

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



Tat'ána Borovcová

Ser/Thr proteinkinázy u mykobakterií

Ser/Thr protein kinases in mycobacteria

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Linda Doubravová, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

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

V Praze, 13. 8. 2021

.....

Děkuji RNDr. Lindě Doubravové, Ph.D. za trpělivost a ochotu, se kterou mi pomáhala a dávala cenné rady.

Obsah

Seznam použitých zkratk	VI
Abstrakt	VIII
1. Úvod	1
2. Charakteristické vlastnosti mykobakterií	3
2.1 Genetika	3
2.2 Fyziologie	5
2.3 Virulence a patogeneze	6
3. Ser/Thr proteinkinázy	8
3.1 Proteinkinázy PknA, PknB a PknD.....	10
3.2 Proteinkinázy PknE, PknF a PknH	11
3.3 Proteinkinázy PknI, PknJ a PknL.....	12
3.4 Proteinkinázy PknG a PknK.....	12
4. Struktura a aktivace	14
4.1 Struktura.....	14
4.2 Aktivace	17
5. Využití ESTPKs jako terapeutický cíl.....	20
6. Závěr	23
Seznam použité literatury	24

Seznam použitých zkratk

2-A9P	2-amino-N9-propyl-purin
2-AP	2-aminopurin
ABC	ATP binding cassette
AX20017	nízkomolekulární inhibitor Ser/Thr proteinkináz
AZD7762	inhibitor proteinkinázy PknG
CwlM	peptidoglykanová hydroláza
CYC116	inhibitor proteinkinázy PknG
dacB	gen kódující hydrolázu D-aminokyselin
dew	dělení a buněčná stěna
DivIVA	protein určující místo přepážky
EmbR	transkripční regulátor
ESAT-6	6-kDa early secretory antigenic target
ESTPKs	Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu
ESX	ESAT6 sekreční systém
ffh	gen kódující signal recognition particle protein
FHA	fork-head associated
FtsZ	filamenting temperature-sensitive mutant Z
GarA	glycogen accumulation regulator
GDH	glutamát dehydrogenáza
glnH	glutamin ABC transportér
GOGAT	glutamin oxoglutarát aminotransferáza
IC50	inhibiční koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MLSA	MultiLocus sequence analysis
MmaA4/Hma	hydroxymycolate synthase MmaA4
MmA4	mycolic acid methyltransferase
MurA	UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase
mym	operon
ODHC	2-oxoglutarát dehydrogenáza
PASTA	penicilin-binding and Ser/Thr kinase associated
PBPA	enzym syntetizující buněčnou stěnu
PDIMs	pthiocerol dimycocerosates
PepE	dipeptidáza
PGLs	peptidoglykany
PknA – PknL	proteinkinázy A - L

PspA	proteinfosfatáza
pstS	gen kódující složky systému absorpce fosfátu
R406	inhibitor proteinkinázy PknG
RmlA	enzym biosyntézy L-rhamnosy
RodA	protein určující tvar buňky
RshA	anti-sigma factor
Ser	serin
SigH	RNA polymerase sigma-H factor
Thr	treonin
virS	předpokládaný regulátor transkripce
Wag31	protein podobný tropomyosinu

Abstrakt

Mycobacterium tuberculosis kóduje 11 Ser/Thr proteinkináz. Tyto proteinkinázy jsou strukturně příbuzné eukaryotickým proteinkinázám. Fosfoproteom obsahuje stovky proteinů fosforylovaných na Ser/Thr zbytcích, které ovlivňují všechny aspekty biologie buňky, což podporuje kritickou roli fosforylace na regulaci fyziologie. Důležitou roli na regulaci mají zejména proteinkinázy PknA, PknB, PknG a PknL, tyto proteinkinázy se vyskytují u všech druhů mykobakterií. Pro *M. tuberculosis* jsou však esenciální pouze PknA a PknB, které regulují tvar buňky, skrze regulaci syntézy buněčné stěny, a buněčné dělení. Další důležitou proteinkinázou je PknG, která ač není esenciální pro růst, je nezbytná pro virulenci, jelikož podporuje přežití patogenu uvnitř makrofágů hostitele. Ser/Thr proteinkinázy proto představují zajímavý cíl pro výzkum inhibitorů využitelných pro léčbu tuberkulózy.

Klíčová slova: Ser/Thr proteinkinázy, mykobakterie, přenos signálů, fosforylace, patogenese

Abstract

The *Mycobacterium tuberculosis* genome encodes 11 Ser/Thr protein kinases. These protein kinases are structurally related to eukaryotic protein kinases. The phosphoproteome contains hundreds of proteins phosphorylated on Ser/Thr residues that influence all aspects of cell biology, which supports the critical role of phosphorylation in the regulation of physiology. Particularly important role in regulation belongs to protein kinases PknA, PknB, PknG and PknL, these protein kinases occur in all species of mycobacteria. Although only PknA and PknB are essential for the *M. tuberculosis*, they regulate cell shape through the regulation of cell wall synthesis and cell division. Another important protein kinase is PknG, although not essential for growth it is necessary for virulence, because it promotes the survival of pathogen inside macrophages of the host. As a result, Ser/Thr protein kinases represent an interesting target for inhibitor development that could be used as drugs against tuberculosis.

Key words: Ser/Thr protein kinases, mycobacteria, cell signaling, phosphorylation, pathogenesis

1. Úvod

Mykobakterie jsou grampozitivní, aerobní bakterie, jejichž zástupci mohou způsobovat onemocnění. Nejvýznamnějším zástupcem je *Mycobacterium tuberculosis*, intracelulární patogen způsobující tuberkulózu, která zůstává jednou z hlavních příčin úmrtí na celém světě. Kromě současně aktivních případů nemoci představuje schopnost *M. tuberculosis* způsobovat přetrvávající asymptomatickou infekci u člověka další obavy, protože latentní infekce se může aktivovat a opět způsobit onemocnění. Předpokládá se, že změny v genové expresi a metabolismu způsobují latentní infekci, která umožňuje perzistenci s minimální replikací. Reverzibilní fosforylace proteinů je klíčovým mechanismem, kterým jsou přenášeny signály prostředí, které způsobují tyto změny v genové expresi. Mykobakterie hojně využívají reverzibilní fosforylaci Ser/Thr zbytků jako jednu ze strategií k zajištění přísné kontroly růstu a dělení buněk (Kang et al. 2005; Wehenkel et al. 2006).

Přenos signálu je důležitou aktivitou všech živých buněk. Transdukce signálu se nejčastěji používá k popisu detekce extracelulárního signálu, který je poté přenášen přes cytoplazmatickou membránu a přeměněn na intracelulární odpověď. Výsledkem je, že transdukce signálu je nezbytná pro buněčnou adaptabilitu na změny ve vnějším prostředí. Tyto adaptivní reakce umožňují bakteriálním patogenům růst a přežít v nepříznivých prostředích v lidském hostiteli během infekce (Prisic and Husson 2014).

Navzdory velké rozmanitosti podnětů a reakcí je signalizace prováděna malým počtem molekulárních drah. Příkladem základní strategie je reverzibilní fosforylace proteinů (West and Stock 2001). Fosforylace je jednou z kovalentních modifikací, které proteiny podléhají v posttranslačním procesu a od svého objevu v polovině 50. let minulého století se proteinová fosforylace a defosforylace ukázala jako dobrý mechanismus regulace molekulárních procesů v reakci na intra- a extracelulární podněty (Cozzone 1988; Kennelly 2002).

Obecně jsou mezi prokaryoty široce rozšířeny takzvané dvousložkové regulační systémy. Tyto systémy jsou složeny ze senzorkého kinázového proteinu, který fosforylací aktivuje transkripční regulátor odezvy. V typickém dvousložkovém systému vstupní doména senzorké histidinkinázy detekuje environmentální signál, to vede k aktivaci histidinkinázy, která se autofosforyluje na konzervovaném histidinovém zbytku. Aktivovaná histidinkináza poté zprostředkuje transfer fosfátu na konzervovaný aspartátový zbytek v přijímací doméně regulátoru odezvy. Fosforylace regulátoru odezvy aktivuje výstupní doménu, která iniciuje odpovídající buněčnou odpověď (Parish 2015; Ulrich et al. 2005). Dvousložkové systémy jsou přítomny v grampozitivních i gramnegativních patogenních bakteriích, ve kterých kromě regulace „housekeeping“ funkcí kontrolují expresi toxinů a dalších proteinů důležitých pro patogenezí (West and Stock 2001).

Jednosložkové systémy jsou cytoplazmatické proteiny, které obsahují jak senzorovou doménu, tak výstupní doménu. Senzorová doména obvykle snímá intracelulární signály prostřednictvím vazby malých molekul, což vede k ovlivnění transkripce výstupní doménou (Ulrich et al. 2005).

V porovnání s jinými bakteriálními druhy obsahují mykobakterie poměrně malý počet dvousložkových systémů, přesto však tyto systémy mají klíčový význam pro přežití bakterií a hrají roli v patogenitě. Například *M. tuberculosis* má 12 dvousložkových regulačních systémů, několik z nich se podílí na virulenci a jejich narušení vede k útlumu nebo hypervirulenci (Parish 2015). Na druhou stranu však mykobakterie obsahují relativně vysoký počet Ser/Thr proteinkináz, které mezi ostatními skupinami bakterií nejsou tak hojně rozšířené.

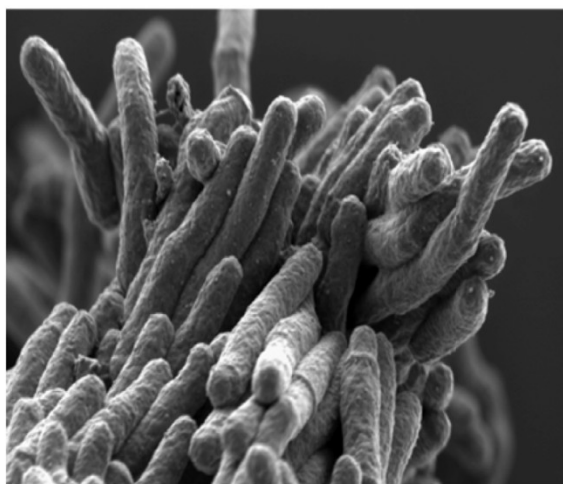
Cíle této práce jsou:

představit Ser/Thr proteinkinázy u mykobakterií a shrnout současné poznatky o těchto proteinkinázách. Stručně seznámit o významu mykobakterií jako patogenů. Dalším cílem je popsat strukturu a aktivaci některých ESTPKs a představit některé inhibiční molekuly proteinkináz a jejich potenciál pro vývoj nových antimykotik.

2. Charakteristické vlastnosti mykobakterií

Mycobacterium je rod bakterií z čeledi *Mycobacteriaceae* řazené do kmene *Actinobacteria*. Jedná se o grampozitivní, aerobní, acidorezistentní, nepohyblivé bakterie, které mohou způsobovat onemocnění. Kromě fakultativně patogenních zástupců zahrnuje také oportunní patogeny a volně žijící nepatogenní druhy. Patogenní druhy jsou schopné infikovat jak zvířata, tak také člověka a mohou způsobovat značné ekonomické a hospodářské škody. Mezi striktně patogenní zástupce patří např. *Mycobacterium tuberculosis*, původce tuberkulózy u člověka, a *M. leprae*, původce lepry. Mezi oportunní patogeny pak řadíme např. *M. avium*, *M. simiae*, *M. ulcerans* nebo *M. abscessus complex*, který u člověka způsobuje chronická plicní onemocnění, řadu onemocnění kůže a měkkých tkání nebo infekce centrálního nervového systému a obecně se jedná o jeden z nejvíce antibioticky rezistentních druhů (Rastogi et al. 2001; To et al. 2020).

Mykobakterie lze rozdělit na dvě základní skupiny: na pomalu rostoucí bakterie, které vyžadují více jak sedm dní, aby vytvořily viditelné kolonie na pevném médiu a na rapidně rostoucí bakterie vyžadující méně než sedm dnů na vytvoření kolonií. Pomalu rostoucí zástupci jsou často patogeny člověka a zvířat, zatímco rychle rostoucí jsou převážně nepatogenní, i když jsou zde výjimky.



Obrázek 1: Snímek *M. tuberculosis* z elektronového mikroskopu (Koch and Mizrahi 2018)

2.1 Genetika

V současnosti je rozeznáváno přes 190 odlišitelných zástupců mykobakterií (Waman et al. 2019). Evoluce mykobakterií zahrnuje různé procesy jako například redukci genomu, různé inzerce pomocí duplikace genů a horizontálního genového přenosu. Tyto děje napomáhají přežití v různých přírodních prostředích a geografických nikách (Rahman et al. 2014).

Rahman et al. (2014) srovnávací genomovou analýzou 44 genomů mykobakterií zjistili, že genomy nepatogenních mykobakterií jsou větší než genomy patogenních nebo oportunně patogenních mykobakterií, tím ukázali, že platí, že v přírodě volně žijící druhy potřebují větší velikost genomu než druhy parazitické.

K extrémnímu zmenšení genomu došlo u původce lepry *M. leprae*, velikost genomu je pouze 3,27 Mbp, naproti tomu např. původce tuberkulózy *M. tuberculosis* má velikost genomu 4,41 Mbp (Cole et al. 1998, 2001). Genom *M. leprae* obsahuje pouze asi 1604 genů kódujících proteiny, to odpovídá asi 49,5%, 27% jsou pseudogeny a zbylých 23,5% genomu pravděpodobně nekóduje žádný produkt a mohlo by se proto jednat o regulační sekvence. Genom *M. tuberculosis* kóduje okolo 4000 proteinů, což odpovídá přibližně 91% kódovací kapacity genomu a pouze 6 pseudogenů. Dále bylo objeveno, že ze zhruba 1600 funkčních genů *M. leprae* je jich 1439 shodných s geny *M. tuberculosis*. Sassetti et al. (2003) zjistili, že většina genů, které jsou předpokládány pro optimální růst *M. tuberculosis*, jsou také vysoce konzervované v genomu *M. leprae*.

Opačným extrémem k *M. leprae* je *M. smegmatis*. Tento nepatogenní zástupce má jeden z největších genomů mezi mykobakteriemi o velikosti zhruba 6,9 Mbp obsahující přibližně 6716 genů kódujících proteiny (Rahman et al. 2014).

Analýzou bylo zjištěno, že geny identifikované jako potencionálně důležité pro růst jsou rozestoupeny po celém chromosomu, ale zároveň při bližším prozkoumání bylo odhaleno, že mnoho těchto genů tvoří klastry v operonech a pravděpodobně jsou i společně kotranskribovány. Navíc u mnoha těchto genů se předpokládá důležitá funkce v metabolismu. Zajímavostí je, že minimální soubor genů potřebný pro přežití se mezi bakteriemi výrazně liší v závislosti na evoluční historii (C. M. Sassetti et al. 2003).

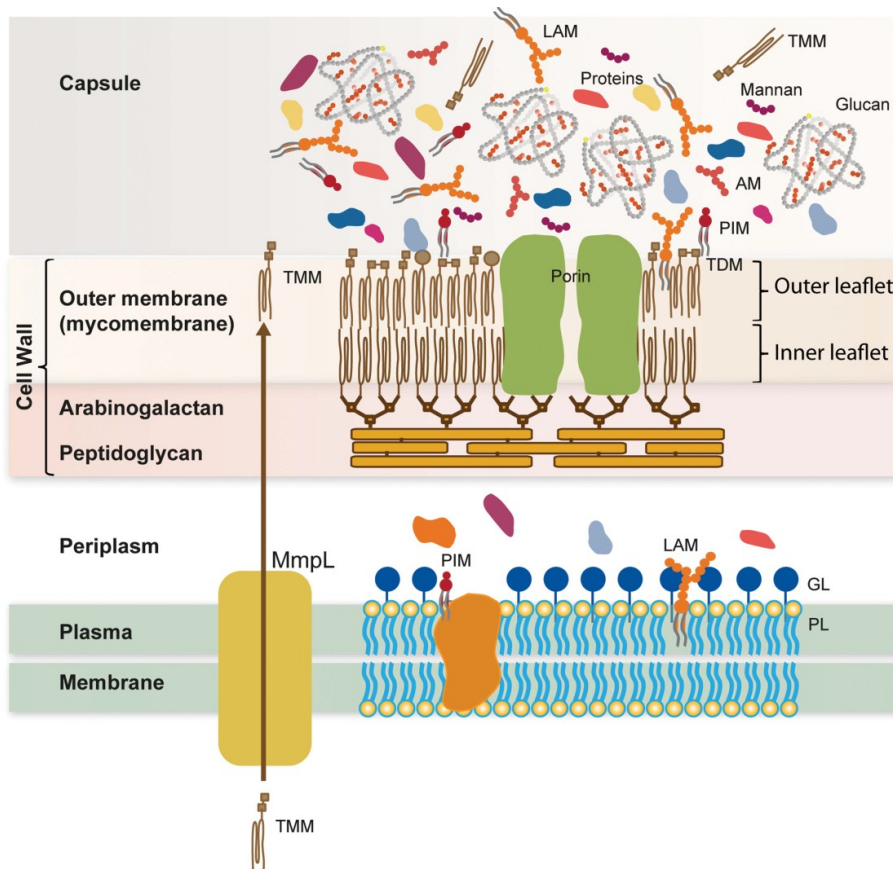
V genomu *M. tuberculosis* bylo identifikováno celkem 194 genů, které jsou potřebné pro růst *in vivo* a překvapivě velká část z těchto genů je specifických pouze pro mykobakterie a blízké příbuzné druhy. Na rozdíl od jiných bakterií se zdá, že mykobakterie pro získání patogenity nevyužily horizontálního přenosu DNA z jiného organismu, spíše došlo k adaptaci genů saprofytických předků na funkci v hostitelském prostředí. Tento model by tak vysvětloval i vznik velké části genomu duplikací (Sassetti and Rubin 2003).

Studiem fylogenetického stromu vytvořeného analýzou 16s rDNA a metodou MLSA byly objeveny rozdíly mezi druhy mykobakterií a v rámci nich. 117 mykobakteriálních druhů bylo rozděleno do čtyř hlavních kladů a ty byly dále rozděleny na sub klady. První klad je mixem všeho a rozděluje se na čtyři podskupiny (Ia-d). Patogenní mykobakterie jsou dominantní v kladu II a rozdělují jej na tři podskupiny v závislosti na typu onemocnění, které způsobují. Druhy z komplexu *M. avium* jsou sloučeny do kladu IIIa a jsou blízké příbuzné nepatogenním druhům v kladu IIIb. A nakonec ve čtvrtém kladu jsou seskupeny oportunně patogenní zástupci způsobující plicní a kožní onemocnění (Saha et al. 2019).

2.2 Fyziologie

Buněčný obal je velice důležitou složkou všech bakterií zejména proto, že zde probíhá mnoho důležitých procesů. Mezi ně řadíme např. mechanickou rezistenci, transport proteinů a solutů, ochranu buňky vůči vlivům vnějšího prostředí, dále složky obalu napomáhají buněčnému dělení, motilitě buněk a adhezi k receptorům (Chiaradia et al. 2017; Daffé and Marrakchi 2019). Buněčný obal je zároveň dynamickou strukturou a může být přestavěn v závislosti na aktuálních potřebách patogenu a přizpůsobit se tak podmínkám vnějšího prostředí (Singh et al. 2018). Tento obal se u mykobakterií skládá z plazmatické membrány, buněčné stěny, vnější „mykomembrány“ a kapsule (obr. 2).

Složení a struktura plazmatické membrány mykobakterií je podobná ostatním grampozitivním a gramnegativním organizmům (Daffé and Marrakchi 2019). Naopak buněčná stěna se neliší ani gramnegativním a ani grampozitivním bakteriím a je jedinečná zejména svým vysokým obsahem lipidů, ty tvoří až 60% obsahu buněčné stěny a 40% jejich celkové suché hmotnosti. Kostru buněčné stěny tvoří peptidoglykan, ten je kovalentně vázán k arabinogalaktanu, který je esterifikován kyselinou mykolovou, což je mastná kyselina s velmi dlouhým řetězcem. Tato mastná kyselina poté tvoří vnitřní list vnější membrány, takzvané mykomembrány. Vnější list je tvořen množstvím nekovalentně vázaných lipidů a glykolipidů (Chiaradia et al. 2017; Daffé and Marrakchi 2019).



Obrázek 2: Model buněčného obalu mykobakterií. Buněčný obal je tvořen plazmatickou membránou, buněčnou stěnou vnější „mykomembránou“ a kapsulí (Daffé and Marrakchi 2019).

Kapsule je nejsvrchnější strukturou mykobakteriálního obalu, její složení se mění v závislosti na tom, zdali se jedná o patogenní, pomalu rostoucí či nepatogenní, rychle rostoucí zástupce. U patogenních druhů jsou hlavní složkou polysacharidy a proteiny, u nepatogenních druhů je tvořena primárně proteiny (Lemassu et al. 1996; Ortalo-Magné et al. 1995).

2.3 Virulence a patogeneze

Mykobakteriální faktory virulence lze definovat jako bakteriální geny nebo složky buňky, které umožňují jejich celkové přežití uvnitř hostitele (Ly and Liu 2020). *M. tuberculosis* neprodukuje jediný dominantní faktor odpovědný za způsobení nemoci na rozdíl od některých jiných bakteriálních patogenů, které produkují specifické faktory virulence nebo toxiny, ale spíše vyvolává patogenezi komplexní kombinací virulenčních derivátů a odpovědí hostitele (Madacki et al. 2019).

M. tuberculosis používá jako jednu z hlavních strategií po podstoupení fagocytózy makrofágy deaktivaci nebo oddálení diferenciaci fagozomu na fagolysosom, čímž zabraňuje vzniku kyselého prostředí, které je optimální pro aktivitu hydrolytických enzymů. Mezi faktory zabraňující tomuto procesu je možno zařadit například retenci vakuolární H^+ -ATPázy nebo zabraňování aktivity Rab GTPázy (Madacki et al. 2019). Jedním z charakteristických znaků členů komplexu *M. tuberculosis* je jejich schopnost syntetizovat řadu jedinečných a komplexních lipidů, z nichž mnohé mohou fungovat jako obranné, útočné nebo adaptivní efekторы virulence (Hotter and Collins 2011). Jako faktor virulence byl například identifikován lipid phtiocerol dimycocerosát (PDIM), který je ve spojení se sekrečním systémem ESX-1 zapotřebí pro indukci prasknutí hostitelského fagozomu (Augenstreich et al. 2017). Dalším dobře zdokumentovaným faktorem virulence *M. tuberculosis* je protein ESAT-6, který se zdá pro patogenezi nezbytný, protože se předpokládá, že by mohl fungovat jako modulátor hostitelské zánětlivé odpovědi (Sun et al. 2019).

U mykobakterií rozlišujeme pět různých sekrečních systémů ESX, neboli sekreční systémy typu VII, které se označují jako ESX-1 až ESX-5. Tyto sekreční systémy jsou potřebné pro transport substrátů přes komplexní obal mykobakteriálních buněk, navíc bylo zjištěno, že sekreční systémy ESX-1, ESX-3 a ESX-5 jsou potřebné pro plnou virulenci *M. tuberculosis* (Brosch et al. 2019). Nejnověji vyvinutým sekrečním systémem typu VII je ESX-5, který se vyskytuje pouze u pomalu rostoucích druhů mykobakterií (Newton-Foot et al. 2016). Tento sekreční systém je vyžadován pro integritu buněčné stěny a úplnou virulenci (Ly and Liu 2020).

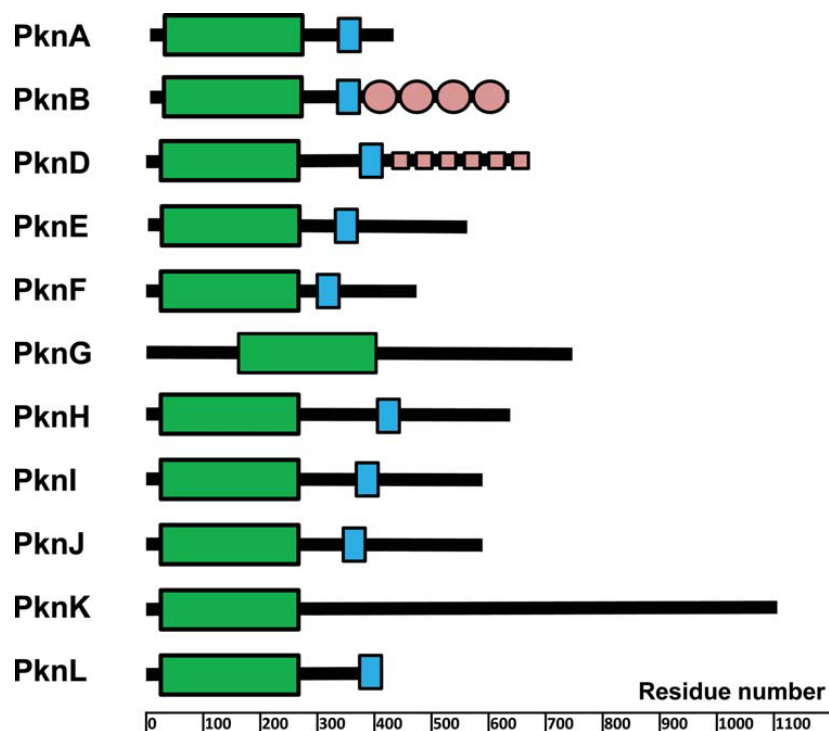
Dalšími dobře známými faktory virulence jsou povrchové lipidy ve vnější membráně mykobakterií, které mají důležitou roli v interakci hostitele a patogenu. Mezi tyto lipidy se řadí například phtiocerol dimycocerosaty nebo fenolové glykolipidy (PGLs) (Ly and Liu 2020). PDIMs jsou rozvětvené lipidy, které jsou přítomny pouze ve vnější membráně patogenních druhů mykobakterií, předpokládá se, že zprostředkovávají na receptorech závislou fagocytózu, přispívají

k nízké propustnosti buněčné stěny, poskytují ochranu buněk proti reaktivním meziproduktům dusíku a dále že interferují s rozpoznáváním imunitních buněk a podporují únik z fagosomu hostitelských buněk a smrt hostitelských buněk (Ehrt, Schnappinger, and Rhee 2018; Ly and Liu 2020). PGLs jsou také omezeny pouze na patogenní mykobakterie a například PGL-1 nacházející se u *M. leprae* se podílí na invazi hostitelských fagocytujících buněk (Tabouret et al. 2010).

M. leprae čelí během infekce prostředí uvnitř makrofágu hosta, kde oxidativní stres a oxid dusnatý v kombinaci se sníženou koncentrací kyslíku, nízkým pH a vysokou koncentrací oxidu uhličitého přispívají ke zpomalení růstu. V porovnání s *M. tuberculosis* ztratil *M. leprae* většinu genů účastnících se detoxikace reaktivních forem dusíku a kyslíku. Avšak ponechal si epoxidohydroxylázy, peroxydoxiny a superoxid dismutázu, které mohou poskytovat minimální obranný mechanismus pro přežití intrafagozomálního nitrosativního a oxidačního stresu (Visca et al. 2002).

3. Ser/Thr proteinkinázy

Genom *M. tuberculosis* kóduje celkem 11 serin/treoninových proteinkináz eukaryotického typu (ESTPKs), pojmenovaných PknA, PknB, PknD – L, které jsou strukturně příbuzné eukaryotickým proteinkinázám (obr. 3). Fosfoproteom obsahuje stovky proteinů, které jsou fosforylovány těmito proteinkinázami. Priscic et al. (2010) identifikovali přes 500 fosforylačních míst ve 301 proteinech, čímž ukázali, že alespoň 7% proteinů *M. tuberculosis* je fosforylovaných. Tyto proteiny se podílí na různých aspektech biologie, což podporuje důležitou roli ESTPKs na regulaci fyziologie, růstu, patogeneze, virulence, perzistence a reaktivace infekce. Navíc více než 40% z těchto fosfoproteinů bylo fosforylováno na více než jednom místě, přičemž některé proteiny mohou obsahovat až sedm míst (Priscic et al. 2010). Dále většina fosforylovaných peptidů *in vitro* byla fosforylována více kinázami a některé byly dokonce aktivně vyhledávány většinou kináz, na druhou stranu však bylo objeveno 48 proteinů u *M. tuberculosis*, které jsou fosforylovány pouze jednou kinázou (Priscic et al. 2010).



Obrázek 3: organizace domén Ser/Thr proteinkináz *M. tuberculosis*. Zelenou barvou jsou vyobrazeny kinázové domény, modrou barvou jsou zobrazeny transmembránové domény a některé známé extracelulární domény jsou označeny červeně (Priscic and Husson 2014)

Ser/Thr proteinkinázy, na rozdíl od dvoukomponentových systémů, nejsou tak široce rozšířeny mezi různými skupinami bakterií, jejich rozšíření je různé i mezi různými druhy mykobakterií, například *M. leprae* kóduje pouze čtyři ESTPKs a *M. marinum* naopak celkem 24 různých ESTPKs. Je však zajímavé, že mykobakteriální genomy obsahují relativně nízký počet dvoukomponentových

systémů v porovnání s jinými bakteriálními genomy podobné velikosti, to naznačuje, že snížený počet histidinových kináz je kompenzován alternativními mechanizmy přenosu signálu včetně Ser/Thr fosforylace (Wehenkel et al. 2008). Přítomnost PknA, PknB, PknG a PknL ve všech druzích naznačuje důležitou roli těchto proteinkináz na regulaci klíčových aspektů fyziologie mykobakterií, přestože pro *M. tuberculosis* jsou esenciální pouze proteinkinázy PknA a PknB. Předpokládá se, že v závislosti na nase, kterou různé druhy obsazují, budou mít ostatní typy ESTPKs specializovanější regulační role (Prisic and Husson 2014; M. Sasseti et al. 2003).

Devět proteinkináz je receptorového typu, konkrétně se jedná o PknA, PknB, PknD, PknE, PknF, PknH, PknI, PknJ a PknL. Tyto proteinkinázy se skládají z extracytoplazmatické sensorové domény a intracelulární kinázové domény a tedy transdukují vnější signály. Zbývající dva typy, PknG a PknK, jsou cytoplazmatické kinázy, které mají regulační doménu rozpoznávající změny uvnitř buňky (Prisic and Husson 2014). Pomocí metody sekvenční alignment bylo ukázáno, že jedenáct typů ESTPKs, které *M. tuberculosis* kóduje, lze rozdělit do tří klastřů po třech proteinkinázách a zbývající dvě nezařazené proteinkinázy, PknG a PknK, které postrádají transmembránovou doménu (Narayan et al. 2007). Av-Gay a Everett (2000) pomocí porovnání sekvencí odhalili, že v celé rodině Ser/Thr proteinkináz je konzervováno 15 aminokyselinových zbytků vyskytujících se v Hankových doménách VI až IX a dále že všechny typy s výjimkou proteinkinázy PknI obsahují lysin v aktivním místě, což je pro ESTPKs charakteristické. PknI na této pozici obsahuje asparagin.

Fosforylace u *M. tuberculosis* převažuje na Thr proti Ser a to v poměru přibližně 60%:40%, toto zjištění bylo překvapivé v porovnání s eukaryoty, kde fosforylace Ser může zaujímat až 80-90% všech fosforylačních oblastí (Prisic et al. 2010). Prisic et al. (2010) navíc identifikovali čtyři statisticky významné sekvenční motivy fosforylace, přičemž u všech z nich vystupoval Thr jako akceptor fosforylace.

Pro šest nejvíce aktivních proteinkináz (konkrétně PknA, PknB, PknD, PknE, PknF a PknH) byl identifikován významný motiv místa fosforylace. Mezi hlavní rysy patří především Thr jako akceptor fosforu a významná selekce na hydrofobní zbytky na pozicích +3 a +5. Pozoruhodné je, že Ser nemohl nahradit Thr jako akceptor fosforu pro žádnou proteinkinázu. Ale byl identifikován jeden motiv, který rozpoznával Ser jako fosfoakceptor. Tento motiv měl výraznou preferenci pro kyselé aminokyselinové zbytky na pozici -5 u proteinkinázy PknD (Prisic et al. 2010). Společný motiv fosforylace má za důsledek, že další faktory musí přispívat ke specifčnosti substrátu *in vivo* jednotlivých ESTPKs. Mezi tyto faktory pravděpodobně patří koordinovaná exprese a kolokalizace proteinkinázy a substrátu a protein-proteinové interakce mezi substrátem a proteinkinázou, ale také s možnými členy větších proteinových komplexů.

Důležitou třídu substrátů ESTPKs představují proteiny obsahující forkhead-associated (FHA) domény. FHA domény váží peptidy s pThr, čímž napomáhají sestavení proteinových komplexů. *M. tuberculosis* kóduje pět proteinů s FHA doménami, konkrétně se jedná o proteiny GarA, EmbR, ABC

transportér Rv1747 a dva proteiny exprimované společně s proteinkinázami PknA a PknB (Alber 2009). FHA domény mohou zprostředkovávat vazbu buněčných substrátů, alternativně mohou fungovat jako inhibitory proteinkinázy blokací vazby substrátu do aktivační smyčky aktivovaných ESTPKs. Prostřednictvím alosterických modifikací nebo vytvořením dalších vazebných míst pro FHA doménu může fosforylace zprostředkovávat aktivaci proteinů s FHA-doménou. Na druhou stranu může fosforylace zvýšit autoinhibici FHA domény zvýhodněním intramolekulární vazby na vazebné místo pThr (Greenstein et al. 2006).

3.1 Proteinkinázy PknA, PknB a PknD

Proteinkinázy PknA a PknB jsou kódovány sousedními geny v operonu blízko počátku replikace, který dále obsahuje geny pro enzym PBPA syntetizující buněčnou stěnu, proteinfosfotátázu PspA a protein RodA, který určuje tvar buňky. PknA i PknB jsou nezbytné pro růst *M. tuberculosis* a bylo potvrzeno, že regulují syntézu buněčné stěny a tvar buněk v závislosti na jejich vazbě k *rodA* a *pbpA*. Experimentálně bylo zjištěno, že pokud došlo k inaktivaci nebo nadměrné expresi *pknA* a *pknB*, tak tyto změny vedly ke vzniku širokých a nepravidelných buněk a zpomalení jejich růstu (Kang et al. 2005). Dále deplece PknA a/nebo PknB vedla k výraznému zvýšení citlivosti na β -laktamová antibiotika a rifampinu (Zeng et al. 2020). Kromě syntézy buněčné stěny jsou přímo či nepřímo spojeny s regulací několika dalších buněčných procesů včetně buněčného dělení, regulace transkripce a syntézy lipidů. Proteinkinázy by tedy mohly fungovat tak, aby široce koordinovaly buněčnou fyziologii s růstem buněk (Prisic and Husson 2014).

Během exponenciální fáze růstu a po infekci makrofágů jsou převážně exprimovány kinázy PknA a PknB, ale exprese desetkrát klesá po přechodu do stacionární fáze růstu. Tato výrazně vyšší exprese během exponenciálního růstu v porovnání se stacionární fází ukazuje, že během aktivní replikace buněk je nezbytná regulační aktivita těchto esenciálních proteinkináz (Kang et al. 2005).

Jedním z hlavních substrátů je peptidoglykanová hydroláza CwlM. Kináza PknB fosforyluje CwlM na C-terminálním konci, tato fosforylace je důležitá pro růst buněk, protože CwlM po fosforylaci interaguje s cytoplazmatickým enzymem MurA, který katalyzuje první krok biosyntézy peptidoglykanového prekurzoru (Boutte et al. 2016). Dalšími identifikovanými substráty fosforylace byly proteiny účastníci se buněčného dělení a elongace, zejména proteiny FtsZ a Wag31 (Kang et al. 2005). Protein FtsZ je mykobakteriálním homologem tubulinu, jedná se o esenciální protein tvořící Z kruh, funguje jako lešení pro komplex divizomu a tím umožňuje dělení buněk. Fosforylace FtsZ proteinkinázou PknA vede k inhibici jeho GTPázové aktivity *in vitro* (Thakur and Chakraborti 2006). Wag31, protein podobný tropomyosinu a homolog DivIVA, je esenciální pro životaschopnost mykobakterií a lokalizuje se asymetricky k pólům (Kang et al. 2008). Specifická, ale omezená fosforylace kompletního proteinu Wag31 byla pozorována *in vitro*, fosforylace probíhala pomocí

PknA a PknA společně s PknB, ale nikoli samotným PknB (Kang et al. 2005). Na obou svých N- a C-terminálních koncích obsahuje Wag31 coiled-coil domény, které mohou tvořit multimery nebo interagovat s jinými proteiny. To naznačuje, že protein-proteinové interakce *in vivo* mohou měnit konformaci Wag31 a tím ovlivňovat dostupnost sekvence kinázového substrátu (Kang et al. 2005).

Dále byl nově identifikován enzym RmlA jako substrát PknB. Tento enzym se účastní biosyntézy L-rhamnosy a analýzou hmotností spektrometrie bylo odhaleno, že k fosforylaci dochází celkem na třech Thr zbytcích. Navíc biochemická analýza mutantů odhalila, že jejich aktivita byla potlačena, což negativně ovlivnilo stavbu buněčné stěny buněk (Qu et al. 2021).

Proteinkináza PknD je kódována neesenciálním genem, který se nachází v lokusu spolu s geny, které se účastní transportu fosfátu a zdá se, že je kotranskribován společně s genem *pstS*, který kóduje složky systému absorpce fosfátu (Av-Gay and Everett 2000; Camus et al. 2002). Přesná funkce a ligandy PknD nejsou známy, ale spojení genu *pknD* s geny pro transport fosfátu naznačuje roli ve vychytávání fosfátu. Proteinkinázy PknD a PknB fosforylují regulátory σ -faktoru Rv0516c a RshA na nekanonických místech, která neodpovídají současnému paradigmatu regulace σ -faktoru (Andrew E. Greenstein et al. 2007). Bylo ukázáno, že fosforylace RshA *in vivo* reguluje SigH a aktivace proteinkinázy PknD u *M. tuberculosis* změnila expresi více než 100 genů regulovaných SigH, čímž byl dodán důkaz, že PknD převádí signály prostředí na transkripční odpověď (Andrew E Greenstein et al. 2007)

3.2 Proteinkinázy PknE, PknF a PknH

Celkem málo je zatím známo o funkci a substrátech proteinkinázy PknE, ale zdá se, že se jedná o proteinkinázu receptorového typu. Gen kódující tuto proteinkinázu se nezdá být součástí žádného operonu, navíc sousedí s geny neznámé funkce, zajímavé však je, že je oddělen pouze dvěma geny od genu *pknF*, což by mohlo naznačovat možné funkční spojení těchto dvou proteinkináz (Prisic and Husson 2014).

Gen *pknF* se nachází v operonu s genem pro Rv1747, který kóduje ABC transportér (Camus et al. 2002). Experimenty poukazují na funkční interakce mezi proteinkinázou PknF a Rv1747, ve kterých autofosforylovaná PknF rekrutuje Rv1747 skrze jeho amino-terminální FHA doménu, což vede k fosforylaci Rv1747 (Molle et al. 2004).

Kináza PknH je kódována za 3' koncem genu, který kóduje transkripční regulátor EmbR. Blízká fyzická vzdálenost mezi geny by mohla naznačovat možnou funkční interakci mezi těmito dvěma proteiny. Papavinasundaram et al. (2005) prokázali, že delece PknH vedla u imunosupresivních myši k hypervirulentnímu fenotypu, ve vzorcích z plic a sleziny vzrostl PknH deleční kmen na hustotu 10krát až 100krát vyšší než divoké kmeny. Navíc *pknH* deleční kmen, který rostl v kulturách, byl více rezistentní vůči stresu způsobenému okyseleným dusitanem, to naznačuje, že PknH zprostředkovává signál hostiteli a vyvolává tak reakci, která přispívá k přežití a růstu *in vivo*.

To dále pravděpodobně vede k vyváženému růstu bakterií a ustálení chronické infekce.

3.3 Proteinkinázy PknI, PknJ a PknL

Relativně málo je známo o funkci a substrátech proteinkinázy PknI. Jedná se o proteinkinázu receptorového typu, extracelulární doména zatím nebyla charakterizována, avšak podle její sekvence aminokyselin se nepodobá žádné známé proteinové doméně (Prisic and Husson 2014). Gen *pknI* je součástí klastru genů obsahujících *dacB* (Rv2911) kódující hydrolázu D-aminokyselin účastníci se remodelace buněčné stěny a *ffh* (Rv2916c), který kóduje signal recognition particle protein (Camus et al. 2002). V návaznosti na genech obklopujících gen *pknI* je zde možnost, že proteinkináza funguje v regulaci obratu buněčné stěny.

Relativně málo je známo i o kináze PknJ. Extracelulární doména této kinázy nebyla zatím charakterizována a nemá žádné rozpoznatelné motivy (Prisic and Husson 2014). Předpokládá se, že přenos konformačních změn do intracelulární kinázové domény je aktivován prostřednictvím sensorové domény, která rozpoznává ligand (Good et al. 2004). Bylo demonstrováno, že kinázová doména PknJ může dimerizovat a že se autofosforyluje na třech Thr zbytcích v aktivační smyčce. Na rozdíl od ostatních ESTPKs nacházejících se u *M. tuberculosis* nemá PknJ detekovatelný ortolog u mykobakteriálních druhů mimo komplex *M. tuberculosis* (Narayan et al. 2007). Jang et al. (2010) potvrdili fosforylaci čtyř substrátů PknJ. Jedná se o samotnou proteinkinázu PknJ, která se autofosforyluje na třech treoninových zbytcích, konkrétně na Thr¹⁶⁸, Thr¹⁷¹ a Thr¹⁷³. Dále se jedná o transkripční regulátor EmbR, dipeptidázu PepE a metyltransferázu MmaA4/Hma, která se účastní biosyntézy kyseliny mykolové. Proteinkináza PknJ by tedy mohla být zapojena do metabolismu dusíku a aminokyselin, pravděpodobně skrze fosforylaci PepE (Jang et al. 2010).

Proteinkináza PknL je kódována genem sousedícím s transposázou a domnělým proteinem vázajícím DNA, další geny v oblasti kódují několik konzervovaných hypotetických proteinů a biosyntetických enzymů pro mannan, aromatické aminokyseliny a syntézu lipidů (Camus et al. 2002). Dále ve směru 5' konce se nachází klastr *dcw*, který obsahuje několik genů kódujících enzymy pro syntézu prekurzorů peptidoglykanu, penicillin-binding protein a několik proteinů dělení buňky. Toto by mohlo naznačovat možnou funkci PknL na regulaci syntézy buněčné stěny.

3.4 Proteinkinázy PknG a PknK

Proteinkináza PknG je jedna ze dvou ESTPKs, která postrádá transmembránovou oblast a předpokládá se tedy, že se jedná o cytoplazmaticky lokalizovaný protein, který je exprimován pouze u patogenních mykobakterií. PknG je kódována genem spojeným do operonu s *glnH*, lipoproteinem vázajícím glutamin, a konzervovaným membránovým proteinem neznámé funkce (Camus et al. 2002). Gen *pknG* je pro růst mykobakterií postradatelný, nebyly totiž pozorovány žádné změny na morfologii buněk nebo růstu mezi divokým kmenem a mutantem s delecí *pknG* (Walburger et al. 2004).

Proteinkináza PknG je složena ze tří odlišných strukturních domén, jejichž kombinace nebyla nalezena v žádné jiné proteinové kináze. Skládá se z kinázové domény, rubredoxinu a tetratricopeptid repetiční domény, bylo ukázáno, že rubredoxin je nezbytný pro funkci proteinkinázy (Scherr et al. 2007). C-koncová polovina obsahuje tetratrikopeptidovou repetici (TPR), tato doména interaguje s vrcholem C-terminálního laloku kinázové domény PknG. N-terminální oblast obsahuje dva motivy Cys-X-X-Cys-Gly, které jsou charakteristické pro rubredoxiny. Kinázová doména je vložena mezi rubredoxinovou a TPR doménu (Scherr et al. 2007).

Na rozdíl od ostatních ESTPKs neexistují důkazy o fosforylaci aktivačních nebo katalytických smyček kinázové domény a pro kinázovou aktivitu PknG nebyla nutná autofosforylace (Prisic and Husson 2014). Všechna autofosforylační místa se nacházejí v nestrukturované N-koncové oblasti proteinu a nehrají žádnou roli při aktivaci kinázové domény (O'Hare et al. 2008).

Walburger et al. (2004) zjistili, že proteinkináza PknG je sekretovaná patogenními mykobakteriemi uvnitř fagozomu makrofágů a tím inhibovala fúzi fagozomu s lysozomem. Tato inhibice poté zprostředkovává intracelulární přežití mykobakterií v hostiteli. Naopak inhibice PknG vede k lokalizaci mykobakterií do lysozomu a tím tedy k jejich usmrcení. Tato modulace fúze fagozomu s lysozomem pomocí PknG by mohla být zprostředkována fosforylací hostitelských proteinů po sekreci v makrofágu (Walburger et al. 2004).

Jedním ze substrátů proteinkinázy PknG je protein GarA, který byl identifikován jako substrát fosforylace i dalších ESTPKs (Villarino et al. 2005). Nefosforylovaný protein GarA působí jako alosterický regulátor komplexu 2-oxoglutarát dehydrogenázy (ODHC) a dále interaguje také s metabolickými enzymy glutamát dehydrogenázou (GDH) a glutamát syntázou (GOGAT). Výsledkem vazby nefosforylovaného GarA je inhibice enzymů GDH a ODHC a aktivace GOGAT, to vede k metabolické změně směrem k syntéze glutamátu (O'Hare et al. 2008). GarA je proteinkinázou PknG fosforylován na prvním treoninovém zbytku konzervovaného N-koncového motivu ETTS, zatímco jiné ESTPKs fosforylují druhý treonin tohoto motivu (Villarino et al. 2005). Po fosforylaci se GarA přepne do vypnutého stavu díky intramolekulárnímu rozpoznání N-koncového fosfotreoninu FHA doménou, za těchto podmínek se metabolický tok přeorientuje zpět na katabolický směr, což vede ke spotřebě glutamátu. PknG má tedy účast na regulaci enzymů centrálního metabolismu dusíku a uhlíku.

Druhou proteinkinázou postrádající transmembránovou oblast je PknK. Gen *pknK* je umístěn blízko genu kódujícího předpokládaný regulátor transkripce *virS*, který byl popsán jako potenciální gen virulence u *M. tuberculosis* (Av-Gay and Everett 2000). PknK je schopna fosforylovat VirS *in vitro* a dále fosforyluje několik proteinů kódovaných v *mym* operonu, který je regulován VirS (Prisic and Husson 2014). Fosforylace VirS vede ke zvýšení afinity k sekvencím DNA promotoru (Kumar et al. 2009).

4. Struktura a aktivace

4.1 Struktura

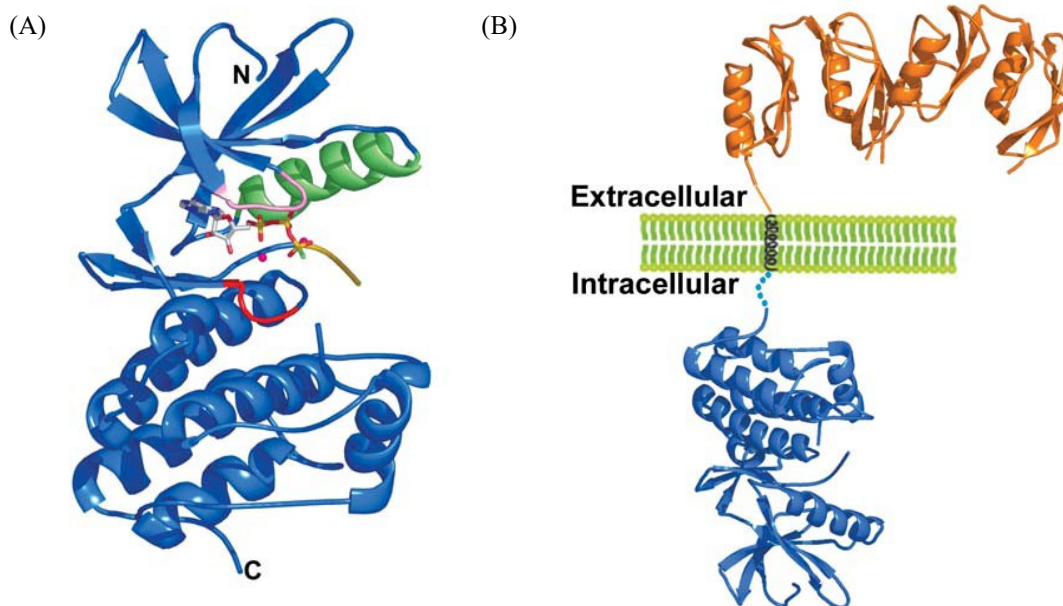
Celkem obecně existují Ser/Thr proteinkinázy v konstitutivně vypnutém stavu a signály zmírňují autoinhibici (Alber 2009). Běžný chemický mechanismus aktivace zahrnuje fosforylaci jednoho nebo více míst v aktivační smyčce kinázové domény, což je centrálně umístěný segment 15-33 zbytků ohraničených motivy sekvencí DFG a APE (Nolen, Taylor, and Ghosh 2004). Ve vypnutém stavu aktivační smyčka obecně blokuje aktivní místo nebo zůstává flexibilní a naopak fosforylované aktivační smyčky zaujímají odlišnou konformaci, která sestavuje vazebné místo pThr, které stabilizuje aktivní konformaci (Alber 2009).

Byly stanoveny krystalové struktury různých signálních modulů, včetně katalytických a senzorových domén ESTPK, tyto strukturní studie naznačují, že dimerizace reguluje ESTPKs prostřednictvím alosterického rozhraní, které je v ESTPK rodině univerzální (Greenstein et al. 2006).

Durán et al. (2005) provedli hmotnostní spektrometrii celých intracelulárních oblastí kináz PknB, PknD, PknE a PknF. Srovnáním fosforylačních vzorců odhalili, že se systematicky fosforylovaly dvě oblasti proteinkináz, jednak se jednalo o aktivační smyčku v katalytické doméně a poté o juxtamembránový segment, který spojuje katalytickou doménu s transmembránovou oblastí. Tyto výsledky naznačují, že regulace mykobakteriálních kináz zahrnuje společný mechanismus aktivační smyčky a dále, že fosforylační místa v juxtamembránové oblasti by mohla být důležitá v regulaci aktivity, stabilitě proteinu, alternativně by mohla být zapojena do signálních drah zprostředkovaných proteinkinázami (Durán et al. 2005).

První krystalová struktura bakteriální kinázové domény ESTPKs, ukazující fosforylovanou proteinkinázu PknB vázanou k různým analogům ATP, odhalila pozoruhodnou konzervaci Hanksova typu kinázového záhybu (Ortiz-Lombardía et al. 2003). Celkový tvar katalytické domény proteinkinázy PknB je podobný tvaru eukaryotických proteinových kináz. Katalytická doména je tvořena dvěma laloky, N-koncovou subdoménou, která se skládá z β -listu a dlouhého α -helixu, a C-koncovým lalokem složeným z α -šroubovic (obr. 4) (Ortiz-Lombardía et al. 2003). Dva primární body záhybu, jeden ve smyčce bohaté na Gly a druhý v oblasti spojení mezi laloky, jsou zapojeny do pohybů, které přenáší konformaci z otevřeného stavu na uzavřený a naopak. Katalytická doména zaujímá celkově uzavřenou konformaci s nukleotidem vázaným v hluboké štěrbině mezi N- a C-laloky. Poloha α C-helixu v uzavřeném stavu umožňuje uskutečnit kritický kontakt mezi lysinovým zbytkem v β 3 řetězci a kyselinou glutamovou v α C-helixu. Výsledkem tohoto charakteristického kontaktu je, že lysin je správně orientován tak, aby umístil α - a β -fosfáty nukleotidu pro katalýzu (Ortiz-Lombardía et al. 2003; Young et al. 2003). C-koncová doména PknB se skládá ze čtyř opakovaných PASTA domén (Young et al. 2003), PASTA domény mohou specificky rozpoznávat

stem-peptidy z nespojeného peptidoglykanu, což naznačuje roli ESTPKs při kontrole remodelace peptidoglykanu během buněčného růstu (Wehenkel et al. 2008; Yeats, Finn, and Bateman 2002).

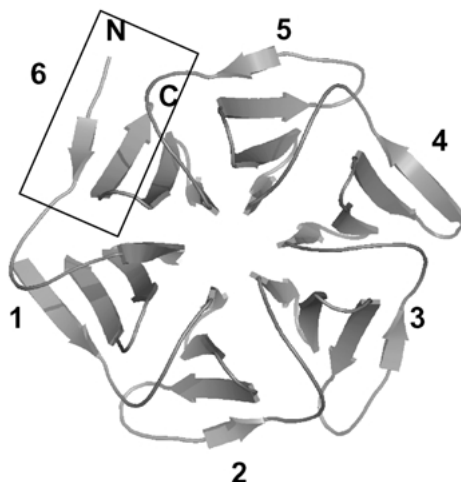


Obrázek 4: (A) Krystalová struktura intracelulární kinázové domény PknB. Stužkový diagram vyobrazuje nukleotid vázaný v hluboké štěrbině aktivního místa. Zelenou barvou je vyznačen C-helix, růžovou barvou P-smyčka, červeně katalytická smyčka a žlutě část aktivační smyčky. (B) Model proteinkinázy PknB v celé délce. Extracelulární doména je tvořena čtyřmi propojenými PASTA doménami (Young et al. 2003).

Ve struktuře PknB se nacházejí dva kovové ionty, konkrétně se jedná o ionty hořčíku. Jeden z těchto iontů slouží k vazbě β - a γ -fosfátů. Druhý kovový iont inhibuje kinázovou reakci, pravděpodobně snížením uvolňování produktu ADP, což je krok omezující rychlost reakce (Ortiz-Lombardía et al. 2003). Aktivační smyčka je umístěna mezi vláknem β_9 a smyčkou P + 1, vedle smyčky s umístěnými hořčíky. Smyčka P + 1 navazuje na C-konec aktivační smyčky a pomáhá při přizpůsobení substrátu, předpokládá se, že hraje klíčovou roli při rozlišování mezi aminokyselinami Ser/Thr a Tyr, protože řídí vzdálenost mezi kostrou substrátu a aktivním místem (Ortiz-Lombardía et al. 2003).

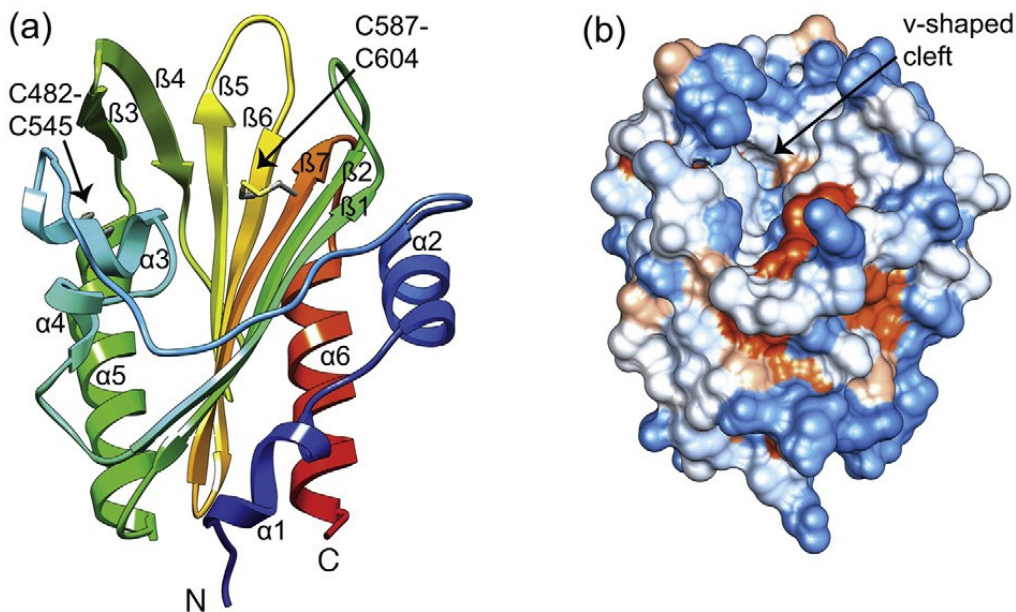
Kináza PknD je unikátní pro patogenní mykobakterie, obsahuje intracelulární kinázovou doménu a předpokládanou extracelulární sensorovou β -propeller doménu (obr. 5) (Good et al. 2004). Sensorová doména PknD má rigidní strukturu, která je flexibilně připojena k předpokládané transmembránové šroubovici. Sensorová doména zaujímá tvar β -vrtule obsahující šest čepelí uspořádaných cyklicky kolem centrálního póru. Každá čepel je tvořena čtyřmi antiparalelními β -vláknými, z nichž první je umístěno ve středu struktury a poslední je umístěno na vnějším okraji. Vlákno 4 a vlákno 1 vedlejší čepel jsou spojeny smyčkou, smyčkou jsou také spojeny vlákna 2 a 3. Tyto dvě smyčky poté tvoří „cup“ β -vrtule. C-konec PknD tvoří třetí β -vlákno šesté čepel, zatímco N-konec tvoří čtvrté vlákno šesté čepel. Celá struktura drží pohromadě topologickým překrytím, které vytváří západku (Good et al. 2004). V takové struktuře je nepravděpodobné, že konformační změna

extracelulární domény vyvolaná ligandem zahájí signalizaci, místo toho struktura sensorové domény PknD podporuje hypotézu transmembránové signalizace, ve které interakce extracelulárního ligandu mění lokalizaci a oligomerizaci kinázy (Greenstein et al. 2006). Vysoká sekvenční identita mezi jednotlivými čepeli, které tvoří nejsymetričtější doposud popsanou strukturu β -vrtule, naznačuje, že kináza PknD by mohla vázat šest homologních ligandů, případně že by mohla vázat jeden asymetrický ligand prostřednictvím zbytků, které se v každé čepeli liší (Good et al. 2004).



Obr. 5: Krystalová struktura extracelulární sensorové domény proteinkinázy PknD. Sensorová doména tvoří strukturu β -vrtule (Good et al. 2004)

Senzorová doména kinázy PknH se skládá ze šesti α -helixů a sedmi antiparalelních β -řetězců s topologií $\alpha 1 - \alpha 2 - \alpha 3 - \alpha 4 - \beta 1 - \beta 2 - \alpha 5 - \beta 3 - \beta 4 - \beta 5 - \beta 6 - \beta 7 - \alpha 6$ (obr. 6). V této struktuře se vyskytují čtyři konzervované zbytky Cys, což naznačuje, že struktura může být stabilizována jedním nebo dvěma disulfidickými můstky. To bylo potvrzeno, jelikož dvě intramolekulární disulfidické vazby spojují šroubovice $\alpha 3 - \alpha 5$ a $\beta 6 - \beta 7$. Dále se zde vyskytuje nepravidelná smyčka spojující šroubovice $\alpha 2$ a $\alpha 3$. Nejvýraznějším prvkem celé struktury je však velká centrální štěrbina tvaru písmene V. Jedna strana této štěrbiny je tvořena helixy $\alpha 3 - \alpha 5$ a řetězci $\beta 3$ a $\beta 4$, druhá strana je tvořena pěti β -řetězci $\beta 1$, $\beta 2$ a $\beta 5 - \beta 7$. Okraj štěrbiny je tvořen $\alpha 2 - \alpha 3$ smyčkou a vnitřní stěna štěrbiny je lemována zbytky ve smyčce $\alpha 3 - \alpha 4$. Zajímavé je, že zbytky obklopující štěrbinu a disulfidické můstky jsou konzervovány (Cavazos, Prigozhin, and Alber 2012).



Obrázek 6: (A) Krystalová struktura extracelulární sensorové domény proteinkinázy PknH. Modrou barvou je zde označen N-konec, červeně poté C-konec. Štěrbina tvaru písmene V je ohraničena β -řetězci, $\alpha 3$ - $\alpha 5$ a smyčkou $\alpha 2$ - $\alpha 3$. (B) Povrch sensorové domény PknH zbarven podle stupně hydrofobicity, oranžově jsou zbarveny oblasti nejvíce hydrofobní, modrou barvou poté polární oblasti (Cavazos et al. 2012).

4.2 Aktivace

Současné důkazy naznačují, že receptorové kinázy *M. tuberculosis* jsou aktivovány reverzibilními interakcemi prostřednictvím dvou odlišných proteinových rozhraní, tyto interakce fungují tak, že podporují fosforylaci aktivační smyčky různými mechanismy (Alber 2009). Ser/Thr protein kinázy podléhají několika mechanismům alosterické regulace. Regulační povrchy kinázových domén mohou vázat proteiny nebo jiné domény samotných kináz, tyto interakce často ovlivňují sestavení katalytického místa umístěním C-helixu, který váže substrát (Huse and Kuriyan 2002).

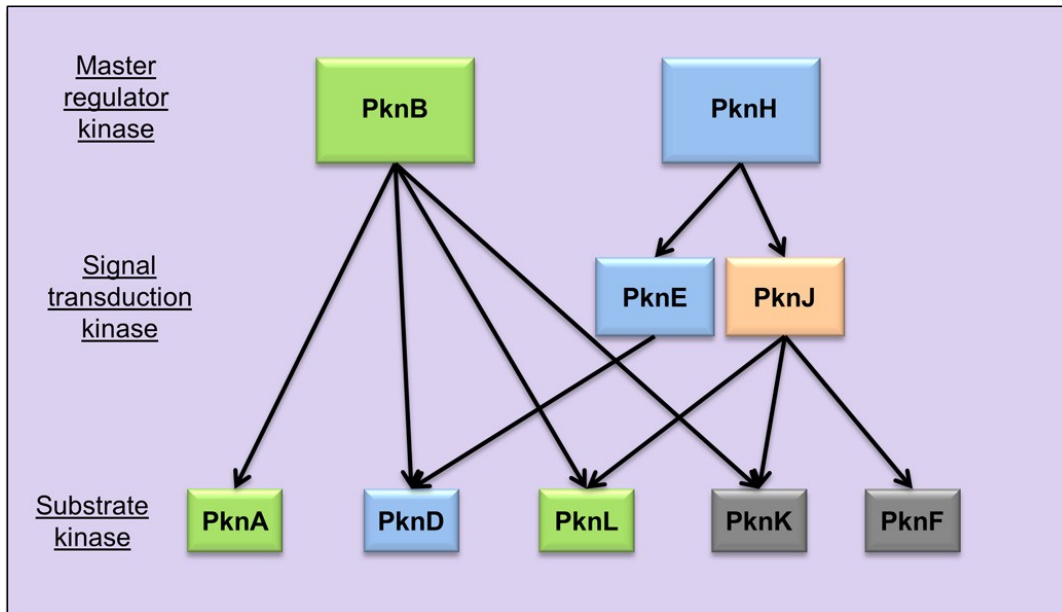
Greenstein et al. (2007) experimentálně prokázali, že proteinkináza PknD je aktivována dimerizací. Nefosforylovaná proteinkináza PknD je silně aktivována dimerizací, ale naopak pokud již byla autofosforylovaná kinázová doména aktivní, dimerizace způsobila malou nebo žádnou další aktivaci. Mutace v alosterické aktivační ploše PknD inaktivovaly aktivaci kinázové domény, což naznačuje, že aktivace vyžaduje vytvoření strukturně specifického dimeru. Dimerizace extracelulárních domén spojuje intracelulární kinázové domény, což podporuje back-to-back dimerizaci a aktivaci kinázy pro auto- i transfosforylaci. Zajímavé navíc je, že neaktivní mutant katalytického místa kinázové domény je schopen aktivace nefosforylované kinázové domény divokého typu dimerizací (Greenstein et al. 2007).

Lombana et al. (2010) ukázali, že dimerizace nefosforylované kinázové domény PknB skrze rozhraní N-laloku vede k aktivaci kinázy, *in vitro* se tak autofosforylace zvyšuje přibližně 5krát. Autofosforylace je zahájena intermolekulárním kontaktem, o čemž svědčí závislost reakce na

koncentraci a schopnosti kinázové domény fosforylovat neaktivní podjednotky. Dimer N-laloku odděluje aktivní místa PknB a brání fosforylačním místům na jednom monomeru v přístupu k aktivnímu místu druhého. Toto uspořádání v kombinaci se skutečností, že katalyticky neaktivní podjednotka je schopna aktivovat partnera divokého typu, naznačuje, že dimer fosforyluje další dimery nebo monomery a kontakty N-laloku stabilizují aktivní konformaci kinázové domény (Lombana et al. 2010).

Ser/Thr proteinkinázy *M. tuberculosis* lze rozdělit do tří funkčních tříd v závislosti na vzorci fosforylace *in vitro* na hlavní regulační proteinkinázy, proteinkinázy signální transdukce a substrátové proteinkinázy (obr. 7) (Baer et al. 2014). Proteinkinázy PknB a PknH jsou jediné, které podléhají výhradně autofosforylaci, což naznačuje jejich roli hlavních regulátorů. Obě tyto proteinkinázy obsahují skládané extracelulární sensorové domény, avšak další proteinkinázy, PknD, PknE a PknJ, které tento strukturní motiv také obsahují, jsou cílem křížové fosforylace. Z toho vyplývá, že pouhá struktura domény nestačí k určení funkční třídy (Baer et al. 2014). Signální transdukční proteinkinázy, které podléhají jak autofosforylaci tak křížové fosforylaci a také fosforylují downstream proteinkinázy, tvoří druhou úroveň hierarchie ESTPKs. Základ hierarchie je poté tvořen substrátovými ESTPKs, PknA, PknD, PknF a PknL, které nepřenáší fosfáty na jiné katalytické domény ESTPKs. Proteinkináza PknL zcela postrádá extracelulární doménu a PknA a PknF sice extracelulární sensorovou doménu obsahují, ale předpokládá se, že jsou rozvinuté. Výsledkem tedy je, že těmto proteinkinázám chybí mechanismus, kterým by přímo reagovali na extracelulární signály, proto hlavní regulační proteinkinázy přenáší fyziologické změny křížovou fosforylací těchto ESTPKs (Baer et al. 2014). Naproti tomu však PknD obsahuje extracelulární sensorovou doménu v podobě β -vrtule (Good et al. 2004), která by mohla být aktivována extracelulárními signály a vyvolávat autofosforylaci, ale v regulační síti je umístěna tak, aby regulovala stresosom v reakci na fosforylaci upstream ESTPKs. (Baer et al. 2014).

Tato hierarchická struktura sítě ESTPKs může umožnit kombinaci více signálů do různých fosforylačních vzorců, které post-translačně koordinují aktivitu mnoha buněčných enzymů a transkripčních regulátorů (Baer et al. 2014).



Obrázek 7: Grafické znázornění hierarchické struktury sítě STPKs u *M. tuberculosis*. Šipky naznačují intermolekulární fosforylaci *in vitro* (Baer et al. 2014).

5. Využití ESTPKs jako terapeutický cíl

Význam fosforylace proteinů při regulaci klíčových procesů životaschopnosti a virulence *M. tuberculosis*, spolu s podstatnými informacemi o struktuře Ser/Thr proteinkináz z nich činí atraktivní cíle pro výzkum a vývoj nových antimykotik (Prisic and Husson 2014). Extracelulární senzorní domény proteinkináz receptorového typu, regulační domény proteinkináz PknG a PknK by mohly poskytovat cíle pro výzkum, které nejsou příbuzné s lidskými typy kináz, a tedy by mohly umožnit vývoj vysoce selektivních inhibitorů mykobakteriálních proteinkináz. Výzkum se momentálně nejvíce zaměřuje na identifikaci inhibitorů esenciálních proteinkináz PknA, PknB a dále PknG (Prisic and Husson 2014).

Inhibiční aktivita nízkomolekulární sloučeniny AX20017 proti 11 mykobakteriálním proteinkinázám odhalila, že je vysoce selektivní proti proteinkináze PknG. Blokování aktivity PknG kinázy specifickým tetrahydrobenzothiofenem vede k rychlému přesunu mykobakterií do lyzozomů makrofágů a jejich zabití. AX20017 se váže hluboko v úzké kapse tvořené štěrbinou kinázové domény a unikátním peptidovým segmentem pocházejícím z N-konce PknG, v tomto místě se váže adenosin ATP. Inhibitor se tak zaměřuje na aktivní konformaci kinázové domény. Výpočty přístupové povrchové plochy odhalily, že v kinázové doméně je ponořeno 90% molekulárního povrchu tohoto inhibitoru a tudíž se zdá, že přesná kombinace reziduí vytváří jedinečnou vazebnou kapsu, která se nevyskytuje v žádné jiné proteinové kináze (Scherr et al. 2007).

Kanehiro et al. (2018) identifikovali čtyři nové inhibitory aktivity proteinkinázy PknG, konkrétně se jedná o sloučeniny AZD7762, R406, R406-volná báze a CYC116. AZD7762, R406 a R406-volná báze navíc podporují přenos mykobakterií do lyzozomů. Inhibiční účinek aktivity PknG byl 75,2% pro AZD7762, 83,8% pro R406, 83,6% pro R406-volnou bázi a 71,2% pro CYC116. Dále zjistili, že tyto sloučeniny byly schopné inhibovat přežití *M. bovis* BCG uvnitř lidských makrofágů bez známek cytotoxicity, proto se zdá, že by tyto inhibitory mohly sloužit jako slibné molekuly pro vývoj anti-mykobakteriálních látek (Kanehiro et al. 2018).

Chen et al. (2017) zjistili, že sklerotiorin, sloučenina získaná z mořských hub z Jihočínského moře, vykazuje nízké hodnoty IC₅₀ a středně silnou inhibiční aktivitu vůči PknG. Tato sloučenina byla schopna výrazně snížit růst mykobakterií v infikovaných makrofázích a zároveň nevykazovala žádnou cytotoxicitu vůči savčím buňkám. Tento inhibitor proto má potenciál pro doplnění antibiotické léčby tuberkulózy.

Dále byly identifikovány potenciální inhibitory PknG derivované z rostliny *Withania somnifera*. Z 22 testovaných sloučenin ukazovaly tři lepší hodnoty GlideScore než v současné době existující molekuly léčiv. Konkrétně se jednalo o Withanolide E, F a D a jejich hodnota G-skóre činila -7,86, -7,69 a -7,63. Důležité je, že čím negativnější je hodnota GlideScore, tím lepší je interakce

inhibitoru s cílovým proteinem. Pro srovnání nejnižší hodnota G-skóre u v současně používaného léčiva činila pouze -6,63. Tato studie proto poskytla molekulární základ na zvážení Withanolidů jako potenciálních inhibitorů PknG u *M. tuberculosis* (Santhi and Aishwarya 2011).

Lougheed et al. (2011) hledali nízkomolekulární inhibitory proteinkinázy PknB. Ve výsledku byly jejich hlavní sloučeniny schopny inhibovat aktivitu PknB *in vitro* v nanomolárním rozmezí, avšak jejich účinnost v celých buňkách byla o dva řády nižší než bylo očekáváno od účinnosti *in vitro*. Z tohoto důvodu dále zkoumali roli propustnosti buněčné stěny mykobakterií, ale nebyly nalezeny žádné důkazy, že by difúze skrze hydrofobní buněčnou stěnu nebo hydrofilní kanály měla negativní vliv na působení inhibitorů. Je proto tedy možné, že PknB nemusí vázat molekuly inhibitoru, pokud se nachází ve fyziologicky relevantní konfiguraci.

Wehenkel et al. (2006) ukázali, že mitoxantron, sloučenina používaná k léčbě rakoviny, je schopna inhibovat aktivitu PknB a tím zabránit růstu mykobakteriálních buněk. Krystalová struktura komplexu PknB s inhibitorem ukazuje, že mitoxantron je ATP-kompetitivní inhibitor. Tato sloučenina inhibuje aktivitu PknB s hodnotami IC₅₀ v mikromolárním rozsahu, konkrétně v rozmezí 0,8 μM. Navíc byla také schopna zabránit růstu buněk v kulturách *M. tuberculosis* s hodnotou MIC 400 μM a rovněž v kulturách *M. smegmatis* a *M. aurum* s hodnotami MIC 100 μM a 25 μM. Různé hodnoty MIC pozorované v této studii lze vysvětlit rozdíly v propustnosti buněčného obalu a ve struktuře cílů mitoxantronu u těchto tří druhů mykobakterií.

V nedávné době Xu et al. (2017) identifikovali novou molekulu IMB-YH-8 jako inhibitor PknB. Molekulární dokování odhalilo, že tato sloučenina interaguje s katalytickou doménou PknB a s dobrou specifitou inhibuje autofosforylaci PknB a také substrátovou fosforylaci GarA. Dále ukázali, že IMB-YH-8 inhibuje také aktivitu PknA, ale neinhibuje PknG, PknF, PknH ani lidskou Ser/Thr proteinkinázu Akt1, proto by se mohlo jednat o možnou sloučeninu použitelnou pro vývoj léčiv.

Bais et al. (2018) zkoumali inhibiční potenciál molekuly 2-aminopurinu (2-AP) a jeho odvozeného analogu 2-A9P proti PknB a ukázali, že obě sloučeniny mohou inhibovat aktivitu této proteinkinázy. Dále hodnotili latentní inhibiční aktivitu kovových iontů a poprvé ukázali, že mohou inhibovat aktivitu mykobakteriálních ESTPKs v mikromolárních koncentracích. Pro studium inhibice autofosforylační aktivity PknB byly využity ionty dvoumocných přechodných kovů, konkrétně se jednalo o Zn²⁺, Ag²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cd²⁺ a Hg²⁺. Studii prokázali, že Cd²⁺, Cu²⁺ a Ag²⁺ téměř úplně inhibovaly autofosforylační aktivitu PknB, zatímco Zn²⁺ a Hg²⁺ vykazovaly pouze mírnou aktivitu a Ni²⁺, Fe²⁺ a Co²⁺ nevykazovaly žádnou inhibici. Inhibiční efekt těchto iontů byl poté zkoumán i na ostatních ESTPKs. PknG byla inhibována pouze iontem Ag²⁺, naopak PknL byla inhibována Hg²⁺ a také Ag²⁺. Tyto výsledky naznačují, že ionty Ag²⁺ a Hg²⁺ jsou nejúčinnějšími a mají široké spektrum inhibice kinázové aktivity více ESTPKs. Ačkoliv ionty přechodných kovů inhibují enzymatickou aktivitu, mají určitá omezení, např. buněčnou toxicitu, nízkou propustnost a nespecifičnost. Proto se Bais et al. rozhodli k vývoji organokovových inhibitorů spojením sloučeniny

2-A9P s kovovými ionty (tabulka 1). Většina těchto kovových komplexů inhibovala aktivitu PknB, navíc komplex MC-4 inhiboval aktivitu PknG a PknL a komplex MC-6 inhiboval PknL. Tyto dva komplexy vykazovaly 90% inhibici růstu buněk při koncentraci 6,25 μM , respektive 12,5 μM ., naopak ostatní komplexy nevykazovaly žádnou inhibici růstu a to ani při nejvyšší koncentraci 50 μM . Dále komplexy MC-4 ani MC-6 neprojevují cytotoxický účinek a proto mají potenciál pro vývoj účinných terapeutik.

Tabulka 1: Biochemické a antimykobakteriální vlastnosti 2-AP a kovových komplexů (MCs) (Bais et al. 2018)

Kovové ionty	Sloučeniny a MCs	IC ₅₀	MIC ₉₀ (μM)
	2-AP	2,6 \pm 0,079 mM	> 50
Zn ²⁺	MC-1	6,8 \pm 0,18 μM	> 50
Zn ²⁺	MC-2	10,5 \pm 0,28 μM	> 50
Cd ²⁺	MC-3	10,2 \pm 0,47 μM	> 50
Hg ²⁺	MC-4	5,0 \pm 0,19 μM	6,25
Cu ²⁺	MC-5	16,6 \pm 0,16 μM	> 50
Ag ²⁺	MC-6	12,9 \pm 0,11 μM	12,5

V neposlední řadě bylo ukázáno, že fyto-molekuly mají schopnost se vázat na proteinkinázu PknB a mohly by tedy být velmi účinné jako léky proti tuberkulóze s méně nežádoucími účinky. Appunni et al. (2017) zkoumali tři sloučeniny fyto-molekul, které by mohly sloužit jako účinné terapeutické alternativy, jednalo se o ermanin, demethylcalabaxanton a cryptolepin hydrochlorid. Analýzou molekulárního dokování prokázali, že všechny tři fyto-molekuly mohou inhibovat aktivitu PknB. Srovnávací analýzou bylo ukázáno, že demethylcalabaxanton měl nejvyšší asociační konstantu v porovnání s ostatními studovanými fyto-molekulami a mohlo by se tedy jednat o účinnou léčivou látku proti tuberkulóze.

6. Závěr

Tato práce je přehledem znalostí o Ser/Thr proteinkinázách eukaryotického typu u mykobakterií. Tyto proteinkinázy hrají důležitou roli v regulaci buněčného dělení, syntéze a remodelaci buněčné stěny, patogenezi a virulenci. Klíčovou roli na regulaci mají zejména proteinkinázy PknA, PknB, PknG a PknL, které jsou přítomny u všech mykobakterií. Esenciální jsou však pouze PknA a PknB, které regulují dělení buňky skrze fosforylaci proteinů FtsZ a Wag31 a syntézu buněčné stěny pomocí fosforylace proteinů RmlA a CwlM.

Velmi důležitou je proteinkináza PknG, která je sice pro růst mykobakterií postradatelná, ale zprostředkovává intracelulární přežití mykobakteriálních patogenů uvnitř makrofágů skrze inhibici fúze fagozomu s lysozomem. Tato inhibice pravděpodobně nastává díky fosforylaci hostitelských proteinů mykobakteriální PknG, která je sekretována do makrofágu hostitele. PknG se dále účastní regulace enzymů centrálního metabolismu dusíku a uhlíku pomocí fosforylace proteinu GarA.

Důležitá role fosforylace proteinů v regulaci fyziologických procesů spolu s identifikací struktur proteinkináz vedla ke snaze nalézt nebo syntetizovat nové účinné inhibitory, které by v budoucnu mohly sloužit jako antimykotika. Inhibiční účinky na enzymy však obecně nekorelují s významným antimykobakteriálním působením v celobuněčných testech. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben vysoce lipofilní povahou mykobakteriální buněčné stěny, která snižuje propustnost xenobiotik. I přesto však bylo popsáno několik inhibitorů zejména proteinkináz PknB a PknG, které by po dalších úpravách mohly mít potenciál účinných terapeutik. Mezi tyto inhibitory se zejména řadí organokovové komplexy nebo fyto-molekuly, které vykazují dobrou inhibici proteinkináz a zároveň neprojevují cytotoxický účinek vůči eukaryotickým buňkám.

Seznam použité literatury

- Alber, Tom. 2009. "Signaling Mechanisms of the Mycobacterium Tuberculosis Receptor Ser/Thr Protein Kinases." *Current Opinion in Structural Biology* 19(6):650–57.
- Appunni, Sandeep, P. M. Rajisha, Muni Rubens, Sangoju Chandana, Himanshu Narayan Singh, and Vishnu Swarup. 2017. "Targeting PknB, an Eukaryotic-like Serine/Threonine Protein Kinase of Mycobacterium Tuberculosis with Phytomolecules." *Computational Biology and Chemistry* 67:200–204.
- Augenreich, Jacques, Ainhoa Arbues, Roxane Simeone, Evert Haanappel, Alice Wegener, Fadel Sayes, Fabien Le Chevalier, Christian Chalut, Wladimir Malaga, Christophe Guilhot, Roland Brosch, and Catherine Astarie-Dequeker. 2017. "ESX-1 and Phthiocerol Dimycocerosates of Mycobacterium Tuberculosis Act in Concert to Cause Phagosomal Rupture and Host Cell Apoptosis." *Cellular Microbiology* 19(7):e12726.
- Av-Gay, Yossef, and Martin Everett. 2000. "The Eukaryotic-like Ser/Thr Protein Kinases of Mycobacterium Tuberculosis." *Trends in Microbiology* 8(5):238–44.
- Baer, Christina E., Anthony T. Iavarone, Tom Alber, and Christopher M. Sassetti. 2014. "Biochemical and Spatial Coincidence in the Provisional Ser/Thr Protein Kinase Interaction Network of Mycobacterium Tuberculosis." *The Journal of Biological Chemistry* 289(30):20422–33.
- Bais, Vaibhav Singh, Balaram Mohapatra, Nadim Ahamad, Sanjana Boggaram, Sandeep Verma, and Balaji Prakash. 2018. "Investigating the Inhibitory Potential of 2-Aminopurine Metal Complexes against Serine/Threonine Protein Kinases from Mycobacterium Tuberculosis." *Tuberculosis* 108(February 2017):47–55.
- Boutte, Cara C., Christina E. Baer, Kadamba Papavinasasundaram, Weiru Liu, Michael R. Chase, Xavier Meniche, Sarah M. Fortune, Christopher M. Sassetti, Thomas R. Ioerger, and Eric J. Rubin. 2016. "A Cytoplasmic Peptidoglycan Amidase Homologue Controls Mycobacterial Cell Wall Synthesis." *ELife* 5(JUN2016).
- Brosch, Roland, Vera M. Kroesen, Jan Madacki, Wafa Frigui, and Fadel Sayes. 2019. "Mycobacterial Virulence: Impact on Immunogenicity and Vaccine Research." *F1000Research* 8.
- Camus, Jean Christophe, Melinda J. Pryor, Claudine Médigue, and Stewart T. Cole. 2002. "Re-Annotation of the Genome Sequence of Mycobacterium Tuberculosis H37Rv." *Microbiology* 148(10):2967–73.
- Cavazos, Alexandra, Daniil M. Prigozhin, and Tom Alber. 2012. "Structure of the Sensor Domain of Mycobacterium Tuberculosis PknH Receptor Kinase Reveals a Conserved Binding Cleft." *Journal of Molecular Biology* 422(4):488–94.
- Chen, Dongni, Shuangshuang Ma, Lei He, Peibo Yuan, Zhigang She, and Yongjun Lu. 2017. "Sclerotiorin Inhibits Protein Kinase G from Mycobacterium Tuberculosis and Impairs Mycobacterial Growth in Macrophages." *Tuberculosis* 103:37–43.
- Chiaradia, Laura, Cyril Lefebvre, Julien Parra, Julien Marcoux, Odile Bulet-Schiltz, Gilles Etienne, Maryelle Tropis, and Mamadou Daffé. 2017. "Dissecting the Mycobacterial Cell Envelope and Defining the Composition of the Native Mycomembrane." *Scientific Reports* 7(1):1–12.

- Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajahdram, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulsten, K. Taylor, S. Whitehead, and B. G. Bartell. 1998. "Deciphering the Biology of Mycobacterium Tuberculosis from the Complete Genome Sequence." *Nature* 393(6685):537–44.
- Cole, S. T., K. Eiglmeier, J. Parkhill, K. D. James, N. R. Thomson, P. R. Wheeler, N. Honoré, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, K. Mungall, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. M. Davies, K. Devlin, S. Duthoy, T. Feltwell, A. Fraser, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, C. Lacroix, J. Maclean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, M. A. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, S. Simon, M. Simmonds, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, K. Taylor, S. Whitehead, J. R. Woodward, and B. G. Barrell. 2001. "Massive Gene Decay in the Leprosy Bacillus." *Nature* 409(6823):1007–11.
- Cozzzone, Alain J. 1988. "Protein Phosphorylation in Prokaryotes." *Annual Review of Microbiology* 42:97–125.
- Daffé, Mamadou, and Hedia Marrakchi. 2019. "Unraveling the Structure of the Mycobacterial Envelope." *Microbiology Spectrum* 7(4):GPP3-0027–2018.
- Durán, Rosario, Andrea Villarino, Marco Bellinzoni, Annemarie Wehenkel, Pablo Fernandez, Brigitte Boitel, Stewart T. Cole, Pedro M. Alzari, and Carlos Cerveñansky. 2005. "Conserved Autophosphorylation Pattern in Activation Loops and Juxtamembrane Regions of Mycobacterium Tuberculosis Ser/Thr Protein Kinases." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333(3):858–67.
- Ehrt, Sabine, Dirk Schnappinger, and Kyu Y. Rhee. 2018. "Metabolic Principles of Persistence and Pathogenicity in Mycobacterium Tuberculosis." *Nature Reviews Microbiology* 16(8):496–507.
- Good, Matthew C., Andrew E. Greenstein, Tracy A. Young, Ho Leung Ng, and Tom Alber. 2004. "Sensor Domain of the Mycobacterium Tuberculosis Receptor Ser/Thr Protein Kinase, PknD, Forms a Highly Symmetric β Propeller." *Journal of Molecular Biology* 339(2):459–69.
- Greenstein, Andrew E., Nathaniel Echols, T. Noelle Lombana, David S. King, and Tom Alber. 2007. "Allosteric Activation by Dimerization of the PknD Receptor Ser/Thr Protein Kinase from Mycobacterium Tuberculosis." *Journal of Biological Chemistry* 282(15):11427–35.
- Greenstein, Andrew E., Christoph Grundner, Nathaniel Echols, Laurie M. Gay, T. Noelle Lombana, Carl A. Miecskowski, Kristi E. Pullen, Pei Yi Sung, and Tom Alber. 2006. "Structure/Function Studies of Ser/Thr and Tyr Protein Phosphorylation in Mycobacterium Tuberculosis." *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 9(3–4):167–81.
- Greenstein, Andrew E., Jason A. MacGurn, Christina E. Baer, Arnold M. Falick, Jeffery S. Cox, and Tom Alber. 2007. "M. Tuberculosis Ser/Thr Protein Kinase D Phosphorylates an Anti-Anti-Sigma Factor Homolog." *PLoS Pathogens* 3(4):475–83.
- Hotter, Grant S., and Desmond M. Collins. 2011. "Mycobacterium Bovis Lipids: Virulence and Vaccines." *Veterinary Microbiology* 151(1–2):91–98. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.030.
- Huse, Morgan, and John Kuriyan. 2002. "The Conformational Plasticity of Protein Kinases." *Cell* 109(3):275–82.
- Jang, Jichan, Alexandre Stella, Frédéric Boudou, Florence Levillain, Eliette Darthuy, Julien Vaubourgeix, Chongzhen Wang, Fabienne Bardou, Germain Puzo, Martine Gilleron, Odile Burlet-Schiltz, Bernard Monsarrat, Priscille Brodin, Brigitte Gicquel, and Olivier Neyrolles. 2010. "Functional Characterization of the Mycobacterium Tuberculosis Serine/Threonine Kinase PknJ." *Microbiology* 156(6):1619–31.

- Kanehiro, Yuichi, Haruaki Tomioka, Jean Pieters, Yutaka Tatano, Hyoji Kim, Hisashi Iizasa, and Hironori Yoshiyama. 2018. "Identification of Novel Mycobacterial Inhibitors Against Mycobacterial Protein Kinase G." *Frontiers in Microbiology* 9(JUL).
- Kang, Choong-Min, Seeta Nyayapathy, Jung-Yeon Lee, Joo-Won Suh, and Robert N. Husson. 2008. "Wag31, a Homologue of the Cell Division Protein DivIVA, Regulates Growth, Morphology and Polar Cell Wall Synthesis in Mycobacteria." *Microbiology* 154(3):725–35.
- Kang, Choong Min, Derek W. Abbott, Tae Park Sang, Christopher C. Dascher, Lewis C. Cantley, and Robert N. Husson. 2005. "The Mycobacterium Tuberculosis Serine/Threonine Kinases PknA and PknB: Substrate Identification and Regulation of Cell Shape." *Genes and Development* 19(14):1692–1704.
- Kennelly, Peter J. 2002. "Protein Kinases and Protein Phosphatases in Prokaryotes: A Genomic Perspective." *FEMS Microbiology Letters* 206(1):1–8.
- Koch, Anastasia, and Valerie Mizrahi. 2018. "Mycobacterium Tuberculosis." *Trends in Microbiology* 26(6):555–56.
- Kumar, Pawan, Devanand Kumar, Amit Parikh, Dimple Rananaware, Meetu Gupta, Yogendra Singh, and Vinay Kumar Nandicoori. 2009. "The Mycobacterium Tuberculosis Protein Kinase K Modulates Activation of Transcription from the Promoter of Mycobacterial Monooxygenase Operon through Phosphorylation of the Transcriptional Regulator VirS." *The Journal of Biological Chemistry* 284(17):11090–99.
- Lemassu, Anne, Annick Ortalo-Magné, Fabienne Bardou, Gaby Silve, Marie-Antoinette Laneel le, and Mamadou Daff. 1996. *Extracellular and Surface-Exposed Polysaccharides of Non-Tuberculous Mycobacteria*. Vol. 142.
- Lombana, T. Noelle, Nathaniel Echols, Matthew C. Good, Nathan D. Thomsen, Ho Leung Ng, Andrew E. Greenstein, Arnold M. Falick, David S. King, and Tom Alber. 2010. "Allosteric Activation Mechanism of the Mycobacterium Tuberculosis Receptor Ser/Thr Protein Kinase, PknB." *Structure* 18(12):1667–77.
- Lougheed, Kathryn E. A., Simon A. Osborne, Barbara Saxty, David Whalley, Tim Chapman, Nathalie Bouloc, Jasveen Chugh, Timothy J. Nott, Dony Patel, Vicky L. Spivey, Catherine A. Kettleborough, Justin S. Bryans, Debra L. Taylor, Stephen J. Smerdon, and Roger S. Buxton. 2011. "Effective Inhibitors of the Essential Kinase PknB and Their Potential as Anti-Mycobacterial Agents." *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 91(4):277–86.
- Ly, Angel, and Jun Liu. 2020. "Mycobacterial Virulence Factors: Surface-Exposed Lipids and Secreted Proteins." *International Journal of Molecular Sciences* 21(11).
- Madacki, Jan, Guillem Mas Fiol, and Roland Brosch. 2019. "Update on the Virulence Factors of the Obligate Pathogen Mycobacterium Tuberculosis and Related Tuberculosis-Causing Mycobacteria." *Infection, Genetics and Evolution* 72(December):67–77.
- Molle, Virginie, Didier Soulat, Jean-Michel Jault, Christophe Grangeasse, Alain J. Cozzone, and Jean-François Prost. 2004. "Two FHA Domains on an ABC Transporter, Rv1747, Mediate Its Phosphorylation by PknF, a Ser/Thr Protein Kinase from Mycobacterium Tuberculosis." *FEMS Microbiology Letters* 234(2):215–23.
- Narayan, Azeet, Preeti Sachdeva, Kirti Sharma, Adesh K. Saini, Anil K. Tyagi, and Yogendra Singh. 2007. "Serine Threonine Protein Kinases of Mycobacterial Genus: Phylogeny to Function." *Physiological Genomics* 29(1):66–75.
- Newton-Foot, Mae, Robin Mark Warren, Samantha Leigh Sampson, Paul David van Helden, and Nicolaas Claudius Gey van Pittius. 2016. "The Plasmid-Mediated Evolution of the Mycobacterial ESX (Type VII) Secretion Systems." *BMC Evolutionary Biology* 16(1):62.

- Nolen, Brad, Susan Taylor, and Gourisankar Ghosh. 2004. "Regulation of Protein Kinases; Controlling Activity through Activation Segment Conformation." *Molecular Cell* 15(5):661–75.
- O'Hare, Helen M., Rosario Durán, Carlos Cerveñansky, Marco Bellinzoni, Anne Marie Wehenkel, Otto Pritsch, Gonzalo Obal, Jens Baumgartner, Jérôme Vialaret, Kai Johnsson, and Pedro M. Alzari. 2008. "Regulation of Glutamate Metabolism by Protein Kinases in Mycobacteria." *Molecular Microbiology* 70(6):1408–23.
- Ortalo-Magné, Annick, Marie-Ange Dupont, Anne Lemassu, Ase B. Andersen, Pierre Gounon, and Mamadou Daffa. 1995. *Molecular Composition of the Outermost Capsular Material of the Tubercle Bacillus*. Vol. 141.
- Ortiz-Lombardía, Miguel, Frédérique Pompeo, Brigitte Boitel, and Pedro M. Alzari. 2003. "Crystal Structure of the Catalytic Domain of the PknB Serine/Threonine Kinase from Mycobacterium Tuberculosis." *Journal of Biological Chemistry* 278(15):13094–100.
- Papavinasasundaram, K. G., Bosco Chan, Ji-Hae Chung, M. Joseph Colston, Elaine O. Davis, and Yossef Av-Gay. 2005. "Deletion of the Mycobacterium Tuberculosis PknH Gene Confers a Higher Bacillary Load during the Chronic Phase of Infection in BALB/c Mice." *Journal of Bacteriology* 187(16):5751.
- Parish, Tanya. 2015. "Two-Component Regulatory Systems of Mycobacteria." *Molecular Genetics of Mycobacteria* 209–23.
- Prisic, Sladjana, Selasi Dankwa, Daniel Schwartz, Michael F. Chou, Jason W. Locasale, Choong Min Kang, Guy Bemis, George M. Church, Hanno Steene, and Robert N. Husson. 2010. "Extensive Phosphorylation with Overlapping Specificity by Mycobacterium Tuberculosis Serine/Threonine Protein Kinases." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(16):7521–26.
- Prisic, Sladjana, and Robert N. Husson. 2014. "Mycobacterium Tuberculosis Serine/Threonine Protein Kinases." *Microbiology Spectrum* 2(5):26.
- Qu, Dehui, Xiaohui Zhao, Yao Sun, Fan-Lin Wu, and Sheng-Ce Tao. 2021. "Mycobacterium Tuberculosis Thymidyltransferase RmlA Is Negatively Regulated by Ser/Thr Protein Kinase PknB." *Frontiers in Microbiology* 12.
- Rahman, Syed Asad, Yadvir Singh, Sakshi Kohli, Javeed Ahmad, Nasreen Z. Ehtesham, Anil K. Tyagi, and Seyed E. Hasnain. 2014. "Comparative Analyses of Nonpathogenic, Opportunistic, and Totally Pathogenic Mycobacteria Reveal Genomic and Biochemical Variabilities and Highlight the Survival Attributes of Mycobacterium Tuberculosis." *MBio* 5(6):e02020-14.
- Rastogi, N., E. Legrand, and C. Sola. 2001. *The Mycobacteria: An Introduction to Nomenclature and Pathogenesis*. Vol. 20.
- Saha, Mousumi Sarkar, Shilpee Pal, Indrani Sarkar, Ayan Roy, Pradeep K. Das Mohapatra, and Arnab Sen. 2019. "Comparative Genomics of Mycobacterium Reveals Evolutionary Trends of M. Avium Complex." *Genomics* 111(3):426–35.
- Santhi, Natchimuthu, and Sekar Aishwarya. 2011. "Insights from the Molecular Docking of Withanolide Derivatives to the Target Protein PknG from Mycobacterium Tuberculosis." *Bioinformation* 7(1):1–4.
- Sassetti, Christopher M., Dana H. Boyd, and Eric J. Rubin. 2003. "Genes Required for Mycobacterial Growth Defined by High Density Mutagenesis." *Molecular Microbiology* 48(1):77–84.
- Sassetti, Christopher M., and Eric J. Rubin. 2003. "Genetic Requirements for Mycobacterial Survival during Infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(22):12989–94.
- Sassetti, M., D H Boyd, E J Rubin, Christopher M. Sassetti, Dana H Boyd, and Eric J Rubin. 2003. *Genes Required for Mycobacterial Growth Defined by High Density Mutagenesis*. Vol. 48.

- Scherr, Nicole, Srinivas Honnappa, Gabriele Kunz, Philipp Mueller, Rajesh Jayachandran, Fritz Winkler, Jean Pieters, and Michel O. Steinmetz. 2007. "Structural Basis for the Specific Inhibition of Protein Kinase G, a Virulence Factor of Mycobacterium Tuberculosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(29):12151–56.
- Singh, Parul, Nagender Rao Rameshwaram, Sudip Ghosh, and Sangita Mukhopadhyay. 2018. "Cell Envelope Lipids in the Pathophysiology of Mycobacterium Tuberculosis." *Future Microbiology* 13(6):689–710.
- Sun, Jianjun, Patricia A. Champion, and Fabiana Bigi. 2019. "Editorial: Cellular and Molecular Mechanisms of Mycobacterium Tuberculosis Virulence." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9.
- Tabouret, Guillaume, Catherine Astarie-Dequeker, Caroline Demangel, Wladimir Malaga, Patricia Constant, Aurélie Ray, Nadine Honoré, Nana Fatimath Bello, Esther Perez, Mamadou Daffé, and Christophe Guilhot. 2010. "Mycobacterium Leprae Phenolglycolipid-1 Expressed by Engineered M. Bovis BCG Modulates Early Interaction with Human Phagocytes." *PLoS Pathogens* 6(10).
- Thakur, Meghna, and Pradip K. Chakraborti. 2006. "GTPase Activity of Mycobacterial FtsZ Is Impaired Due to Its Transphosphorylation by the Eukaryotic-Type Ser/Thr Kinase, PknA *." *Journal of Biological Chemistry* 281(52):40107–13.
- To, Kimberly, Ruoqiong Cao, Aram Yegiazaryan, James Owens, and Vishwanath Venketaraman. 2020. "General Overview of Nontuberculous Mycobacteria Opportunistic Pathogens: Mycobacterium Avium and Mycobacterium Abscessus." *Journal of Clinical Medicine* 9(8):2541.
- Ulrich, Luke E., Eugene V. Koonin, and Igor B. Zhulin. 2005. "One-Component Systems Dominate Signal Transduction in Prokaryotes." *Trends in Microbiology* 13(2):52..
- Villarino, A., R. Duran, A. Wehenkel, P. Fernandez, P. England, P. Brodin, S. T. Cole, U. Zimny-Arndt, P. R. Jungblut, C. Cerveñansky, and P. M. Alzari. 2005. "Proteomic Identification of M. Tuberculosis Protein Kinase Substrates: PknB Recruits GarA, a FHA Domain-Containing Protein, Through Activation Loop-Mediated Interactions." *Journal of Molecular Biology* 350(5):953–63.
- Visca, Paolo, Giulia Fabozzi, Mario Milani, Martino Bolognesi, and Paolo Ascenzi. 2002. "Nitric Oxide and Mycobacterium Leprae Pathogenicity." *IUBMB Life* 54(3):95–99.
- Walburger, Anne, Anil Koul, Giorgio Ferrari, Liem Nguyen, Cristina Prescianotto-Baschong, Kris Huygen, Bert Klebl, Charles Thompson, Gerald Bacher, and Jean Pieters. 2004. "Protein Kinase G from Pathogenic Mycobacteria Promotes Survival within Macrophages." *Science* 304(5678):1800–1804.
- Waman, Vaishali P., Sundeep Chaitanya Vedithi, Sherine E. Thomas, Bridget P. Bannerman, Asma Munir, Marcin J. Skwark, Sony Malhotra, and Tom L. Blundell. 2019. "Mycobacterial Genomics and Structural Bioinformatics: Opportunities and Challenges in Drug Discovery." *Emerging Microbes and Infections* 8(1):109–18.
- Wehenkel, Annemarie, Marco Bellinzoni, Martin Graña, Rosario Duran, Andrea Villarino, Pablo Fernandez, Gwénaëlle Andre-Leroux, Patrick England, Howard Takiff, Carlos Cerveñansky, Stewart T. Cole, and Pedro M. Alzari. 2008. "Mycobacterial Ser/Thr Protein Kinases and Phosphatases: Physiological Roles and Therapeutic Potential." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1784(1):193–202.
- Wehenkel, Annemarie, Pablo Fernandez, Marco Bellinzoni, Vincent Catherinot, Nathalie Barilone, Gilles Labesse, Mary Jackson, and Pedro M. Alzari. 2006. "The Structure of PknB in Complex with Mitoxantrone, an ATP-Competitive Inhibitor, Suggests a Mode of Protein Kinase Regulation in Mycobacteria." *FEBS Letters* 580(13):3018–22.

- West, Ann H., and Ann M. Stock. 2001. *Histidine Kinases and Response Regulator Proteins in Two-Component Signaling Systems*. Vol. 26.
- Xu, Jian, Ju Xian Wang, Jin Ming Zhou, Chang Liang Xu, Bin Huang, Yun Xing, Bin Wang, Rui Luo, Yu Cheng Wang, Xue Fu You, Yu Lu, and Li Yan Yu. 2017. "A Novel Protein Kinase Inhibitor IMB-YH-8 with Anti-Tuberculosis Activity /631/154/436/2388 /631/154/556 /692/308/153 /38/39 /82/80 /82/83 /119/118 /82 /64 /42/44 Article." *Scientific Reports* 7(1).
- Yeats, Corin, Robert D. Finn, and Alex Bateman. 2002. "The PASTA Domain: A β -Lactam-Binding Domain." *Trends in Biochemical Sciences* 27(9):438–40..
- Young, Tracy A., Benedicte Delagoutte, James A. Endrizzi, Arnold M. Falick, and Tom Alber. 2003. "Structure of Mycobacterium Tuberculosis PknB Supports a Universal Activation Mechanism for Ser/Thr Protein Kinases." *Nature Structural Biology* 10(3):168–74.
- Zeng, Jumei, John Platig, Tan Yun Cheng, Saima Ahmed, Yara Skaf, Lakshmi Prasad Potluri, Daniel Schwartz, Hanno Steen, D. Branch Moody, and Robert N. Husson. 2020. "Protein Kinases PknA and PknB Independently and Coordinately Regulate Essential Mycobacterium Tuberculosis Physiologies and Antimicrobial Susceptibility." *PLoS Pathogens* 16(4).