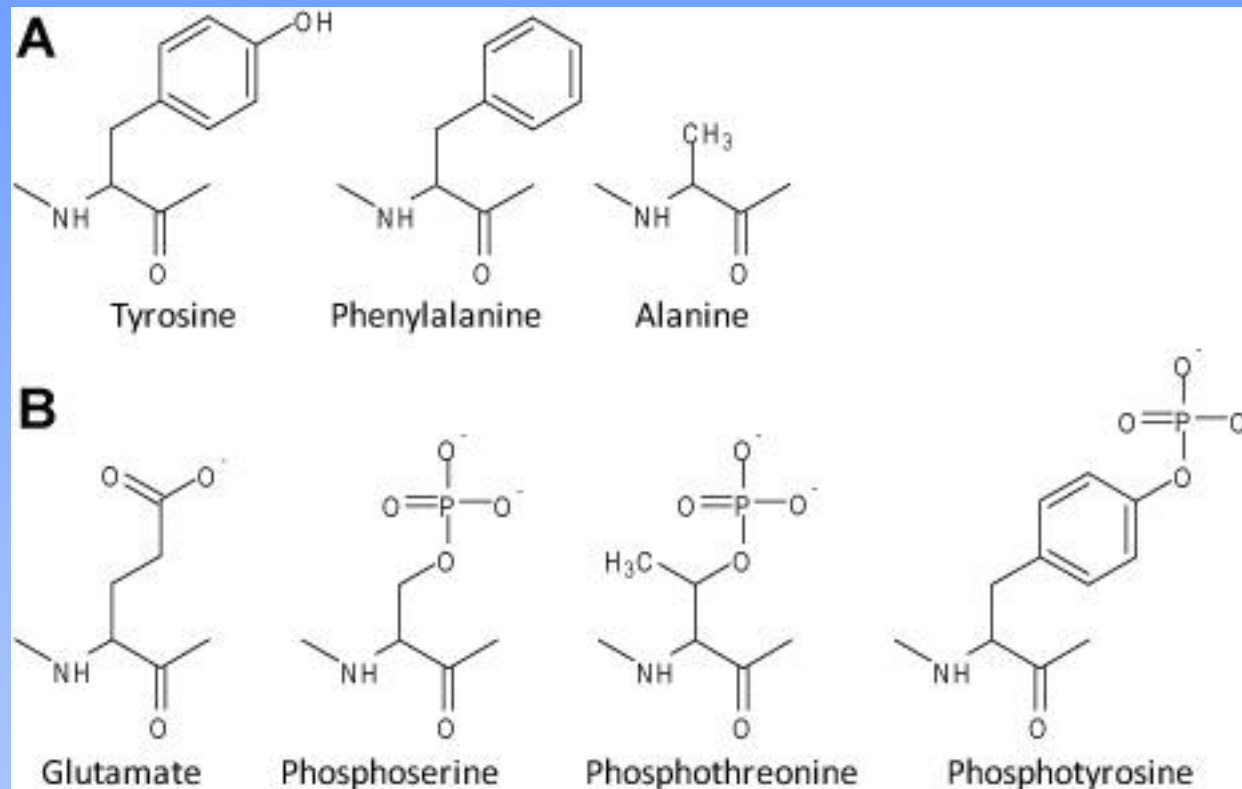
Fosfoablativní mutace: Thr – Ala

Fosfomimetické mutace: Thr – Glu/Asp



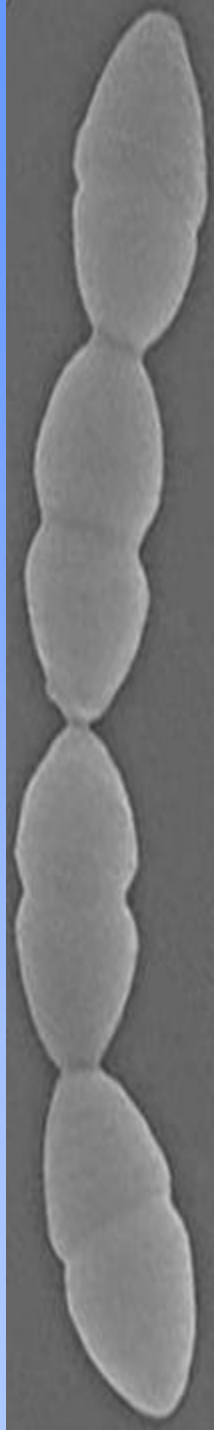
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

DivIVA, protein buněčného dělení a substrát StkP



Fosfoablativní mutace: Thr – Ala

Fosfomimetické mutace: Thr – Glu/Asp

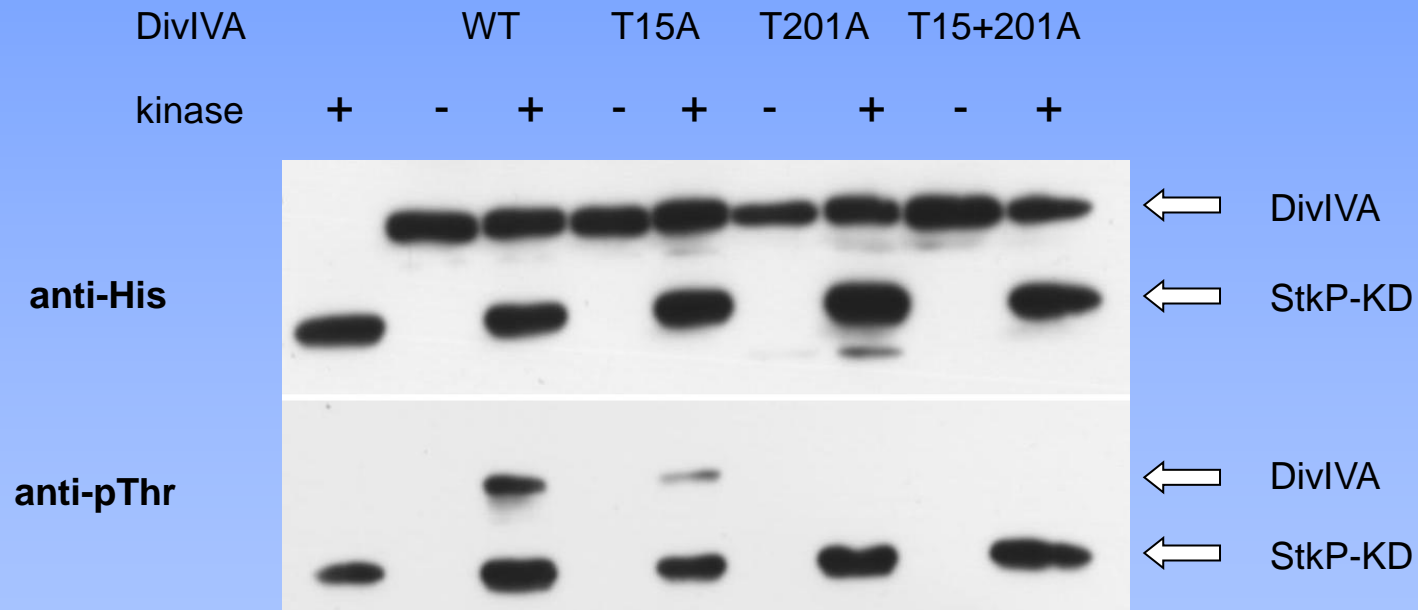


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

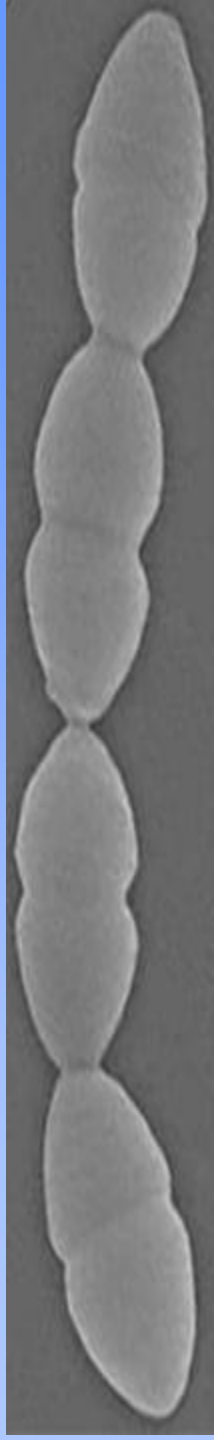
DivIVA, protein buněčného dělení a substrát StkP

Fosforylace T15 a T201 *in vitro*

Fosfoablativní mutanty : DivIVA-T15A, DivIVA-T201A and DivIVA-T15+201A



DivIVA je fosforylován *in vitro* na zbytku T201, s menší účinností též na T15

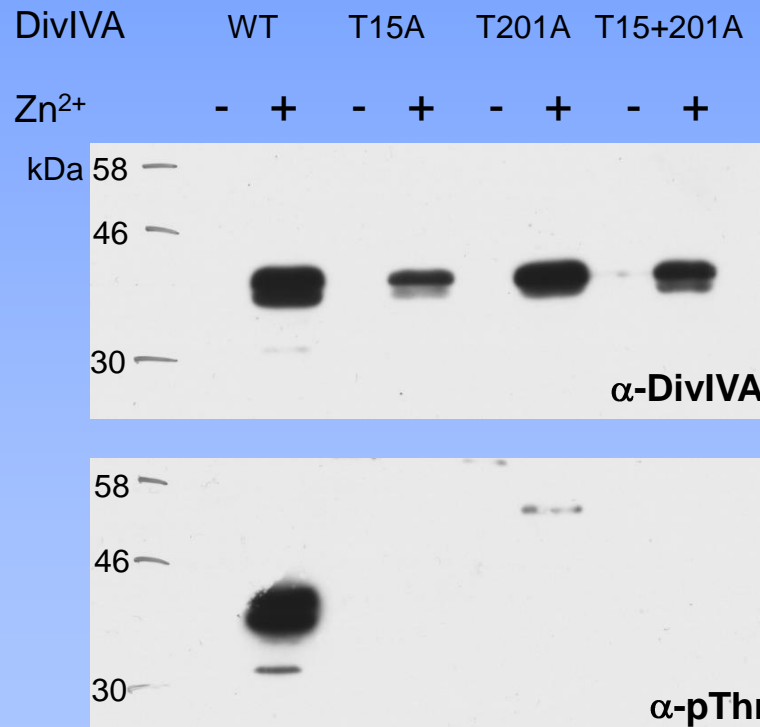


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

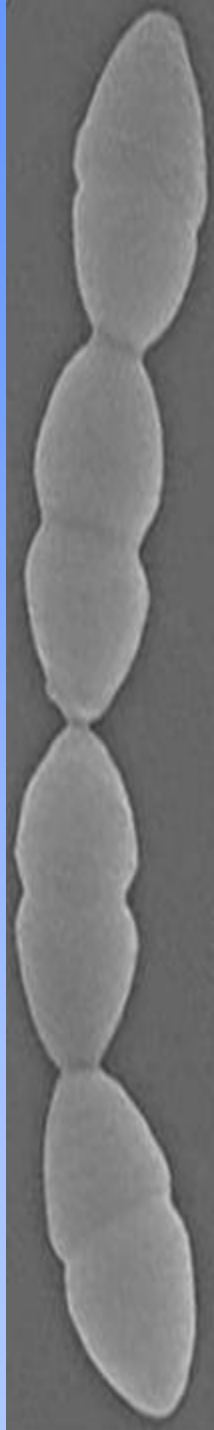
DivIVA, protein buněčného dělení a substrát StkP

Fosforylace T15 a T201 *in vivo*

Fosfoablativní mutanty : DivIVA-T15A, DivIVA-T201A and DivIVA-T15+201A



DivIVA je fosforylován *in vivo* na obou zbytcích T15 i T201

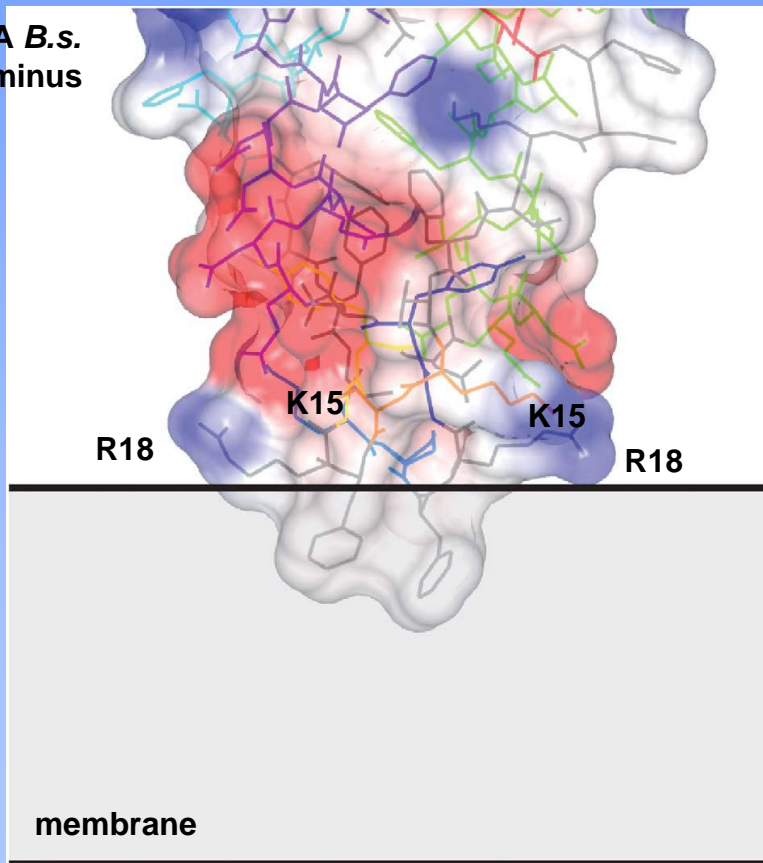


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

DivIVA, protein buněčného dělení a substrát StkP

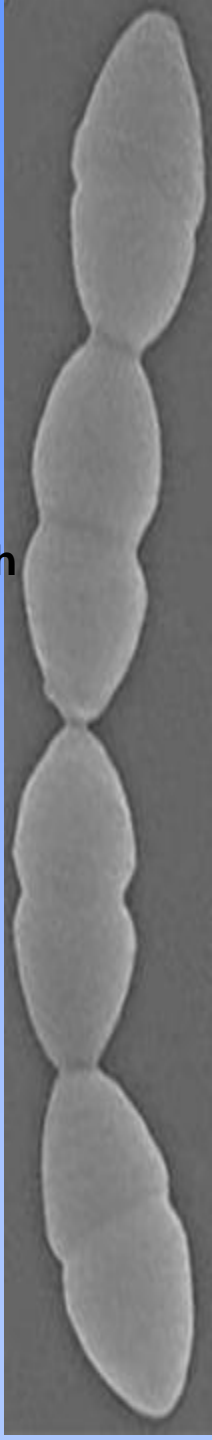
Fosforylace zbytku T15 může inhibovat interakci DivIVA s membránou

DivIVA *B.s.*
N-terminus



Positively charged R18/K15 interact with strongly negatively charged surface of membrane

Phosphorylation of T15 introduces negative charge on the N-terminus of DivIVA of *S. pneumoniae* and likely hamper electrostatic interaction with membrane surface

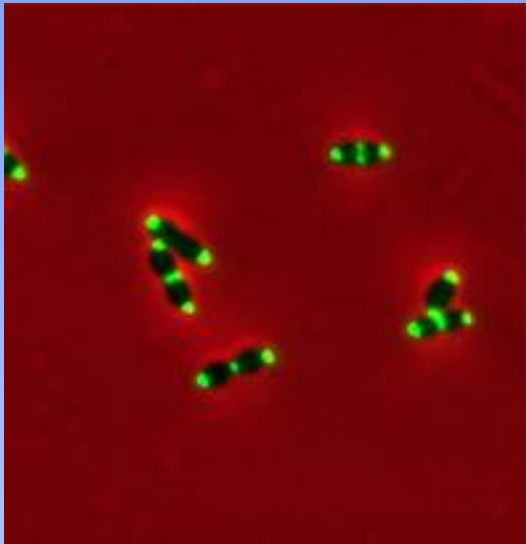


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

DivIVA, protein buněčného dělení a substrát StkP

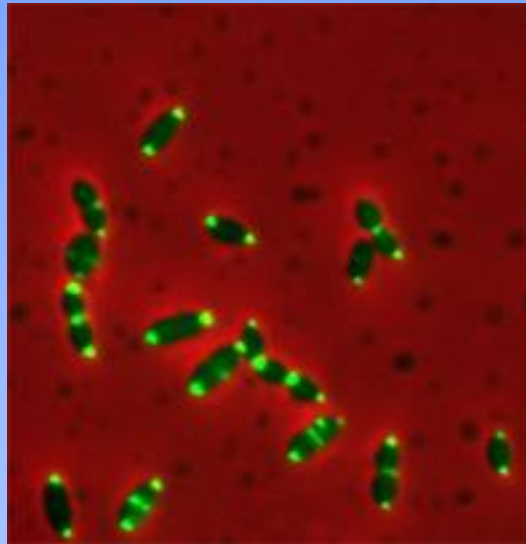
Lokalizace fosfoablativních a fosfomimetických alel DivIVA

S.p. $\Delta divIVA$ + DivIVA-GFP



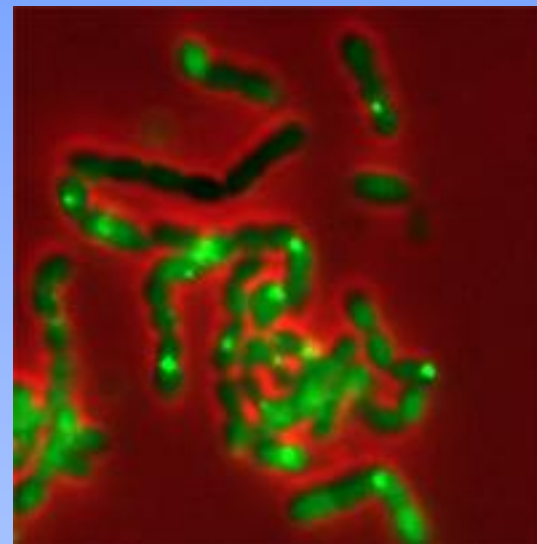
wild type

S.p. $\Delta divIVA$ + DivIVA-T15+201A



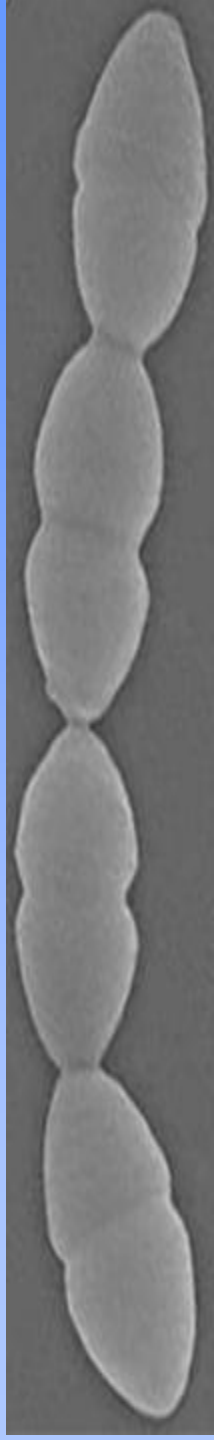
phosphoablative allele

S.p. $\Delta divIVA$ + DivIVA-T15+201E



phosphomimetic allele

Fosfomimetická mutace DivIVA T15E způsobuje delokalizaci



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Shrnutí:

StkP se účastní regulace odpovědi buňky na vnější stresové podmínky

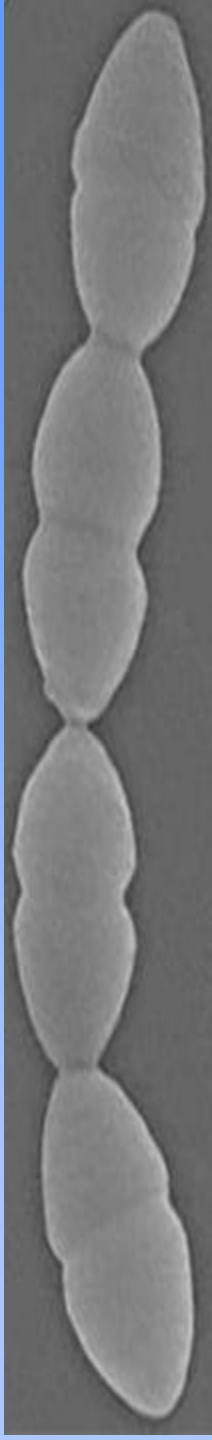
StkP ovlivňuje expresi celé řady genů, z nichž některé kódují proteiny důležité pro virulenci, stresovou odpověď nebo navození stavu kompetence

StkP je transmembránovou Ser/Thr proteinkinázou, která vytváří dimery

PASTA domény jsou determinantou buněčné lokalizace a interagují s ligandem NAG-NAM-pp

StkP kolokalizuje v buněčné přepážce společně s proteinfosfatázou PhpP a proteinem buněčného dělení DivIVA

DivIVA je substrátem StkP a jeho fosforylace ovlivňuje jeho interakci s buněčnou membránou.



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Poděkování

Laboratoř:

Spolupráce:

Linda Nováková

Jésus Sanz

Lenka Sasková

Jan-Willem Veening

Petra Pallová

Orietta Masidda

Aleš Ulrych

Virginie Molle

Eliška Malíková

Shahriar Mobashery

GA ČR, GA AV

