

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

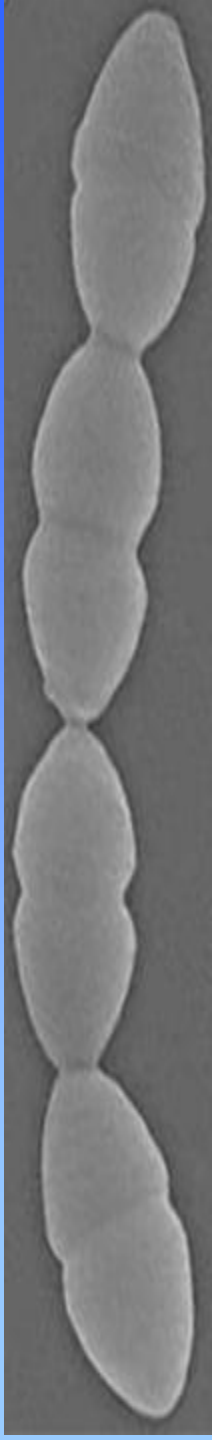
StkP je transmembránovou Ser/Thr proteinkinázou, která vytváří dimery

PASTA domény StkP jsou determinantou buněčné lokalizace a lokalizace StkP je závislá na přítomnosti volného peptidoglykanu v místech jeho aktivní biosyntézy

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

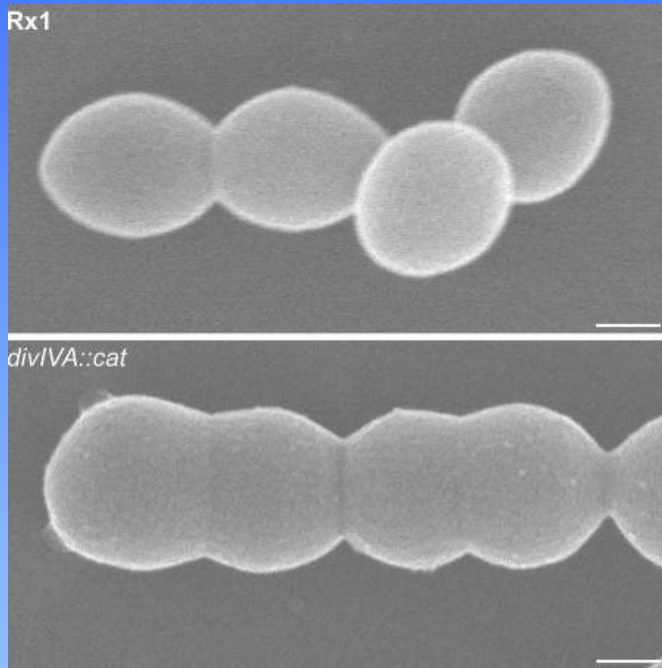
StkP a PhpP regulují koordinaci laterální a septální biosyntézu peptidoglykanu

StkP fosforyluje řadu substrátů, které jsou defosforylovány PhpP



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

DivIVA, protein buněčného dělení a substrát StkP



Vysoce konzervovaný v G+ bakteriích

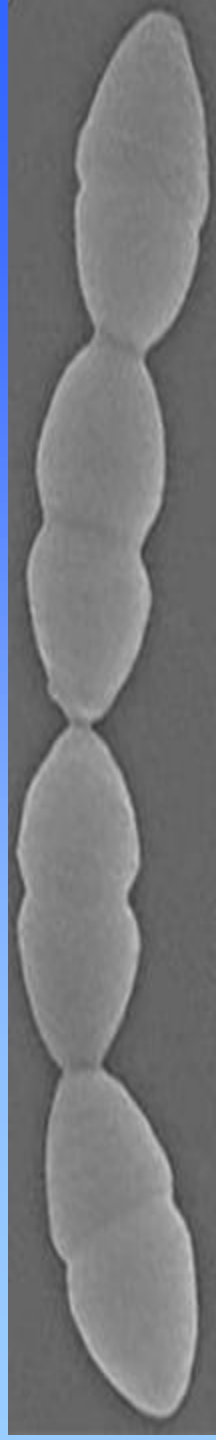
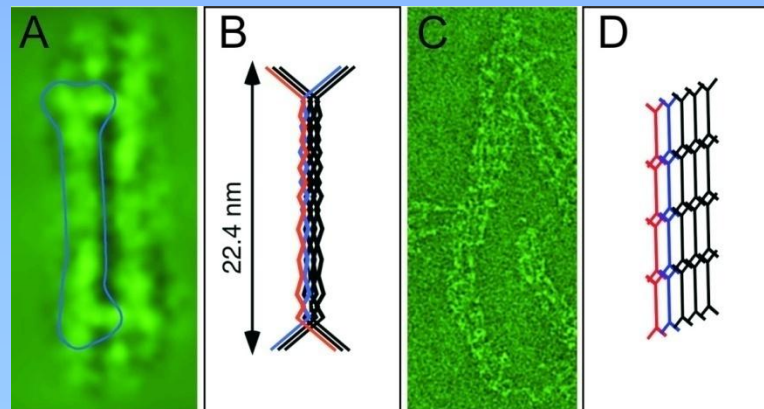
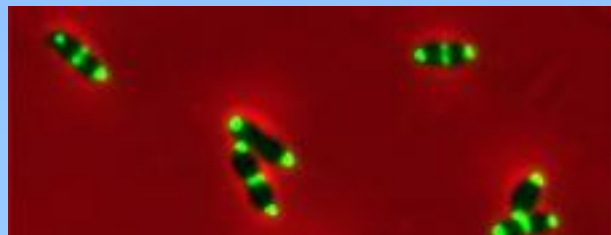
B. subtilis: lokalizován v septu a na b. pólech

S. pneumoniae: morfologie, tvorba septa, segregace chromozómu

Lokalizace: septa a buněčné póly

Interaguje s dalšími proteiny bun. dělení

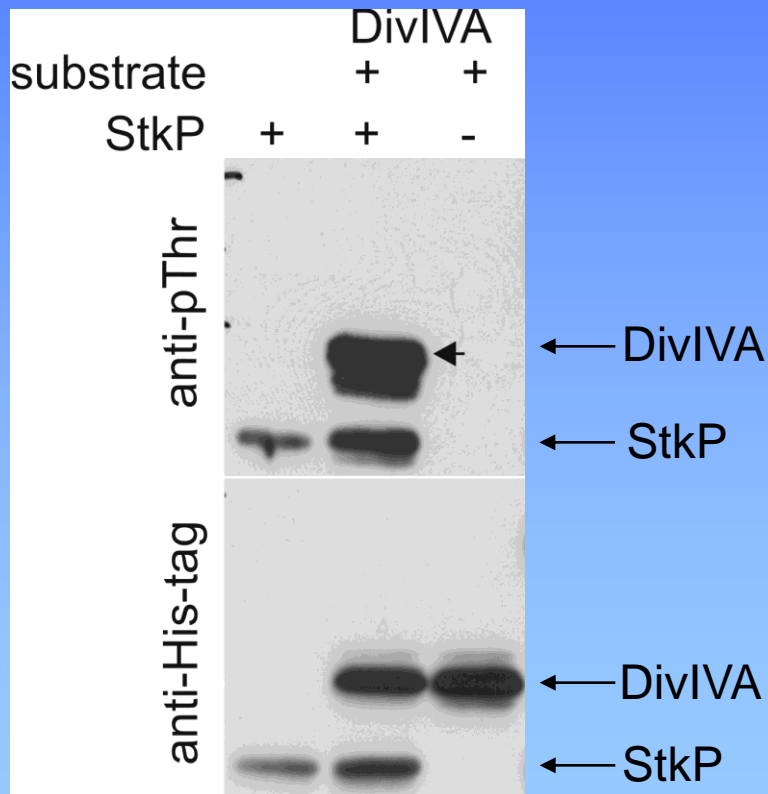
Oligomerizace



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

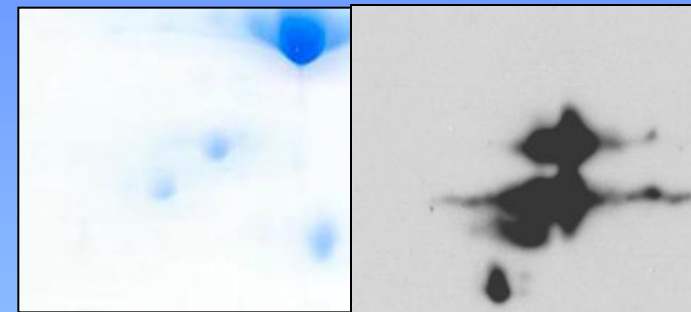
DivIVA, protein buněčného dělení a substrát StkP

In vitro fosforylace

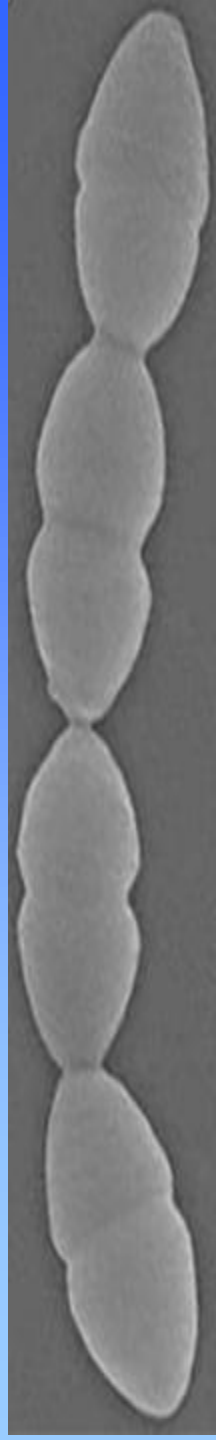


In vivo fosforylace

2D SDS-PAGE a-pThr



MALDI-TOF analýza: DivIVA

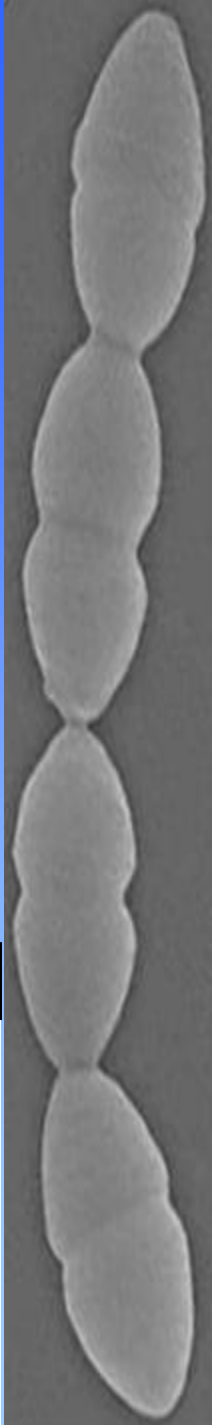
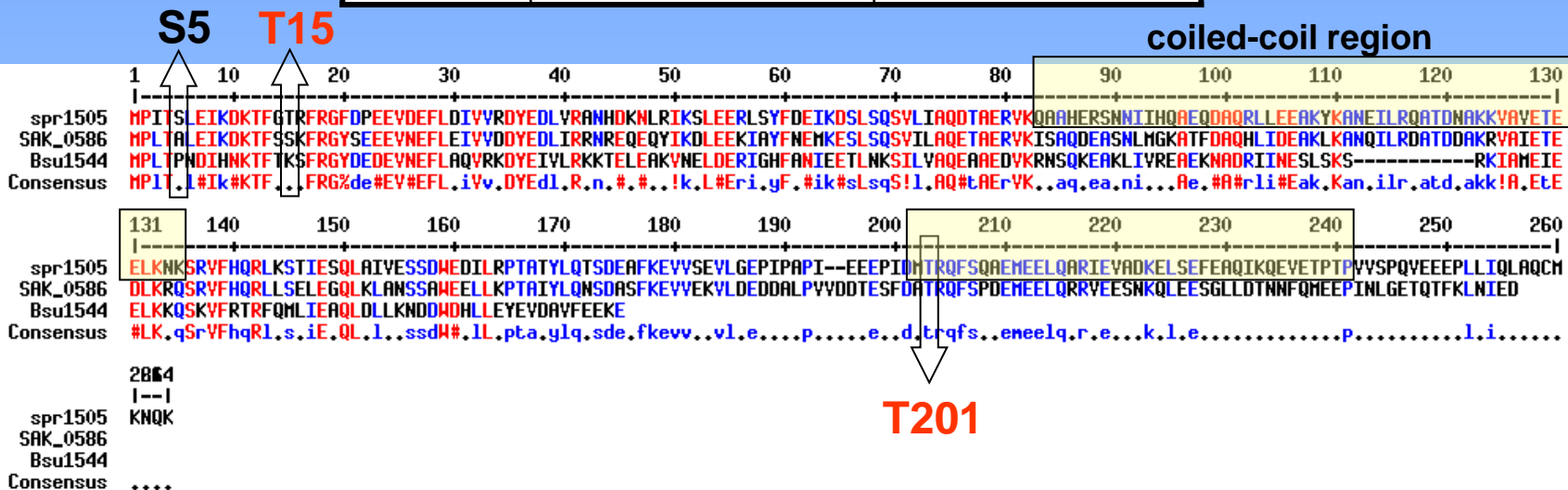


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

DivIVA, protein buněčného dělení a substrát StkP

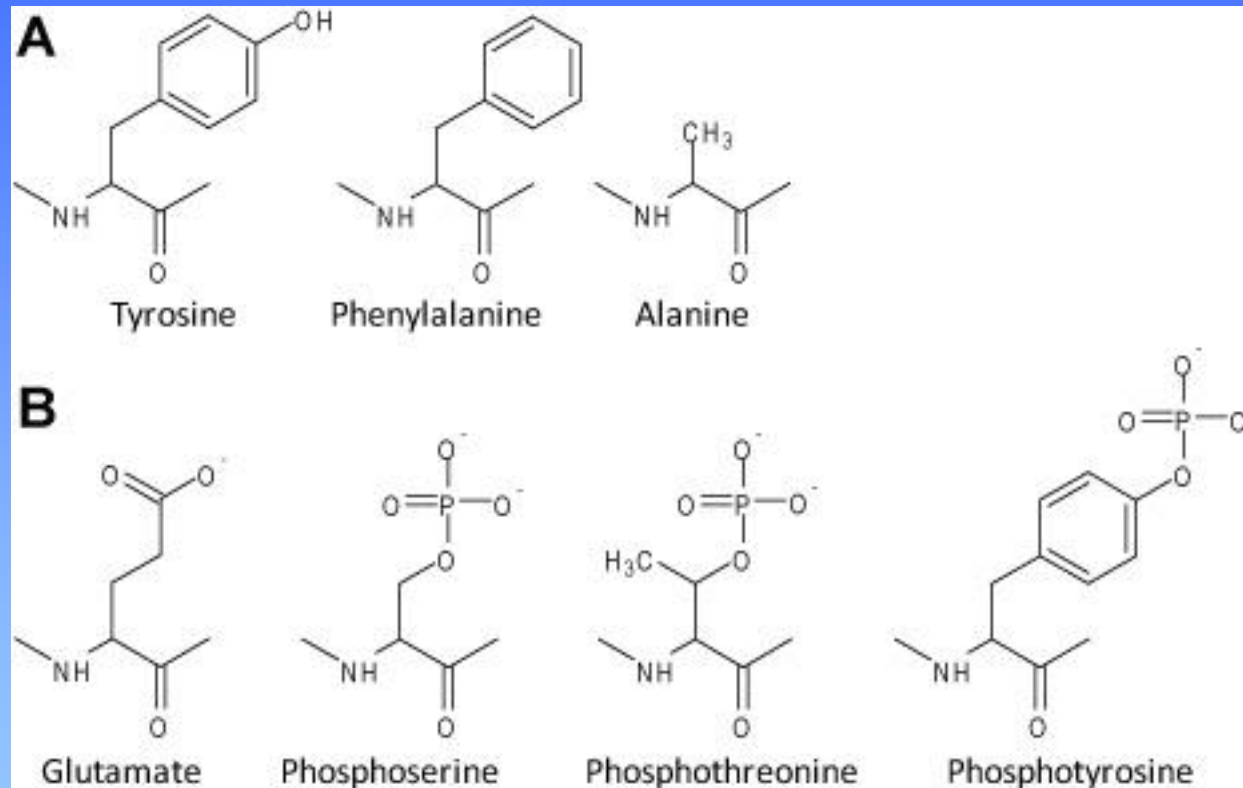
Identifikace fosforylovaných aminokyselinových zbytků

Identification of phosphorylation sites in DivIVA by LC/MS/MS		
residue	<i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>	reference
T4	<i>in vivo</i> – <i>E. coli</i>	this study
S5	<i>in vivo</i> – <i>S.pneumoniae</i>	Sun <i>et al.</i> , 2010 (6)
T15	<i>in vivo</i> – <i>E. coli</i> ; <i>in vitro</i>	this study
S70	<i>in vivo</i> – <i>E. coli</i>	this study
T129	<i>in vivo</i> – <i>E. coli</i>	this study
T201	<i>in vivo</i> – <i>S.pneumoniae</i>	Sun <i>et al.</i> , 2010 (6) Fleurie <i>et al.</i> , 2011(7)
S205	<i>in vivo</i> – <i>E. coli</i>	this study
S224	<i>in vivo</i> – <i>E. coli</i>	this study



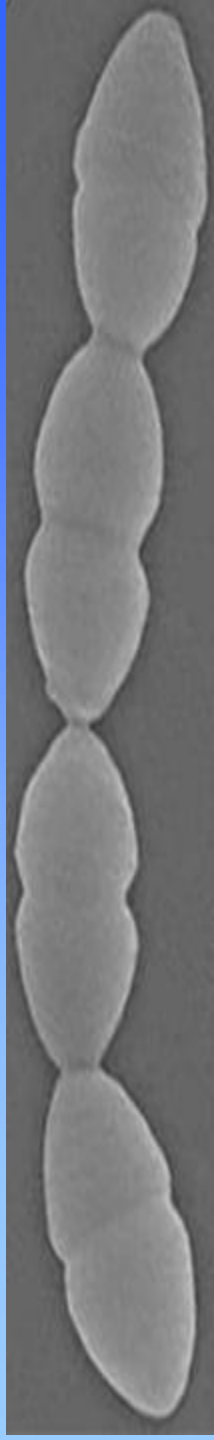
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Fosfoablativní a fosfomimetické aminokyseliny



Fosfoablativní mutace: Thr – Ala

Fosfomimetické mutace: Thr – Glu/Asp

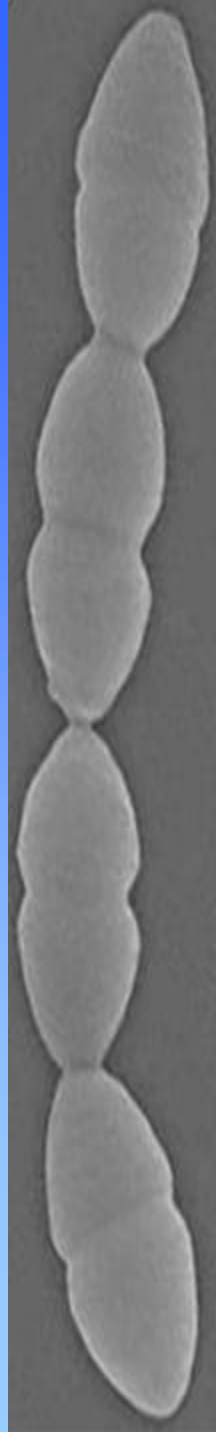
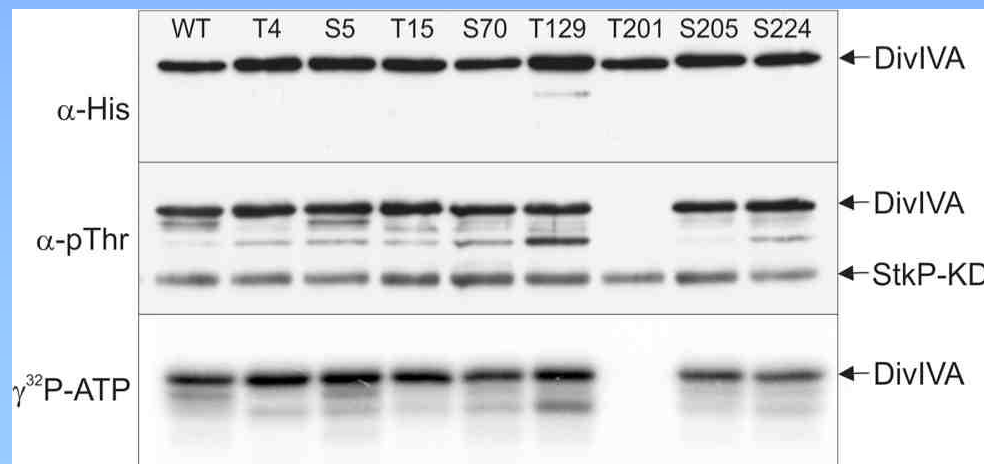


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

DivIVA, protein buněčného dělení a substrát StkP

Identifikace fosforylovaných aminokyselinových zbytků

Identification of phosphorylation sites in DivIVA by LC/MS/MS		
residue	<i>in vivo / in vitro</i>	reference
T4	<i>in vivo</i> – <i>E. coli</i>	this study
S5	<i>in vivo</i> – <i>S.pneumoniae</i>	Sun <i>et al.</i> , 2010 (6)
T15	<i>in vivo</i> – <i>E. coli</i> ; <i>in vitro</i>	this study
S70	<i>in vivo</i> – <i>E. coli</i>	this study
T129	<i>in vivo</i> – <i>E. coli</i>	this study
T201	<i>in vivo</i> – <i>S.pneumoniae</i>	Sun <i>et al.</i> , 2010 (6) Fleurie <i>et al.</i> , 2011(7)
S205	<i>in vivo</i> – <i>E. coli</i>	this study
S224	<i>in vivo</i> – <i>E. coli</i>	this study



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

Komplementace mutace DivIVA

Fig.1 Complementation of *divIVA* mutation in TSB medium
 $\Delta divIVA$ P_{Zn}-*divIVA* (TSB liquid medium)

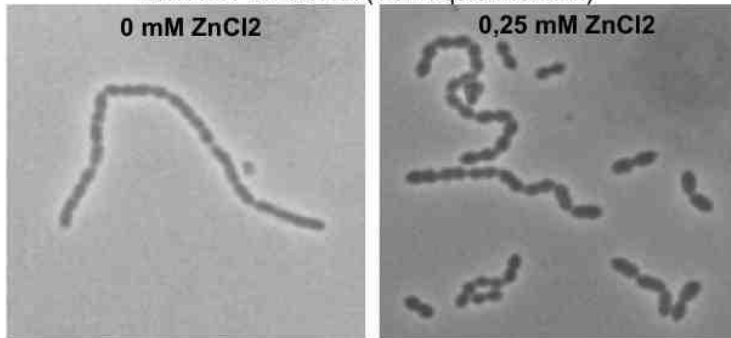


Fig.2 Expression of DivIVA under Zn-inducible promoter

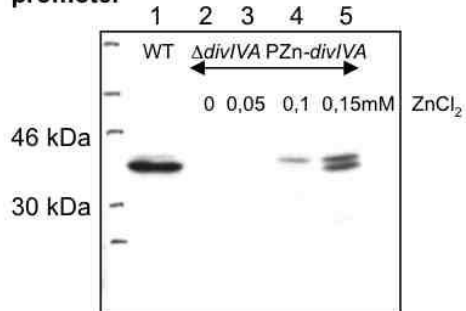
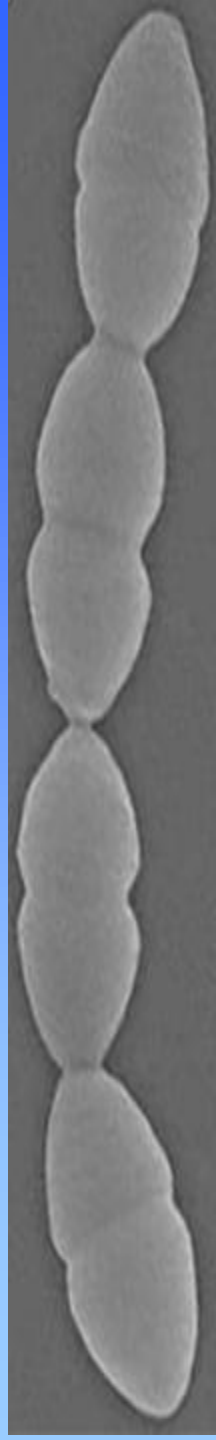
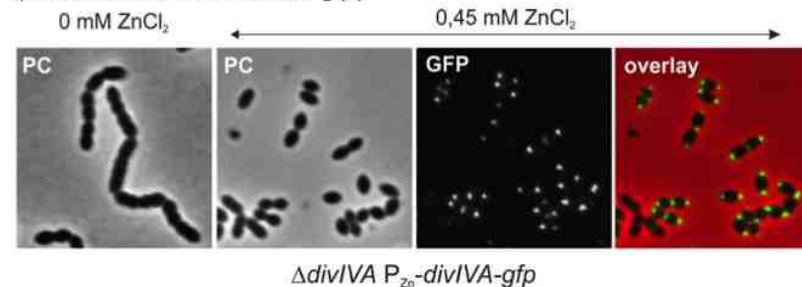


Fig.3 Complementation of *divIVA* on Columbia blood agar
 $\Delta divIVA$ P_{Zn}-*divIVA* (Columbia blood agar)



Fig.4 Complementation of *divIVA* mutation on blood agar plates
 (strain $\Delta divIVA$ P_{Zn}-*divIVA*-gfp)



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

Fosforylace DivIVA in vivo

Fig.1. Phosphorylation of the different phosphabative DivIVA-GFP in vivo (Columbia blood agar plates). Strains $\Delta divIVA$ PZn-*div-gfp*.

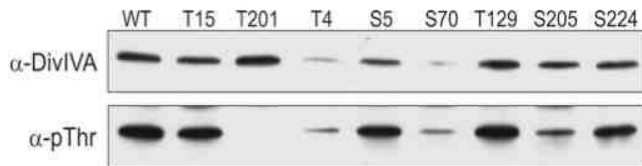


Fig.2. Phosphorylation of DivIVA in vivo (TSB). Strains $\Delta divIVA$ PZn-*divIVA*.

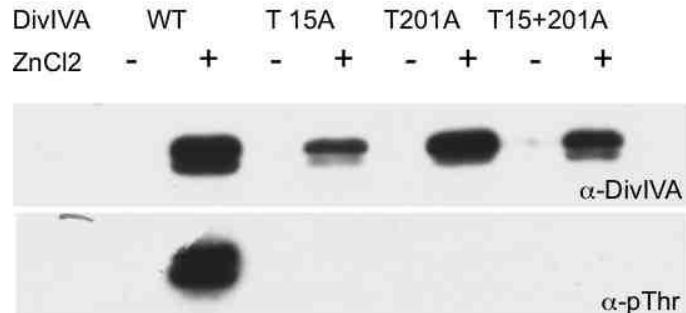
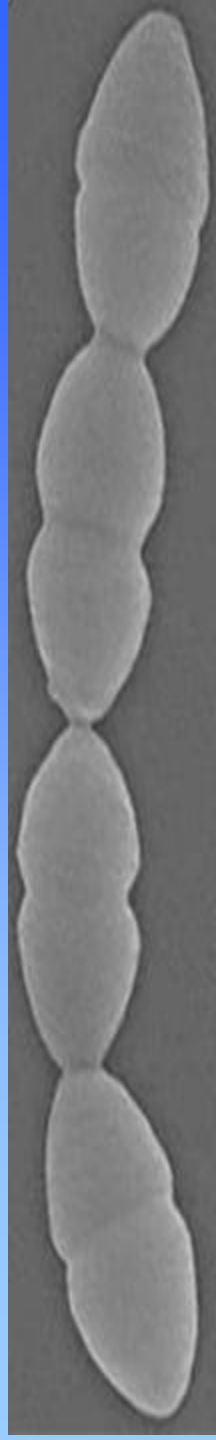
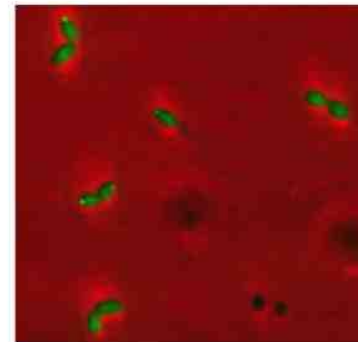
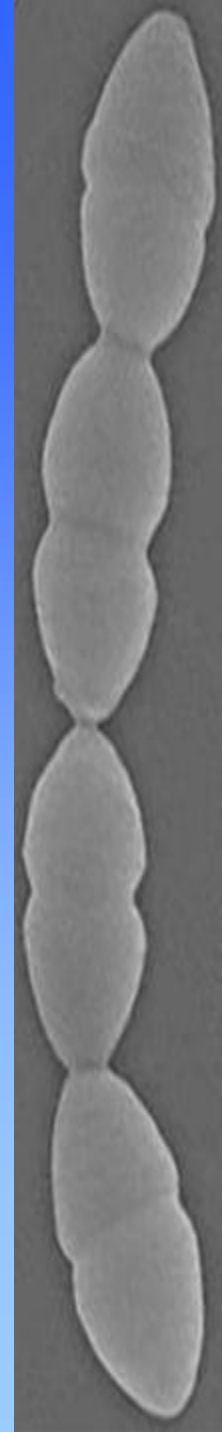
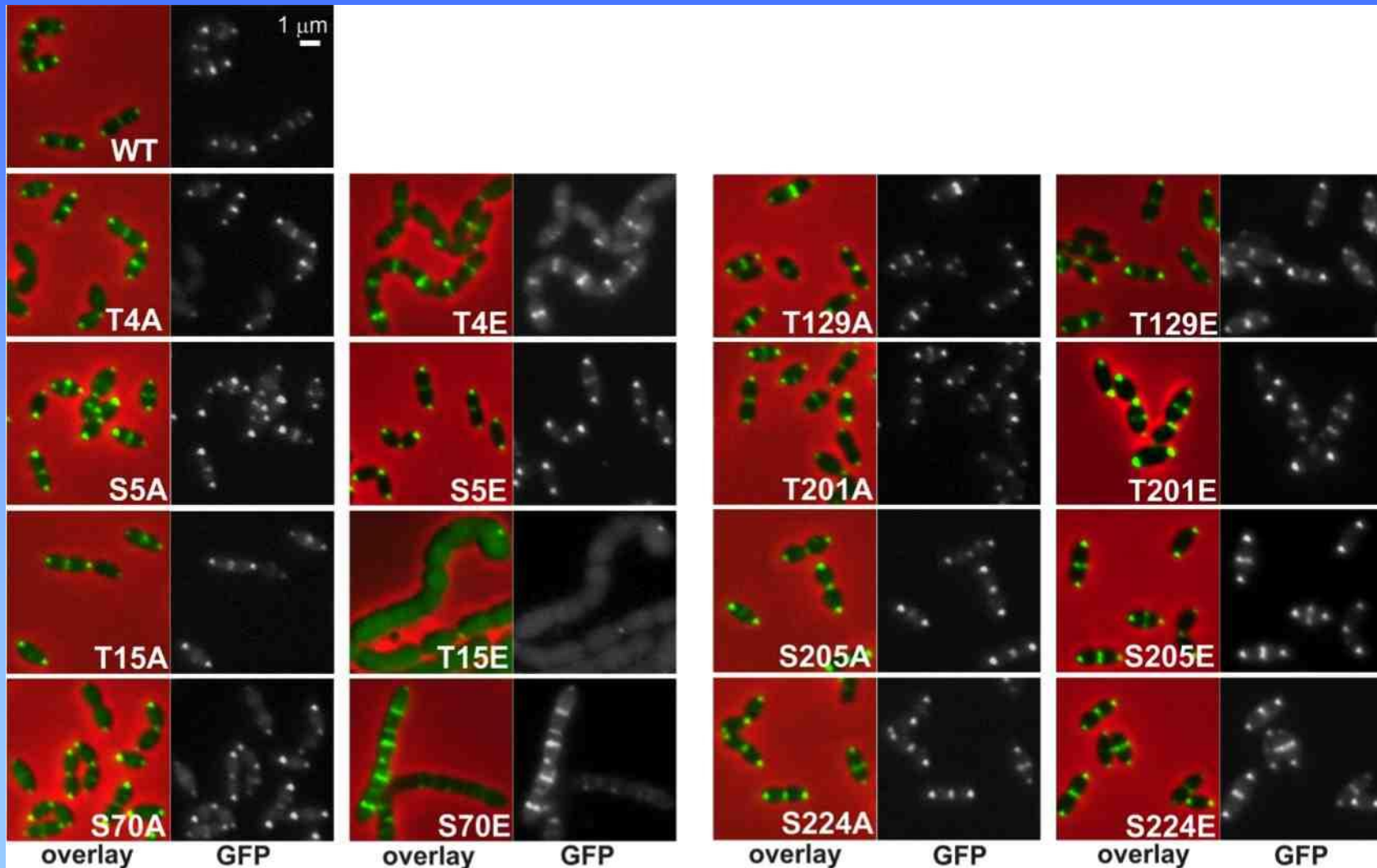


Fig.3. Delocalization (?) of DivIVA-GFP-T15A in strain $\Delta divIVA$ PZn-*divIVA-gfp-T15A*



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

Lokalizace variant DivIVA s fosfo-ablativními a mimetickými mutacemi



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

Fosforylace zbytku T15 může inhibovat interakci DivIVA s membránou

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

Fig.1. Model of DivIVA membrane interaction (Oliva et al., 2010).

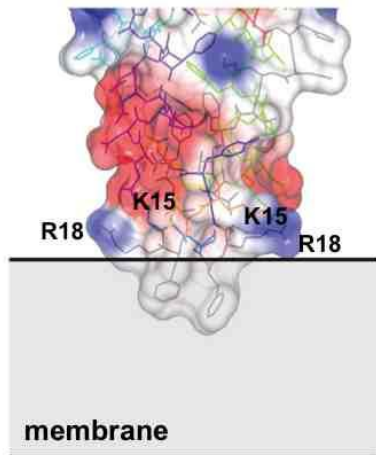
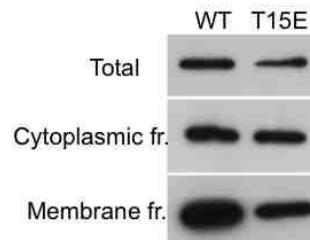


Fig.2. Localization of DivIVA-wt and DivIVA-T15E in cytoplasmic and membrane fractions of *S. pneumoniae*. 20 µg proteins from each fraction was loaded in gel.



WT+ DivIVA-wt

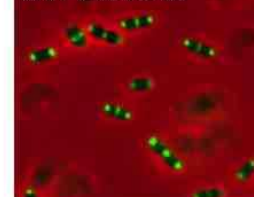
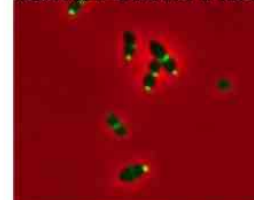
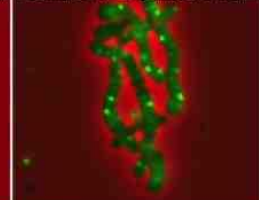


Fig.3. Localization of DivIVAT15A/E in wt and ΔdivIVA background

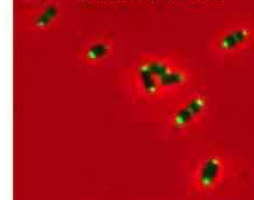
ΔdivIVA+DivIVA-T15A



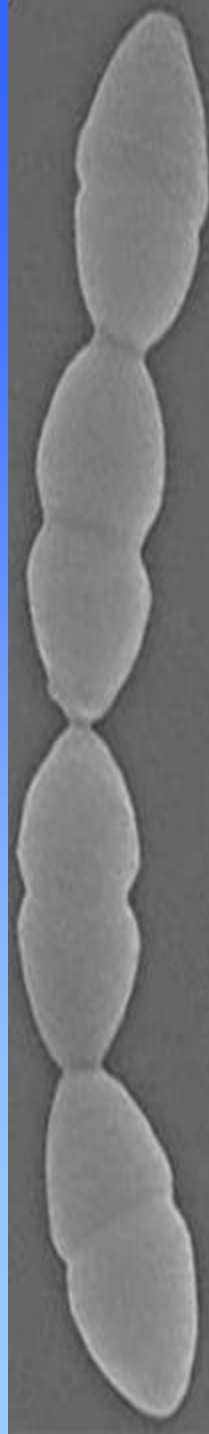
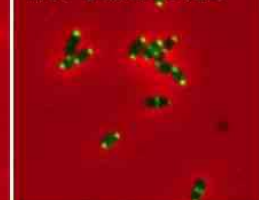
ΔdivIVA+DivIVA-T15E



WT+ DivIVA-T15A

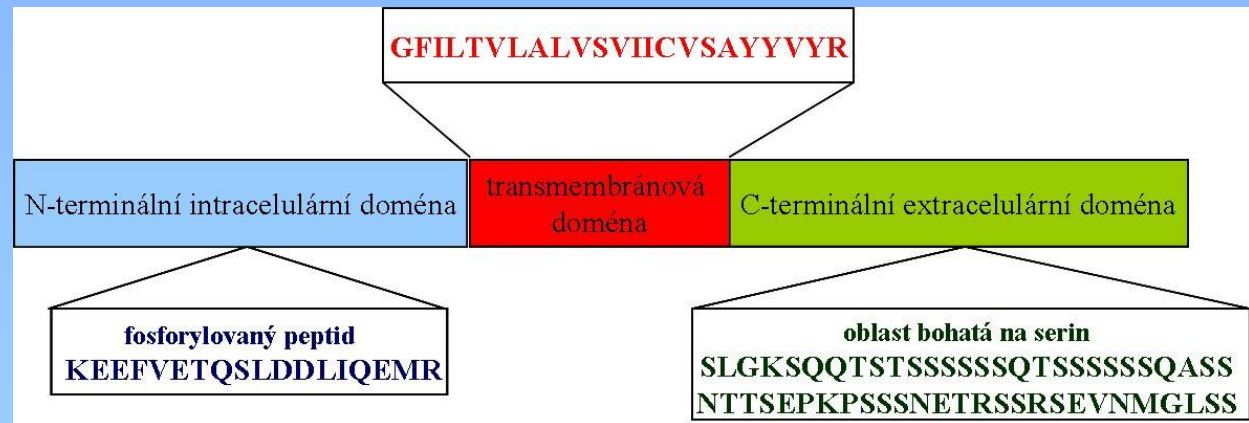


WT+ DivIVA-T15E



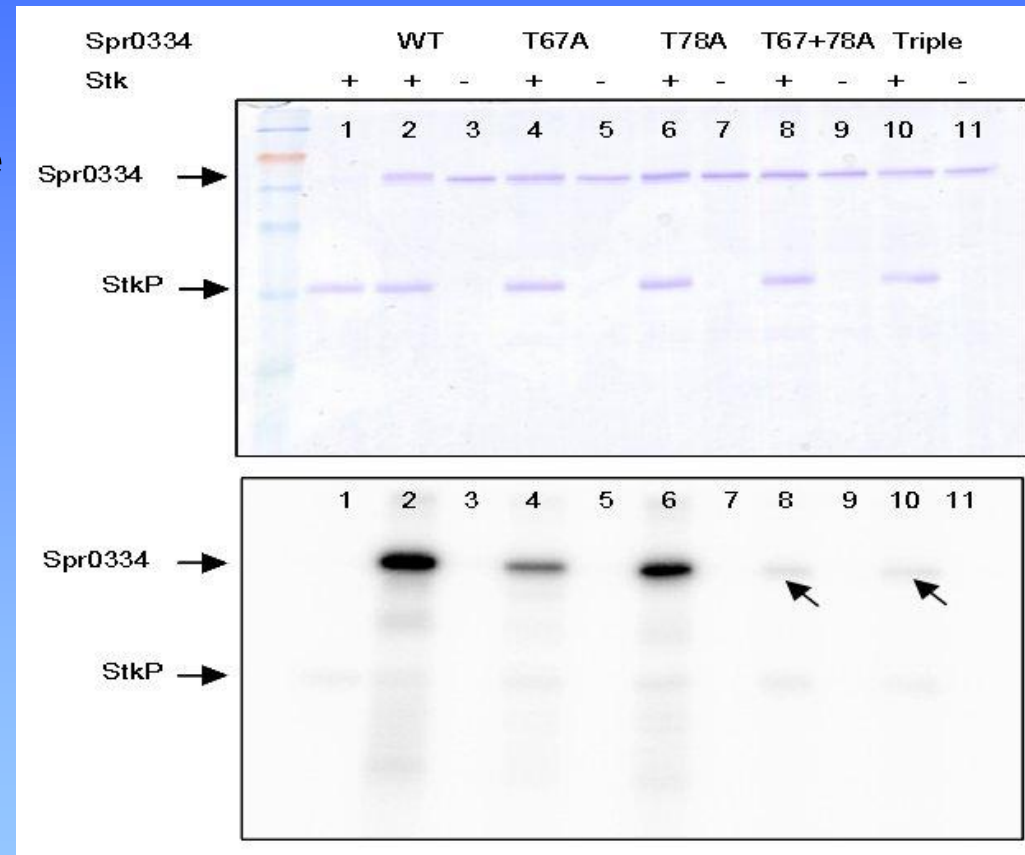
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

- 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



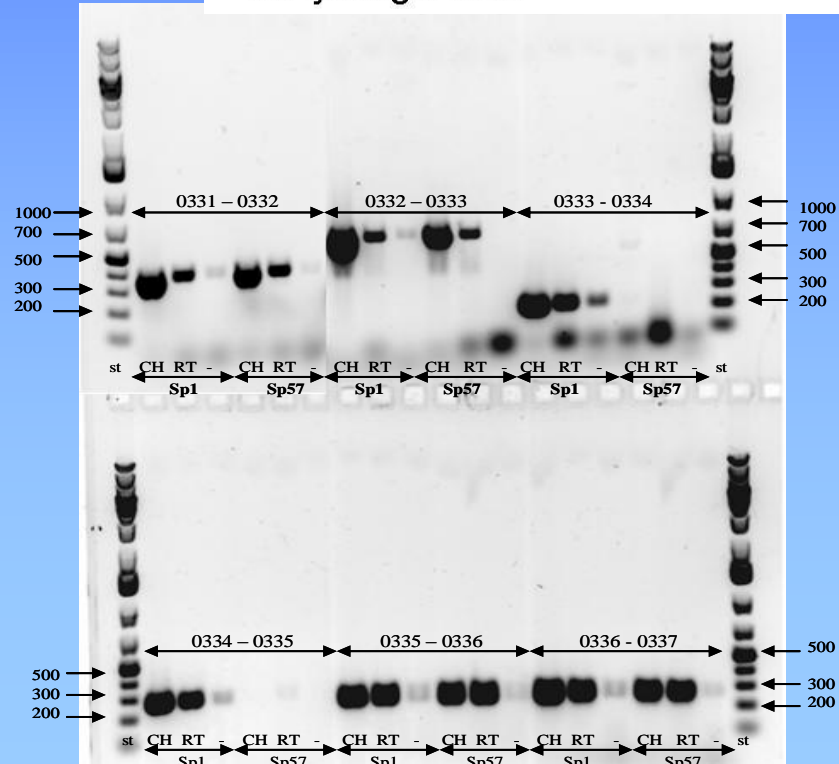
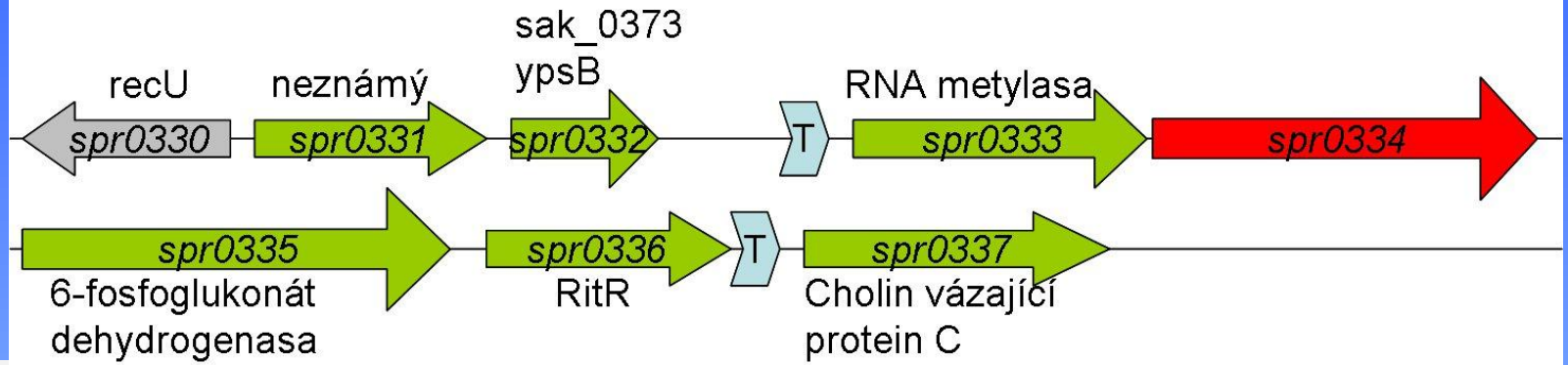
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

- *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: od signální molekuly po buněčné funkce

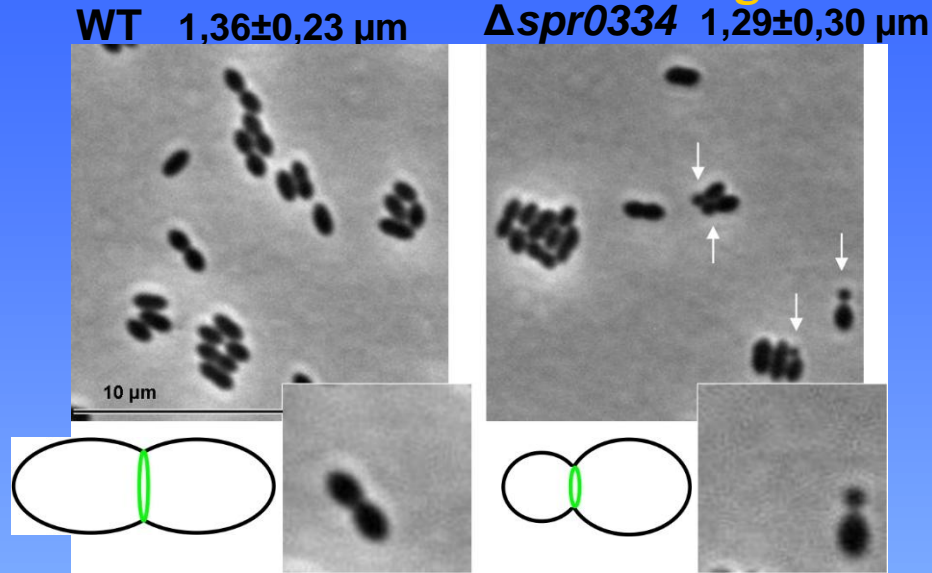
Analýza transkripce genů v předpokládaném operonu *spr0331 - spr0337*



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

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

Morfologie kmene $\Delta spr0334$

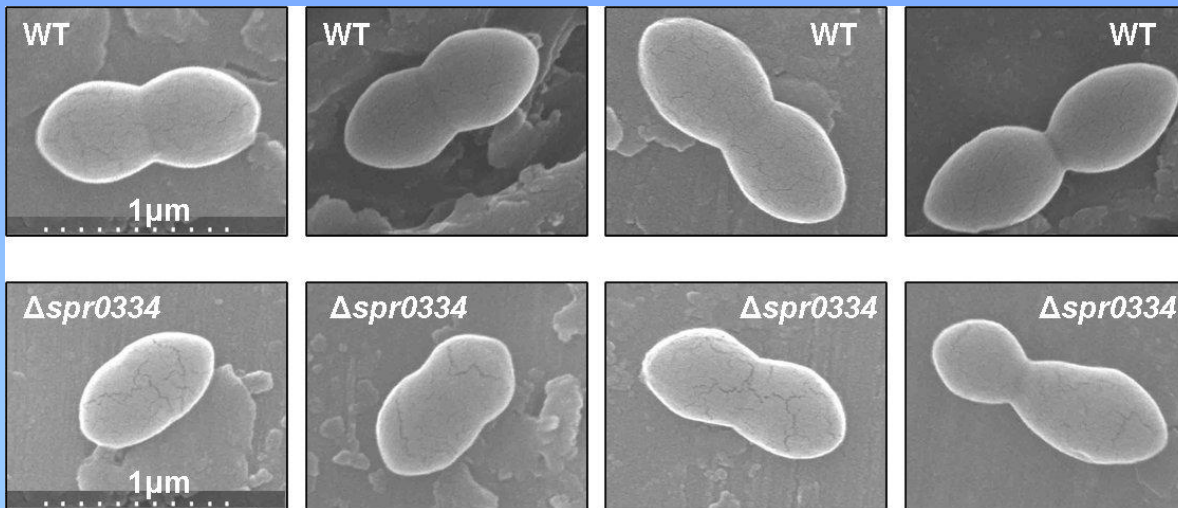


divoký kmen (WT): tvoří lancetovité diplokoky

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



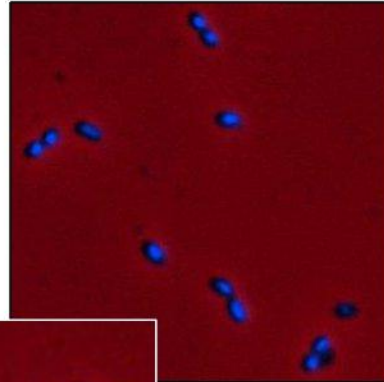
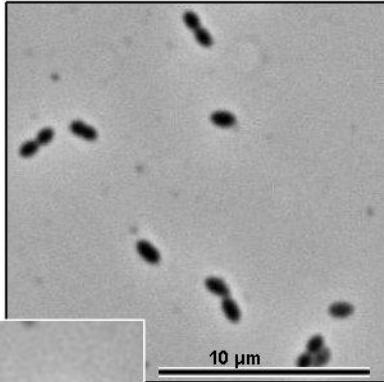
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

WT Morfologie kmene $\Delta spr0334$: barvení DNA

WT

PH

DAPI

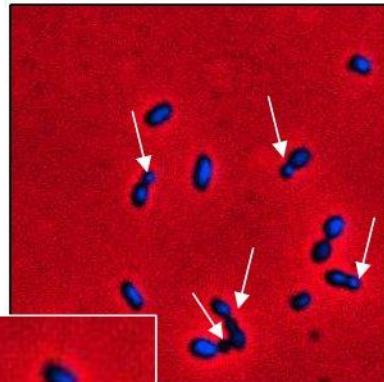
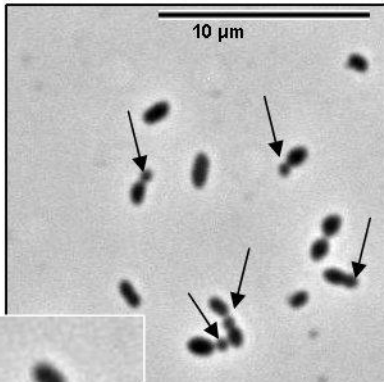


divoký kmen (WT): tvoří lancetovité diplokoky obsahující ve všech buňkách DNA

$\Delta spr0334$

PH

DAPI



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

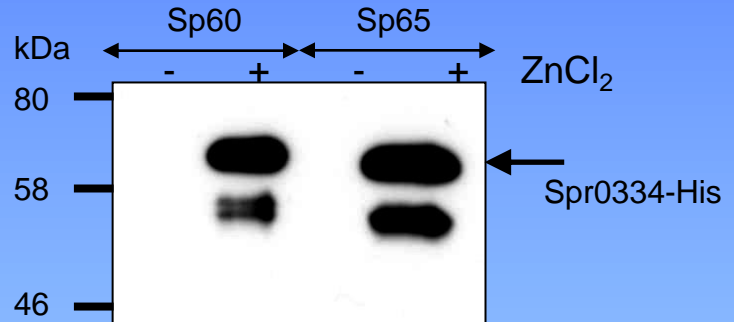
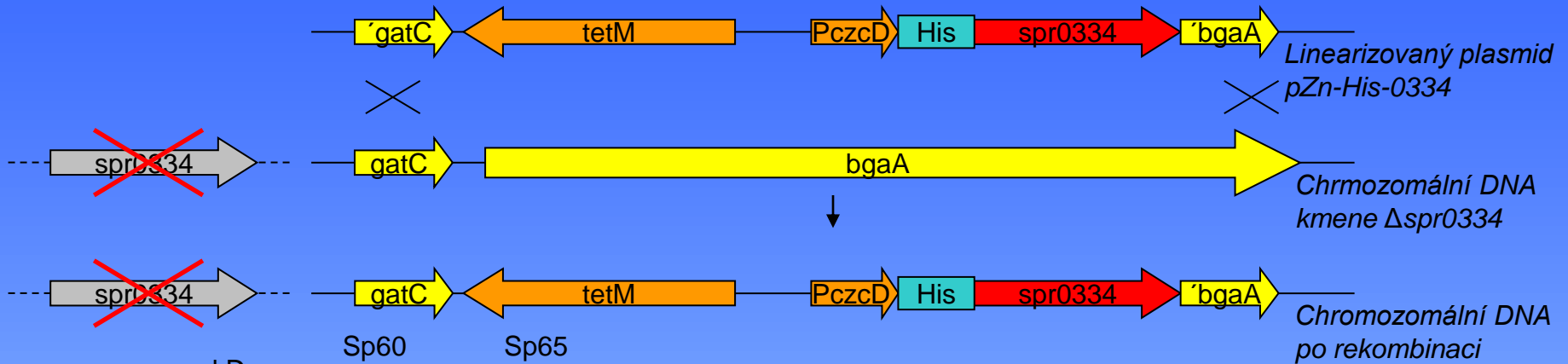
šipky označují minibuňky

PH – fázový kontrast

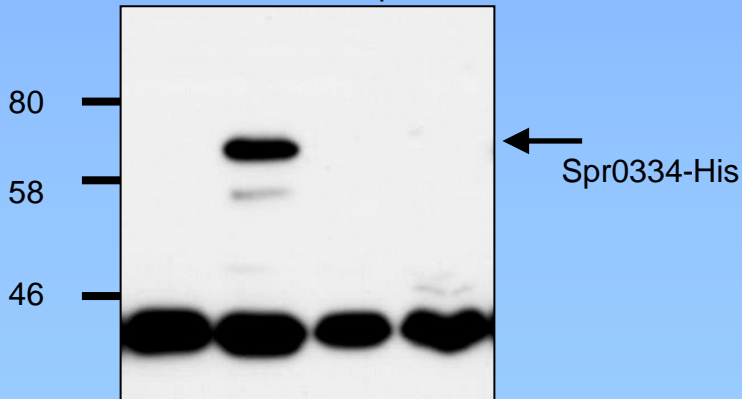
DAPI – překryv fázového kontrastu a DAPI

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

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

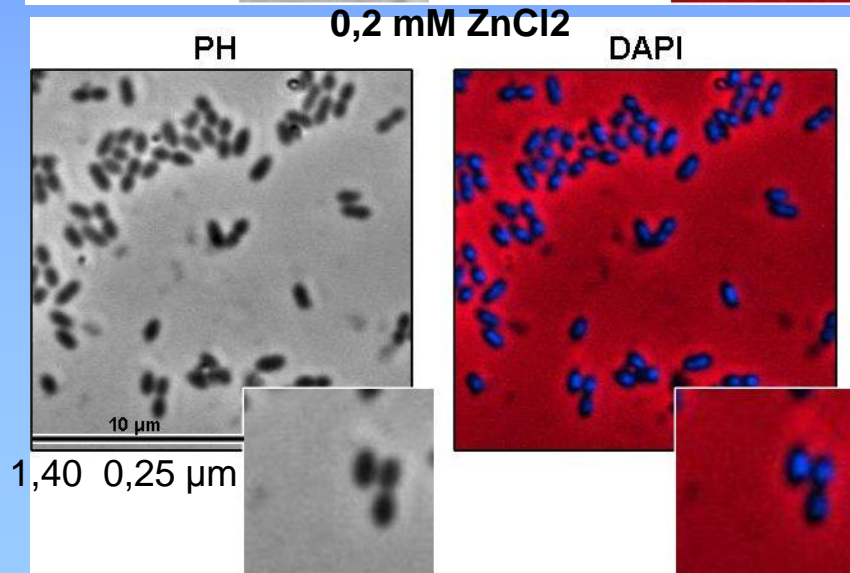
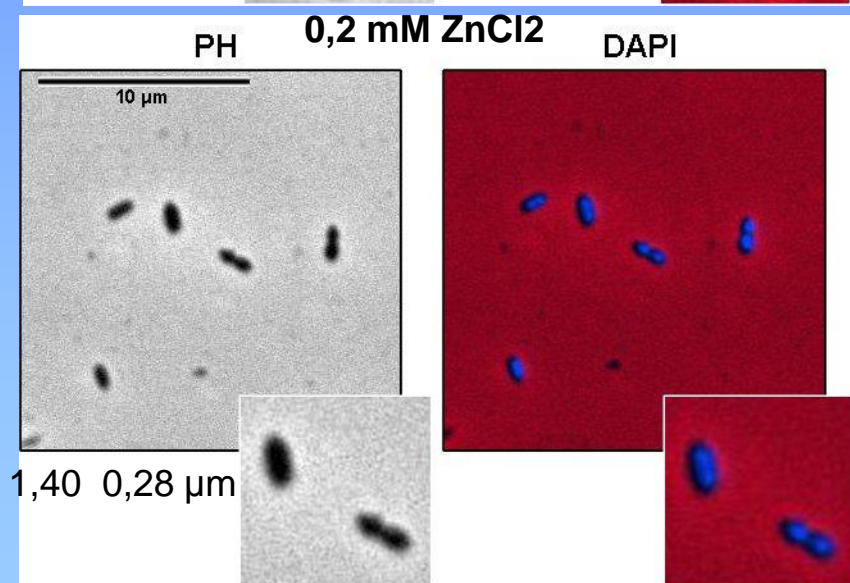
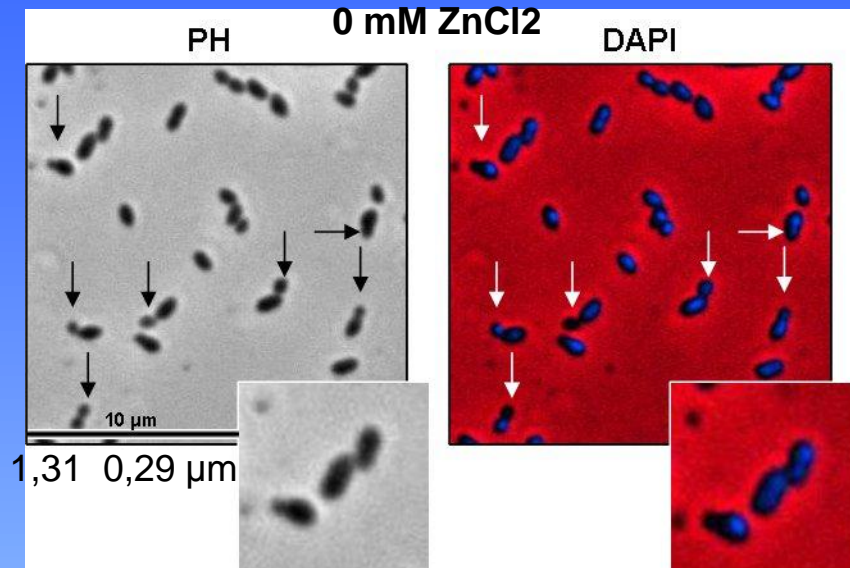
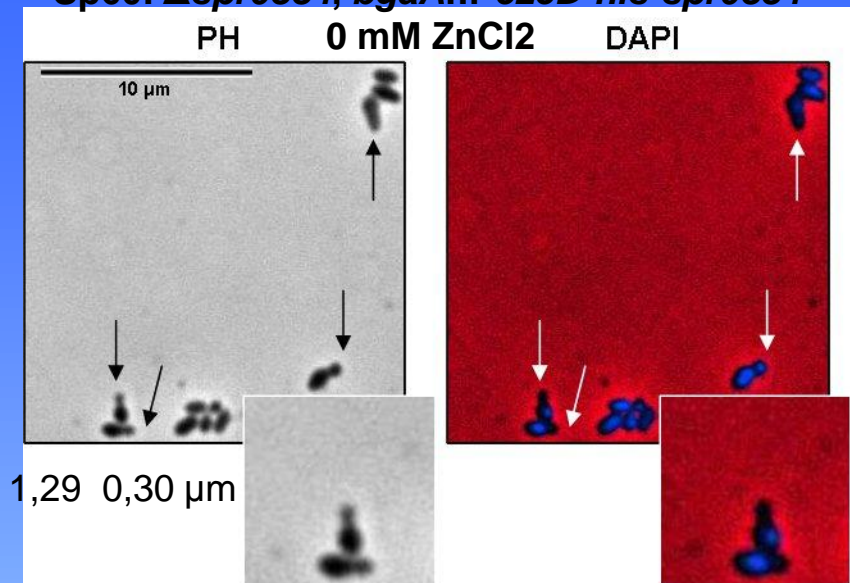
T67 a T78 jsou místy fosforylace proteinu Spr0334 *in vivo*

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

Morfologie kmenů Sp60 a Sp65

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

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



KOMPLEMENTACE MUTACE

NEFOSFORÝLOVANÝ PROTEIN KOMPLEMENTACE MUTACE

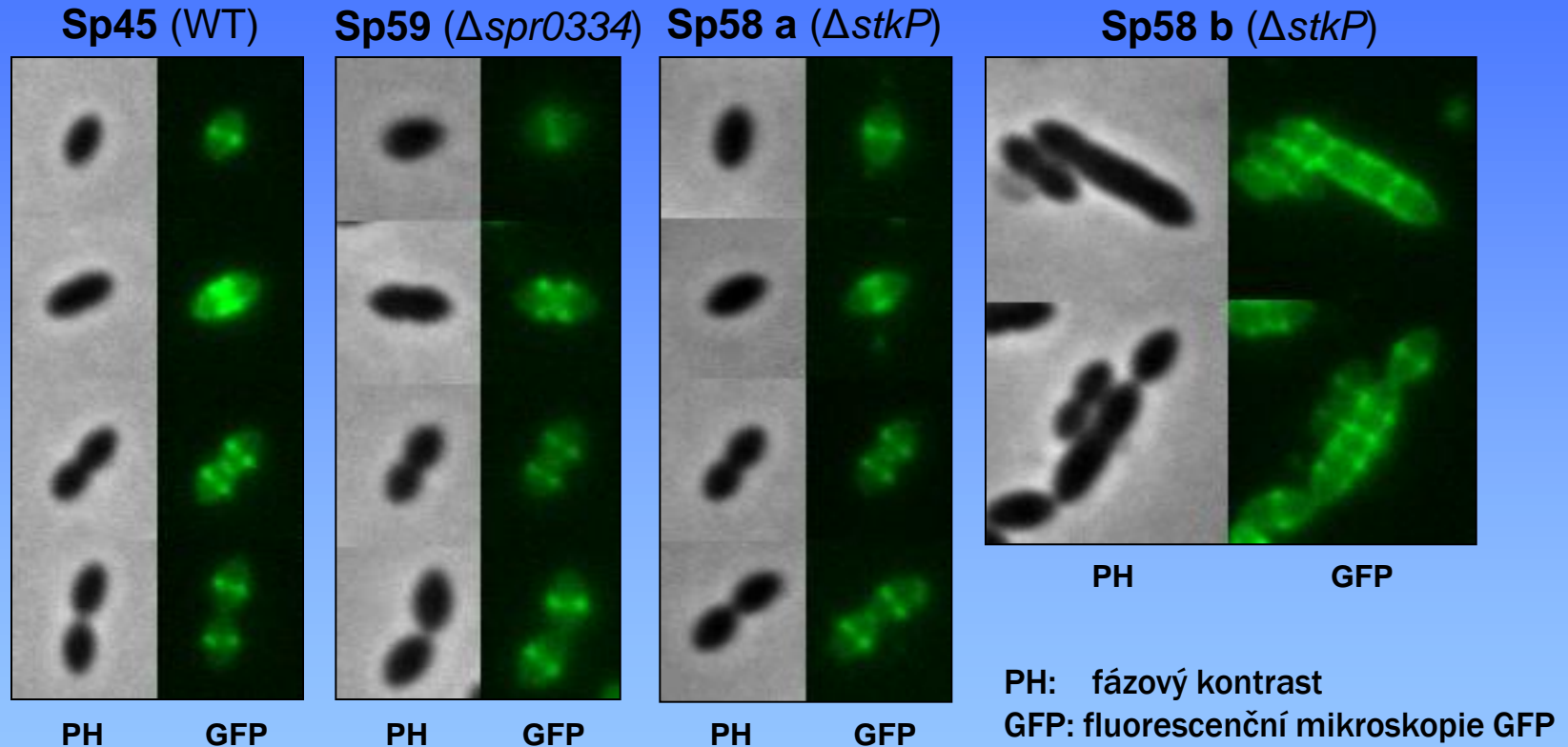
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Lokalizace GFP-Spr0334 v buňce *S. pneumoniae*

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

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

Sp58: Δ *stkP*; *bgaA::gfp-spr0334*

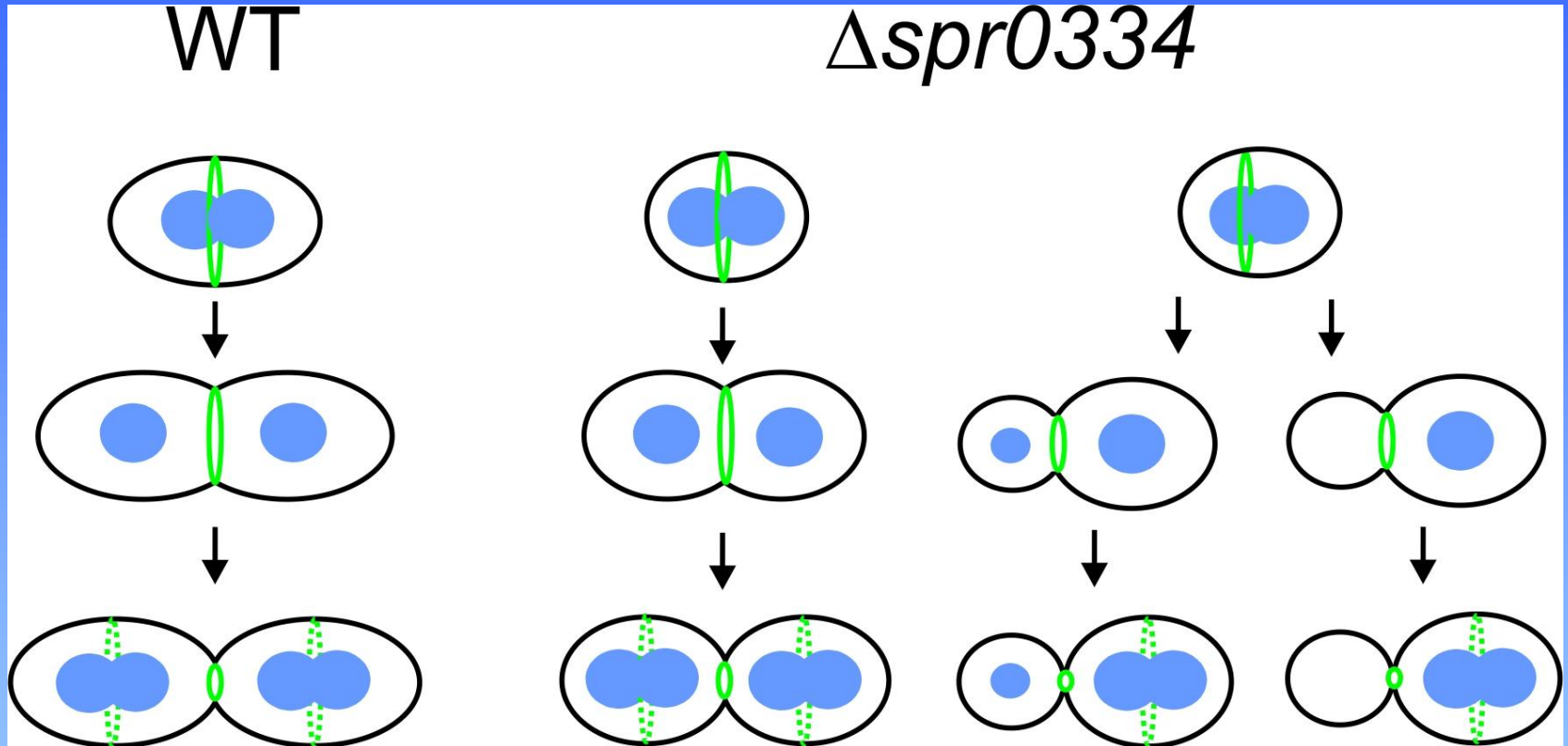


Protein GFP-Spr0334 je ve všech třech kmenech lokalizován převážně v buněčné prepážce.

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

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

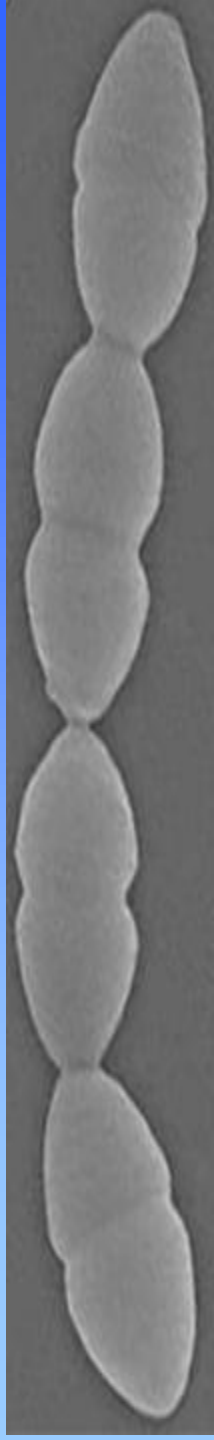
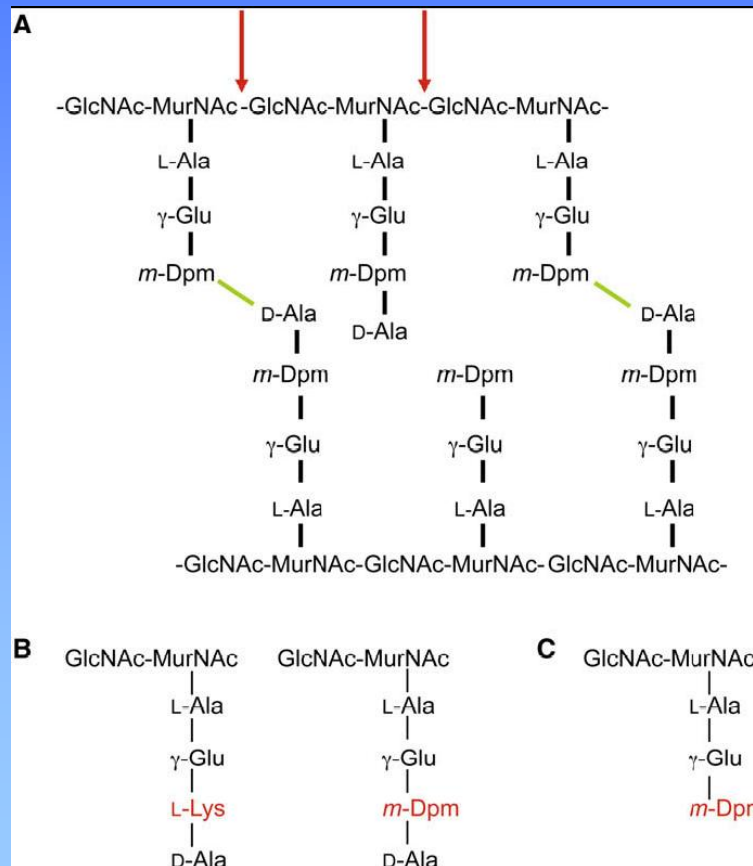
Schématické znázornění buněk kmene $\Delta spr0334$



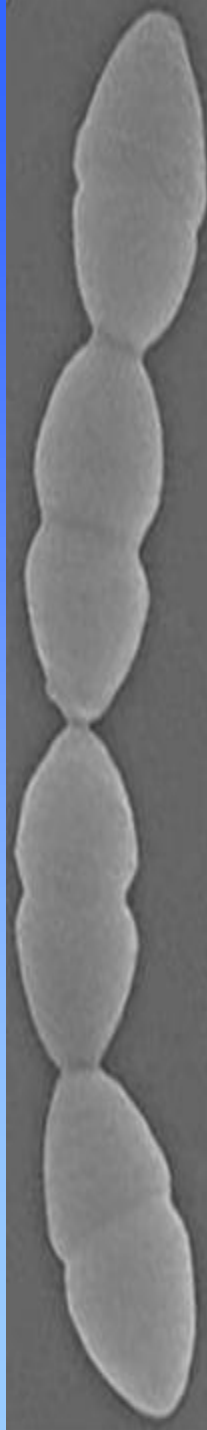
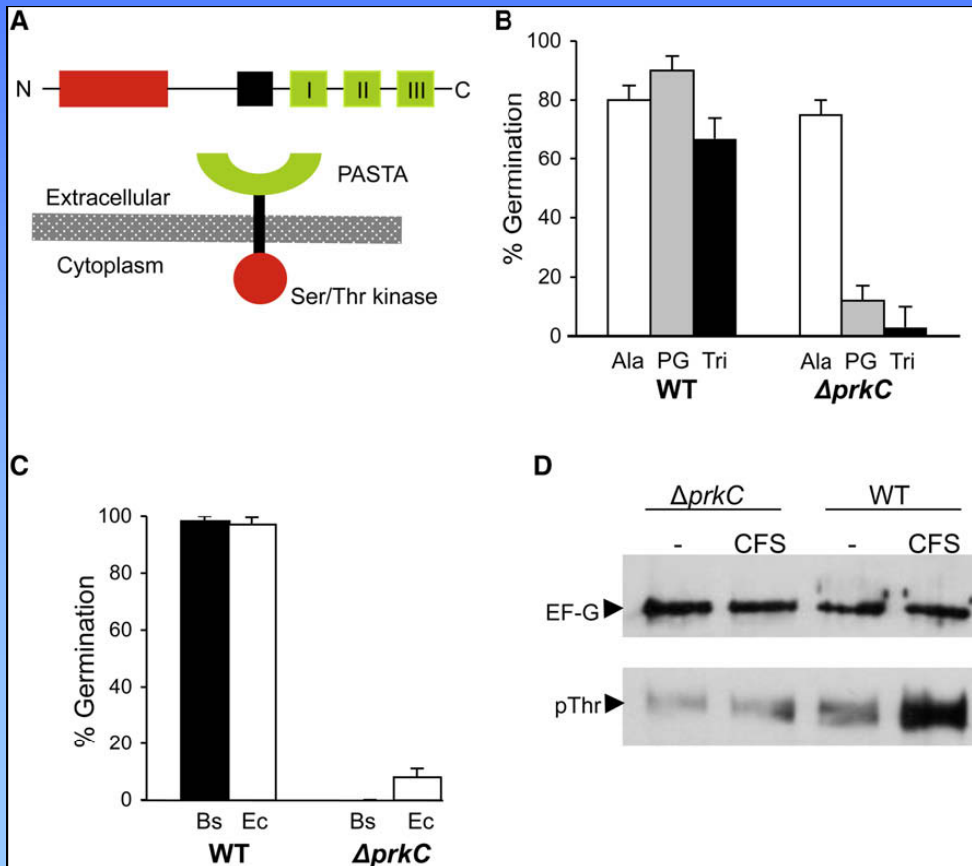
Protein Spr0334 je proteinem buněčného dělení, který ovlivňuje morfologii buněk a nejspíše se účastní výběru budoucího místa dělení či segregace chromosomů u *S. pneumoniae* dosud neznámým mechanismem.

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

Stimulace germinace spór aktivací PrkC-dependentní signální dráhy Struktura peptidoglykanu



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



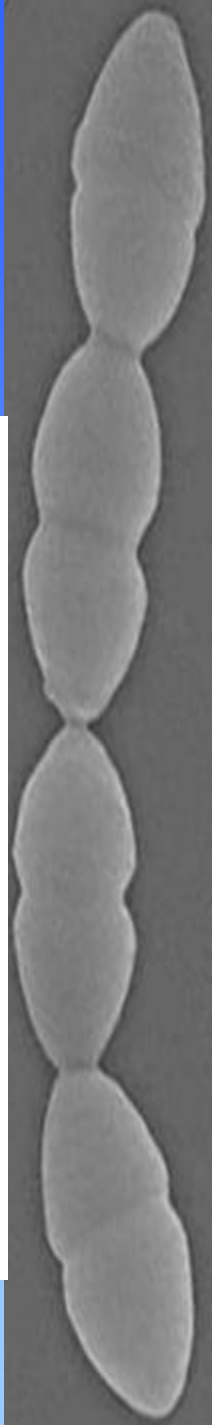
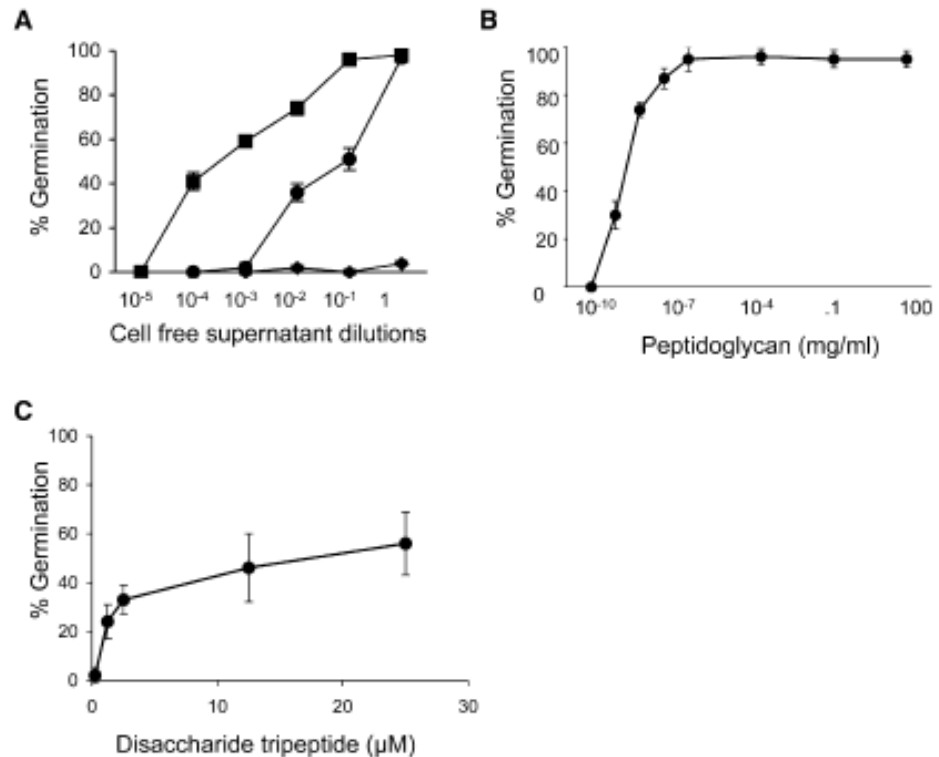
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Peptidoglykan stimuluje germinaci bakteriálních spor

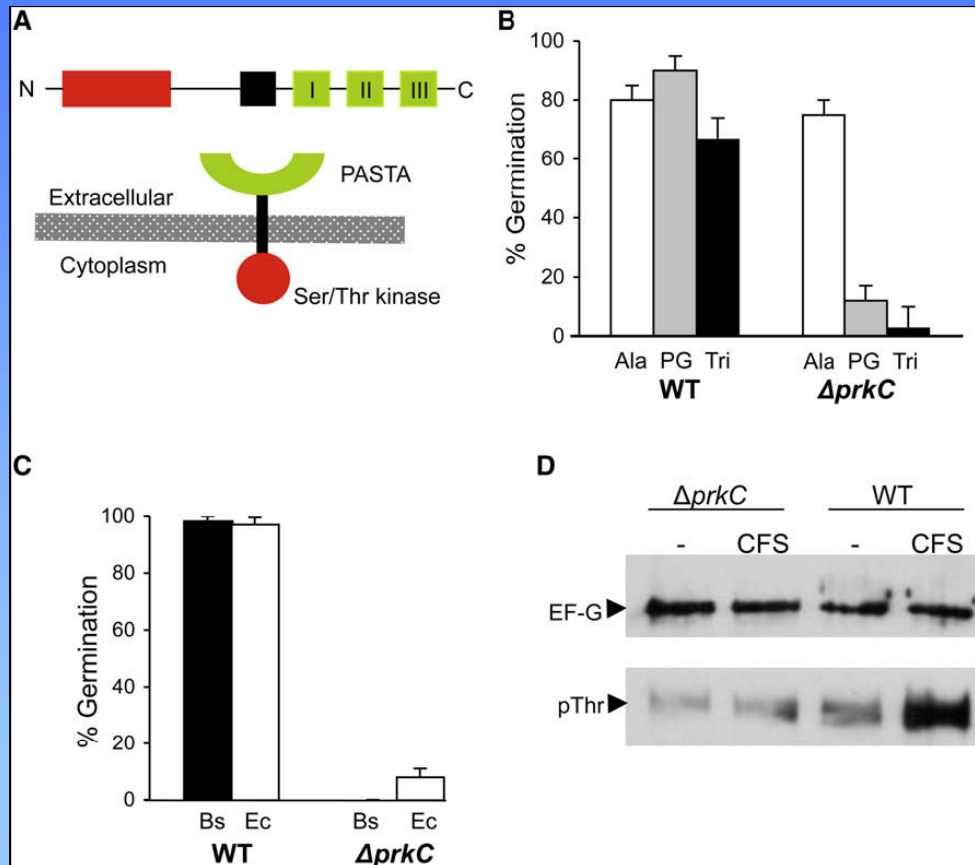
A. Inkubace spor se supernatanty kultur *B. subtilis*, *E. coli* a *S. aureus*

B. Inkubace spor s peptidoglykanem

C. Inkubace spor s NAG-NAM tripeptidem



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



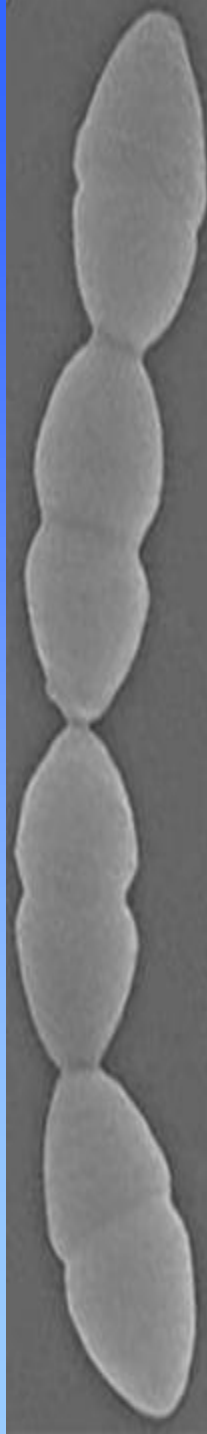
(A) PrkC consists of an N-terminal kinase domain (red), a membrane-spanning sequence (black), and three PASTA repeats (green) in the extracellular domain.

(B) Wild-type or $\Delta prkC$ spores incubated with L-alanine (1 mM), *B. subtilis* peptidoglycan (100 ng/ml), or *B. subtilis* disaccharide tripeptide ("Tri"; 10 mM) for 60 min.

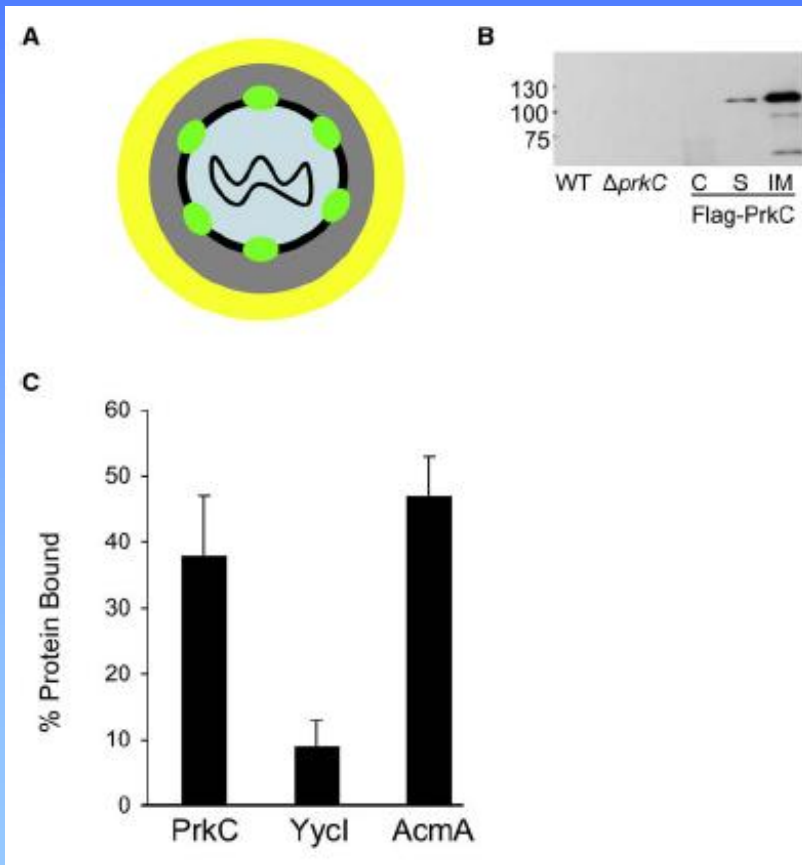
(C) Wild-type or $\Delta prkC$ spores incubated with undiluted cell-free supernatant prepared from logphase *B. subtilis* (Bs) or *E. coli* DH5a (Ec) for 60 min.

(D) Protein lysates from *B. subtilis* $\Delta prkC$ or wild-type spores incubated with buffer alone (-) or with *B. subtilis* cell-free supernatant (CFS; 103 dilution) for 60 min were immunoprecipitated with α -EF-G antibodies and subjected to western blotting with either α -EF-G or α -phosphothreonine antibodies.

Error bars represent SD for triplicate samples.



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

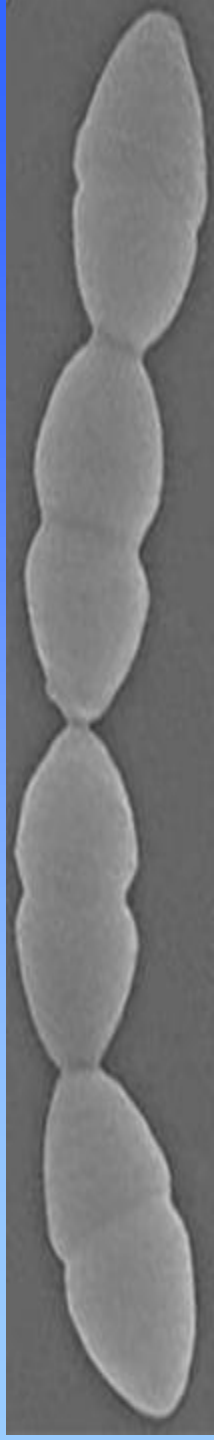


(A) Schematic of PrkC localization. The DNA is located in the core (blue) and is surrounded by the cortex (gray) and the coat (yellow). PrkC (green) is associated with inner membrane (black) of the spore.

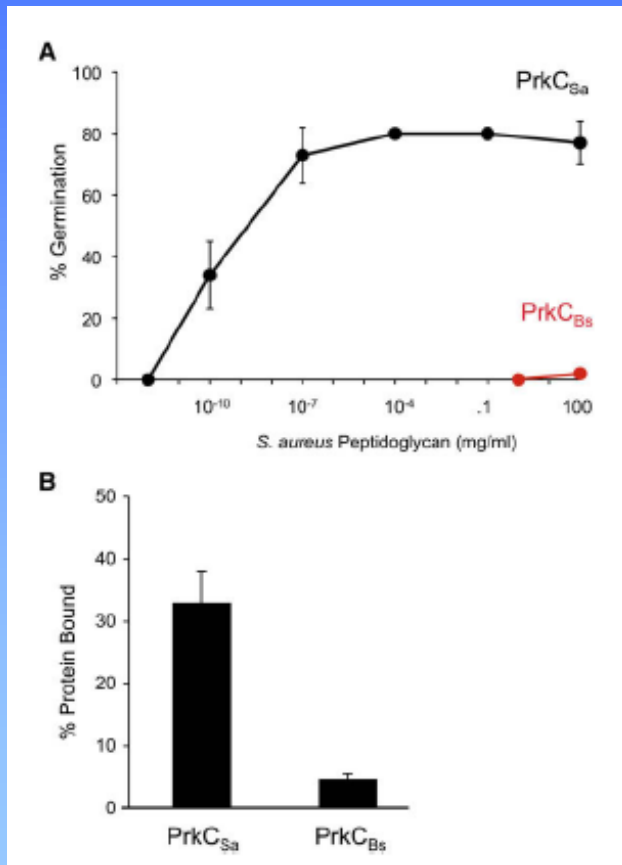
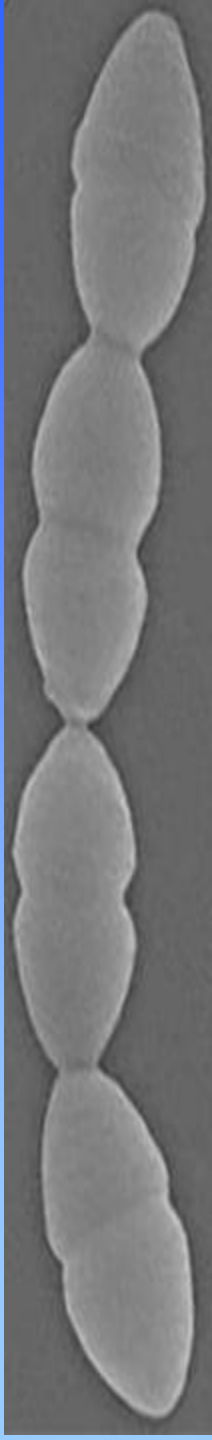
(B) Lysates of wild-type (PY79), DprkC (PB705), and DprkC amyE::Pspac-FLAG-prkCBs (JDB2226) spores were electrophoresed using 8% SDS-PAGE, and blots were probed with anti-FLAG antibody (Sigma). Shown are whole-cell lysate from wild-type spores (WT); whole-cell lysate from DprkC spores (DprkC); coat fraction from JDB2226 (C); soluble S100 fraction from JDB2226 (S); insoluble P100 fraction from JDB2226 (IM).

(C) Fifty micrograms of His-tagged extracellular domains of PrkC, Yycl, or AcmA were incubated with 5 mg purified cell wall peptidoglycan. Centrifugation was used to separate protein bound to insoluble PG from unbound protein. Bound protein was eluted by subjecting insoluble fraction to 2% SDS. Fractions containing unbound protein and protein remaining bound to insoluble PG were subjected to 8% SDS-PAGE and Coomassie blue staining and protein bands were quantified using Image J (NIH). The total protein that was incubated was normalized to 100% for unbound + bound and relative bound protein levels were calculated.

Error bars represent SD for triplicate samples.



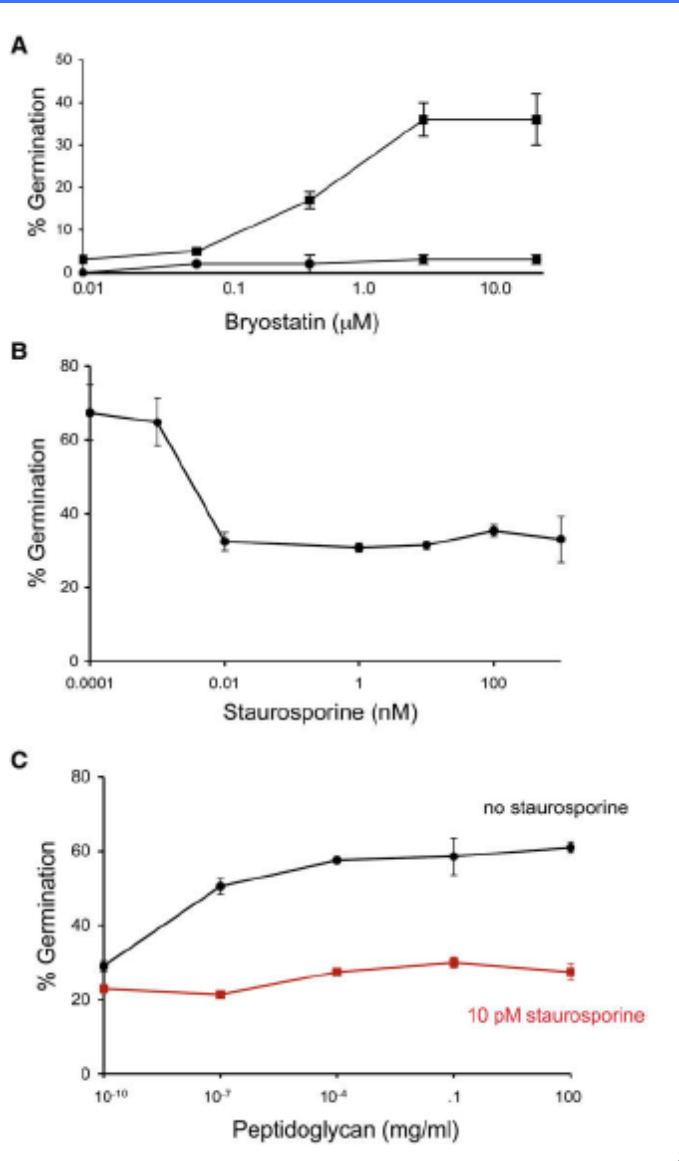
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce



(A) JDB1980 (DprkC amyE::Pspac-his6-prkCBs; red) or JDB2017 (DprkC amyE::Pspac-his6-prkCSa; black) spores were incubated with different amounts of *S. aureus* PG for 60 min.

(B) Fifty micrograms His6-PASTABs (PrkCBs) and His6-PASTASa (PrkCSa) were incubated with 5mg *S. aureus* PG. Unbound proteins and bound proteins were detected by Coomassie blue and % bound protein was calculated as above. Error bars represent SD for triplicate samples.

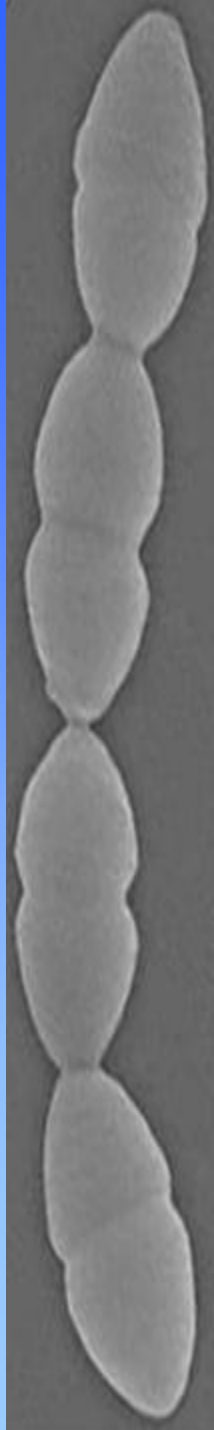
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce



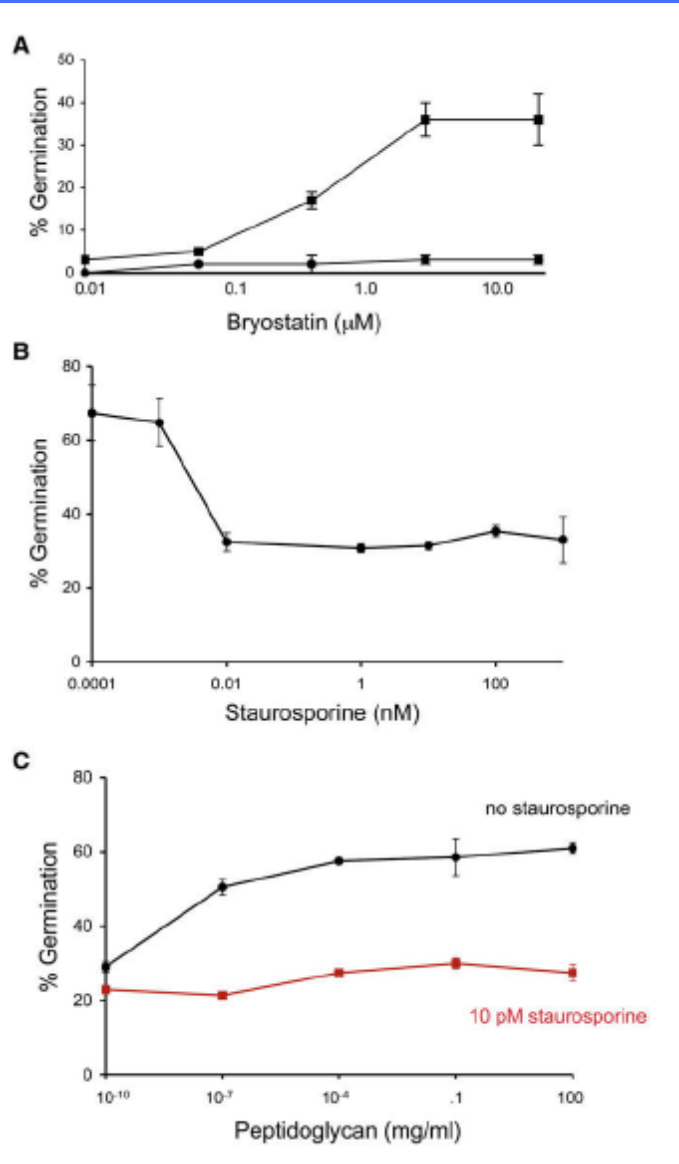
(A) Wild-type (squares) or DprkC (circles) *B. subtilis* spores were incubated for 60 min with bryostatin at indicated concentrations.

(B) Wild-type spores were incubated for 60 min with 100 ng/ml *B. subtilis* peptidoglycan in the presence of staurosporine at indicated concentrations.

(C) Wild-type spores were incubated for 60 min with *B. subtilis* peptidoglycan at indicated concentrations in the presence (red) or absence (black) of 10 pM staurosporine. Error bars represent SD for triplicate samples.



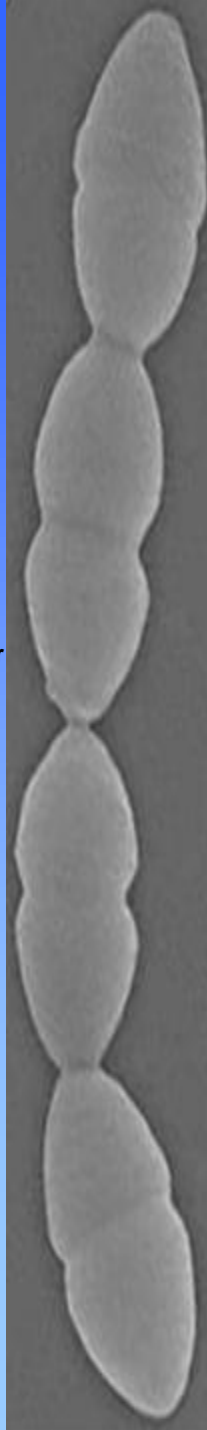
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce



(A) Wild-type (squares) or DprK (circles) *B. subtilis* spores were incubated for 60 min with bryostatin at indicated concentrations.

(B) Wild-type spores were incubated for 60 min with 100 ng/ml *B. subtilis* peptidoglycan in the presence of staurosporine at indicated concentrations.

(C) Wild-type spores were incubated for 60 min with *B. subtilis* peptidoglycan at indicated concentrations in the presence (red) or absence (black) of 10 pM staurosporine. Error bars represent SD for triplicate samples.



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

Bakteriální Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu

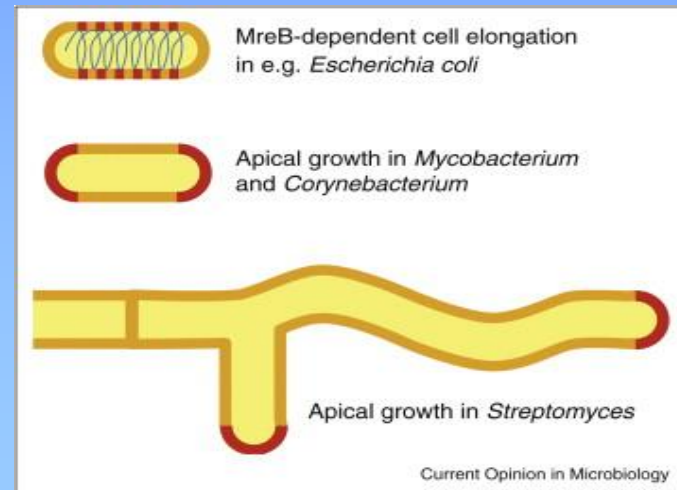
Příklad vlivu fosforylace na buněčnou funkci: DivIVA *Streptomyces coelicolor*

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



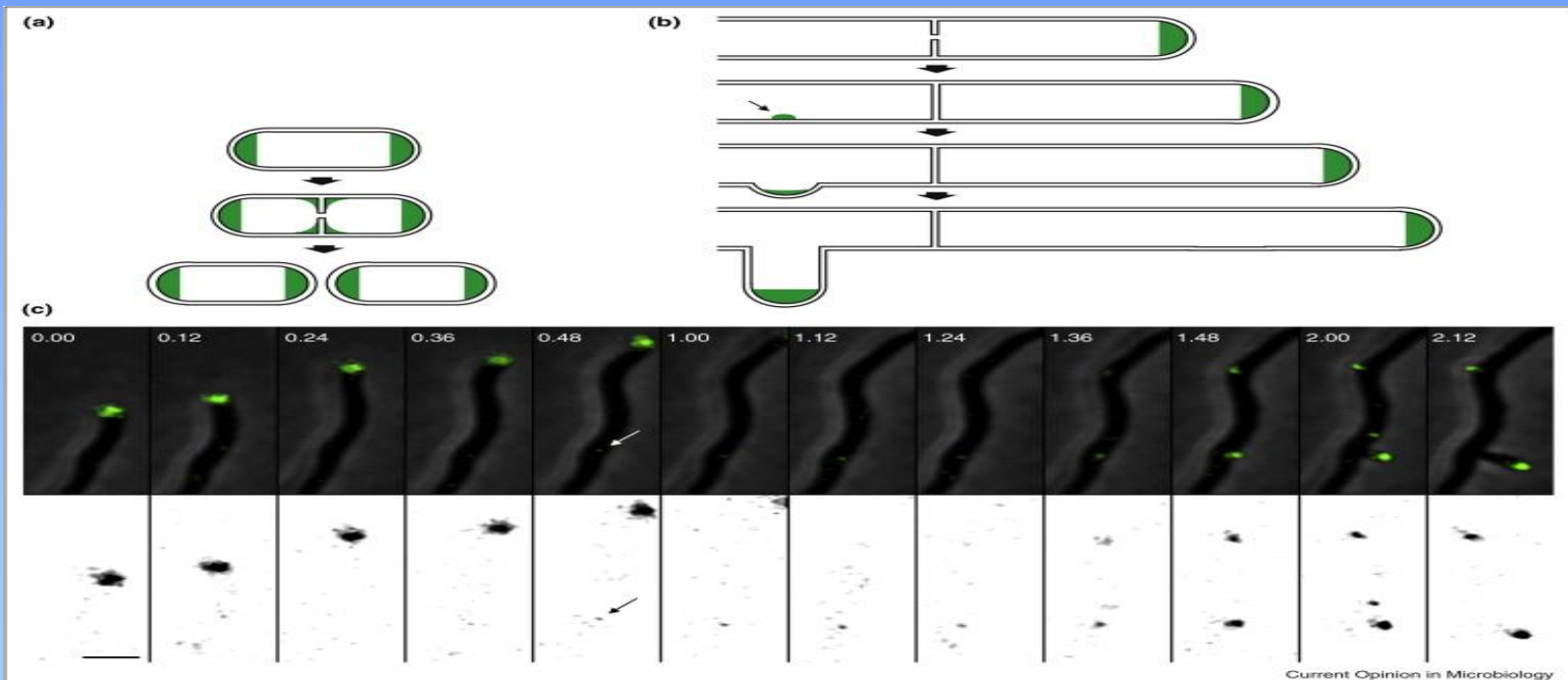
Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

Bakteriální Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu

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

DivIVA je esenciální, overexprese je postačující k tomu, aby došlo k hypervětvění hyf –

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

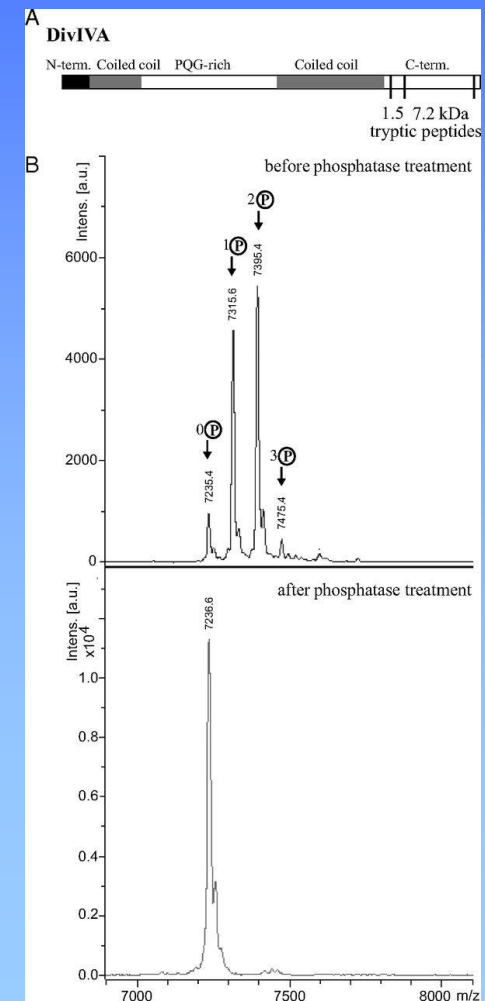


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

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



Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčnou funkci

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

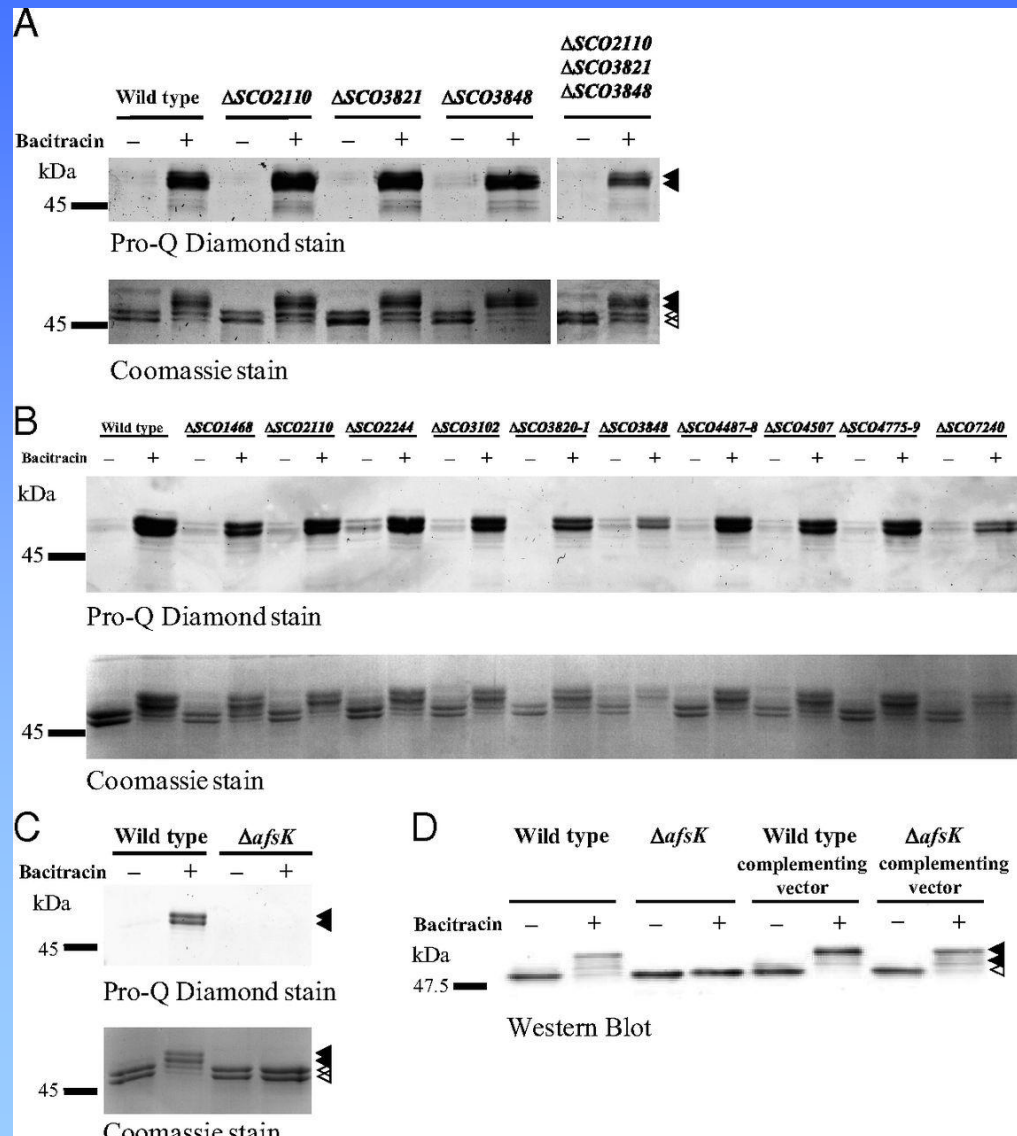
Proteinkináza AfsK fosforyluje DivIVA:

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

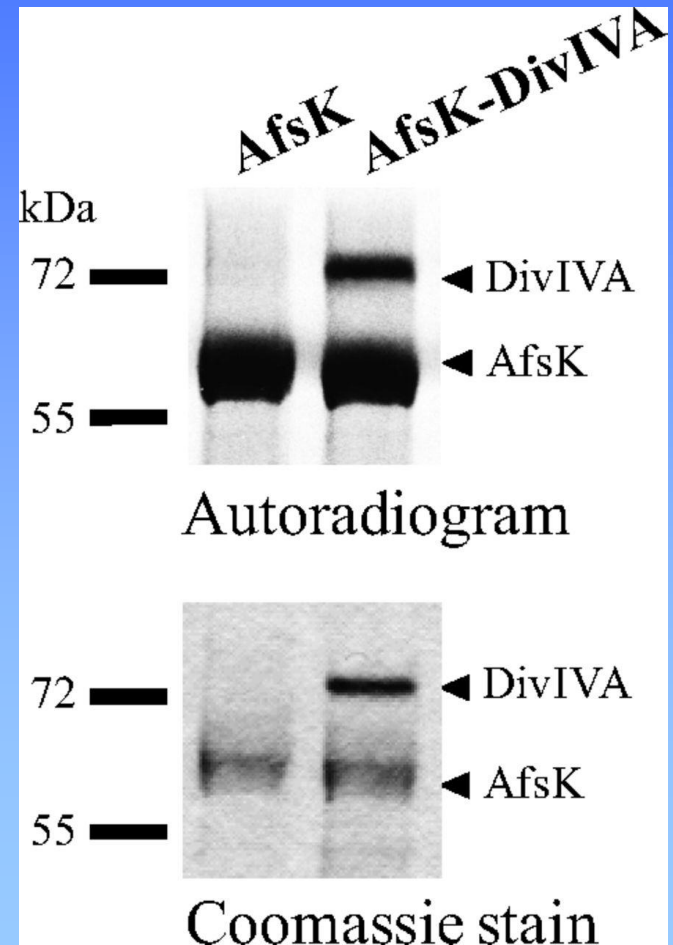
D. Fosforylační stav DivIVA komplementovaného kmene s delecí genu AfsK



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

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

Fosforylace in vitro DivIVA proteinkinázou AfsK:

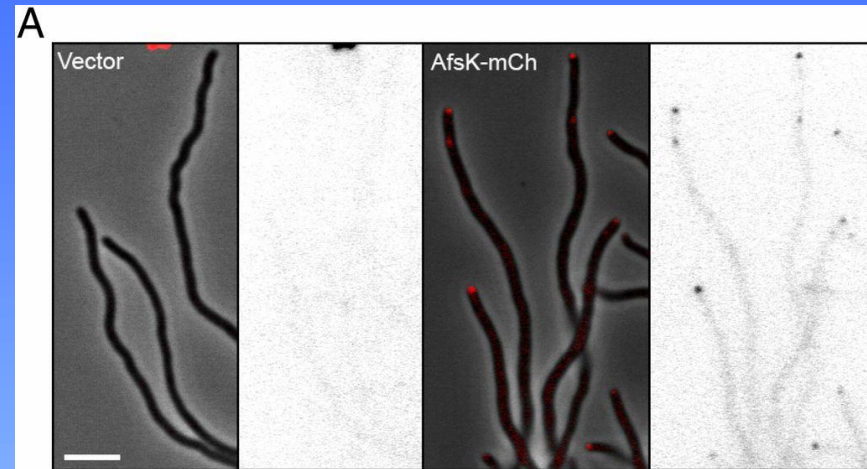


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčnou funkci

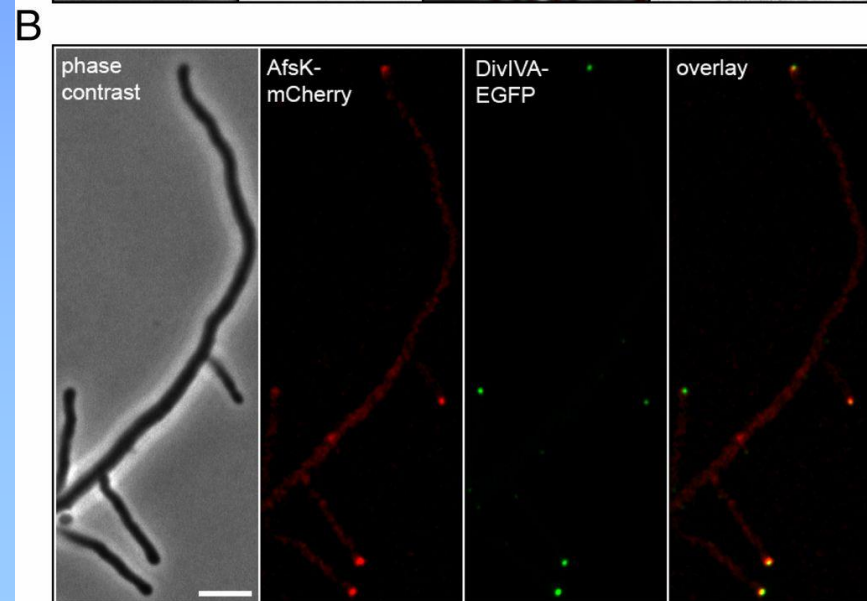
Příklad vlivu fosforylace na buněčnou funkci: DivIVA *Streptomyces coelicolor*

Proteinkináza AfsK kolokalizuje s DivIVA na špičkách rostoucích hyf:

A. Buněčná lokalizace AfsK



B. Kolokalizace AfsK a DivIVA

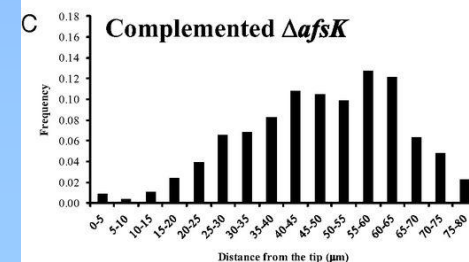
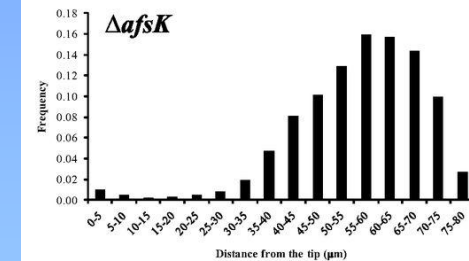
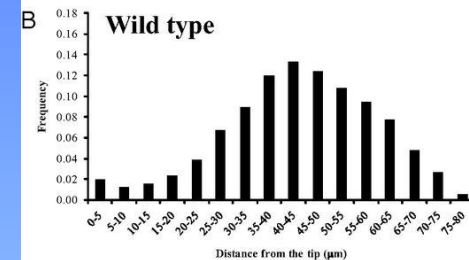
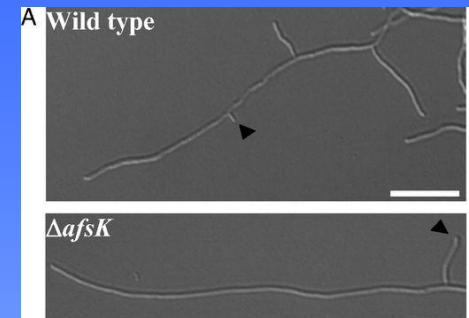


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

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

Proteinkináza AfsK reguluje větvení rostoucích hyf:

A. Mutant AfsK prokazuje méně četné větvení hyf



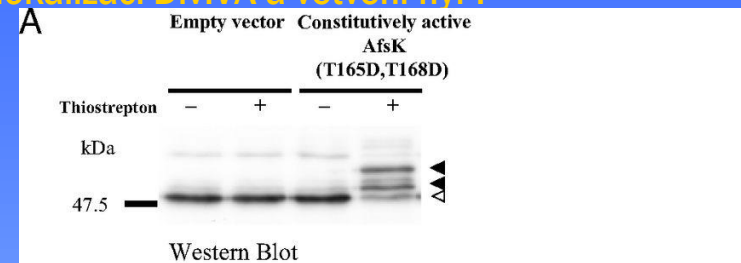
B. Histogramy četnosti vzdáleností větvení hyf od konců (špiček) hyf

Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčnou funkci

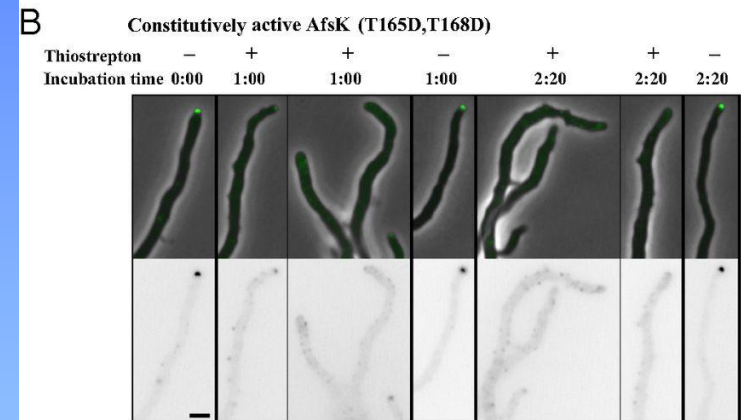
Příklad vlivu fosforylace na buněčnou funkci: DivIVA *Streptomyces coelicolor*

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

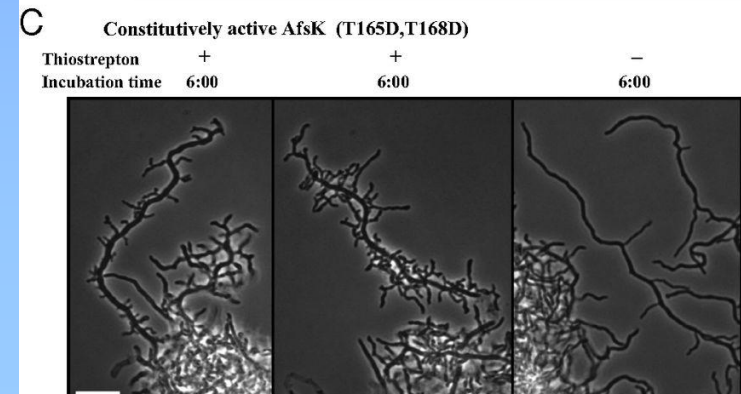
A. Inducibilní exprese konstitutivně aktivní AfsK vede k fosforylaci DivIVA



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



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

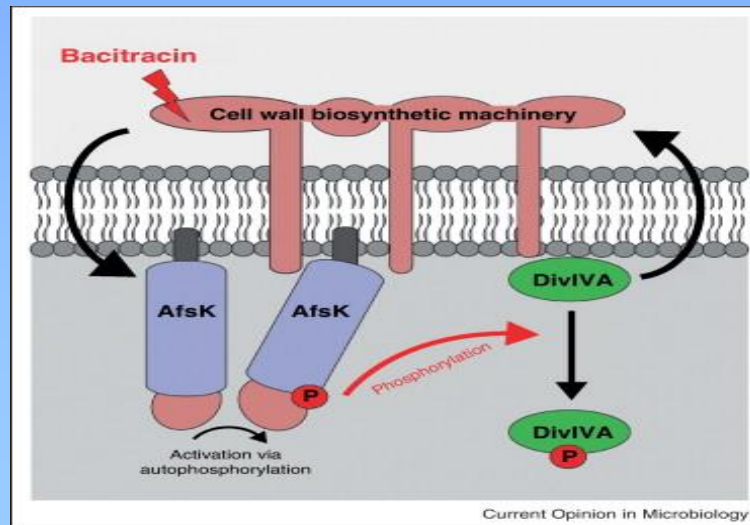


Nekonvenční signální dráhy u prokaryot: od signální molekuly po buněčné funkce

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 polaridy 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



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

