

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Jiří Krupička

Nekonvenční bakteriální signální dráhy
Non-conventional bacterial signaling pathways

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Pavel Branny, CSc.

Praha, 2012

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat svému školiteli Pavlu Brannymu za odborné vedení práce.

Prohlášení:

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

V Praze, dne 24.8. 2012

.....

Jiří Krupička

Abstrakt

Dvoukomponentové systémy byly tradičně považovány za hlavní fosforylační systémy bakterií zapojené v buněčné signalizaci. V poslední době se však pozornost stále více soustředí na bakteriální Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu (eSTKs). Tyto proteinkinázy jsou strukturně podobné svým eukaryotickým protějškům. Některé eSTKs obsahují přídavné domény jako jsou extracelulární PASTA domény, které byly objeveny u různých grampozitivních bakterií. Bylo prokázáno, že tyto domény mohou sloužit jako senzory pro volné peptidoglykanové fragmenty. Naprostá většina vnějších signálních molekul však stále zůstává neznámá. eSTKs fosforylují široké spektrum substrátů, mezi které patří proteiny účastníci se různých buněčných procesů jako je virulence, biosyntéza buněčné stěny, buněčné dělení nebo centrální a sekundární metabolismus. Bylo také popsáno propojení mezi eSTKs a dvoukomponentovými systémy. Tato práce pojednává o současných poznatcích, které se týkají zejména eSTKs a jejich důležitých substrátů, jež byly identifikovány a charakterizovány u různých druhů bakterií.

Klíčová slova: proteinkinázy, PASTA doména, buněčná signalizace, fosforylace, substrát, virulence, biosyntéza buněčné stěny, buněčné dělení, centrální a sekundární metabolismus

Abstract

Two component systems were traditionally considered as main phosphorylation systems of bacteria involved in cell signalling. Recently, attention focuses increasingly on bacterial eukaryote-like Ser/Thr protein kinases (eSTKs). These protein kinases are structurally similar to their eukaryotic counterparts. Some eSTKs possess additional domains such as extracellular PASTA domains that were discovered in a variety of gram-positive bacteria. It has been proved that these domains can act as sensors for unlinked peptidoglycan fragments. However, majority of environmental signal molecules still remains unknown. eSTKs phosphorylate a broad spectrum of substrates including proteins involved in various cell processes such as virulence, cell wall biosynthesis, cell division, and central and secondary metabolism. Cross talk between eSTKs and two component systems also occurs. In this thesis, the current knowledge about eSTKs and their significant substrates in different bacterial species is discussed.

Key words: protein kinases, PASTA domain, cell signalling, phosphorylation, substrate, virulence, cell wall biosynthesis, cell division, central and secondary metabolism

Obsah

Obsah	1
1. Úvod	2
2. Hlavní typy bakteriálních fosforylačních systémů	3
2.1 Dvoukomponentové systémy	3
2.2 Fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferázový systém.....	4
2.3 Neobvyklé kinázy.....	5
2.4 Bakteriální Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu (eSTKs).....	5
3. Rozdělení bakteriálních proteinkináz	8
4. Přídavné domény bakteriálních Ser/Thr proteinkináz eukaryotického typu	9
5. Model aktivace bakteriálních Ser/Thr proteinkináz eukaryotického typu	11
5.1 Signální molekuly aktivující proteinkinázy	12
6. Bakteriální zástupci s identifikovanými substráty eSTKs	12
6.1 Streptococcus pneumoniae	12
6.2 Streptococcus pyogenes	14
6.3 Streptococcus agalactiae.....	15
6.4 Staphylococcus aureus	16
6.5 Chlamydia trachomatis.....	17
6.6 Bacillus subtilis	18
6.7 Corynebacterium glutamicum	20
6.8 Streptomyces coelicolor	21
6.9 Mycobacterium tuberculosis	22
6.10 Myxococcus xanthus	24
6.11 Pseudomonas aeruginosa.....	26
6.12 Yersinia (Y. pestis, Y. pseudotuberculosis, Y. enterocolitica).....	27
6.13 Mycoplasma pneumoniae.....	28
7. Závěr	29
8. Seznam použité literatury	31

1. Úvod

Živé bakteriální buňky se musejí adaptovat na neustálé změny okolního prostředí. Bakterie jsou nepřetržitě vystaveny různým typům signálních molekul včetně produktů jejich vlastního metabolismu. Pro přežití jednotlivých bakteriálních buněk i celých kolonií je nezbytná jejich schopnost dostatečně rychle a přiměřeně na tyto signály odpovídat a přizpůsobovat se tak novým podmínkám. Proto je přítomnost struktur a mechanismů, které umožňují přenos signálu z vnějšího prostředí do buňky, pro bakterie i ostatní formy života zcela zásadní.

Mezi důležité proteinové struktury, zajišťující přenos signálu u prokaryot i eukaryot, patří ATP-dependentní enzymy proteinkinázy. Podle mezinárodního názvosloví enzymů se na základě typu katalyzované chemické reakce řadí do podtřídy s označením fosfotransferázy (EC 2.7). Proteinkinázy zprostředkovávají přenos fosfátové skupiny (γ -fosfátu) z molekuly ATP na hydroxyskupinu aminokyseliny serinu, threoninu (Ser/Thr proteinkinázy, EC 2.7.11) nebo tyrosinu (Tyr proteinkinázy, EC 2.7.10) určitých substrátových proteinů. Odštěpením γ -fosfátu zároveň vzniká ADP. Přenos fosfátové skupiny z ATP na substrát je reverzibilní proces a nazývá se fosforylace. Fosforylovaný substrát může být následně uveden do původního stavu působením enzymů proteinfosfátáz, které tento protein defosforylují, neboť katalyzují hydrolýzu fosfoesteru hydroxyaminokyselin za vzniku fosfátu a hydroxyaminokyselin.

Fosforylace je široce rozšířena ve všech říších organismů a představuje jednu z nejdůležitějších posttranslačních modifikací proteinů. Hraje klíčovou roli v buněčné signalizaci a regulaci. Zároveň se jedná o modifikaci kovalentní. U bakterií se nachází několik typů fosforylačních systémů. Kromě Ser/Thr a Tyr proteinkináz k nim patří dvoukomponentové systémy, fosfoenolpyruvát (PEP) - dependentní fosfotransferázový systém a některé neobvyklé kinázy. V současnosti se pozornost stále více soustředí na bakteriální Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu (eSTKs - ekaryote-like Serine/Threonine Kinases).

Za počátek výzkumu proteinové fosforylace lze považovat začátek 20. století, kdy byl na Rockefellerově institutu pro lékařský výzkum v New Yorku (dnes Rockefellerova univerzita) identifikován fosfát ve vitellinu, proteinu obsaženém ve vaječném žloutku (Levene a Alsberg, 1906). O čtvrt století později Lipmann a Levene (1932) identifikovali fosfoserin jako fosfoaminokyselinu. V roce 1952 izoloval De Verdier fosfothreonin z hovězího kaseinu (De Verdier, 1952). Enzymatickou fosforylaci proteinu poprvé popsali Burnett a Kennedy (1954), avšak s použitím kaseinu jako umělého substrátu. O rok později byl identifikován

první přirozeně fosforylovaný protein (enzym glykogenfosforyláza) izolovaný ze svalové (Fischer a Krebs, 1955) a jaterní tkáně (Sutherland a Wosilait, 1955). Tyto výzkumy se však týkaly pouze eukaryot. Absence přesvědčivých důkazů o kinázové aktivitě u bakterií v kombinaci se zjištěním, že bakterie obsahují mnohem méně fosfoserinu i fosfothreoninu než eukaryotické buňky, způsobila pozdní objevení proteinkináz u bakterií (Garnak a Reeves, 1979). První zprávy o proteinkinázové aktivitě u prokaryot přinesly nezávisle na sobě dvě studie u bakterií *Salmonella typhimurium* (Wang a Koshland, 1978) a *Escherichia coli* (Manai a Cozzone, 1979). V obou případech byla popsána fosforylace na serinových a threoninových zbytcích. Fosforylovaný proteinový substrát u bakterie poprvé celkově charakterizovali Garnak a Reeves (1979). Následný rozvoj fosfoproteomiky umožnil identifikaci dalších substrátů, které se účastní širokého spektra buněčných procesů jako je buněčné dělení, biosyntéza buněčné stěny, virulence, metabolismus či odpověď na stresové podmínky. Přestože byl na poli výzkumných metod proteinkináz a identifikace jejich substrátů zaznamenán v posledních desetiletích značný pokrok, stále není k dispozici dostatek údajů o vlivu fosforylace na aktivitu substrátů.

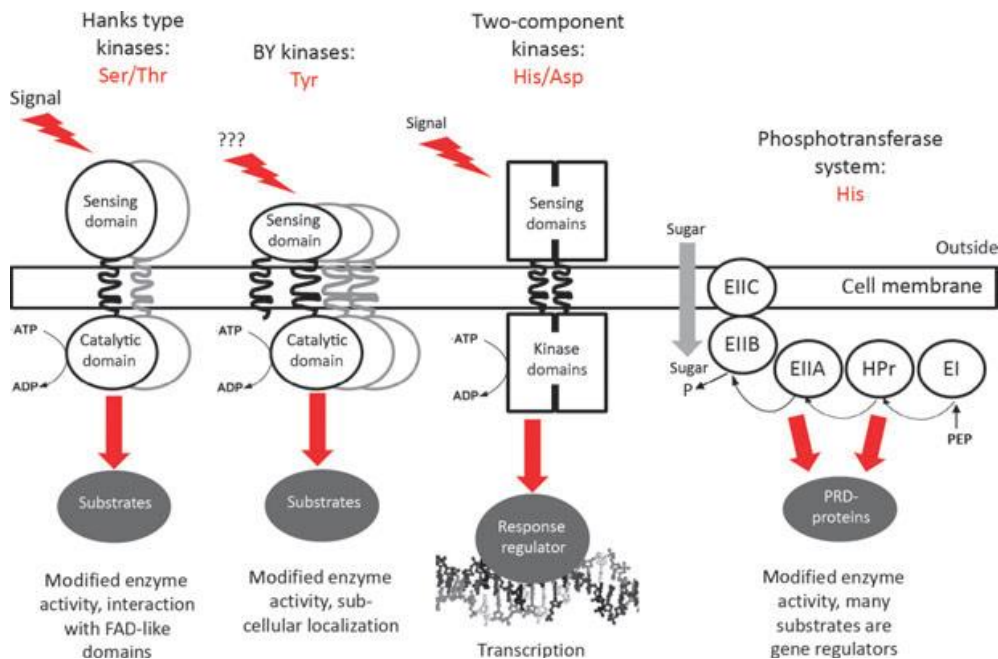
Hlavním znakem bakteriálních Ser/Thr proteinkináz eukaryotického typu (eSTKs) je skutečnost, že sdílejí strukturní a funkční podobnost katalytických domén se svými eukaryotickými protějšky. V této práci se zaměřím především na bakteriální eSTKs a jejich substrátové proteiny, které hrají roli v různých buněčných procesech.

2. Hlavní typy bakteriálních fosforylačních systémů

2.1 Dvoukomponentové systémy

Dvoukomponentové systémy (TCSs) byly považovány za hlavní signalizační systémy bakterií. Sestávají ze dvou složek - transmembránové sensorové kinázy a regulátoru odpovědi. Sensorová kináza slouží k rozpoznání vnějšího stimulu a většinou obsahuje extracytoplasmatickou sensorovou doménu a cytoplasmatickou histidinovou kinázovou doménu. Po aktivaci signální molekulou dochází na sensorové kináze k autofosforylaci na His zbytku a následné fosforylaci Asp zbytku v regulační doméně příslušného regulátoru odpovědi, kterým je nejčastěji transkripční aktivátor. Donorem fosfátové skupiny je ATP (Ulijasz *et al.*, 2009). Fosforylací transkripčního aktivátoru se zvýší jeho afinita k DNA. Vazbu na DNA zprostředkovává C-koncová vazebná doména. Fosforylovaný transkripční aktivátor se poté může připojit na regulační sekvenci DNA a umožnit změnu genové exprese (Roggiani a Dubnau, 1993). V posledních desetiletích byly identifikovány stovky TCSs. Některé se účastní kontroly bakteriální virulence nebo rezistence k antibiotikům, avšak výsledky pokusů

s vyřazováním genů z funkce ukázaly, že většina TCSs je postradatelná (Reinelt *et al.*, 2003). Popsáno bylo i propojení mezi TCS a eSTK (tzv. cross talk) u bakterií *M. xanthus* (Nariya a Inouye, 2005; Sun a Shi, 2001); *S. agalactiae* (Rajagopal *et al.*, 2006); *S. pneumoniae* (Ulijasz *et al.*, 2009) a *M. tuberculosis* (Chao *et al.*, 2010). Jedná se o jev, kdy je regulace substrátového proteinu pod kontrolou TCS i eSTK, nebo je substrátem přímo transkripční aktivátor z TCS.



Obr. 1: Na obrázku jsou znázorněny hlavní typy bakteriálních fosforylačních systémů s příslušnými signálními kaskádami. Složky těchto signálních kaskád jsou barevně vyznačeny - kinázové domény jsou bílé, jejich substráty šedé. Vnější signály a fosforylace jsou znázorněny červenými šipkami. Potenciální oligomerizace kináz je znázorněna šedým stínováním. Popis v textu viz podkapitoly 2.1, 2.2, 2.4. Převzato z (Mijakovic a Macek, 2012).

2.2 Fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferázový systém

Tento systém slouží k detekci a aktivnímu transportu sacharidů do buňky, přičemž dochází k fosforylaci přenášené substrátové molekuly. Donorem fosfátové skupiny je fosfoenolpyruvát (PEP). Fosforylační kaskádu tvoří cytoplasmatické enzymy EI, HPr a komplex obvykle tří proteinů EII asociovaný s membránou. Přenesením fosfátové skupiny z PEP na His zbytek proteinu EI dochází k autofosforylaci. Fosfátová skupina je následně předána na His zbytek proteinu HPr, který ji předá kaskádě proteinů EII (EIIA, EIIB jsou cytoplasmatické, EIIC transmembránový), která zodpovídá za fosforylaci a přenos sacharidů do buňky (Reizer *et al.*, 1999; Liao *et al.*, 1996; Bramley a Kornberg, 1987). Fosfotransferázový systém může být asociován s transkripčními aktivátory, které obsahují konzervovanou regulační doménu (PRD - Phosphotransferase Regulation Domain). Tyto aktivátory byly nalezeny především u gramozitivních bakterií (Reizer *et al.*, 1999).

2.3 Neobvyklé kinázy

Tyto kinázy nelze zařadit do žádné z hlavních skupin. Do této kategorie patří např. bifunkční kináza/fosfatáza z *E. coli*, jejímž substrátem je isocitrátdehydrogenáza (IDH), klíčový enzym Krebsova cyklu. Jedná se o první popsany případ Ser/Thr fosforylace u bakterie s identifikovanou kinázou i jejím endogenním substrátem (Garnak a Reeves, 1979). Podobným příkladem je bifunkční HPr kináza/fosfatáza vyskytující se u grampozitivních bakterií. Jejím substrátem je protein HPr z fosfotransferázového systému. HPr kináza je však ATP-dependentní a katalyzuje fosforylaci HPr na Ser zbytku. Aktivita této kinázy je stimulována metabolity glykolytické dráhy *in vitro*. Defosforylaci HPr zajišťuje HPr fosfatáza, na kterou působí inhibičně přítomnost PEP a enzymu EI (Deutscher a Saier, 1983). ATP-dependentní fosforylace proteinu HPr je důležitá pro regulaci metabolismu sacharidů (Kravanja *et al.*, 1999; Deutscher a Saier, 1983). Mezi další neobvyklé či atypické kinázy patří např. anti-sigma faktor SpoIIAB z *B. subtilis*, který fosforyluje na jediném Ser zbytku anti-sigma faktor SpoIIAA (Najafi *et al.*, 1995) nebo serinové kinázy rodiny RIO1 (LaRonde-LeBlanc *et al.*, 2005). Žádná z těchto kináz není sekvenčně homologní s eSTKs. V bakterii *E. coli* byla nalezena atypická Ser/Thr kináza YihE, která s eSTKs vykazuje určitou podobnost v katalytickém jádře (Zheng *et al.*, 2007). Vzhledem k odlišnostem v některých motivech však kinázu YihE nelze považovat za eSTK (Pereira *et al.*, 2011).

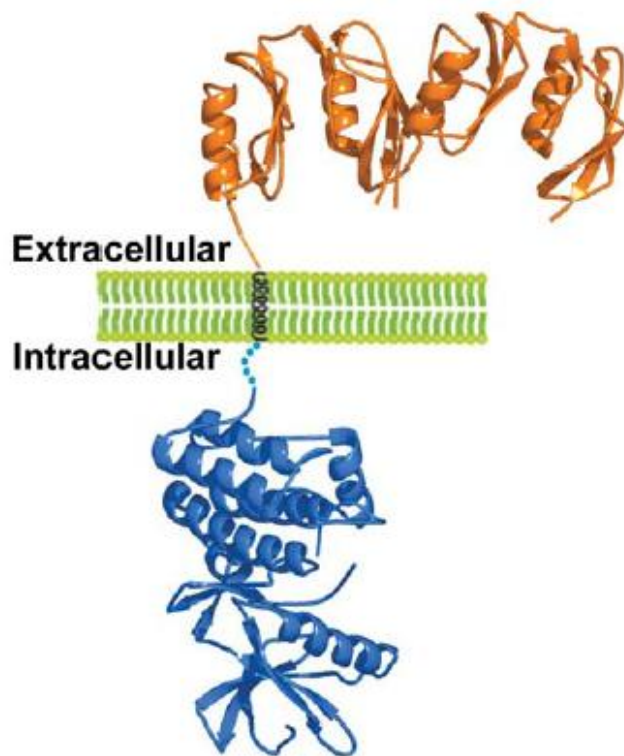
Nedávno byla popsána argininová proteinkináza McsB z *B. subtilis* (Elsholz *et al.*, 2012; Fuhrmann *et al.*, 2009). Podrobnější popis viz kapitola 6.6.

2.4 Bakteriální Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu (eSTKs)

Téměř všechny proteinkinázy, které se vyskytují v eukaryotických buňkách, lze zařadit do jedné nadrodiny. Katalytická doména eukaryotických proteinkináz se skládá z 250 - 300 aminokyselinových zbytků o molekulární hmotnosti cca 30 kDa, a je tvořena 11 konzervovanými subdoménami (I-XI), které jsou odděleny méně konzervovanými oblastmi. Hlavní jádro katalytické domény představuje oblast s nejvyšší frekvencí vysoce konzervovaných zbytků a skládá se ze subdomén VI až IX (Hanks *et al.*, 1988).

Modelovou proteinkinázou eukaryotického typu (eSTK) u bakterií je PknB z *M. tuberculosis*. Byly provedeny dvě studie krystalové struktury tohoto enzymu (Young *et al.*, 2003; Ortiz-Lombardía *et al.*, 2003). PknB je transmembránová proteinkináza s intracelulární kinázovou doménou, která je propojena transmembránovým segmentem s extracelulární částí tvořenou čtyřmi kopiemi PASTA domény (viz Obr. 2), z nichž se každá skládá ze 66 aminokyselin se 43% vzájemnou shodou (popis PASTA domén viz kapitola 4).

Transmembránový segment, jehož součástí je α -helix, se skládá z cca 70 aminokyselinových zbytků (Young *et al.*, 2003).



Obr.2: Celkový model proteinkinázy PknB z bakterie *M. tuberculosis*. Extracelulární doména je znázorněna jako čtyři propojené PASTA domény, jejichž strukturní znázornění bylo převzato ze struktury penicilin vázajícího proteinu PBP2x z bakterie *S. pneumoniae* (Gordon *et al.*, 2000). Převzato z (Young *et al.*, 2003).

Ve dvou studiích byla analyzována krystalová struktura aktivní formy PknB v binárním komplexu s analogy adenosintrifosfátu (ATP) (Ortiz-Lombardía *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2003), která potvrdila celkovou podobnost složení katalytické domény PknB s proteinkinázami eukaryot. Katalytická doména se skládá ze dvou laloků - N-koncové subdomény, ve které se nachází dlouhý α C helix, a C-koncového laloku, tvořeného převážně α -helixy (viz Obr. 3) (Ortiz-Lombardía *et al.*, 2003).

Proteinkinázy se mohou nacházet ve dvou konformačních stavech - otevřeném, nebo uzavřeném. To závisí na vzájemné relativní pozici obou laloků. Až na několik odchylek je uzavřená konformace v souladu s aktivním stavem enzymu (Ortiz-Lombardía *et al.*, 2003). Krystalová struktura kinázové katalytické domény PknB s analogem ATP zaujímá aktivní konformaci (Young *et al.*, 2003). Posuny, které jeden konformační stav změni na druhý, se týkají dvou pantových bodů. Jeden se nachází ve smyčce bohaté na Gly (Gly-rich loop / P-loop) v N-koncovém laloku, druhý je v oblasti spojující oba laloky. Smyčka bohatá na Gly se uplatňuje při vazbě nukleotidu (Ortiz-Lombardía *et al.*, 2003).

Analýza krystalového modelu PknB odhalila, že katalytická doména zaujímá celkově

uzavřenou konformaci s nukleotidem těsně vázaným v hluboké štěrbině mezi N- a C-koncovým lalokem (Ortiz-Lombardía *et al.*, 2003). To je v rozporu s eukaryotickou cAMP-dependentní proteinkinázou PKA, která byla v uzavřené konformaci nalezena pouze pro ternární komplex enzym-nukleotid-substrát, zatímco v binárním komplexu krystalizovala v otevřené konformaci (Zheng *et al.*, 1993). Shoduje se to však s pozorováním u binárního komplexu enzym-nukleotid eukaryotické fosforylázy-kinázy PhK (Owen *et al.*, 1995).

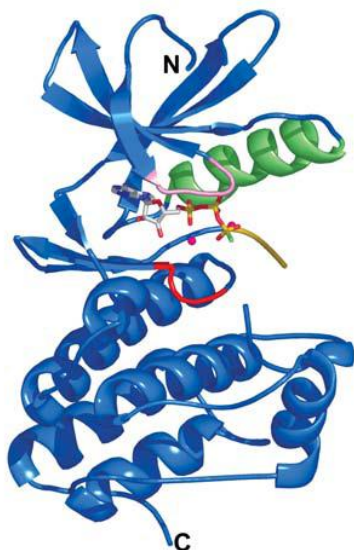
Jedním z typických rysů, které definují uzavřenou konformaci proteinkinázy, je relativní pozice α C helixu. V uzavřeném stavu PknB pozice α C umožňuje navázání rozhodujícího kontaktu mezi lysinovým zbytkem v β 3 listu a kyselinou glutamovou v α C helixu. Výsledkem je orientace lysinu do pozice α - a β -fosfátových skupin nukleotidu, která je vhodná pro katalýzu. Pozice N-konce α C helixu v proteinkináze PknB se shoduje s fosforylázy-kinázou PhK, ale neshoduje se s pozicí této oblasti v proteinkináze PKA (Ortiz-Lombardía *et al.*, 2003).

Doménu pro vazbu nukleotidu v eSTKs tvoří subdomény I až IV. Hlavním rysem subdomény I je přítomnost prostředních konzervovaných zbytků Gly (G), které jsou součástí motivu G-x-G-xx-G-x-V. Tento motiv stabilizuje negativní náboje α - a β -fosfátových skupin ATP během fosforylace. Konzervovaný Lys zbytek v subdoméně II interaguje s α - a β -fosfátovými skupinami ATP a při katalýze pomáhá orientovat ATP (Verma a Maurelli, 2003). V krystalové struktuře aktivní formy PknB byla zjištěna přítomnost dvou kofaktorových iontů Mg^{2+} . Jeden z nich pomáhá koordinovat α - a β -fosfátové skupiny nukleotidu (Ortiz-Lombardía *et al.*, 2003), a s ním také interaguje konzervovaný Asp-Phe-Gly (DFG) motiv nacházející se na N-konci aktivační smyčky (Nagar *et al.*, 2002) v subdoméně VII (Verma a Maurelli, 2003).

Zajímavou vlastností PknB při interakci s nukleotidem je skutečnost, že aminokyseliny vytvářející aktivní místo enzymu se zdají být připraveny pro přenos fosfátové skupiny, avšak γ -fosfát nukleotidu se v tuto chvíli ještě nachází příliš daleko od svého funkčního místa. Tím se PknB odlišuje od binárních komplexů kináza-nukleotid jiných proteinkináz (Ortiz-Lombardía *et al.*, 2003).

V rámci katalytické domény eSTKs se v subdoméně VIII nachází A-P-E motiv, který je mezi proteinkinázami velmi dobře konzervovaný. A-P-E motiv vytváří P + 1 smyčku, která představuje připojovací místo pro P + 1 zbytek substrátového proteinu (Verma a Maurelli, 2003). Blízko A-P-E motivu se nachází aktivační smyčka, která může podstupovat velké konformační změny a určovat tak katalytický stav enzymu. Aktivační smyčka hraje zásadní roli v kontrole aktivity proteinkináz stejně jako v rozpoznávání jejich substrátů. Výsledky studie PknB potvrzují, že struktura proteinkináz je mimořádně konzervovaná napříč

bakteriemi i vyššími eukaryoty (Ortiz-Lombardía *et al.*, 2003). Strukturní a chemické podobnosti PknB se svými eukaryotickými homology v živočišných buňkách podporují univerzální aktivační mechanismus Ser/Thr proteinkináz (Young *et al.*, 2003).



Obr. 3: Stužkové schéma konstruktů PknB. Na obrázku je vidět N- a C-koncový lalok kinázové katalytické domény. Nukleotid (znázorněný pomocí tyček a kuliček) je vázáný v hluboké štěrbině aktivního místa. Mezi důležité strukturní prvky v kinázové doméně patří α C helix (zeleně), smyčka P (růžově), katalytická smyčka (červeně) a část aktivační smyčky (žlutě), která je viditelná v elektronové hustotě. Oblast skládající se z 22 aminokyselinových zbytků C-koncové domény, které připojují kinázovou doménu k transmembránovému helixu, není v elektronové hustotě viditelná. Převzato z (Young *et al.*, 2003).

3. Rozdělení bakteriálních proteinkináz

Všechny charakterizované proteinkinázy se s ohledem na substrátovou specifitu rozdělují na dvě základní třídy - Ser/Thr a Tyr proteinkinázy. V některých publikacích bývají souhrnně označovány jako Hanksovy kinázy (Hanks *et al.*, 1988). Proteinkinázy první třídy, které se vyskytují u bakterií, se nazývají Ser/Thr kinázy eukaryotického typu (eSTKs). Nutno však poznamenat, že všechny bakteriální Ser/Thr proteinkinázy nejsou eSTKs.

Díky možnostem analýzy genomu je známo mnoho bakteriálních organismů, u kterých byla přítomnost těchto proteinkináz i příslušných proteinfosfátáz prokázána. První bakteriální eSTK byla objevena u půdní bakterie *Myxococcus xanthus* (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991).

Zatímco u eukaryot se Hanksovy kinázy uplatňují ve fosforylaci Ser, Thr i Tyr zbytků, u bakterií se tyrosinová fosforylace tímto typem kináz téměř nevyskytuje (Zhao a Lam, 2002). První genetická a biochemická analýza bakteriální tyrosinové proteinkinázy byla provedena až v roce 1997 (Grangeasse *et al.*, 1997). Většina tyrosinových proteinkináz identifikovaných u bakterií nesdílí sekvenční homologii se svými eukaryotickými protějšky a nebyly nalezeny ani žádné eukaryotické homology. Proto byly zařazeny do nové rodiny s názvem BY-kinázy (Bacterial TYrosine kinases) (Jadeau *et al.*, 2008).

BY-kinázy hrají roli v regulaci některých biologických funkcí včetně virulence. BY-kináza PtkA z bakterie *B. subtilis* reguluje enzymatickou aktivitu svých substrátů a může

ovlivňovat jejich lokalizaci v buňce (Jers *et al.*, 2010). BY-kinázy se skládají ze dvou domén - transmembránové aktivační domény (TAD) a intracelulární katalytické domény (CD). Sekvenčně jsou příbuzné ostatním proteinkinázovým rodinám, odlišují se však přítomností oblasti bohaté na tyrosin (YC) a tří motivů Walkerova typu (A, B, B') v katalytické doméně (Jadeau *et al.*, 2008). Aminokyselinové sekvence motivů A i B popsal Walker *et al.* (1982) u proteinů vázajících nukleotidy. Walkerův motiv A je bohatý na Gly a utváří smyčku (P-loop) pro vazbu fosfátové skupiny (Hermoso *et al.*, 2009).

Potenciální geny kódující proteinkinázy eukaryotického typu byly identifikovány také u domény *Archaea* (dříve *Archaeobacteria*). Smith a Kingová (1995) tyto geny objevili u tří navzájem příbuzných metanogenních archebakterií rodu *Methanococcus*.

Na základě analýzy více než 600 prokaryotických genomů bylo zjištěno, že potenciální geny pro eSTKs se vyskytují u téměř dvou třetin sekvenovaných kmenů. Výsledky naznačují, že počet genů pro eSTKs souvisí se složitostí životního cyklu organismů (Pérez *et al.*, 2008). Analýza genomu půdní bakterie *M. xanthus* odhalila přibližně 100 eSTKs (Nariya a Inouye, 2003). Pro porovnání - kvasinka *S. cerevisiae*, ve které se nachází jeden z nejmenších známých eukaryotických genomů, obsahuje přes 100 genů kódujících eSTKs (Pérez *et al.*, 2008). Genom eukaryotického zástupce - jednobuněčné půdní hlenky *Dictiostelium discoideum*, jejíž životní cyklus se podobá bakterii *M. xanthus*, obsahuje 285 genů pro potenciální proteinkinázy (Pérez *et al.*, 2008).

Genomová analýza bakterie *S. pneumoniae* ukázala přítomnost jediného genu kódujícího eSTK StkP, který se nachází ve stejném operonu jako gen pro příbuznou proteinfosfatázu eSTP PhpP. To z této bakterie činí vhodný modelový organismus pro výzkum eSTKs a jejich substrátů (Nováková *et al.*, 2005).

4. Přídavné domény bakteriálních Ser/Thr proteinkináz eukaryotického typu

eSTKs obvykle obsahují i různé přídavné domény, mezi něž patří PASTA doména (Penicillin-binding protein And Serine/Threonine kinase Associated domain), která byla nalezena na C-konci některých eSTKs zejména u grampozitivních bakterií kmenů *Actinobacteria* a *Firmicutes* (Jones a Dyson, 2006). Další studie prokázaly, že se také nachází u některých hypotetických proteinů a peptidyl-prolyl izomerázy archebakterií (Yeats *et al.*, 2002). U eSTKs kmene *Firmicutes* se obvykle vyskytuje jedna vícečetná PASTA doména (Jones a Dyson, 2006). U eukaryot nalezena nebyla. Často se vyskytuje na C-konci bakteriálních vysokomolekulárních proteinů vázajících penicilin (PBP). Soudí se, že je schopna vázat β -laktamová antibiotika a jejich peptidoglykanové analogy. Konzervovaná

oblast se objevuje samostatně nebo ve více kopiích, což naznačuje, že se jedná spíše o doménu než strukturní repetici. Tuto skutečnost potvrdila i analýza krystalové struktury solubilního proteinu PBP2x, enzymu biosyntézy buněčné stěny bakterie *S. pneumoniae*. Trojrozměrná globulární struktura PASTA domény se skládá ze tří β -listů, jednoho α -helixu a smyčky o různé délce mezi prvním a druhým β -listem (Yeats *et al.*, 2002).

První trojrozměrnou krystalovou strukturu vysokomolekulárního proteinu PBP2x z bakterie *S. pneumoniae* pořídil Pares *et al.* (1996). Molekula obsahuje tři domény, z nichž prostřední je doména transpeptidázová. PBP2x představuje primární faktor rezistence pro β -laktamová antibiotika (Dessen *et al.*, 2001). Varianty proteinu PBP2x, které slabě váží tento typ antibiotik, tak mohou být snadno selektovány pomocí cefalosporinů (např. cefuroximem) (Yeats *et al.*, 2002). Bylo prokázáno, že PBP2x v přítomnosti tohoto antibiotika váže dvě jeho molekuly. Při experimentu se β -laktamový kruh první molekuly cefuroximu kovalentně navázal na Ser zbytek transpeptidázové domény, která se v PBP2x nachází vedle PASTA domény, a β -laktamový kruh druhé molekuly se spojil s PASTA doménou prostřednictvím van der Waalových vazeb. β -laktamový kruh je analogní s volnou molekulou peptidoglykanu. Tato fakta naznačují, že PASTA doména váže volné molekuly peptidoglykanu, avšak pravděpodobně s nízkou afinitou, neboť těsné spojení by blokovalo aktivitu transpeptidázové domény (Yeats *et al.*, 2002).

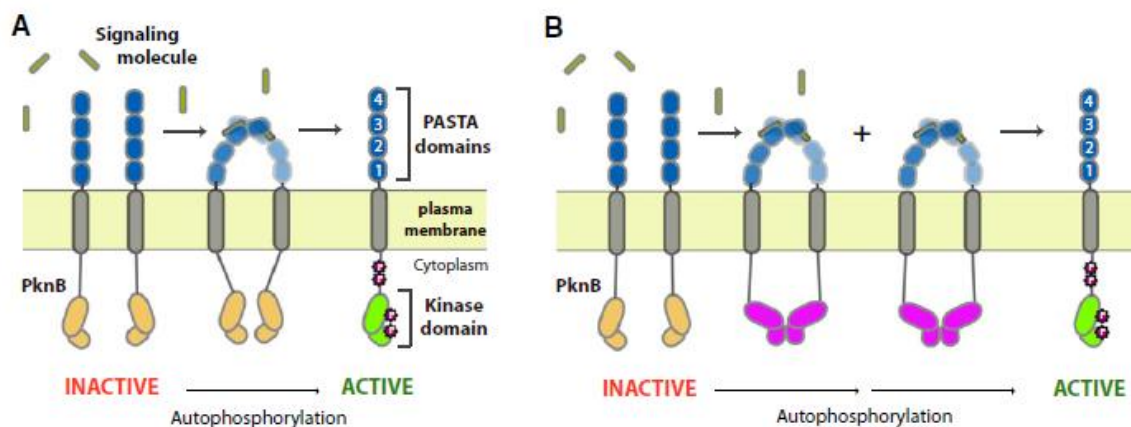
Předpokládá se, že PBPs se zásadním způsobem podílejí na správném průběhu buněčného dělení při vytváření dělicího komplexu. Působení β -laktamových antibiotik je založeno na blízké strukturní podobnosti β -laktamového kruhu s transpeptidačním substrátem (C-koncový acyl D-alanyl-D-alanin peptidového řetězce peptidoglykanu) (Dessen *et al.*, 2001). Transpeptidázová doména rozeznává a atakuje předposlední D-Ala peptidového řetězce peptidoglykanu (Yeats *et al.*, 2002). Antibiotika tak mohou působit jako pseudosubstráty a acylovat transpeptidační aktivní místa PBP, která pak deacylují velmi pomalu, a tak nemůže dále docházet k příčným propojením. Účinnost β -laktamových antibiotik v léčbě infekcí závisí na tom, zda se transpeptidázová doména PBP nachází v periplasmatickém prostoru, kde mají léčiva volný přístup k aktivním místům bez nutnosti přechodu přes cytoplasmatickou membránu (Dessen *et al.*, 2001). Geny kódující eSTKs obsahující PASTA domény se často vyskytují blízko genů, které kódují proteiny účastníci se signalizace a biosyntézy buněčné stěny. U PASTA domén se předpokládá podíl na regulaci aktivity PBPs i eSTKs, které souvisejí s biosyntézou buněčné stěny (Yeats *et al.*, 2002).

Jinou přídatnou doménou je von Willebrandova A doména (VWA). Vyskytuje se např. u PpkA (eSTK) gramnegativní bakterie *P. aeruginosa* jako součást velkého C-koncového

segmentu v periplasmatickém prostoru, kde zřejmě hraje roli v dimerizaci a aktivaci této proteinkinázy po zachycení signální molekuly. Tuto signální molekulu se zatím identifikovat nepodařilo (Mougous *et al.*, 2007). Předpokládaná sekundární struktura VWA domény vykazuje proměnlivý vzor šesti α -helixů a šesti β -listů (Edwards a Perkins, 1995). VWA domény byly u prokaryot prozkoumány jen málo, avšak u eukaryot se běžně vyskytují u různých extracelulárních proteinů (Mougous *et al.*, 2007).

5. Model aktivace bakteriálních Ser/Thr proteinkináz eukaryotického typu

Ser/Thr a Tyr proteinkinázy eukaryotického typu existují ve formě cytoplasmatické i transmembránové. Extracelulární část transmembránových proteinkináz sestává z jedné či více sensorových domén. Vazba signální molekuly na sensorovou doménu má za následek konformační změnu, která vede k autofosforylaci intracelulární katalytické domény a následné fosforylaci substrátového proteinu. Na základě údajů z nukleární magnetické rezonance o struktuře PknB z bakterie *M. tuberculosis* byl navržen molekulární model, ve kterém signální molekula způsobí dimerizaci extracelulární domény PknB skládající se z PASTA domén a vytvoření asymetrického dimeru pro katalytické domény (viz Obr. 4) (Barthe *et al.*, 2010). U PknD, homologu PknB, se předpokládá, že dimerizace extracelulární domény aktivuje kinázu již před fosforylačním procesem a podporuje autofosforylaci katalytické domény (Greenstein *et al.*, 2007).



Obr. 4.: Model dimerizace závislé na ligandu (navrženo pro proteinkinázu PknB). (A) Molekulární model, kde signální molekula způsobuje dimerizaci extracelulární domény PknB a vytvoření asymetrického front-to-front dimeru pro katalytickou doménu, což vede k aktivaci přes autofosforylaci cytoplasmatické domény proteinkinázy PknB. (B) Model autofosforylace závislé na dimerizaci. Signální molekula způsobuje back-to-back dimerizaci cytoplasmatické domény proteinkinázy PknB. Dimer poté zaujme aktivní konformaci nutnou k fosforylaci uvnitř dimeru. Převzato z (Barthe *et al.*, 2010).

U bakterie *S. pneumoniae* bylo zjištěno, že dimerizace může ovlivnit vzájemné

působení proteinkinázy a substrátového proteinu (Pallová *et al.*, 2007). Jiný model pro aktivaci PknB je založen na aktivačním mechanismu popsaném u eukaryotické Ser/Thr dsRNA dependentní proteinkinázy PKR. Při aktivaci se za podpory její RNA vazebné domény nejprve vytvoří dimer katalytické domény a až poté může dojít k vzájemné fosforylaci mezi původními monomery (Dey *et al.*, 2005).

5.1 Signální molekuly aktivující proteinkinázy

V rámci eukaryotických buněk je známo mnoho extracelulárních signálních molekul aktivujících proteinkinázy. Patří sem rozličné hormony, růstové faktory a neuropřenašeče (mediátory). Tyto látky se souhrnně nazývají první poslové. O povaze extracelulárních signálních molekul aktivujících bakteriální eSTKs je toho dosud známo jen málo. U eSTKs grampozitivních bakterií obsahujících PASTA domény se předpokládá, že by tyto domény mohly vázat signální molekuly v podobě volných peptidoglykanových podjednotek a regulovat proces biosyntézy buněčné stěny (Yeats *et al.*, 2002; Gordon *et al.*, 2000). U eSTK PrkC *B. subtilis* bylo prokázáno, že váže peptidoglykanové fragmenty z rostoucích bakterií a že mohou sloužit jako signální molekuly (Shah *et al.*, 2008). To potvrdila i studie týkající se StkP *S. pneumoniae*, kde byl vyzkoušen syntetický peptidoglykan (Maestro *et al.*, 2010).

6. Bakteriální zástupci s identifikovanými substráty eSTKs

6.1 Streptococcus pneumoniae

Tato grampozitivní bakterie se vykytuje v podobě diplokoků a představuje extracelulární patogen, který kolonizuje lidské hostitele. Bakterie bez pouzdra není virulentní, avšak v opouzdřené invazivní formě může způsobit pneumonii, sepsi nebo meningitidu. Analýza genomové sekvence odhalila přítomnost genu *stkP* kódujícího jedinou eSTK StkP a také genu *phpP*, který leží ve stejném operonu a kóduje eSTP PhpP (Nováková *et al.*, 2005). U StkP byly nalezeny čtyři kopie C-koncové PASTA domény, které váží peptidoglykan a na jejichž přítomnosti závisí aktivace StkP a rozpoznání jejího substrátu (Nováková *et al.*, 2010). Nedávno bylo zjištěno, že PASTA domény StkP *S. pneumoniae* mohou vázat nejmenší nejmenší volné podjednotky peptidoglykanu (Maestro *et al.*, 2011).

U této bakterie bylo také objeveno propojení mezi TCS a eSTK. V tomto případě je proteinkinázou fosforylována přímo složka TCS - protein RitR, který byl identifikován jako transkripční aktivátor TCS, avšak jeho kódující sekvence, na rozdíl od ostatních transkripčních aktivátorů TCS identifikovaných v *S. pneumoniae*, nesousedí s žádnou sekvencí kódující příbuznou histidinovou kinázu. RitR je tedy nespárovaným transkripčním aktivátorem, ve kterém se na pozici aspartátu (Asp), předpokládaném místě pro fosforylaci

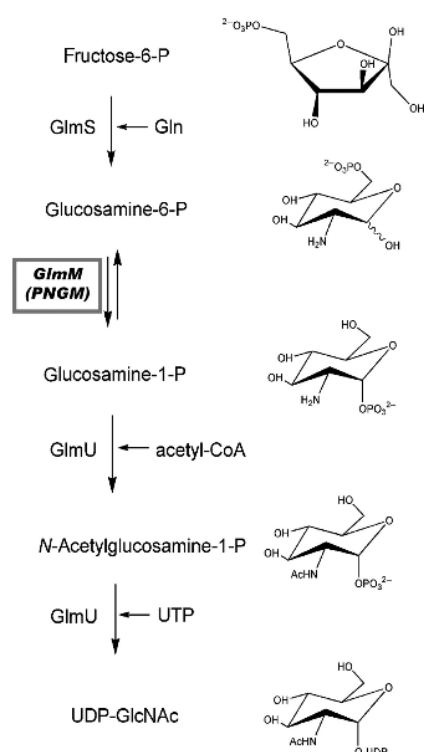
histidinovou kinázou v rámci TCS, nachází asparagin (Asn) (Ulijasz *et al.*, 2009). Výzkumný tým Throup *et al.* (2000) prokázal, že ve kmeni *S. pneumoniae* s inaktivovaným RitR dochází k výrazné redukci virulence. Jiná studie ukázala, že inaktivací RitR dochází k potlačení exprese genů kódujících transportní protein pro komplex Fe-hem, odtud název RitR (Repressor of iron transport - represor transportu železa) (Ulijasz *et al.*, 2004). Bylo prokázáno, že RitR je fosforylován v DNA vazebné doméně proteinkinázou StkP *in vitro* a defosforylován příbuznou proteinfosfatázou PhpP (Ulijasz *et al.*, 2009).

Studie Echenique *et al.* (2004) ukázala, že StkP je součástí signální sítě, která reguluje navození kompetence *in vitro* a expresi operonu *comCDE* a patogenezi při infekci plic a přenosu bakterií krevním řečištěm *in vivo*. StkP pozitivně reguluje kompetenci a virulenci. Přítomnost funkční StkP je nezbytná pro expresi genů hlavního operonu kompetence *comCDE*. Deficience StkP výrazně snižuje virulenci ve virulentních kmenech. Jiná studie odhalila, že StkP pozitivně reguluje transkripci genů, jejichž produkty se účastní syntézy buněčné stěny, biosyntézy pyrimidinu, oprav DNA, příjmu železa a reakce na oxidativní stres. Mutace v genu *stkP* způsobuje citlivost k různým stresovým podmínkám jako je zvýšená teplota, přítomnost oxidačních činidel, osmotický tlak a nízké pH (Sasková *et al.*, 2007).

Na základě fosfoproteomické analýzy byly identifikovány dva potenciální substráty StkP *in vivo* - fosfoglukosaminmutáza (GlmM) a α podjednotka RNA polymerázy (α RNAP - RpoA), která hraje roli v zahájení transkripce (Nováková *et al.*, 2005). V pozdější studii se RpoA jako substrát StkP *in vitro* potvrdit nepodařilo (Nováková *et al.*, 2010). Na základě kinázové reakce bylo potvrzeno, že StkP fosforyluje GlmM *in vitro* (Nováková *et al.*, 2005). GlmM katalyzuje první krok biosyntetické dráhy vedoucí k UDP-*N*-acetylglukosaminu, který je základním prekurzorem složek buněčné stěny bakterií (viz Obr. 5). Nepublikovaná studie prokázala, že fosforylace GlmM proteinkinázou StkP v *S. pneumoniae* je důležitá pro aktivaci proteinu. Fosforylovaná GlmM vykazuje nejvyšší specifickou aktivitu, a to nejen v reakci přeměny glukosamin-6-fosfátu na glukosamin-1-fosfát, ale především v reakci opačné. Jako jedno z míst fosforylace fosfoglukosaminmutázy GlmM proteinkinázou StkP byl pomocí hmotnostní spektrometrie určen Ser99. GlmM je také schopna komplementace podmíněně letálního kmene *E. coli* s inaktivovaným chromozomálním genem *glmM* a s kopií tohoto genu na termosenzitivním plazmidu (Pallová, 2007).

Bylo potvrzeno, že StkP váže a fosforyluje klíčový protein buněčného dělení FtsZ *in vitro*. FtsZ, homolog eukaryotického tubulinu, polymeruje a vytváří prstenec ve středu dělící se buňky, kde vznikne septum. Deleční mutanta v genu *stkP* nevykazuje narušení při vytváření FtsZ prstence (Giefing *et al.*, 2010). Fosforylace proteinkinázou StkP je tedy

pro substrát FtsZ postradatelná.



Obr. 5: Přehled prvních kroků biosyntetické dráhy peptidoglykanu. V rámečku je zvýrazněn produkt genu *glmM* - enzym fosfoglukosaminmutáza (GlmM), který hraje zásadní roli v produkci klíčového prekursoru UDP-*N*-acetylglukosaminu (UDP-GlcNAc). GlmM katalyzuje reverzibilní přeměnu glukosamin-6-fosfátu na glukosamin-1-fosfát v metabolické dráze znázorněné ve schématu. Tato přeměna probíhá přes meziprodukt glukosamin-1,6-bisfosfát (není zobrazeno). Zkratky: GlmS - ribozym aktivovaný vazbou glukosamin-6-fosfátu, Gln - glutamin; GlmU - bifunkční enzym *N*-acetylglukosamin-1-fosfátacetyltransferáza / UDP-*N*-acetylglukosaminpyrofosforyláza. Toto schéma je převzato z (Mehra-Chaudhary *et al.*, 2011).

Jiná studie nedávno pomocí fosfoproteomického přístupu a následné hmotnostní spektrometrie odhalila, že substrátem StkP je další důležitý protein buněčného dělení - protein DivIVA *in vivo*. Kinázovou reakcí bylo zjištěno, že DivIVA je také substrátem StkP *in vitro*. Mutanta v genu *stkP* vykazuje poruchy v buněčném dělení. DivIVA společně s MinC a MinD určuje střed buňky a po rozdělení buňky udržuje MinCD u jejích pólů. Dále byly zjištěny další dva *in vivo* a zároveň *in vitro* substráty StkP - Mn-dependentní anorganická pyrofosfatáza PpaC a hypotetický protein spr0334 s neznámou funkcí. Pyrofosfatázy katalyzují hydrolýzu anorganického pyrofosfátu (PP_i), který vzniká během různých biosyntetických reakcí. Regulují také mnoho enzymů, které se pyrofosfatázových reakcí neúčastní. Jejich vliv je většinou inhibiční (Nováková *et al.*, 2010).

6.2 *Streptococcus pyogenes*

Tato patogenní grampozitivní bakterie patří mezi streptokoky skupiny A (GAS, Group A Streptococci), které způsobují celou řadu lidských onemocnění od lehkých infekcí až po syndrom toxického šoku.

Analýza sekvence genomu odhalila jeden gen kódující potenciální eSTK ST-STK a jeden gen kódující potenciální proteinfofosfatázu ST-STP. Na základě sekvenční analýzy bylo

zjištěno, že ORFs pro proteinkinázu ST-STK a proteinfosfatázu ST-STP se překrývají o jeden nukleotid a jsou zřejmě přepisovány společně. Analýza sekvence aminokyselin odhalila, že proteinfosfatáza ST-STP obsahuje 11 typických motivů eukaryotických proteinfosfatáz typu 2C (PP2C). U proteinkinázy ST-STK bylo zjištěno, že N-koncová oblast zahrnující prvních 270 aminokyselinových zbytků obsahuje všech 11 konzervovaných subdomén (I-XI). C-koncová část obsahuje tři PASTA domény, z nichž každá se skládá ze 68-81 aminokyselinových zbytků. Společným substrátem ST-STK a ST-STP je histon-like protein SP-HLP, což je malý protein vázající DNA a účastnící se kontroly genové exprese, replikace DNA a uspořádání nukleoidu. Kinázovou reakcí bylo jisténo, že proteinkináza ST-STK tento substrát fosforyluje a proteinfosfatáza ST-STP defosforyluje *in vitro* (Jin a Pancholi, 2006).

6.3 *Streptococcus agalactiae*

S. agalactiae je grampozitivní oportunně patogenní bakterie, která patří mezi streptokoky skupiny B (GBS, Group B Streptococci). Byla popsána jediná eSTK - Stk1 a její kognátní fosfatáza Stp1. Proteinkináza Stk1 fosforyluje tři substráty *in vitro*, které byly identifikovány hmotnostní spektrometrií. Prvním substrátem je adenylosukcinát syntetáza PurA, enzym účastnící se syntézy AMP a důležitý pro regulaci koncentrace purinových nukleotidů a jejich biosyntézu *de novo*. Fosforylace PurA negativně reguluje aktivitu tohoto enzymu (Rajagopal *et al.*, 2005), Druhým je Mn-dependentní anorganická pyrofosfatáza PpaC. Pyrofosfatázy katalyzují hydrolýzu anorganických pyrofosfátů (PP_i) na orthofosfáty (P_i). Pyrofosfáty jsou uvolňovány během hydrolýzy ATP nebo při různých biosyntetických reakcích v metabolismu sacharidů, nukleotidů nebo aminokyselin. Analýza kmenů *S. agalactiae* postrádajících Stk1 v novorozeneckém krysím modelu sepse ukázala výrazné zmírnění virulence. PpaC je prvním příkladem solubilní bakteriální pyrofosfatázy asociované s membránou, která je fosforylována proteinkinázou (Rajagopal *et al.*, 2003). Je třeba zmínit, že PurA a PpaC byly potvrzeny jako substráty Stk1 pouze v podmínkách chudých na živiny, kde jsou bakterie nuceny plně využívat svůj biosyntetický aparát a mnoho látek syntetizují *de novo* (Rajagopal *et al.*, 2005; Rajagopal *et al.*, 2003).

Třetím substrátem Stk1 v *S. agalactiae* je transkripční aktivátor CovR v rámci TCS CovS/CovR, kde byl popsán další příklad propojení mezi eSTK a TCS (tzv. cross talk). V tomto případě se jedná o regulaci genové exprese β-hemolysinu/cytolysinu (β-H/C), která je podřízena kontrole TCS CovS/CovR i eSTK Stk1. β-H/C je cytotoxin nezbytný pro přežití GBS v krevním řečišti a pro rezistenci k oxidativnímu stresu. Kinázová reakce ukázala, že Stk1 fosforyluje transkripční aktivátor CovR *in vitro*. Fosforylací CovR proteinkinázou Stk1

dochází k pozitivní regulaci transkripce genu pro β -H/C v GBS (Rajagopal *et al.*, 2006), zatímco CovS/CovR reguluje transkripci tohoto genu negativně (Jiang *et al.*, 2005; Lamy *et al.*, 2004). Dvě rozdílné fosforylační události mohou ovlivnit vazbu CovR na promotor genu kódujícího β -H/C. Stk1 fosforyluje substrát CovR na zbytku Thr65, což zřejmě může inhibovat jeho fosforylaci na zbytku Asp i afinitu k DNA. Naopak fosforylace na zbytku Asp a vazba na DNA snižuje fosforylaci CovR na zbytku Thr (Lin *et al.*, 2009).

Vědecký tým Silvestroni *et al.* (2009) identifikoval ve dvou ze tří nezávislých pokusů, které byly prováděny s kmenem divokého typu (WT) exprimujícím Stk1 i s mutantními kmeny, 10 fosfopeptidů jako potenciální substráty Stk1. Tři z nich byly identifikovány jako FtsZ, DivIVA a protein s DivIVA doménou. Fosforylace threoninových zbytků DivIVA se objevila ve WT, ale v Stk1 deficientním kmeni nikoliv. Fosforylace proteinu s DivIVA doménou se objevila pouze v kmeni deficientním pro fosfatázu Stp1. Reverzibilní fosforylace DivIVA je důležitá pro normální segregaci buněk GBS. Potenciální substráty Stk1 FtsZ, DivIVA a protein s doménou DivIVA se samy *in vitro* nefosforylují, což naznačuje, že jejich fosforylace je závislá na proteinkináze. Fosforylace DivIVA a proteinu s DivIVA doménou se objevila v přítomnosti Stk1 *in vitro* a v případě DivIVA také *in vivo* použitím obohacení fosfopeptidu. Fosforylace FtsZ nebyla zaznamenána ani v přítomnosti Stk1, dokonce ani v její zvýšené koncentraci (Silvestroni *et al.*, 2009).

6.4 *Staphylococcus aureus*

Grampozitivní *S. aureus* je významným lidským patogenem zodpovědným za různé infekce (nozokomiální i získané mimo zdravotnická zařízení). Primárně je extracelulárním patogenem. U této bakterie byla identifikována a charakterizována pouze jediná eSTK PknB a jedna eSTP (Beltramini *et al.*, 2009).

PknB je proteinkináza s MAP-kinázovou aktivitou, neboť bylo prokázáno, že fosforyluje lidský transkripční faktor ATF-2 *in vitro*. Potenciální substráty PknB se účastní apoptózy, imunitních reakcí, transportu látek a metabolismu. PknB představuje sekretovaný protein, což otevírá možnost, že fosforyluje nejen vlastní bakteriální proteiny, ale i substráty hostitele. Je možné, že sekrece PknB bakterii pomáhá vyhnout se zničení po fagocytóze hostitelským makrofágem. To je v souladu se zjištěním, že PknB fosforyluje ATF-2 *in vitro*. Fosforylace ATF-2 má za následek expresi širokého spektra proteinů účastnících se rozličných procesů. Exprimovány jsou např. buněčné cyklické molekuly (cyklin D), molekuly podporující přilnavost buňky, růstové faktory, anti-apoptotické faktory a molekuly podporující invazi. PknB fosforyluje substráty na Ser a Thr zbytcích, což je v souladu s primární sekvencí

tohoto enzymu. Součástí sekvence PknB je také oblast bohatá na prolin, což tento enzym spojuje s evolučně dobře konzervovanou rodinou prolinových kináz jako jsou cyklin-dependentní kinázy (CDK) či mitogenem aktivované kinázy (MAPK) (Miller *et al.*, 2010).

Aktivita PknB se týká regulace důležitých buněčných procesů - nedávno byly objeveny zejména substráty PknB *in vitro* s rozličnými funkcemi v centrálním metabolismu (Donat *et al.*, 2009; Lomas-Lopez *et al.*, 2007). Bylo zjištěno, že PknB i její příbuzná proteinfosfatáza STP jsou důležité pro metabolismus buněčné stěny (Beltramini *et al.*, 2009). Jejich aktivita ovlivňuje biosyntézu buněčné stěny, buněčné dělení a rezistenci k β -laktamovým antibiotikům. Mutantní kmeny *S. aureus* postrádající PknB i zmíněnou STP vykazují značné poruchy v buněčném dělení včetně vícečetných a nedokončených sept, vyboulení a nepravidelné tvary buněk. Na rozdíl od divokého kmene (WT), mutanty pouze s delecí genu *stp* vykazují ztlustělé buněčné stěny a zvýšenou rezistenci k endopeptidáze lysostafinu. Mutantní kmeny s delecí genu *pknB* nebo genů *pknB* i *stp* vykazují zvýšenou citlivost k β -laktamovým antibiotikům (Beltramini *et al.*, 2009).

Substrátem PknB je také globální transkripční regulátor MgrA, protein příbuzný regulátoru SarA, který reguluje expresi virulenčních genů. Fosforylací MgrA v buněčných extraktech *in vitro* zaniká jeho schopnost vázat se na promotor genu *norA* kódující efluxní pumpu NorA. Zesílená exprese PknB vede ke zvýšení exprese NorA, což způsobí zvýšení rezistence k baktericidním látkám chinolonům (Truong-Bolduc *et al.*, 2008).

Samotný globální transkripční regulátor SarA je také substrátem PknB a obsahuje motiv helix-turn-helix (HTH) a vlásenkovou oblast (Liu *et al.*, 2006), kterými se váže na DNA a aktivuje transkripci různých virulenčních faktorů v závislosti na růstové fázi - např. proteinu Fnb (Fibronectin-binding) během exponenciální fáze růstu. Fosforylace SarA *in vitro* mění jeho afinitu k DNA, čímž na transkripční úrovni reguluje virulenci (Didier *et al.*, 2010).

Nedávno byla popsána další eSTK s označením SA0077. SarA je fosforylován *in vitro* proteinkinázami PknB a SA0077. Proteinkináza SA0077 fosforyluje SarA na serinovém zbytku, což vede k poklesu schopnosti substrátu SarA vázat DNA (Didier *et al.*, 2010).

6.5 Chlamydia trachomatis

Grampozitivní bakterie *C. trachomatis* je pohlavně přenosný obligátní intracelulární patogen se složitým vývojovým cyklem uvnitř hostitele. Tato bakterie interaguje se signálním systémem eukaryotické hostitelské buňky a využívá její signální dráhy k regulaci svého vlastního vývoje. *C. trachomatis* je hlavním původcem preventabilní slepoty (trachomu) u dětí. V buňce hostitele podstupuje dvoufázový vývojový cyklus. Nejdříve se vyvíjí a roste

uvnitř malého prostoru v membráně - inkluzi, kde probíhá diferenciace z infekční a metabolicky neaktivní extracelulární formy (elementárního tělíska) do neinfekční a metabolicky aktivní formy (retikulárního tělíska), která je schopna replikace (Verma a Maurelli, 2003).

Pomocí genomové sekvenace byly identifikovány dva otevřené čtecí rámce (ORFs) kódující předpokládané Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu (eSTKs) Pkn1 a PknD v *C. trachomatis* serovaru L2. Bakteriální dvouhybridní analýza ukázala, že Pkn1 interaguje s PknD a že Pkn1 interaguje s IncG, což bylo poté ověřeno kinázovou reakcí *in vitro* a v případě substrátu IncG také imunoprecipitací. Pkn1 je substrátem PknD a IncG je substrátem Pkn1. IncG je inkluzním membránovým proteinem s neznámou funkcí (Verma a Maurelli, 2003). Bylo však zjištěno, že IncG *C. trachomatis* interaguje s proteinem 14–3–3β savčích hostitelských buněk v kvasinkovém dvouhybridním systému (Scidmore *et al.*, 2001). Předpokládá se, že fosforylace proteinů *C. trachomatis* může hrát důležitou roli v interakcích s proteiny hostitelské buňky při infekci (Verma a Maurelli, 2003).

Dřívější sekvenace a následná anotace genomu *C. trachomatis* serovaru D poskytla důkaz o přítomnosti tří ORFs, které kódují potenciální eSTKs Pkn1, PknD a Pkn5, a jednoho ORF vykazujícího sekvenční podobnost s eukaryotickou proteinfosfatázou typu PP2C (Stephens *et al.*, 1998). Studie Verma a Maurelli (2003) také ověřovala, zda homolog třetího ORF v *C. trachomatis* serovaru L2 kóduje potenciální proteinkinázu Pkn5, avšak fosforylační aktivitu tohoto předpokládaného enzymu nepotvrdila. Podrobná analýza konzervované oblasti na N-konci kódující subdomény domnělé proteinkinázy Pkn5 ukázala, že chybí subdoména I (obsahuje konzervované Gly zbytky) a XI (obsahuje konzervovaný Arg zbytek), které zastávají důležité funkce při fosforylaci substrátu, což naznačuje, že Pkn5 zřejmě není funkční proteinkináza. Mohlo by se jednat o aminoglykosid 3' fosfotransferázu, enzym příbuzný eSTKs fosforylující neproteinové substráty (Verma a Maurelli, 2003).

6.6 *Bacillus subtilis*

U této grampozitivní sporulující bakterie byla popsána jediná eSTK s označením PrkC. PrkC je transmembránová proteinkináza s velkou extracelulární doménou (Madec *et al.*, 2002) obsahující tři repetice motivů PASTA (Shah *et al.*, 2008). Jedním ze substrátů PrkC je protein HPr z fosfotransferázového systému, který je fosforylován PrkC na serinovém zbytku 12 *in vitro*. Jako substráty PrkC *in vitro* byly identifikovány i některé enzymy centrálního metabolismu (Pietack *et al.*, 2010), malá ribozomová GTPáza CpgA, translační faktor GTPáza EF-Tu a protein YezB, který se uplatňuje při obecné odpovědi na stres a je pokládán za

potenciální složku stresozomu (Absalon *et al.*, 2009). Tyto tři substráty: CpgA, EF-Tu a YezB jsou defosforylovány proteinfosfatázou PrpC *in vitro*. Zatímco CpgA je nutný pro normální růst *B. subtilis*, PrkC za stejných podmínek nikoliv. Je možné, že funkce PrkC může být nahrazena jinou kinázou, nebo fosforylovaný CpgA není přímo zapojen v procesu nezbytném pro normální růst bakterie (Absalon *et al.*, 2009). CpgA je translační faktor, jehož deficience vede k abnormálním tvarům buněk a nestejně tloušťce buněčné stěny (Absalon *et al.*, 2008). Detekce fosfoproteinů z bezbuněčného extraktu kultury ve stacionární fázi růstu radioaktivně značeným fosfátem na 2D elektroforéze poskytla důkaz, že YezB je substrátem PrkC a PrpC *in vivo* (Absalon *et al.*, 2009). Elongační faktor EF-G je substrátem PrkC a PrpC *in vitro* (Gaidenko *et al.*, 2002). Bylo potvrzeno, že EF-G je substrátem PrkC také *in vivo*. Fosforylace tohoto elongačního faktoru probíhá v rostoucích buňkách v odpovědi na peptidoglykanové fragmenty (Shah a Dworkin, 2010), které se váží na extracelulární PASTA domény PrkC. Peptidoglykanové fragmenty spouští klíčení dormantních spor *B. subtilis* (Shah *et al.*, 2008). Inkubace rostoucích buněk s malými solubními fragmenty peptidoglykanu způsobuje spuštění exprese genu *yocH*, který kóduje peptidoglykanovou hydrolázu sekretovanou do extracelulárního prostoru a štěpící peptidoglykan uvolňovaný z okolních buněk. Exprese genu *yocH* závisí na přítomnosti funkční PrkC. Produkt YocH pak reguluje svou vlastní expresi prostřednictvím signální dráhy proteinkinázy PrkC (Shah a Dworkin, 2010).

U *B. subtilis* byla nedávno objevena argininová proteinkináza McsB. Jedná se o první známý případ fosforylace na argininových zbytcích u bakterie. Substrátovým proteinem tohoto enzymu je CtsR - dimerický represor genů kódujících proteiny tepelného šoku HSP (Heat Shock Proteins) (Fuhrmann *et al.*, 2009). Ten spolu s několika dalšími proteiny slouží jako hlavní transkripční regulátor kontrolující odpověď bakteriální buňky na stres vyplývající z tepelného šoku (Derré *et al.*, 1999; Krüger a Hecker, 1998; Hecker *et al.*, 1996). Na základě biochemické analýzy bylo zjištěno, že substrát CtsR je fosforylován na argininových zbytcích v DNA vazebné doméně. Tím dojde k inhibici jeho represorové funkce a genové expresi HSP proteinů (Fuhrmann *et al.*, 2009). Proteinkinázu McsB během normálních růstových podmínek blokuje chaperon ClpC. Jakmile je však buňka vystavena stresu, ClpC začne přednostně interagovat se špatně sbalenými proteiny a předpokládá se, že uvolněním proteinkinázy McsB je umožněno vytvoření komplexu McsB s CtsR, což vede k uvolnění CtsR z repetice DNA, čímž je umožněna exprese genů kódujících proteiny tepelného šoku (HSP - Heat Shock Proteins) (Kirstein *et al.*, 2005).

Sekvenční analýza ukázala, že argininová proteinkináza McsB nevykazuje žádnou výraznou podobnost se známými Ser, Thr, Tyr či His kinázami (Fuhrmann *et al.*, 2009).

Nejnovější studie vědeckého týmu Elsholz *et al.* (2012) prokázala, že fosforylace proteinů na Arg zbytcích je funkční *in vivo* a uplatňuje se v regulaci důležitých buněčných procesů jako je degradace proteinů, odpověď na stres či kompetence.

6.7 *Corynebacterium glutamicum*

Nepatogenní grampozitivní *C. glutamicum* je tyčinkovitá půdní bakterie, která se používá k průmyslové produkci některých aminokyselin včetně L-glutamátu. Zatím byly blíže popsány čtyři eSTKs - PknA, PknB, PknG a PknL.

PknA/B/L obsahují jeden transmembránový helix a jsou zřejmě membránovými enzymy. Na C-koncích extracytoplasmatické části PknB byly nalezeny čtyři a v případě PknL pět PASTA domén (Schultz *et al.*, 2009). Substráty PknA potvrzené *in vitro* představují solubilní proteinkináza PknG (Fiuza *et al.*, 2008a), FtsZ - klíčový protein buněčného dělení (Schultz *et al.*, 2009), ligáza MurC, nepostradatelná v procesu biosyntézy buněčné stěny, neboť katalyzuje navázání prvního aminokyselinového zbytku (L-alaninu) na nukleotidový prekurzor UDP-N-acetylmuramovou kyselinu (UDP-MurNAc) (Fiuza *et al.*, 2008b) a protein OdhI - inhibitor 2-oxoglutarát dehydrogenázy v metabolismu glutamátu (Barthe *et al.*, 2009).

OdhI obsahuje FHA doménu (Niebisch *et al.*, 2006) a je substrátem PknA a PknB *in vitro* (Fiuza *et al.*, 2008a), PknG *in vitro* (Fiuza *et al.*, 2008a) a také *in vivo* (Schultz *et al.*, 2009; Schultz *et al.*, 2007). Aby mohla PknG fosforylovat substrát OdhI, vyžaduje napřed fosforylaci proteinkinázou PknA. U homologu PknG v *M. tuberculosis* toto neplatí (Fiuza *et al.*, 2008a). OdhI je fosforylován na nejméně dvou místech *in vivo* včetně Thr zbytku. Kromě PknG může k fosforylaci OdhI *in vivo* přispívat také jedna či několik zbývajících proteinkináz PknA, PknB či PknL. Defosforylace OdhI je katalyzována proteinfosfatázou Ppp typu PP2C *in vitro* (Schultz *et al.*, 2009). Nefosforylovaný OdhI se váže na E1 podjednotku OdhA komplexu 2-oxoglutarát dehydrogenázy, klíčového enzymu Krebsova cyklu, a inhibuje jeho aktivitu. Fosforylaci OdhI proteinkinázou PknG se tato inhibiční schopnost ruší (Schultz *et al.*, 2007; Niebisch *et al.*, 2006). Delece genu *odhI* v mutantě s delecí *pknG* má za následek potlačení růstového defektu na médiu s glutaminem (Schultz *et al.*, 2009).

FtsZ je substrátem PknA/B/L *in vitro* a fosfatázy Ppp *in vivo* (Schultz *et al.*, 2009). Snížená exprese *ftsZ* způsobuje abnormální tvar buněk (Ramos *et al.*, 2005).

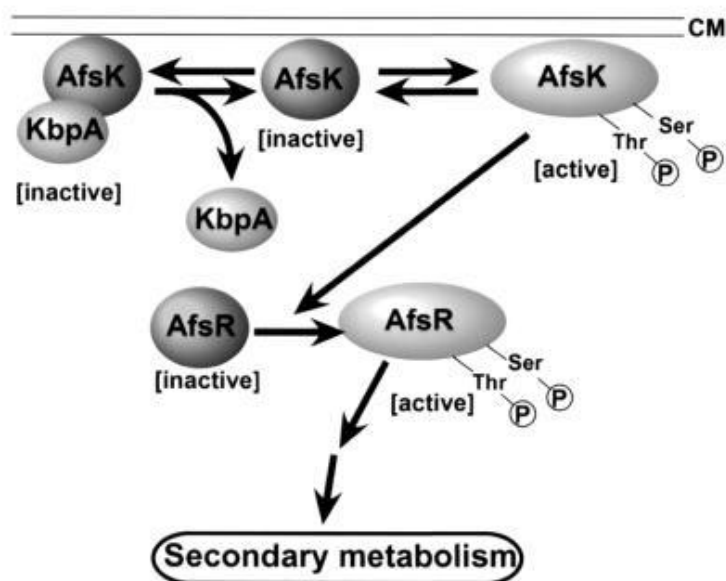
Částečná deficiencie PknA nebo PknB se projevuje prodloužením buněk, což naznačuje poruchu v buněčném dělení. Zvýšená exprese genů *pknA* či *pknB* má za následek nedostatečný růst buněčných pólů, čímž u *C. glutamicum* vznikají atypické buňky kulovitého tvaru. Geny *pknA* a *pknB* jsou tedy nezbytné pro udržování normálního tvaru buněk. Mutace

genu *pknL*, nebo *pknG* má za následek životaschopné mutanty vykazující normální tvar buněk i růstovou rychlost (Fiuza *et al.*, 2008a). Na základě experimentů s delečními mutanty bylo zjištěno, že všechny čtyři eSTKs této bakterie jsou pro životaschopnost buněk postradatelné (Schultz *et al.*, 2009).

6.8 *Streptomyces coelicolor*

S. coelicolor je půdní vláknitá grampozitivní bakterie se složitým životním cyklem zahrnujícím morfologickou a fyziologickou diferenciaci. Patří mezi *Aktinomycety*. Při nedostatku živin zahájí diferenciaci, vytváří vzdušné mycelium a produkuje sekundární metabolity, z nichž mnohé účinkují jako antibiotika. Tato bakterie obsahuje 31 genů kódujících potenciální eSTKs (Pérez *et al.*, 2008). Charakterizována byla proteinkináza AfsK, která je asociovaná s cytoplasmatickou membránou (Matsumoto *et al.*, 1994).

Substrátem AfsK je globální regulační protein AfsR. Fosforylace AfsR proteinkinázou AfsK byla potvrzena kinázovou reakcí *in vitro* (Matsumoto *et al.*, 1994). Fosforylací proteinu AfsR se zvýší afinita jeho DNA vazebné domény pro regulační oblasti genu *afsS*. AfsR pozitivně reguluje transkripci *afsS*, jehož produktem je transkripční aktivátor AfsS regulující sekundární metabolismus *S. coelicolor* (Sawai *et al.*, 2004). Bylo také zjištěno, že protein AfsR je během růstu bakterie fosforylován i dalšími eSTK, které byly označeny PkaG a AfsL (Sawai *et al.*, 2004). V proteinu AfsR byla identifikována ATP-vazebná doména a DNA vazebná doména. DNA vazebná doména by mohla aktivovat transkripci genů kódujících syntézu pigmentů. U mutantů v genu *afsR* není ovlivněna sporulace (Horinouchi *et al.*, 1990).



Obr. 6: Předpokládané modelové schéma znázorňující inhibici autofosforylace proteinkinázy AfsK proteinem KbpA v *S. coelicolor*. CM - cytoplasmatická membrána; AfsR - substrátový protein proteinkinázy AfsK. Převzato z (Umeyama a Horinouchi, 2001).

Narušení genu *afsK* má za následek významnou, avšak nikoli úplnou ztrátu produkce antibiotika aktinorhodinu (Sawai *et al.*, 2004). Přenos signálu v odpovědi na nutriční podmínky v systému AfsK/AfsR v *S. coelicolor* je zahrnut v regulaci sekundárního metabolismu na rozdíl od *S. griseus*, kde se účastní tvarové diferenciacce (Umeyama *et al.*, 1999). Bylo zjištěno, že s proteinkinázou AfsK interaguje protein KbpA, jehož kódující sekvence se nachází proti směru transkripce genu *afsK*. KbpA se váže na N-konec nefosforylované formy AfsK obsahující katalytickou doménu, zamezuje její autofosforylační aktivitě a inhibuje fosforylaci substrátu AfsR *in vitro* (viz Obr. 6). Transkripce genu *kbpA* probíhá během růstu a je zesílena, jakmile začne produkce aktinorhodinu a utváření vzdušného mycelia. KbpA účinkuje jako inhibitor negativní zpětné vazby v regulačním systému AfsK/AfsR a potlačuje produkci aktinorhodinu v *S. coelicolor*. Delecí genu *kbpA* se zvýší koncentrace fosforylované formy AfsR, která způsobí výrazné zvýšení produkce sekundárních metabolitů aktinorhodinu a undecylprodigiosinu, zatímco zvýšená exprese genu *kbpA* vede ke snížení jejich produkce (Umeyama a Horinouchi, 2001).

6.9 *Mycobacterium tuberculosis*

Tato grampozitivní patogenní bakterie je původcem infekčního onemocnění tuberkulózy. U této bakterie byl charakterizován nejvyšší počet eSTKs. Sekvenováním genomu byly identifikovány geny kódující 11 potenciálních eSTKs - PknA/B/D/E/F/G/H/I/J/K/L, jednu Ser/Thr fosfatázu PstP a dvě Tyr fosfatázy PtpA a PtpB. Kromě dvou solubilních kináz (PknG a PknK) představují všechny zmíněné eSTKs předpokládané transmembránové kinázy přijímající signály z vnějšího prostředí (Cole *et al.*, 1998). Nejlépe charakterizovaná je proteinkináza PknB (bližší popis viz kapitola 2.4), jejíž extracelulární část se skládá ze čtyř kopií PASTA domén (Barthe *et al.*, 2010), které byly nalezeny u různých grampozitivních bakterií. Významným substrátem PknA je protein FtsZ, což bylo potvrzeno kinázovou reakcí *in vitro* a následnou analýzou hmotnostní spektrometrie. FtsZ je důležitý při buněčném dělení, kdy polymeruje a zahajuje vznik Z prstence ve střední části buňky, čímž iniciuje vznik septa. Fosforylovaný FtsZ vykazuje téměř nulovou GTPázovou aktivitu a výrazně sníženou schopnost polymerovat (Thakur a Chakraborti, 2006). Substrátem PknA je také protein FipA obsahující FHA doménu. Fosforylace a interakce FipA a FtsZ je nezbytná pro buněčné dělení při sestavování divizomu v podmínkách oxidativního stresu. Imunoprecipitační reakce potvrdila, že FHA doména FipA je nutná pro interakci s PknA (Sureka *et al.*, 2010). Substrátem PknA je také ligáza MurD uplatňující se v biosyntéze peptidoglykanu, kde katalyzuje vazbu D-glutamátu k nukleotidovému prekurzoru UDP-N-

acetylmuramoyl-L-alaninu (Thakur a Chakraborti, 2008). Další významný substrát PknA i PknB je bifunkční enzym GlmU důležitý pro biosyntézu buněčné stěny a katalyzující poslední dva kroky syntézy UDP-GlcNAc (bližší popis viz kapitola 6.1 a Obr. 5). Kinázová reakce *in vitro* ukázala, že PknB fosforyluje GlmU na variabilní C-koncové doméně v oblasti 414-439, kde je jediným přístupným zbytkem pro fosforylaci Thr425. Biochemická analýza ukázala, že tato doména je důležitá pro regulaci acetyltransferázové aktivity GlmU. Fosforylace GlmU proteinkinázou PknB neovlivňuje uridyltransferázovou aktivitu (ta je závislá na produktu acetyltransferázové reakce), avšak acetyltransferázovou aktivitu mění výrazně. PknB tímto způsobem nepřímo reguluje uridyltransferázovou aktivitu GlmU, která je rovněž regulována dostupností substrátu (Parikh *et al.*, 2009).

Geny *pknA* a *pknB* leží na stejném operonu nedaleko počátku replikace. V tomto operonu se také nachází gen *pstP* kódující proteinfosfátázu defosforylující PknB a dále dva významné geny: *rodA*, jehož produkt hraje roli v syntéze peptidoglykanu, a *pbpA* důležitý pro kontrolu tvaru buňky. Geny *pknA* a *pknB* jsou exprimovány především během exponenciální fáze růstu. Výrazná nadprodukce těchto genů vede ke zpomalení růstu a tvarovým změnám buněk. Při jejich mírném nedostatku vznikají úzké prodloužené buňky. U PknA a PknB byly identifikovány tři substráty *in vivo* - Wag31, ortolog klíčového proteinu buněčného dělení DivIVA *B. subtilis*, konzervovaný hypotetický protein Rv1422 s neznámou funkcí a samotná PknB. Všechny tři substráty byly potvrzeny *in vitro* a výsledky naznačují, že se PknB a PknA fosforylují navzájem (Kang *et al.*, 2005).

Nezanedbatelná část substrátů identifikovaných u popsaných proteinkináz v *M. tuberculosis* hraje roli v biosyntéze kyseliny mykolové (Pereira *et al.*, 2011). Např. PknD fosforyluje substrátový protein FabH účastníci se biosyntetické dráhy kyseliny mykolové, která je složkou buněčné stěny. Fosforylace inhibuje enzymatickou aktivitu FabH *in vitro* (Veyron-Churlet *et al.*, 2009).

Potenciálním společným substrátem čtyř proteinkináz PknA/B/H/J je transkripční aktivátor s ATPázovou aktivitou EmbR (Jang *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2006; Molle *et al.*, 2003). EmbR reguluje transkripci operonu *embCAB* kódujícího enzymy buněčné stěny arabinosyltransferázy, čímž také dochází k regulaci biosyntézu arabinanu. Arabinan je jedna ze složek arabinogalaktanu, klíčové molekuly v mykobakteriálních buněčných stěnách. Proteinfosfátáza Mstp defosforyluje EmbR, přičemž dochází nejen ke snížení ATPázové aktivity, ale i ke snížení afinity k eSTKs a DNA. Tyto účinky jsou opačné než při působení eSTKs. Fosforylace EmbR ovlivňuje poměr lipoarabinomananu/lipomananu v buněčné stěně, což je důležité pro virulenci a rezistenci *M. tuberculosis* k antibiotiku ethambutolu (Sharma

et al., 2006). EmbR obsahuje doménu FHA, která rozpoznává fosfoprotein a tedy autofosforylovanou proteinkinázu. Bylo prokázáno, že FHA doména hraje zásadní roli při interakci EmbR s PknH (Molle *et al.*, 2003).

Potenciálním společným substrátem proteinkináz PknB/D/E/F (Villarino *et al.*, 2005) a PknG (O'Hare *et al.*, 2008) je protein GarA rovněž obsahující doménu FHA (Villarino *et al.*, 2005). GarA je potenciální regulační protein degradace glykogenu během růstu buněk. Interakce mezi aktivační smyčkou PknB a C-koncovou FHA doménou GarA jsou nezbytné k fosforylaci substrátu na jediném Thr zbytku u N-konce. Aminokyselinová sekvence genu *garA* je mezi mykobakteriemi velmi dobře konzervovaná (Villarino *et al.*, 2005). Autofosforylace PknG podporuje vazbu GarA, což bylo potvrzeno nejen *in vitro*, ale také *in vivo*. Nefosforylovaný GarA inhibuje α -ketoglutarát dekarboxylázu v Krebsově cyklu (O'Hare *et al.*, 2008). PknG sestává z kinázové katalytické domény obklopené po stranách velkou N- a C-koncovou doménou neznámé funkce. Na rozdíl od většiny mykobakteriálních eSTKs neobsahuje transmembránovou doménu a předpokládá se, že se nachází výhradně v cytoplasmě. PknG *M. tuberculosis* je sekretována do hostitelských buněk (Walburger *et al.*, 2004) podobně jako YpkA u *Yersinia* (Juris *et al.*, 2000). Jakmile se *M. tuberculosis* ocitne uvnitř makrofága, PknG je vylučována do fagozomu a její aktivita blokuje splnutí fagozomu s lysozomem, aby podpořila přežití bakterie. Inaktivace PknG mutací genu *pknG* nebo přímo chemickou inhibicí má za následek transport bakterie do lysozomu a její buněčnou smrt (Walburger *et al.*, 2004).

Za zmínku stojí tzv. cross talk také u *M. tuberculosis*, kde je transkripční aktivátor DosR fosforylován nejen histidinovou kinázou DosS v rámci TCS DosS/DosR, ale i proteinkinázou PknH *in vitro*, což bylo prokázáno pomocí biochemické analýzy, protein-proteinových interakcí a hmotnostní spektrometrie (Chao *et al.*, 2010). PknH fosforyluje také penicilin vázající protein DacB1, který neobsahuje FHA doménu, *in vitro* (Zheng *et al.*, 2007).

Potenciálním substrátem PknL je protein Rv2175c obsahující motiv helix-turn-helix (HTH) typický pro DNA vazebné proteiny. Fosforylace proteinkinázou PknL na Thr zbytku N-koncové domény Rv2175c negativně reguluje vazbu na DNA (Cohen-Gonsaud *et al.*, 2009).

U *M. tuberculosis* bylo identifikováno mnoho dalších substrátů zmíněných eSTKs, rozsah této práce je však omezený a nemůže ani zdaleka obsáhnout dosavadní poznatky.

6.10 Myxococcus xanthus

Gramnegativní bakterie *Myxococcus xanthus* se stala prvním prokaryotickým zástupcem, u kterého byla poprvé objevena eSTK, která nese označení Pkn1 a kontroluje

normální průběh vývoje *M. xanthus* (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991). Tato půdní bakterie je pozoruhodná svým složitým životním cyklem. Buňky *M. xanthus*, které registrují nedostatek živin v okolním prostředí vykazují zajímavé chování, když se shluknou a vytvoří mnohobuněčné plodničky. Uvnitř těchto plodniček část tyčinkovitých buněk diferencuje v kulovité myxospory. V genomu této bakterie bylo odhaleno přibližně 100 genů kódujících potenciální eSTKs (Nariya a Inouye, 2003), avšak podrobněji byly charakterizovány pouze některé z nich. Substrátové proteiny se zatím podařilo identifikovat jen u několika proteinkináz.

Kinázová doména většiny eSTKs myxobakterií se vyskytuje na N-konci. Mnoho eSTKs myxobakterií obsahuje variabilní přídavnou doménu neznámé funkce na C-konci. Je možné, že reguluje kinázovou aktivitu nebo přijímá signály z vnějšího prostředí (Pérez *et al.*, 2008). Kmen s delecí genu *pkn5* vytváří plodničky mnohem rychleji než divoký kmen (WT), zatímco kmen s delecí *pkn6* se vyvíjí pomaleji než WT. To ukazuje, že Pkn5 a Pkn6 regulují vývoj buněk a diferenciaci spor opačným způsobem (Zhang *et al.*, 1996).

Expresce transkripčního aktivátoru MrpC je regulována nejen eSTK Pkn14, ale i TCS MrpA/B (Nariya a Inouye, 2005; Sun a Shi, 2001). MrpC je substrátem cytoplasmatické proteinkinázy Pkn14, která je fosforylována transmembránovou proteinkinázou Pkn8. Tyto proteinkinázy vytvářejí fosforylační kaskádu. Fosforylaci MrpC proteinkinázou Pkn14 odhalila kvasinková dvouhybridní analýza. Modifikací MrpC během vegetativního růstu dochází k negativní regulaci exprese genu *mrpC* (Nariya a Inouye, 2005). Studie Sun a Shi (2001) přinesla identifikaci tří proteinů nezbytných pro vývojový proces *M. xanthus*, který se spouští v období přetrvávajícího nedostatku živin. Prvním je potenciální sensorová histidinová kináza MrpA, druhým MrpB - transkripční aktivátor v rámci TCS, který aktivuje expresi genu *mrpC* kódujícího třetí z identifikovaných proteinů MrpC, který obsahuje receptory pro cAMP. Geny *mrpA*, *mrpB* a *mrpC* leží ve stejném lokusu. Nemodifikovaný MrpC pozitivně reguluje svou vlastní genovou expresi (Sun a Shi, 2001) a také expresi genu *fruA*, jehož produktem je hlavní transkripční aktivátor FruA, nezbytný pro vytváření plodniček a spor v nepříznivém období (Ueki a Inouye, 2003).

Proteinkináza Pkn4 je usazená v membráně a fosforyluje substrát fosfofruktokinázu (PFK) *in vitro* na Thr zbytku. Gen *pkn4* se nachází ve stejném operonu jako gen *pfk*. PFK je klíčovým regulačním proteinem glykolýzy, kde za přítomnosti ATP katalyzuje fosforylaci fruktóza-6-fosfátu za vzniku fruktóza-1,6-bisfosfát, a to nejen u prokaryot, ale i u eukaryot. Modifikace PFK *M. xanthus* má za následek výrazné zvýšení aktivity tohoto enzymu (Nariya a Inouye, 2002).

U transmembránové proteinkinázy Pkn2 s C-koncovou extracytoplasmatickou doménou byly odhaleny dva substráty *in vitro*. Prvním je β -laktamáza, enzym štěpící β -laktamový kruh penicilinových antibiotik a podílející se na rezistenci k těmto léčivům. Pkn2 fosforyluje β -laktamázu na několika Thr zbytcích. Modifikovaná β -laktamáza přestane být sekretována do periplasmatického prostoru a hromadí se v cytoplasmě a membráně. Mutace v genu *pkn2* nemá žádný vliv na vegetativní růst, ale snižuje množství myxospór o 30-50 %. Druhý substrát představuje HU α - histon-like protein vázající DNA. Pkn2 fosforyluje HU α na jediném Thr zbytku *in vitro*. Fosforylovaný HU α není schopen vázat DNA (Udo *et al.*, 2000). V modelové bakterii *E. coli* vytváří HU α s HU β heterodimer *in vivo* a ovlivňuje genovou expresi (Lewis *et al.*, 1999).

6.11 *Pseudomonas aeruginosa*

Tato gramnegativní bakterie je oportunním lidským patogenem schopným vytvářet biofilmy na povrchu sliznic. Při interakci s hostitelem používá sekreční systém typu VI (T6SS). Charakterizována byla transmembránová eSTK PpkA, která fosforyluje protein Fha1 *in vitro* v přítomnosti kofaktoru Mn²⁺. Opačně působí eSTP PppA, která v buňce udržuje zásobu nefosforylovaného Fha1. PpkA a PppA regulují sekreci proteinů v rámci T6SS.

Protein Fha1 obsahuje FHA (Forkhead-associated) doménu na N-konci a C-koncovou doménu neznámé funkce s vysokým obsahem prolinu (Mougous *et al.*, 2007). FHA doména se skládá ze 65-100 aminokyselin a váže fosforylované peptidy v protein-proteinových interakcích *in vitro*. Byla nalezena u prokaryot i eukaryot (Durocher *et al.*, 1999). Funkce ostatních sekvenčních motivů Fha1 není známa. Modifikovaný Fha1 je nutný pro sekreci hypotetického proteinu Hcp1. Geny kódující PpkA, PppA a Fha1 se nacházejí na genomovém ostrově I pro sekreci Hcp. PpkA na C-konci obsahuje periplasmatický segment s von Willebrandovou A doménou (VWA) (Mougous *et al.*, 2007). Sekreční systém je spouštěn dosud neznámým signálem, který způsobí dimerizaci VWA. PpkA se následně autofosforyluje, což způsobí interakci s Fha1. Fosforylovaný Fha1 aktivuje neznámým mechanismem sekreci Hcp1 poháněnou proteinem ClpV1 (protein podporující sekreci typu VI). Bylo potvrzeno, že PpkA a PppA fosforylují a defosforylují Fha1 *in vitro* (Mougous *et al.*, 2007). Dimerizace extracelulárních domén PpkA může podporovat aktivaci sekrečního systému. Mutanty bez schopnosti autofosforylace PpkA nemohou ani fosforylovat Fha1, ani aktivovat sekreční systém. Aktivitu kinázy podporuje protein TagR, složka postranlační regulační dráhy sekrece typu VI (Hsu *et al.*, 2009).

U této bakterie byla blíže popsána také eSTK Stk1, která je kódována genem *stk1* ležícím ve stejném operonu s genem *stp1* pro eSTP Stp1, která se podobá eukaryotickému typu PP2C. Bylo prokázáno, že Stk1 fosforyluje eukaryotický histonový protein H1 *in vitro* (Mukhopadhyay *et al.*, 1999). H1 vykazuje výraznou podobnost v sekvenci aminokyselin s proteinem AlgR3, který se podílí na regulaci produkce alginátu, exopolysacharidu obsaženého v pouzdře virulentní formy *P. aeruginosa* (Kato *et al.*, 1990). Pouzdro s alginátem bakterii chrání před fagocytózou hostitelskými makrofágy (Leid *et al.*, 2005). Tato fakta naznačují, že Stp1 hraje roli ve virulenci, avšak pro bližší pochopení funkce této proteinkinázy bude zapotřebí dalších studií.

6.12 *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*)

Některé bakterie rodu *Yersinia* patří mezi lidské patogeny, které mohou způsobit různá onemocnění včetně dýmějového moru. *Yersinia* a mnohé další patogenní grampozitivní bakterie používají sekreční systém typu III (T3SS) za účelem přesunu efektorových proteinů do hostitelské buňky. Mutanty postrádající funkční T3SS nejsou schopné způsobit akutní onemocnění u myši (Houppert *et al.*, 2012).

Efaktorové proteiny se nazývají Yops (*Yersinia* outer proteins) a zahrnují YopE, YopH, YopJ, YopT, YopM a YpkA. Ve virulenční *Yersinii* jsou tyto proteiny kódovány 70 kb plasmidem (Galyov *et al.*, 1993). YopH je homologem Tyr proteinfosfátáz eukaryot. Defosforylační aktivita tohoto enzymu uvnitř makrofága přispívá ke ztrátě jeho schopnosti fagocytovat *Yersinii* (Guan a Dixon, 1990). YpkA (*Yersinia* protein kinase A, někdy označována YopO) patří vzhledem ke své sekvenční podobnosti se savčími Ser/Thr kinázami mezi eSTK a představuje první popsanou bakteriální proteinkinázu hrající roli ve virulenci (Galyov *et al.*, 1993). YpkA je nejprve produkována ve formě neaktivního enzymu. K aktivaci dochází po translokaci do hostitelské buňky, kde je aktivována vazbou na aktin. Při expresi proteinkinázy YpkA v kultivovaných epiteliálních buňkách dochází k úplnému rozrušení aktinového cytoskeletu. Tato vlastnost vede k inhibici funkce makrofágů včetně fagocytózy, čímž se *Yersinia* brání imunitnímu systému (Juris *et al.*, 2000). YpkA je pro virulenci *Yersinie* nepostradatelná, neboť narušení její katalytické domény má za následek ztrátu virulence (Galyov *et al.*, 1993). *Yersinia* postrádající C-konec YpkA není virulentní a dokonce i delece 20 posledních aminokyselin na C-konci způsobuje úplnou ztrátu kinázové aktivity (Juris *et al.*, 2000).

Tyto poznatky ukazují, že přítomnost těchto 20 aminokyselin je zcela nezbytná nejen pro aktivitu YpkA, ale i pro vazbu aktinu, která je touto sekvencí zprostředkována. Sekvenční

analýza odhalila, že C-konec YpkA vykazuje výraznou sekvenční podobnost s C-koncem eukaryotického proteinu coroninu vázajícího aktinová vlákna cytoskeletu. C-konec coroninu utváří amfipatický helix, který se podobá předpokládané sekundární struktuře posledních 20 aminokyselin YpkA a je tedy pravděpodobné, že se YpkA váže na stejná místa aktinu jako coronin (Juris *et al.*, 2000).

Pokud je kináza YpkA aktivní a není narušen její C-konec, má v podmínkách *in vivo* celkový vliv na aktinový cytoskelet. Jelikož aktin hraje klíčovou roli v mechanismech nespecifické imunity jako je fagocytóza a chemotaxe, předpokládá se, že rozrušení aktinového cytoskeletu kinázou YpkA slouží k inhibici těchto procesů a zajištění přežití *Yersinia* uvnitř hostitele. Za zmínku stojí, že aktin je aktivátorem a zároveň substrátem YpkA *in vitro* (Juris *et al.*, 2000).

Kromě aktinu byly popsány další dva substráty YpkA - otubain 1 (Juris *et al.*, 2006) a Gaq (Navarro *et al.*, 2007). Otubain 1 je proteáza patřící do rodiny cysteinových proteáz, která funguje jako enzym degradující ubiquitin v lidských buňkách. Účastní se také zprostředkování lymfocytární antigenové odpovědi. Přesná molekulární funkce tohoto enzymu nebyla dosud zcela objasněna (Edelmann *et al.*, 2009). Juris *et al.* (2006) prokázal, že proteinkináza YpkA fosforyluje Otubain 1 *in vitro*. Dále bylo zjištěno, že otubain 1 interaguje s YpkA a aktinem *in vivo*. Další substrát proteinkinázy YpkA představuje protein Gaq - podjednotka heterotrimerního G proteinu. YpkA inhibuje mnohé Gaq-dependentní signální dráhy fosforylací klíčového aminokyselinového zbytku Ser47. Tento zbytek se nachází v konzervované smyčce pro vazbu pyrofosfátu na α -podjednotce s GTPázovou aktivitou. Modifikací α -podjednotky dochází k inhibici její GTPázové aktivity *in vitro* (Navarro *et al.*, 2007).

6.13 *Mycoplasma pneumoniae*

Pleomorfní bakterie *M. pneumoniae* je extracelulární patogen patřící do třídy *Mollicutes*. Vzhledem k absenci buněčné stěny jsou tyto bakterie nepostižitelné β -laktamovými antibiotiky inhibujícími biosyntézu buněčné stěny. *M. pneumoniae* způsobuje atypickou pneumonii a mimoplicní infekce jako je astma nebo artritida.

U této bakterie byla identifikována jediná eSTK s označením PrkC, která neobsahuje žádnou PASTA doménu. Pomocí detekce fosfoproteinů bylo zjištěno, že PrkC fosforyluje čtyři substráty - proteiny HMW1 a HMW3 podporující přilnavost buňky k povrchům (např. epitelu hostitele), hlavní adhesin P1 a povrchový protein MPN474. Tyto substráty však nebyly detekovány v bezbuněčných extraktech mutantního kmene v genu *prkC*. Zvýšená míra

fosforylace substrátů proteinkinázy PrpC byla zaznamenána v mutantním kmeni pro gen *prpC* kódující proteinfosfatázu PrpC, která tyto substráty defosforyluje (Schmidl *et al.*, 2010). V dřívější studii bylo pomocí biochemických a imunologických technik a následné analýzy fosfoaminokyselin zjištěno, že proteiny HMW1 a HMW2 jsou fosforylovány na Ser a Thr zbytcích (Dirksen *et al.*, 1994).

Analýza mutantního kmene *M. pneumoniae* v genu *prkC* dále odhalila, že přítomnost proteinkinázy PrkC je nutná pro přilnavý růst bakteriálních buněk na pevném povrchu a cytotoxicitu k eukaryotickým buňkám. Fosforylace proteinkinázou PrkC je zásadní pro stabilizaci vysokomolekulárních proteinů, které jsou důležité pro přilnavost buňky k povrchům. Jedná se o první popsany případ, kdy fosforylace zvyšuje stabilitu proteinů. Proteiny podporující přilnavost vykazují vzájemnou závislost. HMW1 je nezbytný pro stabilizaci HMW2 a P1. Naopak HMW2 je nutný pro stabilizaci HMW3 a povrchového proteinu P65 (Schmidl *et al.*, 2010).

Analýza genomu *M. pneumoniae* ukázala přítomnost dvou genů kódujících Ser/Thr kinázy - *hprK* (HPr kináza) a *prkC* (eSTK PrkC). Je známo, že HPr kináza fosforyluje pouze jeden substrát - HPr protein fosfotransferázového systému. U PrkC v *M. pneumoniae*, jejíž homology se vyskytují v některých grampozitivních bakteriích, se však předpokládá fosforylace celé řady substrátů (Schmidl *et al.*, 2010).

7. Závěr

Od identifikování první bakteriální proteinkinázy eukaryotického typu uplynulo již více než 20 let. Přestože byly za hlavní fosforylační systémy prokaryot dlouho považovány dvoukomponentové systémy (TCS) a přítomnost Ser/Thr a Tyr proteinkináz byla připisována pouze eukaryotům, díky poznatkům vyplývajícím z dosavadních výzkumů je známo, že eSTKs i Tyr proteinkinázy eukaryotického typu hrají v bakteriální signalizaci významnou roli. Tyto fosforylační enzymy byly objeveny u mnoha různých bakteriálních organismů. Analýzy genomů několika archebakterií odhalily přítomnost proteinkináz i v doméně *Archea*, přičemž tyrosinová fosforylace byla v této doméně zaznamenána rovněž. Nedávno byla popsána argininová proteinkináza McsB u bakterie *B. subtilis*, první svého druhu u prokaryot. Zda se argininové proteinkinázy vyskytují u jiných bakteriálních druhů nebylo zatím zjištěno. McsB by se mohla stát prvním členem nové rodiny bakteriálních proteinkináz.

Většina prokaryotických proteinkináz byla identifikována jen pomocí sekvenování genomu. Pouze u omezeného počtu ze všech předpokládaných eSTKs z různých bakteriálních organismů se podařilo identifikovat substrátové proteiny. Tyto substráty představují široké

spektrum rozličných proteinů účastnících se celé řady buněčných procesů jako je buněčné dělení, centrální a sekundární metabolismus, diferenciace, virulence aj. Za zmínku stojí také skutečnost, že substrátem může být i cizorodý protein, který není součástí bakteriální buňky, jako v případě proteinkinázy YpkA některých patogenních bakterií rodu *Yersinia*. V posledních letech bylo popsáno i několik propojení mezi eSTKs a TCS, označované jako tzv. cross talk. Velké množství předpokládaných proteinkináz i jejich substrátů však představují jen hypotetické proteiny.

Charakterizaci proteinkináz a identifikaci jejich specifických substrátů však znesnadňuje substrátová promiskuita proteinkináz, kdy jedna kináza může fosforylovat více různých substrátů, a také proteinkinázová funkční redundance, kdy jedna kináza může funkčně zastoupit jinou kinázu. Dále je třeba poznamenat, že většina identifikací specifických substrátů byla provedena v podmínkách *in vitro* a postrádá potvrzení *in vivo*. Pokročilé technologie na poli fosfoproteomiky by mohly potvrzení *in vivo* usnadnit a umožnit identifikaci dalších proteinových substrátů. To by výrazně pomohlo k rekonstrukci interakcí mezi proteinkinázami, proteinfosfatázami a jejich substráty. Poskládání střípků signálních drah umožní hlubší porozumění bakteriální signalizaci a fyziologii.

Multirezistence některých bakterií k současným antibiotikům představuje v současnosti závažný problém. Výsledky výzkumů proteinkináz mohou pomoci při vývoji alternativních bakteriostatik. Inhibitory v podobě malých specifických molekul, které by vyřadily z funkce eSTKs fosforylující např. substráty, které se účastní buněčného dělení nebo biosyntézy buněčné stěny, by mohly přinést nové možnosti v léčbě bakteriálních infekcí. Nevýhoda eSTKs by však mohla spočívat v podobnosti katalytických domén s jejich eukaryotickými protějšky, neboť existuje možnost, že by inhibitory mohly blokovat aktivitu eukaryotických eSTKs v buňkách hostitele. Dalším potenciálním cílem pro nová léčiva by mohly být přídavné PASTA domény nalezené u eSTKs grampozitivních bakterií. Výhodou by bylo extracelulární umístění těchto domén a jejich absence u eukaryot. Jako příklad lze uvést PknB bakterie *M. tuberculosis* a její homology, které se zřejmě vyskytují u většiny grampozitivních bakterií. Další alternativou pro cíl nových léčiv by se mohly stát BY-kinázy, jejichž výhodou je odlišnost molekulární struktury katalytického místa od tyrosinových kináz eukaryot.

8. Seznam použité literatury

- Absalon, C., Hamze, K., Blanot, D., Frehel, C., Carballido-Lopez, R., Holland, B.I., van Heijenoort, J., Séror, S.J. (2008) The GTPase CpgA is implicated in the deposition of the peptidoglycan sacculus in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 190(10), 3786–3790.
- Absalon, C., Obuchowski, M., Madec, E., Delattre, D., Holland, I.B., Séror, S.J. (2009) CpgA, EF-Tu and the stressosome protein YezB are substrates of the Ser/Thr kinase/phosphatase couple, PrkC/PrpC, in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 155(Pt 3), 932–943.
- Barthe, P., Roumestand, C., Canova, M.J., Kremer, L., Hurard, C., Molle, V., Cohen-Gonsaud, M. (2009) Dynamic and structural characterization of a bacterial FHA protein reveals a new autoinhibition mechanism. *Structure* 17, 568–578.
- Barthe, P., Mukamolova, G.V., Roumestand, C., Cohen-Gonsaud, M. (2010) The structure of PknB extracellular PASTA domain from *Mycobacterium tuberculosis* suggests a ligand-dependent kinase activation. *Structure* 18(5), 606–615.
- Beltramini, A.M., Mukhopadhyay, C.D., Pancholi, V. (2009) Modulation of cell wall structure and antimicrobial susceptibility by a *Staphylococcus aureus* eukaryote like serine/threonine kinase and phosphatase. *Infect. Immun.* 77(4), 1406–1416.
- Bramley, H.F., and Kornberg, H.L. (1987) Sequence homologies between proteins of bacterial phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase systems: identification of possible phosphate-carrying histidine residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(14), 4777–4780.
- Burnett, G., and Kennedy, E.P. (1954) The enzymatic phosphorylation of proteins. *J. Biol. Chem.* 211(2), 969–980.
- Cohen-Gonsaud, M., Barthe P., Canova M.J., Stagier-Simon, C., Kremer, L., Roumestand, C., Molle, V. (2009) The *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thrkinase substrate Rv2175c is a DNA-binding protein regulated by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 284(29), 19290–19300.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E. 3rd, Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S., Barrell, B.G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393(6685), 537–544.
- De Verdier, C. H. (1952) Isolation of phosphothreonine from bovine casein. *Nature* 170, 804–805.
- Dessen A., Mouz, N., Gordon, E., Hopkins, J., Dideberg, O. (2001) Crystal structure of PBP2x from a highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate: a mosaic framework containing 83 mutations. *J. Biol. Chem.* 276, 45106–45112.
- Derré, I., Rapoport, G., Msadek, T. (1999) CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 31, 117–131.
- Deutscher, J., and Saier, M.H. Jr. (1983) ATP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80(22), 6790–6794.
- Dey, M., Cao, C., Dar, A.C., Tamura, T., Ozato, K., Sicheri, F., Dever, T.E. (2005) Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2 α substrate recognition. *Cell* 122(6), 901–913.
- Didier, J.P., Cozzone, A.J., and Duclos, B. (2010) Phosphorylation of the virulence regulator SarA modulates its ability to bind DNA in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 306(1), 30–36.
- Dirksen, L.B., Krebes, K.A., Krause, D.C. (1994) Phosphorylation of cytoadherence-accessory proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 176(24), 7499–7505.
- Donat, S., Streker, K., Schirmeister, T., Rakette, S., Stehle, T., Liebeke, M., Lalk, M., Ohlsen, K. (2009) Transcriptome and functional analysis of the eukaryotic-type serine/threonine kinase PknB in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 191(13), 4056–4069.
- Durocher, D., Henckel, J., Fersht, A.R., Jackson, S.P. (1999) The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Mol. Cell.* 4(3), 387–394.
- Edelmann, M.J., Iphöfer, A., Akutsu, M., Altun, M., di Gleria, K., Kramer, H.B., Fiebiger, E., Dhe-Paganon, S., Kessler, B.M. (2009) Structural basis and specificity of human otubain 1-mediated deubiquitination. *Biochemical Journal* 418(2), 379–390.

- Edwards, Y.J., and Perkins, S.J.** (1995) The protein fold of the von Willebrand factor type A domain is predicted to be similar to the open twisted beta-sheet flanked by alpha-helices found in human ras-p21. *FEBS Lett.* 358(3), 283–286.
- Echenique, J., Kadioglu, A., Romao, S., Andrew, P.W., Trombe, M.C.** (2004) Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 72, 2434–2437.
- Elsholz, A.K., Turgay, K., Michalik, S., Hessling, B., Gronau, K., Oertel, D., Mäder, U., Bernhardt, J., Becher, D., Hecker, M., Gerth, U.** (2012) Global impact of protein arginine phosphorylation on the physiology of *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 7451–7456.
- Fischer, E.H., and Krebs, E.G.** (1955) Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J. Biol. Chem.* 216, 121–132.
- Fiuza, M., Canova, M.J., Zanella-Cleon, I., Becchi, M., Cozzone, A.J., Mateos, L.M., Kremer, L., Gil, J.A., Molle, V.** (2008a) From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the role of PknA and PknB in cell division. *J. Biol. Chem.* 283(26), 18099–18112.
- Fiuza, M., Canova, M.J., Patin, D., Letek, M., Zanella-Cleon, I., Becchi, M., Mateos, L.M., Mengin-Lecreulx, D., Molle, V., Gil, J.A.** (2008b) The MurC ligase essential for peptidoglycan biosynthesis is regulated by the serine/threonine protein kinase PknA in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* 283(52), 36553–36563.
- Fuhrmann, J., Schmidt, A., Spiess, S., Lehner, A., Turgay, K., Mechtler, K., Charpentier, E., Clausen, T.** (2009) McsB is a protein arginine kinase that phosphorylates and inhibits the heat-shock regulator CtsR. *Science* 324(5932), 1323–1327.
- Gaidenko, T.A., Kim, T.J., Price C.W.** (2002) The PrpC serine-threonine phosphatase and PrkC kinase have opposing physiological roles in stationary-phase *Bacillus subtilis* cells. *J. Bacteriol.* 184(22), 6109–6114.
- Galyov, E.E., Håkansson, S., Forsberg, A., Wolf-Watz, H.** (1993) A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* 361(6414), 730–732
- Garnak, M., and H. C. Reeves** (1979) Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Science* 203(4385), 1111–1112.
- Giefing, C., Jelencsics, K.E., Gelbmann, D., Senn, B.M., Nagy, E.** (2010) The pneumococcal eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP co-localizes with the cell division apparatus and interacts with FtsZ in vitro. *Microbiology* 156(Pt 6), 1697–1707.
- Gordon, E., Mouz, N., Duée, E., Dideberg, O.** (2000) The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J. Mol. Biol.* 299(2), 477–485.
- Grangeasse, C., Doublet, P., Vaganay, E., Vincent, C., Deléage, G., Duclos, B., Cozzone, A.J.** (1997) Characterization of a bacterial gene encoding an autophosphorylating protein tyrosine kinase. *Gene* 204, 259–265.
- Greenstein, A.E., Echols, N., Lombana, T.N., King, D.S., Alber, T.** (2007) Allosteric activation by dimerization of the PknD receptor Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 282(15), 11427–11435.
- Guan, K.L., and Dixon, J.E.** (1990) Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* 249(4968), 553–556.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M., Hunter, T.** (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241(4861), 42–52.
- Hermoso, A., Espadaler, J., Enrique Querol, E., Aviles, F.X., Sternberg, M. J., Oliva, B., Fernandez-Fuentes, N.** (2009) Including functional annotations and extending the collection of structural classifications of protein loops (ArchDB). *Bioinform. Biol. Insights* 1, 77–90.
- Hecker, M., Schumann, W., and Völker, U.** (1996) Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 19(3), 417–428.
- Horinouchi, S., Kito, M., Nishiyama, M., Furuya, K., Hong S.K., Miyake, K., Beppu, T.** (1990) Primary structure of AfsR, a global regulatory protein for secondary metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* 95(1), 49–56.
- Houppert, A.S., Kwiatkowski, E., Glass, E.M., DeBord, K.L., Merritt, P.M., Schneewind, O., Marketon, M.M.** (2012) Identification of chromosomal genes in *Yersinia pestis* that influence type III secretion and delivery of Yops into target cells. *PLoS One* 7(3), e34039.

- Hsu, F., Schwarz, S., Mougous, J.D.** (2009) TagR promotes PpkA catalysed type VI secretion activation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 72(5), 1111–1125.
- Chao, J.D., Papavinasasundaram, K.G., Zheng, X., Chávez-Steenbock, A., Wang, X., Lee, G.Q., Av-Gay, Y.** (2010) Convergence of Ser/Thr and two-component signaling to coordinate expression of the dormancy regulon in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 285(38), 29239–29246.
- Jadeau, F., Bechet, E., Cozzone, A.J., Deleage, G., Grangeasse, C., Combet, C.** (2008) Identification of the idiosyncratic bacterial protein tyrosine kinase (BY-kinase) family signature. *Bioinformatics* 24(21), 2427–2430.
- Jang, J., Stella, A., Boudou, F., Levillain, F., Darthuy, E., Vaubourgeix, J., Wang, C., Bardou, F., Puzo, G., Gilleron, M., Burlet-Schiltz, O., Monsarrat, B., Brodin, P., Gicquel, B., Neyrolles, O.** (2010) Functional characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinase PknJ. *Microbiology* 156(Pt 6), 1619–1631.
- Jers, C., Pedersen, M.M., Paspaliari, D.K., Schütz, W., Johnsson, C., Soufi, B., Macek, B., Jensen, P.R., Mijakovic, I.** (2010) *Bacillus subtilis* BY-kinase PtkA controls enzyme activity and localization of its protein substrates. *Mol. Microbiol.* 77(2), 287–299.
- Jiang, S.M., Cieslewicz, M.J., Kasper, D.L., Wessels, M.R.** (2005) Regulation of virulence by a two-component system in group B streptococcus. *J. Bacteriol.* 187(3), 1105–1113.
- Jin, H., and V. Pancholi.** (2006) Identification and biochemical characterization of a eukaryotic-type serine/threonine kinase and its cognate phosphatase in *Streptococcus pyogenes*: their biological functions and substrate identification. *J. Mol. Biol.* 357(5), 1351–1372.
- Jones, G., and Dyson, P.** (2006) Evolution of transmembrane protein kinases implicated in coordinating remodeling of gram-positive peptidoglycan: Inside versus outside. *J. Bacteriol.* 188(21), 7470–7476.
- Juris, S.J., Rudolph, A.E., Huddler, D., Orth, K., Dixon, J.E.** (2000) A distinctive role for the Yersinia protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(17), 9431–9436.
- Juris, S.J., Shah, K., Shokat, K., Dixon, J.E., Vaccratsis, P.O.** (2006) Identification of otubain 1 as a novel substrate for the Yersinia protein kinase using chemical genetics and mass spectrometry. *FEBS Lett.* 580(1), 179–183.
- Kang, C.M., Abbott, D.W., Park, S.T., Dascher, C.C., Cantley, L.C., Husson, R.N.** (2005) The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes Dev.* 19(14), 1692–1704.
- Kato, J., Misra, T.K., Chakrabarty, A.M.** (1990) AlgR3, a protein resembling eukaryotic histone H1, regulates alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(8), 2887–2891.
- Kirstein, J., Zühlke, D., Gerth, U., Turgay, K., Hecker, M.** (2005) A tyrosine kinase and its activator control the activity of the CtsR heat shock repressor in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 24(19), 3435–3445.
- Kravanja, M., Engelmann, R., Dossonnet, V., Blüggel, M., Meyer, H.E., Frank, R., Galinier, A., Deutscher, J., Schnell, N., Hengstenberg, W.** (1999) The hprK gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Mol. Microbiol.* 31(1), 59–66.
- Krüger, E., and Hecker, M.** (1998) The first gene of the *Bacillus subtilis* clpC operon, *ctsR*, encodes a negative regulator of its own operon and other class III heat shock genes. *J. Bacteriol.* 180(24), 6681–6688.
- Lamy, M.C., Zouine, M., Fert, J., Vergassola, M., Couve, E., Pellegrini, E., Glaser, P., Kunst, F., Msadek, T., Trieu-Cuot, P., Poyart, C.** (2004) CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol. Microbiol.* 54: 1250–1268.
- LaRonde-LeBlanc, N., Guszczynski, T., Copeland, T., Wlodawer, A.** (2005) Structure and activity of the atypical serine kinase Rio1. *FEBS J.* 272(14), 3698–3713.
- Leid, J.G., Willson, C.J., Shirtliff, M.E., Hassett, D.J., Parsek, M.R., Jeffers, A.K.** (2005) The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J. Immunol.* 175(11), 7512–7518.
- Levene, P.A., and Alsberg, C.L.** (1906) The cleavage products of vitellin. *J. Biol. Chem.* 2, 127–133.
- Lewis, D.E.A., Geanacopoulos, M., Adhya, S.** (1999) Role of HU and DNA supercoiling in transcription repression: specialized nucleoprotein repression complex at gal promoters in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 31(2), 451–461.
- Liao, D.L., Silverton, E., Seok, Y.J., Lee, B.R., Peterkofsky, A., Davies, D.R.** (1996) The first step in sugar transport: crystal structure of the amino terminal domain of enzyme I of the *E. coli* PEP:sugar phosphotransferase system and a model of the phosphotransfer complex with HPr. *Structure* 4(7), 861–872.

- Lin, W.J., Walthers, D., Connelly, J.E., Burnside, K., Jewell, K.A., Kenney, L.J., Rajagopal, L.** (2009) Threonine phosphorylation prevents promoter DNA binding of the group B Streptococcus response regulator CovR. *Mol. Microbiol.* 71(6),1477–1495.
- Lipmann, F. A., and Levene, P. A.** (1932) Serinephosphoric acid obtained on hydrolysis of vitellinic acid. *J. Biol. Chem.* 98, 109–114.
- Liu, Y., Manna, A.C., Pan, C.H., Kriksunov, I.A., Thiel, D.J., Cheung, A.L., Zhang, G.** (2006) Structural and function analyses of the global regulatory protein SarA from *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(7), 2392–2397.
- Lomas-Lopez, R., Paracuellos, P., Riberty, M., Cozzone, A.J., Duclos, B.** (2007) Several enzymes of the central metabolism are phosphorylated in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 272(1), 35–42.
- Madec, E., Laszkiewicz, A., Iwanicki, A., Obuchowski, M., Séror, S.** (2002) Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. *Mol. Microbiol.* 46(2), 571–586.
- Maestro, B., Nováková, L., Heseck, D., Lee, M., Leyva, E., Mobashery, S., Sanz, J.M., Branny, P.** (2011) Recognition of peptidoglycan and β -lactam antibiotics by the extracellular domain of the Ser/Thr protein kinase StkP from *Streptococcus pneumoniae*. *FEBS Lett.* 585(2), 357–363.
- Manai, M. and Cozzone, A.J.** (1979) Analysis of the protein-kinase activity of *Escherichia coli* cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91(3), 819–826.
- Matsumoto, A., Hong, S.K., Ishizuka, H., Horinouchi, S., Beppu, T.** (1994) Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene* 146(1), 47–56.
- Mehra-Chaudhary, R., Mick, J., Beamer, L.J.** (2011) Crystal structure of *Bacillus anthracis* phosphoglucosamine mutase, an enzyme in the peptidoglycan biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* 193(16), 4081–4087.
- Mijakovic, I., and Macek, B.** (2012) Impact of phosphoproteomics on studies of bacterial physiology. *FEMS Microbiol Rev.* 36(4), 877–892.
- Miller, M., Donat, S., Rakette, S., Stehle, T., Kouwen, T.R., Diks S.H., Dreisbach, A., Reilman, E., Gronau, K., Becher, D., Peppelenbosch M.P., van Dijk J.M., Ohlsen, K.** (2010) Staphylococcal PknB as the first prokaryotic representative of the prolinedirected kinases. *PLoS One* 5(2), e9057.
- Molle, V., Kremer, L., Girard-Blanc, C., Besra, G.S., Cozzone, A.J., Prost, J.F.** (2003) An FHA phosphoprotein recognition domain mediates protein EmbR phosphorylation by PknH, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 42(51), 15300–15309.
- Mougous, J.D., Gifford, C.A., Ramsdell, T.L., Mekalanos, J.J.** (2007) Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Cell Biol.* 9(7), 797–803.
- Mukhopadhyay, S., Kapatral, V., Xu, W., Chakrabarty, A.M.** (1999) Characterization of a Hank's type serine/threonine kinase and serine/threonine phosphoprotein phosphatase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181(21), 6615–6622.
- Muñoz-Dorado, J., Inouye, S., Inouye, M.** (1991) A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell.* 67(5), 995–1006.
- Nagar, B., Bornmann, W.G., Pellicena, P., Schindler, T., Veach, D.R., Miller, W.T., Clarkson, B., Kuriyan, J.** (2002) Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.* 62(15), 4236–4243.
- Najafi, S.M., Willis, A.C., Yudkin, M.D.** (1995) Site of phosphorylation of SpoIIAA, the anti-anti-sigma factor for sporulation-specific sigma F of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177(10), 2912–2913.
- Nariya, H., and Inouye, S.** (2002) Activation of 6-phosphofructokinase via phosphorylation by Pkn4, a protein Ser/Thr kinase of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* 46(5), 1353–1366.
- Nariya, H., and Inouye, S.** (2003) An effective sporulation of *Myxococcus xanthus* requires glycogen consumption via Pkn4-activated 6-phosphofructokinase. *Mol Microbiol.* 49(2), 517–528.
- Nariya, H., and Inouye, S.** (2005) Identification of a protein Ser/Thr kinase cascade that regulates essential transcriptional activators in *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* 58(2), 367–379.
- Navarro L., Koller, A., Nordfelth, R., Wolf-Watz, H., Taylor, S., Dixon, J.E.** (2007) Identification of a molecular target for the Yersinia protein kinase A. *Mol. Cell.* 26(4), 465–477.
- Niebisch, A., Kabus, A., Schultz, C., Weil, B., Bott, M.** (2006) Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein. *J. Biol. Chem.* 281(18), 12300–12307.
- Nováková, L., Sasková, L., Pallová, P., Janecek, J., Novotná, J., Ulrych, A., Echenique, J., Trombe, M.C., Branny, P.** (2005) Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein

phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. FEBS J. 272(5), 1243–1254.

Nováková L., Bezousková, S., Pompach, P., Spidlová, P., Sasková, L., Weiser, J., Branny, P. (2010) Identification of multiple substrates of the StkP Ser/Thr protein kinase in *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. 192(14), 3629–3638.

O'Hare, H.M., Durán, R., Cerveňansky, C., Bellinzoni, M., Wehenkel, A.M., Pritsch, O., Obal, G., Baumgartner, J., Vialaret, J., Johnsson, K., Alzari, P.M. (2008) Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria. Mol. Microbiol. 70(6), 1408–1423.

Ortiz-Lombardía, M., Pompeo, F., Boitel, B., Alzari, P.M. (2003) Crystal structure of the catalytic domain of the PknB serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. J. Biol. Chem. 278(15), 13094–13100.

Owen, D.J., Noble, M.E.M., Garman, E.F., Papageorgiou, A.C., Johnson, L.N. (1995) Two structures of the catalytic domain of phosphorylase kinase: an active protein kinase complexed with substrate analogue and product. Structure 3(5), 467–482.

Pallová, P. (2007) Dimerizace Ser/Thr proteinkinasy eukaryotního typu *Streptococcus pneumoniae* a charakterizace jejího substrátu, fosfoglukosaminmutasy GlmM. Praha, 120 s. Disertační práce PřF UK na katedře genetiky a mikrobiologie. Vedoucí disertační práce Pavel Branny.

Pallová, P., Hercík, K., Sasková, L., Nováková, L., Branny, P. (2007) A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP of *Streptococcus pneumoniae* acts as a dimer *in vivo*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 355(2), 526–530.

Pares, S., Mouz, N., Petillot, Y., Hakenbeck, R., Dideberg, O. (1996) X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. Nat. Struct. Biol. 3(3), 284–289.

Parikh, A., Verma, S.K., Khan, S., Prakash, B., Nandicoori, V.K. (2009) PknB-mediated phosphorylation of a novel substrate, *N*-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase, modulates its acetyltransferase activity. J. Mol. Biol. 386(2), 451–464.

Pereira, S.F., Goss, L., Dworkin, J. (2011) Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 75(1), 192–212.

Pérez, J., Castaneda-García, A., Jenke-Kodama, H., Muller, R., Muñoz-Dorado, J. (2008) Eukaryotic-like protein kinases in the prokaryotes and the myxobacterial kinome. Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 105(41), 15950–15955. Článek a přílohy dostupné z (<http://www.pnas.org/content/105/41/15950.long>).

Pietack, N., Becher, D., Schmidl, S.R., Saier, M.H., Hecker, M., Commichau, F.M., Stülke, J. (2010) *In vitro* phosphorylation of key metabolic enzymes from *Bacillus subtilis*: PrkC phosphorylates enzymes from different branches of basic metabolism. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 18(3), 129–140.

Rajagopal, L., Clancy, A., Rubens, C.E. (2003) A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence. J. Biol. Chem. 278(16), 14429–14441.

Rajagopal, L., Vo, A., Silvestroni, A., Rubens, C.E. (2005) Regulation of purine biosynthesis by a eukaryotic type kinase in *Streptococcus agalactiae*. Mol Microbiol. 56(5), 1329–1346.

Rajagopal, L., Vo, A., Silvestroni, A., Rubens, C.E. (2006). Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signalling mechanisms in *Streptococcus agalactiae*. Mol. Microbiol. 62(4), 941–957.

Ramos, A., Letek, M., Campelo, A.B., Vaquera, J., Mateos, L.M., Gil, J.A. (2005) Altered morphology produced by *ftsZ* expression in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869. Microbiology 151(Pt 8), 2563–2572.

Reinelt, S., Hofmann, E., Gerharz, T., Bott, M., Madden, D.R. (2003) The structure of the periplasmic ligand-binding domain of the sensor kinase CitA reveals the first extracellular PAS domain. J. Biol. Chem. 278(40), 39189–39196.

Reizer, J., Bachem, S., Reizer, A., Arnaud, M., Saier, M.H. Jr., Stülke, J. (1999) Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis - the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. Microbiology 145(Pt 12), 3419–3429.

Roggiani, M., and Dubnau, D. (1993) ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *srfA*. J. Bacteriol. 175(10), 3182–3187.

Sasková, L., Nováková, L., Basler, M., Branny, P. (2007) Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. 189, 4168–4179.

Sawai, R., Suzuki, A., Takano, Y., Lee, P. C., Horinouchi, S. (2004) Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Gene 334, 53–61.

- Scidmore, M. A., Hackstadt, T.** (2001) Mammalian 14–3–3 β associates with the *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane via its interaction with IncG. *Mol. Microbiol.* 39(6), 1638–1650.
- Shah, I.M., Laaberki, M.H., Popham, D.L., Dworkin, J.** (2008) A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell* 135(3), 486–496.
- Shah, I.M., and Dworkin, J.** (2010) Induction and regulation of a secreted peptidoglycan hydrolase by a membrane Ser/Thr kinase that detects muropeptides. *Mol. Microbiol.* 75(5), 1232–1243.
- Sharma, K., Gupta, M., Krupa, A., Srinivasan, N., Singh, Y.** (2006) EmbR, a regulatory protein with ATPase activity, is a substrate of multiple serine/threonine kinases and phosphatase in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS J.* 273(12), 2711–2721.
- Schmidl, S.R., Gronau, K., Hames, C., Busse, J., Becher, D., Hecker, M., Stulke, J.** (2010) The stability of cytoadherence proteins in *Mycoplasma pneumoniae* requires activity of the protein kinase PrkC. *Infect. Immun.* 78(1), 184–192.
- Schultz, C., Niebisch, A., Gebel, L., Bott, M.** (2007) Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76(3), 691–700.
- Schultz, C., Niebisch, A., Schwaiger, A., Viets, U., Metzger, S., Bramkamp, M., Bott, M.** (2009) Genetic and biochemical analysis of the serine/threonine protein kinases PknA, PknB, PknG and PknL of *Corynebacterium glutamicum*: evidence for non-essentiality and for phosphorylation of OdhI and FtsZ by multiple kinases. *Mol. Microbiol.* 74(3), 724–741.
- Silvestroni, A., Jewell, K.A., Lin, W.J., Connelly, J.E., Ivancic, M.M., Tao, W.A., Rajagopal, L.** (2009) Identification of serine/threonine kinase substrates in the human pathogen group B streptococcus. *J. Proteome Res.* 8(5), 2563–2574.
- Smith, R.F., and King, K.Y.** (1995) Identification of a eukaryotic-like protein kinase gene in archaeobacteria. *Protein Sci.* 4(1), 126–129.
- Stephens, R.S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R.L., Zhao, Q., Koonin, E.V., Davis, R.W.** (1998) Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 282(5389), 754–759.
- Sun, H., and Shi, W.** (2001) Genetic studies of *mnp*, a locus essential for cellular aggregation and sporulation of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 183(16), 4786–4795.
- Sutherland, E.W. Jr., and Wosilait, W.D.** (1955) Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature* 175, 169–170.
- Sureka, K., Hossain, T., Mukherjee, P., Chatterjee, P., Datta, P., Kundu, M., Basu, J.** (2010) Novel role of phosphorylation-dependent interaction between FtsZ and FipA in mycobacterial cell division. *PLoS One* 5(1), e8590.
- Thakur, M., and Chakraborti, P.K.** (2006) GTPase activity of mycobacterial FtsZ is impaired due to its transphosphorylation by the eukaryotic-type Ser/Thr kinase, PknA. *J. Biol. Chem.* 281(52), 40107–40113.
- Thakur, M., and Chakraborti, P.K.** (2008) Ability of PknA, a mycobacterial eukaryotic-type serine/threonine kinase, to transphosphorylate MurD, an enzyme involved in the process of peptidoglycan biosynthesis. *Biochem. J.* 415(1), 27–33.
- Throup, J.P., Koretke, K.K., Bryant, A.P., Ingraham, K.A., Chalker, A.F., Ge, Y., Marra, A., Wallis, N.G., Brown, J.R., Holmes, D.J., Rosenberg, M., Burnham, M.K.** (2000) A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 35(3), 566–576.
- Truong-Bolduc, Q.C., Ding, Y., Hooper, D.C.** (2008) Posttranslational modification influences the effects of MgrA on *norA* expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 190(22), 7375–7381.
- Udo, H., Lam, C.K., Mori, S., Inouye, M., Inouye, S.** (2000) Identification of a substrate for Pkn2, a protein Ser/Thr kinase from *Myxococcus xanthus* by a novel method for substrate identification. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2(4), 557–563.
- Ueki, T., and Inouye, S.** (2003) Identification of an activator protein required for the induction of *fruA*, a gene essential for fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 8782
- Ulijasz, A.T., Andes, D.R., Glasner, J.D., Weisblum, B.** (2004) Regulation of iron transport in *Streptococcus pneumoniae* by RitR, an orphan response regulator. *J. Bacteriol.* 186(23), 8123–8136.
- Ulijasz, A.T., Falk, S.P., Weisblum, B.** (2009) Phosphorylation of the RitR DNA-binding domain by a Ser-Thr phosphokinase: Implications for global gene regulation in the streptococci. *Mol. Microbiol.* 71, 382–90.
- Umeyama, T., Lee, P.C., Ueda, K., Horinouchi, S.** (1999) An AfsK/AfsR system involved in the response of aerial mycelium formation to glucose in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* 145(Pt 9), 2281–2292.
- Umeyama, T., and Horinouchi, S.** (2001) Autophosphorylation of a bacterial serine/threonine kinase, AfsK, is inhibited by KbpA, an AfsK-binding protein. *J. Bacteriol.* 183(19), 5506–5512.

- Verma, A., and Maurelli, A.T.** (2003) Identification of two eukaryote-like serine/threonine kinases encoded by *Chlamydia trachomatis* serovar L2 and characterization of interacting partners of Pkn1. *Infect. Immun.* 71(10), 5772-5784.
- Veyron-Churlet, R., Molle, V., Taylor, R.C., Brown, A.K., Besra, G.S., Zanella-Cléon, I., Fütterer, K., Kremer, L.** (2009) The *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III activity is inhibited by phosphorylation on a single threonine residue. *J. Biol. Chem.* 284(10), 6414–6424.
- Villarino, A., Duran, R., Wehenkel, A., Fernandez, P., England, P., Brodin, P., Cole, S.T., Zimny-Arndt, U., Jungblut, P.R., Cerveñansky, C., Alzari, P.M.** (2005) Proteomic identification of *M. tuberculosis* protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions. *J. Mol. Biol.* 350(5), 953–963.
- Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Klebl, B., Thompson, C., Bacher, G., Pieters, J.** (2004) Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science.* 304(5678), 1800–1804.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J.** (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1(8), 945-51.
- Wang, J.Y., and Koshland, D.E. Jr.** (1978) Evidence for protein kinase activities in the prokaryote *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 253(21), 7605–7608.
- Yeats, F., Finn, R.D., Bateman, A.** (2002) The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends Biochem. Sci.* 27(9), 438.
- Young, T.A., Delagoutte, B., Endrizzi, J.A., Falick, A.M., Alber, T.** (2003) Structure of *Mycobacterium tuberculosis* PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases. *Nat. Struct. Biol.* 10(3), 168–174.
- Zhang, W., Inouye, M., Inouye, S.** (1996) Reciprocal regulation of the differentiation of *Myxococcus xanthus* by Pkn5 and Pkn6, eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases. *Mol. Microbiol.* 20(2), 435–447.
- Zhao, X., and Lam, J.S.** (2002) WaaP of *Pseudomonas aeruginosa* is a novel eukaryotic type protein-tyrosine kinase as well as a sugar kinase essential for the biosynthesis of core lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 277(7), 4722–4730.
- Zheng, J., Knighton, D.R., Xuong, N.H., Taylor, S.S., Sowadski, J.M., Ten Eyck, L.F.** (1993) Crystal structures of the myristylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed conformations. *Protein Sci.* 2(10), 1559–1573.
- Zheng, J., He, C., Singh, V.K., Martin, N. L., Jia, Z.** (2007). Crystal structure of a novel prokaryotic Ser/Thr kinase and its implication in the Cpx stress response pathway. *Mol. Microbiol.* 63(5), 1360–1371.
- Zheng, X., Papavinasasundaram, K.G., Av-Gay, Y.** (2007) Novel substrates of *Mycobacterium tuberculosis* PknH Ser/Thr kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355(1), 162–168.

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/>