

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



Michaela Gregorová

Význam fosforylácie proteínov pre bakteriálnu bunku
Significance of protein phosphorylation for bacterial cell

Bakalárska práca

Školiteľ: RNDr. Pavel Branny, CSc.

Praha, 2021

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť neboli predložené k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe 05.05.2021

Podpis

Pod'akovanie:

Rada by som pod'akovala môjmu školiteľovi RNDr. Pavlovi Brannymu, CSc. za cenné rady a trpezlivosť pri vedení mojej bakalárskej práce.

Abstrakt

Fosforylácia – najčastejšie sa vyskytujúca posttranslačná úprava, plní významnú úlohu v mnohých bunkových procesoch baktérií. Baktérie obsahujú enzýmy, ktoré majú na starosti pripojenie fosfátovej skupiny (kinázy) aj enzýmy s reciprokou aktivitou (fosfatázy). Reverzibilná fosforylácia a defosforylácia proteínov sú základom prenosu signálov z okolia do vnútra bunky. Modifikácia špecifických aminokyselín má za následok zmenu aktivity cieľového proteínu, jeho stability či lokalizácie v rámci bunky, alebo môže ovplyvniť jeho interakciu s ďalším partnerom. Bakteriálne bunky sú vďaka komplexnému systému týchto fosforylačných kaskád, schopné sa veľmi efektívne prispôbovať meniacim sa podmienkam prostredia.

Kľúčové slová: proteínová fosforylácia, signálne dráhy, dvojzložkové systémy, proteinkinázy Ser / Thr eukaryotického typu, bakteriálne tyrozínové proteinkinázy, regulácia jednotlivých bunkových procesov

Abstract

Phosphorylation – most common post-translational modification has an important role in many cellular processes of bacteria. Bacteria contain enzymes that are in charge of adding phosphoryl group (kinases) or enzymes with reciprocal activity (phosphatases). Reversible phosphorylation and dephosphorylation of proteins are fundamental for signal transduction from the environment to the cell. These modifications can affect enzymatic activity, protein stability, localization as well as interaction with another protein. Due to the complexity of these phosphorylation networks, bacterial cells are capable to adapt very effectively to changing environmental conditions.

Key words: protein phosphorylation, signalling pathways, two component systems, eukaryotic-type Ser/Thr protein kinases, bacterial tyrosine protein kinases, regulation of particular cellular processes

Zoznam skratiek

ATP – adenzíntrifosfát

ADP – adenzíndifosfát

AMP – adenzín monofosfát

GTP – guanozíntrifosfát

TF – transkripčný faktor

BY – kináza – bakteriálna tyrozínkináza (**b**acterial Tyrosine(**Y**) kinase)

TCS – dvojzložkový systém (**t**wo **c**omponent **s**ystem)

RR – regulátor odpovede (**r**esponse **r**egulator)

HK – histidínová kináza (histidine (**H**) kinase)

eSTK – Ser/Thr kináza eukaryotického typu (eukaryotic like Serine/Threonine kinase)

eSTP – Ser/Thr fosfatáza eukaryotického typu (eukaryotic like Serine/Threonine phosphatase)

HPt – **H**istidine **P**hosphotransfer

Pi – anorganický fosfát

DSPK – duálne špecifická proteínkináza (**D**ual **S**pecificity **P**rotein **K**inase)

YC – Tyrosine (**Y**) cluster

PTP – proteín tyrozín fosfatáza (**p**rotein **t**yrosine **p**hosphatase)

LMW – PTP - **l**ow **m**olecular **w**eight – **p**rotein **t**yrosine **p**hosphatase

PH P – polymerázova – histidinolová fosfatáza (**p**olymerase-**h**istidinol **p**hosphatases)

PASTA – **P**BP and Ser/Thr associated

PBP – **p**enicillin-**b**inding **p**rotein

PPP – fosfoproteín fosfatáza (**p**hosphoprotein **p**hosphatases)

PPM – proteín fosfatáza závislá na kovových iónoch (**p**roteinphosphatase **m**etal-depenent)

EPS – exopolysacharidy

LPS – lipopolysacharidy

CPS – kapsulárne polysacharidy

CAMP – kationové antimikrobiálne peptidy (**c**ationic **a**ntimicrobial **p**eptides)

Ugd – **U**DP-galaktóza **d**ehydrogenáza

UDP – uridíndifosfát

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Úvod..... | 1 |
| 2. Fosforylácia proteínov..... | 2 |
| 2.1 Dvojzložkové systémy..... | 2 |
| 2.1.1 Histidínové kinázy..... | 2 |
| 2.1.2 Regulátory odpovede..... | 3 |
| 2.1.3 Hybridné kinázy a fosforelay..... | 3 |
| 2.2 Fosforylácia tyrozínu..... | 5 |
| 2.2.1 BY-kinázy..... | 5 |
| 2.2.2 Princíp autofosforylácie..... | 7 |
| 2.2.3 Odstránenie fosfátovej skupiny..... | 8 |
| 2.3 Fosforylácia Ser/Thr..... | 9 |
| 2.3.1 Ser/Thr-kinázy eukaryotického typu..... | 9 |
| 2.3.2 PASTA-eSTKs kinázy..... | 10 |
| 2.3.3 Ser/Thr proteínfosfatázy..... | 11 |
| 3. Fosforylácia proteínov a jej dopad na virulenciu a patogenézu..... | 12 |
| 3.1 Syntéza exopolysacharidov..... | 12 |
| 3.2 Translokácia efektorových molekúl..... | 14 |
| 4. Význam proteínovej fosforylácie v bunkových procesoch..... | 17 |
| 4.1 Životný cyklus..... | 17 |
| 4.2 Biosyntetické a metabolické deje..... | 19 |
| 5. Fosforylácia proteínov a jej úloha v rezistencii voči antibiotikám..... | 22 |
| 5.1 Regulácia produkcie enzýmov modifikujúcich antibiotiká..... | 22 |
| 5.2 Regulácia porínov..... | 22 |

| | |
|---|----|
| 5.3 Modifikácia bunkových povrchov..... | 24 |
| 6. Záver..... | 28 |
| Zoznam literatúry..... | 29 |

1. Úvod

Posttranslačné modifikácie sú dôležité pre zmenu vlastností proteínov. Tieto úpravy vedú k zmenám v proteínovej informácii a môžu vyústiť do zvýšenia či zníženia afinity k substrátu a tým ovplyvňujú enzýmovú aktivitu či interakciu s inými proteínmi. Najčastejšou z týchto posttranslačných úprav je fosforylácia. Ide o pripojenie fosfátovej skupiny (PO_4^{3-}), o ktorej je známe, že prebieha preferenčne na štyroch aminokyselinách – seríne, treoníne, tyrozíne a histidíne. Od objavenia enzymatickej fosforylácie na proteínoch v roku 1954 (Burnett *et al.* 1954) sa stala táto modifikácia predmetom intenzívneho skúmania. Spočiatku sa myslelo, že ide o úpravu špecifickú pre eukaryotické bunky, až kým nebola v roku 1979 preukázaná proteínkinázová aktivita u *E.coli* (Manai *et al.* 1979).

Najzastúpenejšiou u baktérií je histidínová fosforylácia, ktorá je základom pre dvojzložkové systémy. Nasleduje fosforylácia na seríne a za ňou na treťom mieste je fosforylácia treonínu. Za tento druh fosforylácie sú zodpovedné kinázy príbuzné s tými, ktoré sa vyskytujú u eukaryot. Ďalšou modifikáciou je fosforylácia tyrozínu vykonávaná kinázami špecifickými pre baktérie, ktoré nevykazujú žiadnu homológiu s eukaryotickými. V poslednej dobe sa objavujú publikácie, ktoré popisujú fosforyláciu ariginínových, lyzínových a cysteínových zvyškov.

Fosforylácia sa ukázala byť dôležitým faktorom pre adaptáciu a prežitie bakteriálnej bunky, nakoľko sa funkcia tejto posttranslačnej úpravy prejavila vo viacerých fyziologických procesoch. Okrem iného medzi tieto procesy patrí prenos signálu, bunkové delenie, syntéza peptidoglykánu, exopolysacharidov či produkcia biofilmu. Fosforylácia tiež hrá úlohu v primárnom a sekundárnom metabolizme a rezistenci k antibiotikám. Fosfoproteomika odhalila aj prepojenie medzi bakteriálnou fosforyláciou a patogenitou. Z tohto hľadiska je fosforylácia u prokaryotických organizmov veľmi sľubnou oblasťou pre výskum, nakoľko odhalením funkcie a regulácie mechanizmu týchto procesov môžeme efektívne postupovať v boji s patogénnymi baktériami.

2. Fosforylácia proteínov

Fosforylácia proteínov je známa posttranslačná úprava vyskytujúca sa naprieč organizmami. Ide o reverzibilné pripojenie fosfátovej skupiny sprostredkované špecifickými enzýmami, nazývanými proteínkinázy. Zdrojom fosfátovej skupiny sú spravidla nukleozidtrifosfáty. Proteínová fosforylácia ovplyvňuje široké spektrum bunkových procesov, od vývoja a delenia až po metabolizmus. Medzi najčastejšie sa vyskytujúce fosforylácie patrí fosforylácia serínu/treonínu a tyrozínu. Fosforylácia histidínu je v bakteriálnej bunke tiež bohato zastúpená. Dnes vieme o jej dôležitom postavení v dvojzložkových systémoch.

2.1 Dvojzložkové systémy

Tieto regulačné systémy (označované ako TCSs – two component systems) využívajú fosforyláciu histidínu a následný transfer fosfátovej skupiny na aspartát k prenosu informácií z vonkajšieho prostredia do bunky a umožňujú tak efektívnu reakciu na zmenu podmienok okolia. Klasické TCSs sa skladajú z dvoch komponentov – z histidínovej kinázy (HK) viazanej na membránu a regulátora odpovede (RR - z ang. response regulator). Signál putuje od N-terminálnej domény HK na C-terminálnu doménu, kde dôjde k fosforylácii histidínu. Z histidínu je fosfátová skupina prenesená na asparágovú kyselinu N-terminálnej domény RR, čím sa stimuluje jeho C-koncová doména. Aktivovaná C-doména regulátora odpovede potom môže ovplyvňovať expresiu rôznych génov v závislosti od stimulov prijatých z vonkajšieho prostredia (Tierney *et al.* 2019).

2.1.1 Histidínové kinázy

Pre HK je typické ich konzervované jadro, ktoré má kinázovú aktivitu. Aktivita jadra je ovplyvňovaná vstupnou N-koncovou doménou, ktorá prijíma signály z vonkajšieho prostredia. Táto doména je vo väčšine prípadov membránovo viazaná a smeruje do extracelulárneho priestoru. Cez transmembránové domény je signál prenášaný na intracelulárnu C-koncovú doménu, kde dochádza k autofosforylácii histidínu už zmieným kinázovým jadrom. Fosforylácia je ATP-dependentná, teda zdrojom fosfátu je ATP. Konkrétne ide o prenos gama-fosfátu z ATP na histidín. Autofosforylácia prebieha bimolekulárne, čo znamená, že jeden monomér danej HK prenáša fosfátovú skupinu na histidín druhého monoméru. Reakciou vzniká fosfohistidín a ADP. HK tak majú okrem autokinázovej aktivity aj ďalšie enzymatické aktivity: môžu slúžiť ako fosfotransferázy a katalyzovať prenos fosfátu z jednej domény na druhú, alebo fungujú ako fosfatázy, čiže dokážu fosfátovú skupinu aj odstrániť procesom hydrolyzy. To im umožňuje v prípade potreby hydrolyzovať ich RR a zastaviť tak odpoveď bunky na zmenu

podmienok. Jednotlivé histidínové kinázy sú svojou stavbou prispôsobené signálnym dráham, v ktorých vystupujú (Alex *et al.* 1994, Stock *et al.* 2000).

2.1.2 Regulátory odpovede

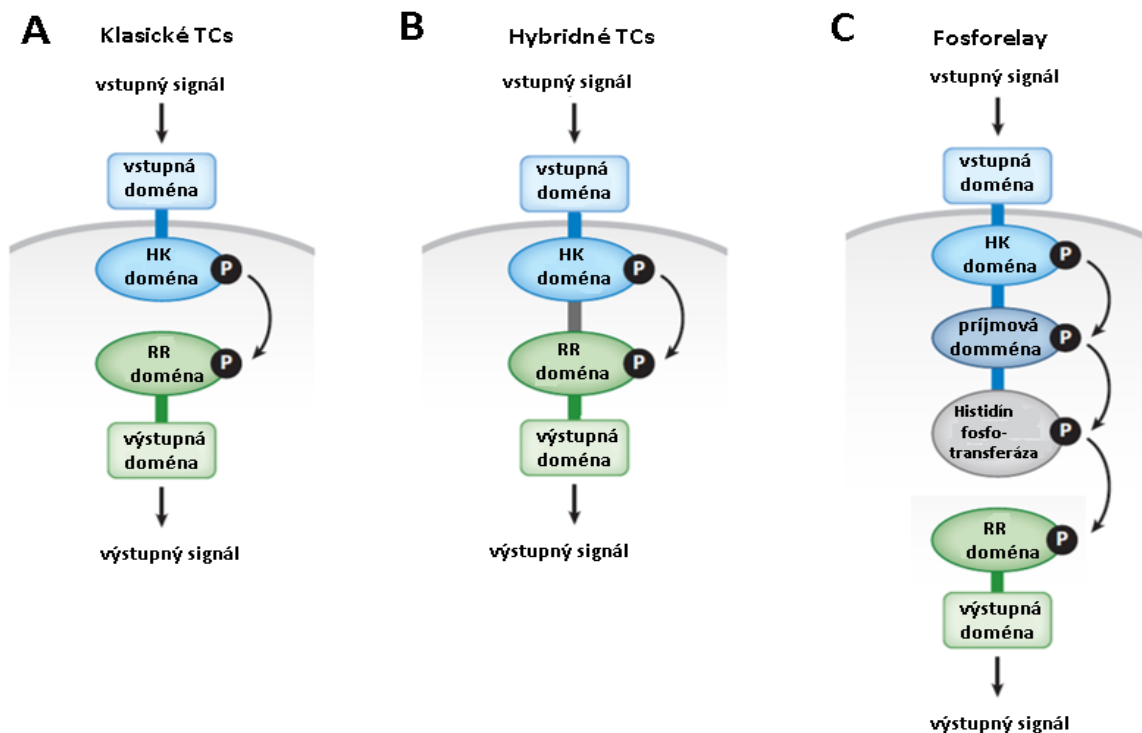
Za prenos fosfátovej skupiny z fosfohistidínu na fosfoaspartát zodpovedajú regulátory odpovede. Donorom fosfátovej skupiny môžu byť aj molekuly ako acetylfosfát či karbamoylfosfát. Fosforylácia RR teda nie je vždy závislá na HK. Tieto proteíny sa skladajú z konzervovanej N-terminálnej domény, ktorá je regulačná a z variabilnej C-koncovej efektorovej domény. Regulačná doména obsahuje minimálne dva aspartátové zvyšky, na ktoré je prenášaná fosfátová skupina z príslušnej histidínovej kinázy. Väzba fosfátovej skupiny na aspartát ovplyvňuje aktivitu RR. Veľké množstvo RR sa dokáže samo zbaviť fosfátovej skupiny a tým prejsť do neaktívneho stavu, nevyžaduje teda pre svoju deaktiváciu fosfatázovú aktivitu HK. Regulátory odpovede zväčša fungujú ako transkripčné faktory a majú na efektorovej doméne DNA väzobné miesto. Nájdu sa však aj RR, ktoré toto miesto nemajú a ich C-koncová doména v tomto prípade funguje ako enzým. Niektoré vôbec nedisponujú efektorovými doménami. Takéto RR sa podieľajú na transfere fosfátu v systémoch hybridných kináz alebo fosforelays (Stock *et al.* 2000).

2.1.3 Hybridné kinázy a fosforelay

Ako hybridné sa označujú systémy, ktorých HK a RR sú spojené do jedného polypeptidového reťazca. Majú N-koncovú vstupnú doménu nasledovanú HK doménou a regulátorovou doménou s konzervovanou asparágovou kyselinou. Celý polypeptid je zakončený výstupnou C-doménou s miestom na naviazanie DNA. Hybridné kinázy sú značne rôznorodé a ich štruktúra im umožňuje zapojiť do signálnej kaskády viaceru stimulov naraz.

Fosforelay je systém používajúci viacnásobný prenos fosfátovej skupiny. Integrovaný membránový polypeptid je zložený zo vstupnej domény, HK domény, za ktorou nasleduje tzv. príjmová doména podobná RR. Za príjmovou doménou nasleduje ďalšia doména obsahujúca histidínové zvyšky, ktorá sa označuje ako HPt (histidín obsahujúca fosfotransférová doména). Regulátor odpovede je oddelený samostatný proteín. Samotný fosfátový prenos prebieha v štyroch krokoch. Najprv dôjde k ATP-dependentnej autofosforylácii histidínu HK. Následne je fosfát prenesený z His na Asp na regulačnej príjmovej doméne. Z fosfoaspartátu je fosfát transferovaný na His na HPt doméne a odtiaľ opäť na Asp. Nakoniec je procesom hydrolýzy uvoľnený vo forme Pi (Alex *et al.* 1994, Stock *et al.* 2000; Groisman *et al.* 2016).

Existujú ďalšie typy TCSs, ktoré však svojou štruktúrou nezodpovedajú vyššie zmieneným klasickým dvojzložkovým systémom. Okrem tohto klasického typu sa môžeme stretnúť aj so systémami, ktorých HK sú intramembránové a nemajú extracelulárnu doménu, prijímajúcu signály z okolia. Namiesto toho spolupracujú s ďalšími proteínmi, ktoré im pomáhajú detekovať stimuly. Často sa môžeme stretnúť so samostatnými proteínmi fungujúcimi ako prenášače fosfátovej skupiny z HK na RR, ktoré disponujú histidín obsahujúcou doménou. Občas potrebujú TCSs ďalšie regulátory odpovede alebo proteíny potrebné pre správne fungovanie HK a v takomto prípade ide o systémy trojzložkové.



Obrázok č. 1 Znáročenie rôznej stavby dvojzložkových systémov vyskytujúcich sa naprieč bakteriálnou ríšou.

(A) klasický typ dvojzložkových systémov tvorených integrovaným polypeptidom so vstupnou a HK doménou a cytoplazmatickým regulátorom odpovede s výstupnou, DNA viažucou doménou. (B) Hybridný systém tvorený jedným polypeptidom. (C) Fosforelay systém tvorený navyše príjmovou a HPt doménou (prevzaté a upravené z Groisman *et al.* 2016).

2.2 Fosforylácia tyrozínu

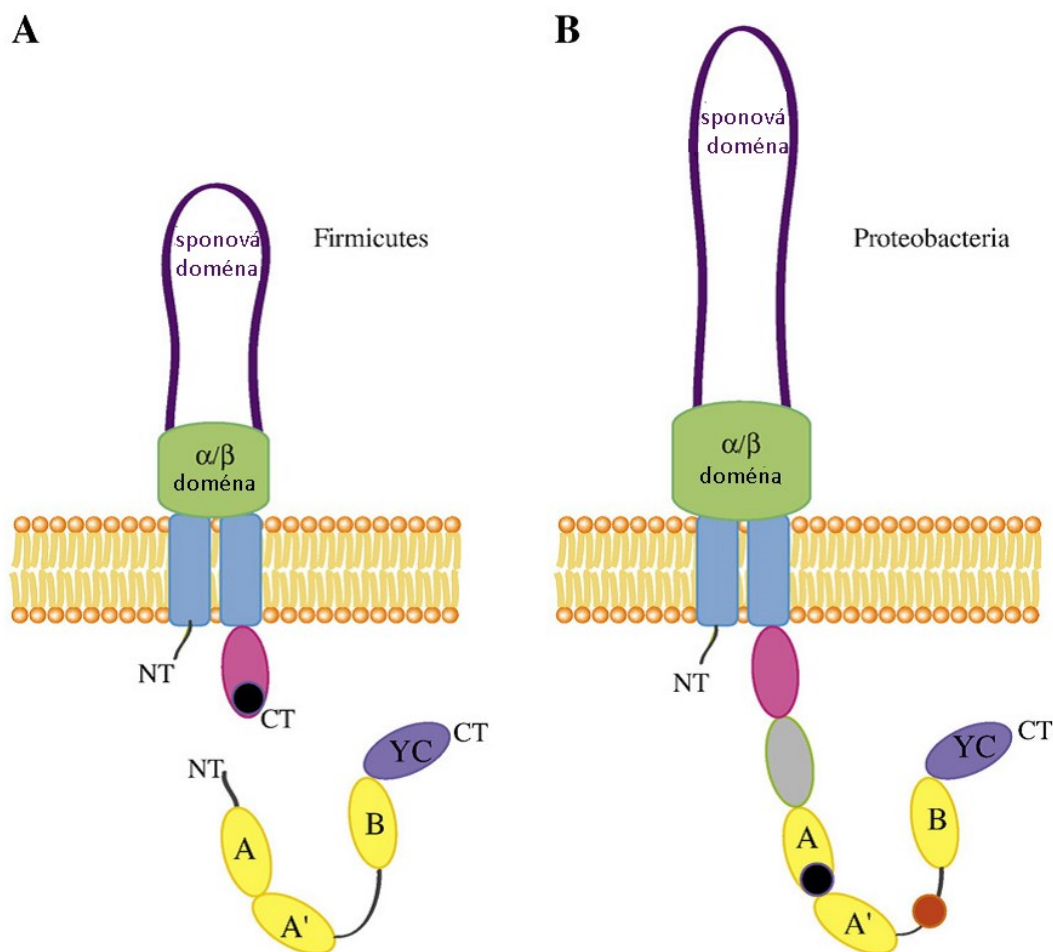
Za túto modifikáciu je zodpovedná rodina prokaryotických proteíny tyrozínových kináz (PPTKs). Fosforylácia tyrozínu prebieha ATP prípadne GTP- dependentnou autofosforyláciou, ktorú vykonávajú bakteriálne tyrozínové kinázy známe ako BY-kinázy. BY-kinázy sa v bunke

podieľajú na syntéze a expote extracelulárnych polysacharidov, metabolizme, odpovedi na teplotný šok, bunkovom cykle a istou mierou prispievajú aj k rezistencii voči antibiotikám. Okrem týchto, pre bakteriálnu bunku typických BY-kináz, ktoré sú zodpovedné za väčšinu fosforylácie na tyrozíne, sa v ojedinelých prípadoch vyskytujú aj atypické kinázy (tzv. „odd“ type kinázy) a kinázy eukaryotického typu (tiež známe ako Hanks-type kinázy), ktoré sú štruktúrne príbuzné tyrozínovým proteínkinázam nájdeným u eukaryot (Whitmore *et al.* 2012). Ďalšou známou skupinou sú duálne špecifické proteín kinázy (DSPK), ktoré okrem tyrozínovej fosforylácie katalyzujú aj transfer fosfátu na serín či treonín (Getz *et al.* 2019).

2.2.1 BY-kinázy

Tieto proteínkinázy majú na terminálnej C-doméne tzv. P-slučku tvorenú Walker A motívom a ďalšími motívmi Walker A' a B. Štruktúra P-slučky je známa svojím výskytom práve u veľkej rodiny proteínov s ATP-ázovou aktivitou. Jej význam spočíva v naviazaní ATP/GTP, ktorý bude donorom fosfátovej skupiny. Za Walker motívmi sa nachádza tyrozínový cluster (YC). Tento motív môže byť dlhý v rozmedzí od 10 do 20 AK zvyškov a zvyčajne obsahuje 3-7 tyrozínov. Práve tieto YC tyrozíny sú miestom už spomínanej autofosforylácie, hoci k nej nedochádza na každom z nich (Grangeasse *et al.* 2010; Grangeasse *et al.* 2012).

Čo sa týka organizácie BY-kináz v bunke, rozdeľujú sa podľa usporiadania na typ *Proteobacteria* (inak P-typ) a typ *Firmicutes* (F-typ). Ide o prototypy, ktoré sa vyskytujú u rôznych bakteriálnych kmeňov. P-typ je tvorený transmembránovým proteínom, ktorého terminálna amino doména prechádza membránou dvakrát. N-koniec smeruje do vnútra baktérie, membránou prechádzajú dva α -helixy a kontakt s okolím bunky je prostredníctvom α/β domény a z nej vychádzajúcej extracelulárnej spony. Do cytosolu je orientovaná katalytická doména tvorená Walker motívmi, YC a C-koncom. U BY-kinázy typu *Proteobacteria* je súčasťou katalytickej domény aj tzv. RK cluster bohatý na lysín a arginín. Jeho význam pre bunku zatiaľ nie je známy. Organizácia F-typu sa líši od proteobakteriálnej v tom, že transmembránový a cytoplasmatický polypeptid s katalytickou aktivitou sú samostatné, pričom ich vzájomná interakcia je nutná pre priebeh fosforylácie. Membránový proteín je homologický k P-typu, len menších rozmerov (Grangeasse *et al.* 20010; Chao *et al.* 2014).



Obrázok č. 2 - BY-kinázy typu (A) *Firmicutes* a (B) *Proteobacteria*

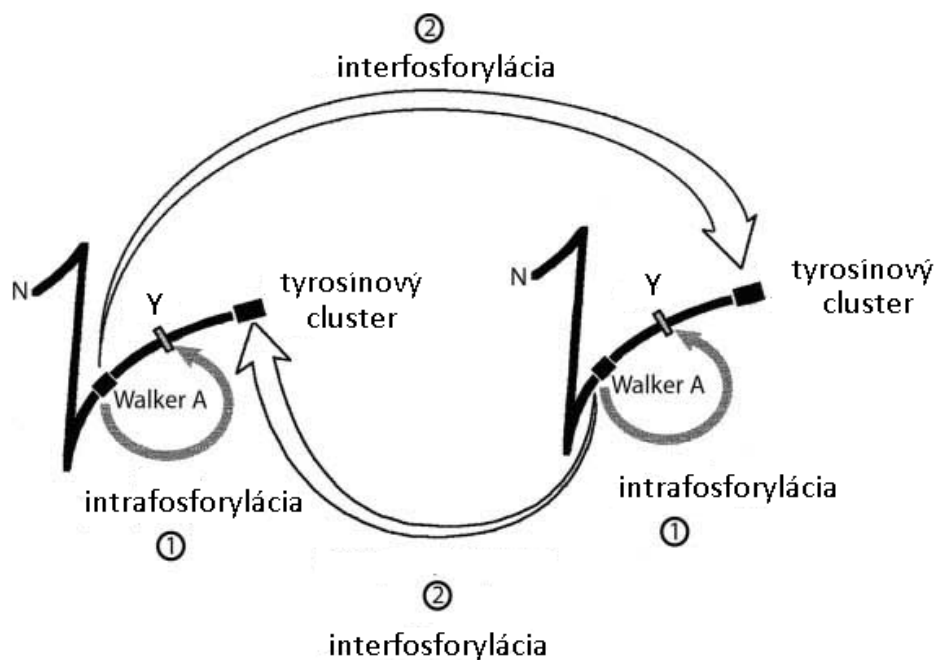
NT (N-terminus); CT (C-terminus); zelenou je znázornená extracelulárna α/β doména a spona, slúžiaca na kontakt s okolitým prostredím; modrou dva transmembránové α -helixy, kotviace extraceluláru časť; ružovou je juxtamembránová doména a fialovou tyrosínový cluster. Červeným kruhom je u P-typu znázornený tyrosín, kde dochádza k intramolekulárnej fosforylácii; čierny kruh stvárňuje fenylalanín v mieste naviazania ATP zvyšujúci afinitu kinázy k ATP a sivou farbou je znázorený RK cluster (prevzaté a upravené z Grangeasse *et al.* 2009).

2.2.2 Princíp autofosforylácie

Vzhľadom na rozdielnu stavbu P a F-typu bakteriálnych tyrozínových kináz je aj proces autofosforylácie odlišný. U P-typu k nej dochádza dvoma rozdielnymi reakciami, ktoré zahŕňajú intrafosforyláciu aj interfosforyláciu na C-koncovnej doméne. K autofosforylácii kináz F-typu sú potrebné dva samostatné proteíny (Cozzone 2004). Jeden z nich je pomocný a dokáže

stimulovať fosforylačnú aktivitu kinázy a zvýšiť jej afinitu k substrátu, pričom sa fosforylačná schopnosť proteínu vykazujúceho kinázovú aktivitu prejavuje len v prítomnosti pomocného proteínu (Soulat *et al.* 2005).

Keďže N-terminálny koniec P-typu BY-kináz nie je autofosforylovaný a neslúži ani ako substrát pre fosforyláciu katalyzovanú C-doménou, je pravdepodobné, že nemá žiadny vplyv na rozsah fosforylácie C-konca. Okrem autofosforylácie tyrozínového clusteru je známe, že C-doména obsahuje fosforylačné miesto aj mimo neho, konkrétne v okolí Walker A motívu. Mechanizmus autofosforylácie prebieha dvoma súčinnými reakciami. Najprv dôjde k autofosforylácii na tyrozíne mimo YC. Toto sa deje výhradne intrafosforylačnou reakciou katalyzovanou vlastnou proteínkinázovou aktivitou enzýmu. Následne sa zvýši kinázová aktivita enzýmu a takto aktivovaná kináza fosforyluje tyrozínový cluster druhej molekuly BY-kinázy intermolekulárne. Je teda zrejmé, že na dosiahnutie jej maximálnej fosforylačnej aktivity je nutné, aby najprv prebehla intrafosforylácia daného tyrozínového zvyšku v okolí motívu Walker A (Grangeasse *et al.* 2001).



Obrázok č. 3 – Mechanizmus fosforylácie u proteobakteriálneho typu BY-kináz
Znázornenie intrafosforylačnej reakcie tyrozínu mimo YC, ktorá vedie k interfosforylácii tyrozínového clusteru druhej molekuly BY-kinázy (prevzaté a upravené z Grangeasse *et al.* 2001).

V prípade BY-kináz F-typu, kde sú pre správne fungovanie fosforylácie potrebné dva odlišné proteíny, je cytoplazmatický polypeptid aktivovaný interakciou svojho N-konca s C-

terminálnym koncom transmembránového polypeptidu. Pri naviazaní dochádza k zmene v terciálnej štruktúre cytoplazmatického proteínu, čo vedie k zvýšeniu afinity enzýmu k ATP a tým aj k celkovému zvýšeniu kinázovej aktivity. K prenosu fosfátovej skupiny môže dochádzať intramolekulárne aj intermolekulárne v závislosti od druhu baktérie (Soulat *et al.* 2005).

Hoci tyrozínové proteínkinázy niektorých druhov grampozitívnych baktérií potrebujú k svojej funkcii pomocné proteíny, u iných druhov slúžia tieto transembránové polypeptidy len ako zosilňovače ich samostatnej kinázovej aktivity. Podobne aj v prípade gramnegatívnych baktérií sú niektoré schopné autofosforylovať samy nezávisle od ďalších pomocných proteínov zatiaľ čo iné to nedokážu (Soulat *et al.* 2005).

2.2.3 Odstránenie fosfátovej skupiny

Odstránenie fosfátovej skupiny majú na starosti tri rodiny enzýmov :

1. fosfatázy eukaryotického typu (PTPs) a fosfatázy s dvojitou špecifitou, ktoré sú aktívne aj voči fosforylácii na seríne a treoníne
2. nízkomolekulárne proteíntyrozín fosfatázy (LMW-PTPs), ktoré nájdeme aj u eukaryot a sú kyslej povahy
3. polymerázové - histidinolové fosfatázy (PHPs), fosfoesterázy gramnegatívnych baktérií

PTPs, duálne špecifické fosfatázy a LMW-fosfatázy využívajú mechanizmus, ktorý zahŕňa typickú CXXXXXR sekvenciu aminokyselín vo fosfát viažúcom mieste. Cysteín ako nukleofil napáda fosfor na substráte za vzniku fosfocysteínu, zatiaľ čo arginín interaguje so zvyškom fosfotyrosínu (Whitmore *et al.* 2012).

2.3 Fosforylácia Ser/Thr

Pripojenie fosfátu na hydroxylovú skupinu serínu alebo treonínu sprostredkovávajú Ser/Thr kinázy, ktoré sú homologické ku kinázam eukaryotickým a teda dostali označenie Ser/Thr kinázy (eSTKs) eukaryotického typu. Fosforylácia na serínových a treonínových zvyškoch je pomerne stabilná modifikácia a na jej odstránenie sú v bunke prítomné špecifické Ser/Thr-fosfatázy (eSTPs) eukaryotického typu (Dworkin 2015). Okrem toho sa u baktérií vyskytujú atypické enzýmy katalyzujúce fosforyláciu a defosforyláciu serínu (Manuse *et al.* 2016). Systém Ser/Thr kináz a fosfatáz neovplyvňuje vo väčšine prípadov konkrétne transkripčné faktory, ale cez posttranslačnú modifikáciu ovplyvňuje vlastnosti svojich cieľových proteínov. Napriek tomu však existujú prípady, keď eSTK fosforyluje určité transkripčné faktory a moduluje ich afinitu k DNA a tým reguluje expresiu génov. Niekedy

môžu ovplyvňovať expresiu génov fosforyláciou regulátorov odpovede (tak, ako to robia TCS) (Janczarek *et al.* 2018).

2.3.1 Ser/Thr-kinázy eukaryotického typu

Vyskytujú sa vo forme transmembránového alebo cytosolického proteínu. Katalytické jadro je známe typickou dvojlaločnou štruktúrou, ktorá vzniká zložením 12, pre tieto enzýmy charakteristických subdomén. Medzi lalokmi je umiestnené aktívne miesto kinázy. Fosforylácia prebieha za pomoci ATP ako donoru fosfátovej skupiny. N-koncový lalok viaže a orientuje ATP voči C-laloku, kde dochádza k prenosu fosfátu na naviazaný substrát (Janczarek *et al.* 2018).

V aktívnom mieste enzýmu sa nachádza aktivačný segment, ktorý je ohraničený konzervovanými motívmi DFG a APE. Okrem toho je zložený z niekoľkých ďalších konzervovaných slučiek – Mg^{2+} viažuca, aktivačná a P+1 slučka. P+1 slučka je miestom, kde dochádza ku kontaktu substrátu a kinázy. Katalytická a P-slučka nie sú súčasťou aktivačného segmentu, ale sú dôležitou súčasťou katalytickej domény kinázy. P-slučka má vysoký obsah glycínu a je podstatná pre transfer fosfátovej skupiny a výmenu vzniknutého ADP za ATP do ďalšieho cyklu. Aktivačná slučka obsahuje serínový, alebo treonínový zvyšok, ktorý interaguje s katalytickou slučkou. Aktivačná slučka je vysoko variabilná a podieľa sa na určení substrátovej špecificity enzýmu.

Kinázy v bunkách fungujú ako prepínače, prechádzajú z aktívnej do neaktívnej formy práve vďaka fosforylácii. Prechod do aktívnej formy je buď autofosforyláciou, alebo transfosforyláciou pomocou inej kinázy, na aspoň jednom Ser/Thr zvyšku v aktivačnej slučke (Pereira *et al.* 2011; Janczarek *et al.* 2018).

2.3.2 PASTA-eSTKs kinázy

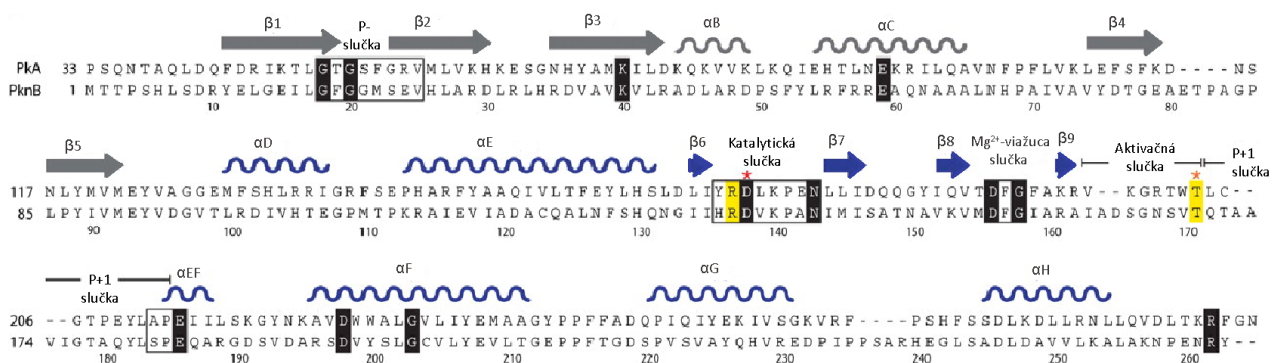
Skupina membránových, výhradne prokaryotických eSTKs disponuje tzv. PASTA motívmi (z ang. Peniciline binding protein And Ser/Thr Associated) na ich extracelulárnej doméne. Tieto kinázy plnia hlavne úlohu regulátorov morfogénzy a bunkového delenia. PASTA motív viaže antibiotiká obsahujúce β -laktámový kruh ako je penicilín a preto je možné ich nájsť aj v penicilín viažucich proteínoch (PBP), kde boli tieto motívy objavené ako prvé (Manuse *et al.* 2016).

Proteín je transmembránový s N-koncovou doménou smerujúcou intracelulárne a C-koncovou doménou smerujúcou von z bunky. Cytoplazmatická doména obsahuje katalytickú doménu a juxtamembránový linker, ktorý ju spája s transmembránovou doménou. Kinázové

jadro pozostáva z rovnakých subdomén ako jadro ostatných eSTKs. N-terminálny lalok kinázy je tvorený štruktúrou zvlneného β -listu a jedným dlhým α -helixom, ktorý sa označuje ako αC . C-lalok pozostáva prevažne z α -helixov. Orientáciou lalokov voči sebe dochádza k prechodu z uzatvorenej do otvorenej konformácie (Ortiz-Lombardí *et al.* 2003).

ATP sa viaže do štrbiny medzi lalokmi, kde je stabilizované interakciou s P-slučkou. Glycínové zvyšky na slučke interagujú s α a β fosfátom nukleozidu. Okrem toho s týmito fosfátmi interaguje aj konzervovaný lyzín v pozícii 40, ktorý pomáha ATP sa orientovať a ukotviť. Glutámová kyselina v polohe 59 N-laloku vytvára s ATP vodíkové mostíky a tým stabilizuje kontakt lyzínu a netransferovaných fosfátov.

Katalytická slučka obsahuje konzervovaný asparagín a aspartát. Asparagín orientuje asparágovú kyselinu, ktorá atakuje hydroxylovú skupinu substrátu (Ser/Thr), ktorý bude fosforylovaný. Aktivačný segment obsahuje druhý aspartát, ktorý reaguje s aspartátom katalytickej slučky. Aktivácia kinázy si vyžaduje fosforyláciu Ser alebo Thr zvyšku aktivačnej slučky, pričom je častejšie, že k nej dôjde na treoníne (Manuse *et al.* 2016).



Obrázok č. 4 – Porovnanie sekvencie časti katalytickej domény PkA kinázy, ktorá je modelovým enzýmom pre fungovanie eSTKs a PknB, ktorá je modelom PASTA-eSTKs kináz

Konzervované motívy sú orámované; čiernym pozadím sú zvýraznené invariantné aminokyselinové zvyšky, červenou hviezdikou je označená asparágová kyselina a ňou fosforylovaný treonín (prevzaté a upravené z Pereira *et al.* 2011).

2.3.3 Ser/Thr proteínfosfatázy

U baktérií nájdeme dve rodiny proteínfosfatáz homologických eukaryotickým Ser/Thr fosfatázam:

1. rodina fosfoprotein fosfatáz (PPP – z ang. phosphoprotein phosphatases)
2. rodina fosfatáz závislých na kovových iónoch (PPM – z ang. metal-dependent phosphatases), kofaktorom je Mg^{2+} alebo Mn^{2+}

U PPP je známe, že okrem Ser/Thr defosforylujú aj fosfohistidínové či fosfotyrozínové zvyšky. Veľa z nich patrí do skupiny tyrozínových fosfatáz s duálnou špecifitou. Do PPM rodiny patrí skupina eSTPs (Ser/Thr fosfatázy eukaryotického typu). Katalytická doména PPM fosfatáz má 11 – 13 charakteristických motívov obsahujúcich 8 konzervovaných aminokyselín. Rovnaké usporiadanie nájdeme aj u eukaryotickej PP2C fosfatázy.

Katalytické jadro je zložené z dvoch antiparalelných β -listov, každý lemovaný dvoma α -helixami. V centre sú dva kovové ióny koordinované vodou a aminokyselinami. Predpokladá sa, že mechanizmus defosforylácie je formou nukleofilného ataku vody na atóm fosforu, ktorý je aktivovaný práve kovovými iónmi v centre (Pereira *et al.* 2011).

3.Fosforylácia proteínov a jej dopad na virulenciu a patogenézu

Fosforylácia na tyrozíne, seríne a treoníne sa ukázala byť dôležitou súčasťou procesov spojených s patogenézou baktérií. K fosforylácii dochádza v rôznych štádiách rozvoja choroby a dejoch, ako je prilnutie na hostiteľskú bunku či interakcia bakteriálnej bunky s hostiteľskou. Takmer všetky faktory bakteriálnej virulencie sú sekretované a lokalizované na bunkovom povrchu. Medzi hlavné virulentné faktory patria exopolysacharidy (EPS). Do tejto skupiny polymérov zaradujeme, okrem iného, kapsulárne polisacharidy (CPS) vykazujúce K-antigén a lipopolysacharidy (LPS) vykazujúce O-antigén. Veľké množstvo syntetických dráh EPS je regulované prostredníctvom fosforylácie Ser/Thr a Tyr. Je tiež známe, že ako u gramnegatívnych tak aj u grampozitívnych baktérií existuje interakcia BY-kináz s endogénnou UDP-glukóza dehydrogenázou (Ugd). Tento enzým zohráva podstatnú úlohu v syntéze exopolysacharidov, nakoľko jeho aktivitou dochádza k vzniku UDP-glukurónovej kyseliny, hlavnej zložky kyseliny kolanovej (Cozzone *et.al.* 2004). Okrem toho patria medzi dôležité virulentné faktory aj efektorové molekuly a exotoxíny produkované baktériami a transportované do hostiteľskej bunky, extracelulárne a s membránou asociované proteíny či biofilm (Bonne Køhler *et al.* 2020).

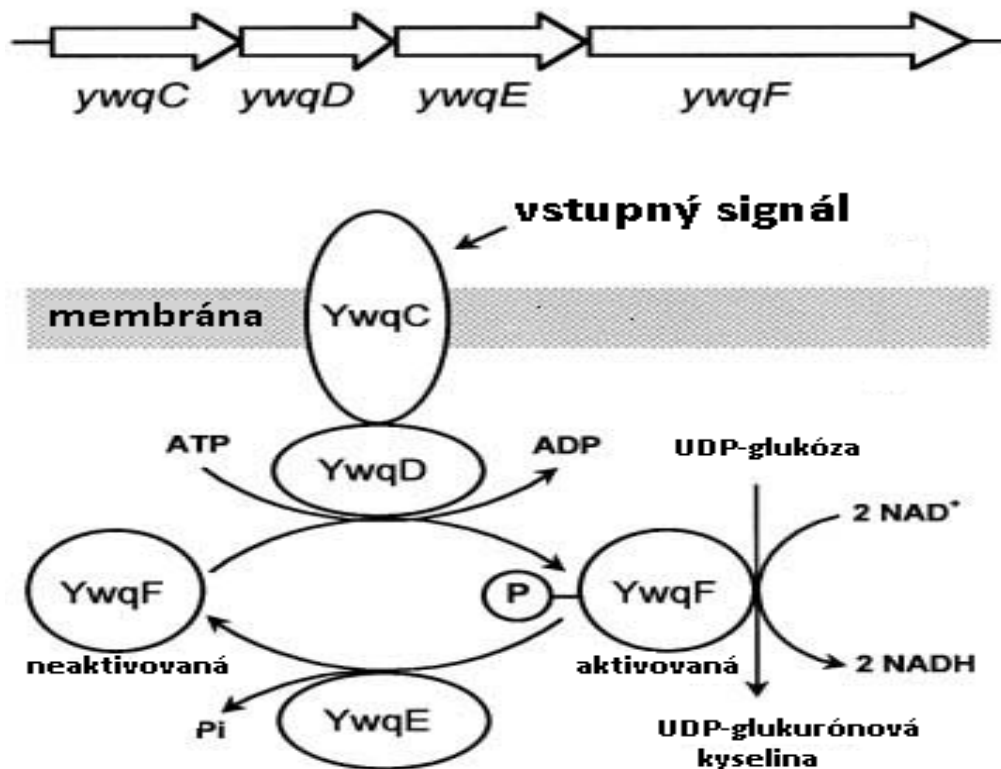
3.1 Syntéza exopolysacharidov

Veľké množstvo BY-kináz sa podieľa na produkcii exopolysacharidov využívajúc vlastnú autofosforyláciu. Známe sú aj prípady, keď tyrozínkináza fosforyluje endogénny substát – Ugd enzým, ktorý je súčasťou syntetickej dráhy EPS. Vo väčšine prípadov sa ukazuje, že produkcia extracelulárnych polysacharidov je zvýšená, keď dôjde k defosforylácii kinázy jej príbuznou fosfatázou.

E.coli kóduje kinázu Wzc a fosfatázu Wzb, ktorých aktivita ovplyvňuje tvorbu kyseliny kolanovej, jednej z hlavných zložiek exopolysacharidov. V istej, oveľa menšej miere sa na tejto regulácii podieľa aj druhá BY-kináza tejto baktérie, Etk a fosfatáza Etp. Tieto BY-kinázy sú typu *Proteobacteria*, proces autofosforylácie teda prebieha sledom intramolekulárnych a intermolekulárnych reakcií. Dôležitým regulačným krokom pre syntézu kyseliny kolanovej je ale práve defosforylácia Wzc kinázy fosfatázou Wzb. Zistilo sa tiež, že táto kináza je schopná fosforylovať enzým Ugd. Intramolekulárnou autofosforyláciou Tyr569 dôjde k stimulácii fosforylácie Ugd, pričom tento enzým nepodlieha defosforylácii prostredníctvom Wzb. Wzb je schopný defosforylovať Wzc na tyrozínovom clusteri ale nie na Tyr569. Fosforylovaný Ugd vykazuje vyššiu aktivitu (Vincent *et al.* 2000).

Ďalšie druhy gramnegatívnych baktérií disponujú kinázami podobnými Wzc u *E.coli*, ktoré zohrávajú úlohu hlavne v syntéze a transporte exopolysacharidových jednotiek. Medzi najznámejšie patrí AmsA rastlinného patogénu *Erwinia amylovora*, YC06 z *Klebsiella pneumoniae* a ExoP baktérie *Rhizobium meliloti* (Vincent *et al.* 2000).

Tyrozín kináza YwqD gram pozitívneho *Bacillus subtilis* je kódovaná príslušným génom, ktorý je súčasťou operonu *ywqCDEF*. Každý z jeho génov kóduje jednu súčiastku fosforylačného systému – *ywqC* kóduje transmembránový proteín prijímajúci signál, produkt *ywqD* je samostatná intracelulárna kináza, *ywqE* kóduje proteínovú tyrozínfosfatázu a *ywqF* kóduje enzým podobný TuaD, čo je UDP-glukóza dehydrogenáza vyskytujúca sa u *B.subtilis*. K autofosforylácii YwqD dochádza intramolekulárne na Tyr228 a následne je ňou katalyzovaná YwqC-dependentná fosforylácia YwF a TuaD. Rovnako ako u gramnegatívnych baktérií, fosforylácia dehydrogenáz zvýši ich aktivitu čo vedie k vyššej produkcii UDP-glukuronovej kyseliny, ktorá je hlavnou zložkou exopolysacharidu – kyseliny kolanovej. V tomto prípade je fosfatáza YwqE schopná defosforylovať Ugd enzýmy, čím sa zníži ich aktivita (Mijakovic *et al.* 2003; Lacour *et al.* 2006).



Obrázok č. 5 – Schéma signálnej dráhy tyrozínovej kinázy YwqD u *B.subtilis*

Znázornený je dopad ňou sprostredkovanej fosforylácie na aktivitu enzýmu UGD-glukóza dehydrogenázy (prevzané a upravené z Mijakovic *et al.* 2003).

Bakteriálna tyrozínkináza, ktorá u *Streptococcus pneumoniae* zodpovedá za správne zloženie kapsuly, je súčasťou komplexnej zostavy proteínov lokalizovanej v mieste tvorby deliacej prepážky. Táto mašinéria pri delení zodpovedá za to, aby boli obe dcérske bunky pokryté polysacharidovým obalom. Ide o BY-kinázu typu *Firmicutes*, ktorá pozostáva z transmembránového CpsC proteínu a samostatnej cytoplazmatickej kinázy CpsD. Defosforyláciu zabezpečuje príbuzná fosfatáza CpsB. Predpokladaný model regulácie je, že interakcia medzi CpsC a CpsD umožní naviazanie ATP. Táto reakcia maximalizuje syntézu kapsulárnych polysacharidov. Keď však dôjde k autofosforylácii CpsD, kináza disociuje od CpsC proteínu, čo má za následok zníženie syntézy CPS. CpsB potom defosforyláciou reaktivuje CpsD a umožní ďalšiu interakciu s CpsC. Táto cyklická fosforylácia CpsD kinázy a jej defosforylácia regulovaná CpsB je základom pre produkciu kapsulárnych polysacharidov (Nourikyan *et al.* 2015; Morona *et al.* 2000).

U *S.aureus* bol objavený aj crosstalk medzi BY-kinázovým komplexom CapA1B1 a eSTK Stk1. BY-kináza v tomto kontexte aktivuje produkciu CPS cez fosforyláciu príslušných enzýmov syntetickej dráhy, zatiaľ čo Stk1 inhibuje Cap systém a indukuje tvorbu peptidoglykánu na úkor syntézy CPS (Bonne Køhler *et al.* 2020).

Je vhodné tiež zmieniť, že u viacerých kmeňov gramnegatívnych patogénnych baktérií živočíchov aj rastlín nájdeme komplexný viaczložkový systém fosfátového transferu – Rcs fosforelay, ktorý je okrem iného zodpovedný aj za zvýšenie syntézy kapsulárnych exopolysacharidov. U *E.coli* dochádza k produkcii obalového polysacharidu - kyseliny kolanovej mimo hostiteľa a nemá úlohu vo virulencii. Naopak *Klebsiella pneumoniae* využíva tento systém na syntézu kapsuly, ktorá zvyšuje jej virulenciu. Rastlinné patogény *Erwinia amylovora* a *Pantoea stewartii* tiež využívajú regulátory odpovede tohto fosfátového prenosu na transkripciu virulentných obalov (Majdalani *et al.* 2005).

3.2 Translokácia efektorových molekúl

Dôležitou stratégiou využívanou k zneškodneniu imunitného systému hostiteľa je produkcia efektorových molekúl a ich injekcia do hostiteľskej bunky. Translokácia efektorových molekúl je sprostredkovaná sekrečnými systémami a tie sú často regulované pomocou fosforylácie. U baktérií sa vyskytuje osem typov transportných systémov cez cytoplazmatickú a vonkajšiu membránu. Ser/Thr kinázovo-fosfatázové systémy svojou reciprokom aktivitou regulujú tieto transportné systémy podľa potreby.

Yersinia pseudotuberculosis obsahuje plazmid pIB1, ktorý kóduje dôležité faktory virulencie – Yop proteíny a Ser/Thr kinázu YpkA (Galyov *et al.* 1994). Cieľom tejto kinázy sú

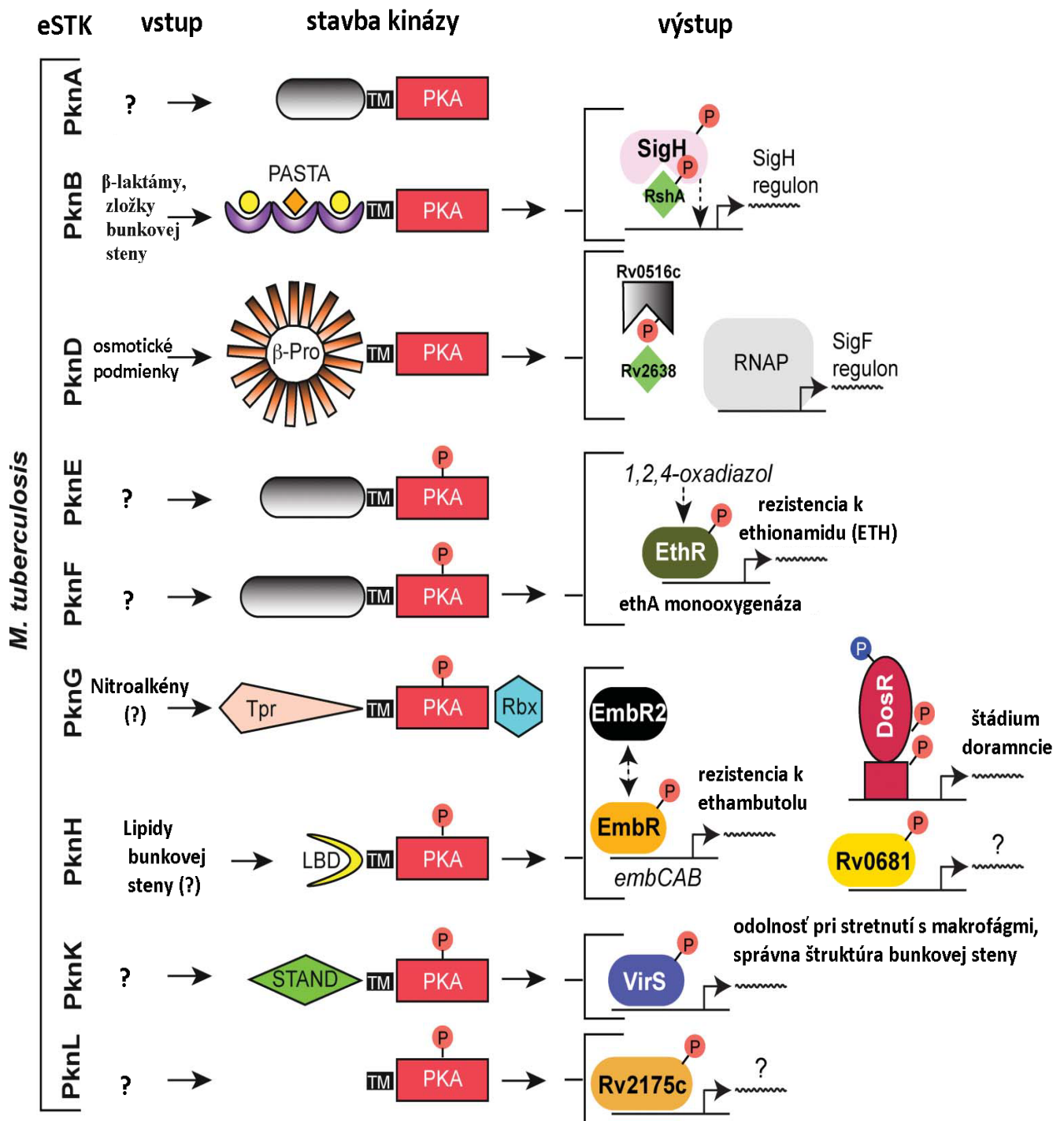
trimérne G-proteíny. Ide o GTP viažuce proteíny zložené z troch podjednotiek (α , β , γ), ktoré majú ústrednú rolu v regulácii mnohých bunkových procesov eukaryot. Podjednotka α viaže GTP a disociuje od dimérnej $\beta\gamma$ podjednotky. Ukázalo sa, že YpkA fosforyluje Ser47 v GTP viažucom mieste aktivovanej α -podjednotky a tým znižuje jeho afinitu ku GTP. Je vysoko pravdepodobné, že zmena náboja na seríne, spôsobená jeho fosforyláciou, vyvoláva konformačné zmeny v aktívnom mieste, ktoré potom nie je schopné naviazať substrát. Takto YpkA inhibuje prenos signálu na efektorové proteíny, ktoré zohrávajú napríklad rolu v regulácii aktínového cytoskeletu. To vedie k depolymerácii aktínových filament esenciálnych pre funkciu makrofágov a ďalších buniek vrodenej imunity (Navarro *et al.* 2007; Juris SJ, Rudolph *et al.* 2000).

Staphylococcus aureus produkuje veľké množstvo extracelulárnych a s membránou asociovaných proteínov, ktoré zohrávajú úlohu v patogenéze. Transkripcia génov týchto virulentných proteínov je regulovaná viacerými transkripčnými faktormi vrátane kľúčového SarA, ktorý ovplyvňuje cez 120 génov. SarA je fosforylovaný dvoma Ser/Thr kinázami – Stk1 a SA0077. Zatiaľ, čo Stk1 fosforyluje SarA hlavne na treonínových zvyškoch a vedie k zvýšeniu DNA väzobnej aktivity, u SA0077 sa ukázala fosforylácia preferenčne na seríne, pričom táto modifikácia spôsobila jej zníženie. Okrem toho Stk1 vykazuje fosforyláciu aj na ďalšom transkripčnom faktore homolognom k SarA – MgrA. V závislosti od podmienok funguje MgrA ako aktivátor alebo represor príslušných génov. Medzi jeho ciele patria gény kódujúce efluxné pumpy slúžiace na sekréciu antimikrobiálnych látok. Nefosforylovaný MgrA slúži ako ich represor. Ak je bunka pod stresom vyvolaným prítomnosťou antibiotík, Stk1 fosforyluje MgrA na Ser110 a Ser113 a tým zabráni jeho väzbe na DNA, čím dôjde k expresii púmp a sekrécii antibiotík von z bunky. Následkom je zvýšenie rezistencie k určitým typom antibiotík (napr. k fluorochinolínu). Okrem toho MgrA reguluje aj expresiu génov virulencie, autolyzínov a kapsulárnych polysacharidov (Truong-Bolduc *et al.* 2008). Exotoxíny známe ako α a β -toxíny hrajú dôležitú úlohu v patogenéze *S.aureus*. Ukázalo sa, že Stk1 má úlohu aj v regulácii syntézy hemolyzínu. Fosforyláciou CcpA proteínu na dvoch tyrozínových zvyškoch (v polohe 18 a 33) v DNA viažucom mieste kinázou Stk1, dôjde k zníženiu produkcie α -toxínu, zatiaľ čo defosforylácia príbuznou fosfatázou Stp1 ju zvyšuje (Burnside *et al.* 2010). Naopak, fosforyláciou transkripčného regulátora SpoVG (konkrétne na Thr4, 13, 24 a Ser41) dôjde k zvýšeniu jeho aktivity a expresii génov kódujúcich enzýmy, napríklad syntetickej dráhy kapsulárnych polysacharidov (Bischoff *et al.* 2016).

Legionella pneumophilla zasa využíva transportný systém 4 (T4SS) na to, aby vpravila Hanks-type kinázu LegK1 do hostiteľa. Tam táto kináza fosforyluje jeden z proteínov

inhibujúcich NF κ B transkripčné faktory, ktoré ovplyvňujú transkripciu génov imunity, apoptózy, bunkového rastu a ďalších významných procesov. Vzhľadom na to, že množstvo efektorových molekúl transportovaných do buniek hostiteľa je obmedzené, býva táto regulácia často robustná a extrémne silná (Ge *et al.* 2009). *Pseudomonas aeruginosa* využíva na kontrolu T6SS systému Ser/Thr kinázu PpkA a fosfatázu PppA (Bonne *et al.* 2020). Morská baktéria a oportúnny patogén *Vibrio alginolyticus* reguluje svoj transportný systém 6 pomocou kinázy PpkA2. Fosforylačnou kaskádou tohto enzýmu je fosforylovaný konkrétny proteín, ktorý prostredníctvom ďalších krokov spúšťa sekréciu efektorových látok cez T6SS a tým zabíja baktérie v okolí. Alternatívou je, že kináza fosforyluje proteín VtsR, ktorý potom interakciou s ďalšími proteínmi podnecuje expresiu T6SS (Yang *et al.* 2018).

Mycobacterium tuberculosis je patogén, ktorý má k dispozícii 11 eSTK (PknA-PknL) a jednu fosfatázu, ktoré svojou aktivitou ovplyvňujú transkripčné faktory génov esenciálnych aj pre virulenciu a patogenézu. Napríklad bolo zistených až 40 substrátov pre kinázu PknH. Transkripčný faktor EmbR podlieha fosforylácii na treoníne sprostredkovej PknH. Táto posttranslačná modifikácia pozitívne reguluje nasadenie EmbR na promotor *embCAB* operónu. Produkty génov tohto operónu sú dôležité pre správne zloženie bakteriálneho obalu a rezistenciu k etambutolu. Defosforylácia fosfatázou MstP vedie k drastickému zníženiu schopnosti EmbR viazať DNA. Okrem toho PknH kináza ovplyvňuje regulátor odpovede DosR, ktorý je potrebný pre stresové odpovede na zmeny v podmienkach okolia (napríklad vstup do štádia dormancie). Preukázaný bol aj dopad PknH kinázy na syntézu lipidov asociovaných s membránou bunky, ktoré sú podstatným faktorom virulencie. Na rezistencii voči etionamidu (ETH) sa podieľa ďalšia z eSTks *M.tuberculosis* – PknF. Monooxygenáza EthA indukuje schopnosti tohto antibiotika chemickými modifikáciami. Bunka tomu zabraňuje fosforyláciou transkripčného faktoru EthR, ktorý je represorom génu pre expresiu tohto enzýmu. VirS je TF podieľajúci sa na regulácii *mymA* operónu, ktorý je esenciálny pre správnu štruktúru bunkovej steny a prežitie baktérií pri stretnutí s makrofágmi. Tento transkripčný faktor je substrátom pre PknK kinázu, presné miesta fosforylácie ale ešte neboli odhalené. Fosforylácia mykobakteriálnymi kinázami bola dokázaná aj na σ -faktoroch a anti- σ -faktoroch. Táto fosforylácia aktivuje príslušné regulóny (napr. aktivácia SigF regulónu ako odpoveď na osmotický šok) (Wright *et al.* 2014).



Obrázok č. 6 – Ser/Thr kinázy eukaryotického typu vyskytujúce sa u *Mycobacterium tuberculosis*

Na obrázku sú znázornené všetky eSTK tohto patogénu, spolu s ich vstupnými signálmi, stavbou kinázy (zobrazené su rozdiely v extracelulárnych doménach, ktoré prijímajú špecifické signály) a s cieľom ich signalizácie (prevzaté a upravené z Wright *et al.* 2014).

Streptococcus pneumoniae a príbuzné druhy majú k dispozícii len jednu PASTA kinázu známu ako StkP (u ostatných druhov sa označuje ako Stk1). Dvojzložkový systém CovRS u týchto baktérií reguluje gény dôležité pre produkciu kapsulárnych polysacharidov, penetráciu do krvných tkanív, či expresiu faktorov virulencie. Regulátor odpovede CovR, fungujúci ako transkripčný faktor je fosforylovaný StkP kinázou na Thr65 a CovS kinázou na aspartáte v polohe 53. Tento crosstalk je zapojený v regulácii produkcie β -hemolyzínu (inak aj cytolyzín) – jedného z hlavných virulentných faktorov u streptokokov. Fosforylácia na Asp vedie k nasadeniu CovR na promotor a represii produkcie β -hemolyzínu, StkP pracuje protichodne, fosforyláciou na Thr preruší väzbu TF a zaháji expresiu génov. Ďalším regulátorom, ktorý je ovplyvňovaný crosstalkom medzi príslušnými TCS a StkP je RR06, ktorý reguluje expresiu elementov potrebných k príľnutiu baktérie na hostiteľské bunky. Je známe, že fosforylácia zvýši stabilitu väzby medzi regulátorom odpovede a DNA, ale presné miesto fosforylácie ani mechanizmus regulácie ešte nie sú známe (Wright *et al.* 2014).

4. Význam proteínovej fosforylácie v bunkových procesoch

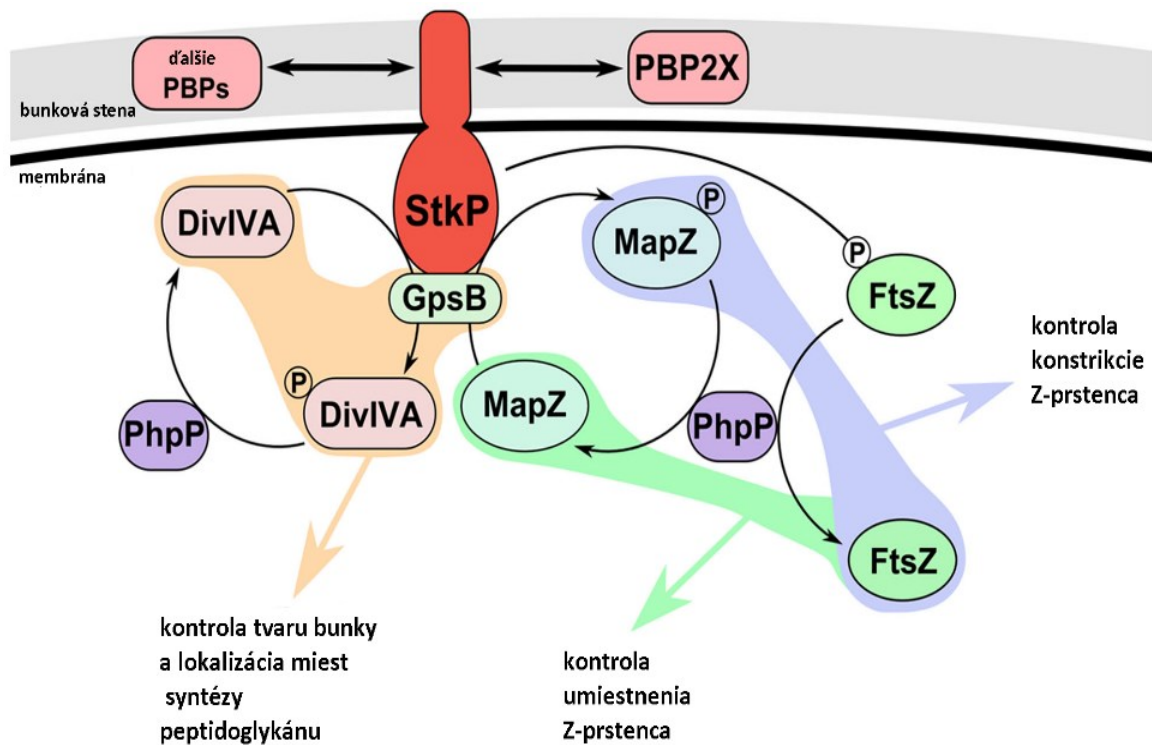
4.1 Životný cyklus

PASTA-kinázy sa zúčastňujú viacerých procesov v rámci životného cyklu a vývinu baktérie. Majú úlohu v produkcii peptidoglykánu a determinácii bunkového tvaru, delení buniek, segregácii chromozómov či v sporulácii.

PrkC PASTA-kináza a fosfatáza PrpC grampozitívneho *B. subtilis* sú kľúčové pre sporuláciu a zároveň aj pre klíčenie spóry a formáciu biofilmu. Okrem toho prispievajú k morfogénze bunky fosforyláciou viacerých endogénnych proteínov (Manuse *et al.* 2016). PrkC je lokalizovaná v mieste delenia, kde interaguje s proteínom bunkového delenia – GpsB. Jeho interakciou s katalytickou podjednotkou PrkC dochádza k fosforylácii na Thr75. Fosforylovaný GpsB je potom schopný znižovať autofosforylačnú aktivitu PrkC kinázy a tým aj jej schopnosť fosforylovať ďalšie proteíny. CpgA je GTPáza, ktorej absencia spôsobuje rastové vady a hromadenie zložiek bunkovej steny vnútri baktérie. GTPázová aktivita tohto enzýmu závisí od jeho interakcie s 30S podjednotkou ribozómu, avšak samotná interakcia si vyžaduje, aby bol CpgA proteín nafosforylovaný. K fosforylácii dochádza na Tyr166 a túto reakciu vykonáva PrkC kináza. Keď spóry opúšťajú štádium dormancie začnú produkovať peptidoglykánové podjednotky. PrkC je schopná vycítiť prítomnosť týchto zložiek v prostredí a následne spúšťa kaskádu fosforylácií, ktoré umožnia klíčenie. CpgA má úlohu aj v biogénze ribozómov a o spórach je známe, že obsahujú veľké množstvo týchto ribonukleoproteínov, ktoré pravdepodobne hrajú dôležitú úlohu pri klíčení. Je možné, že vzťah medzi PrkC kinázou a CpgA proteínom dovoľuje baktérii rýchly a efektívny nástup procesov nutných pre výstup zo štádia dormancie (Pompeo *et al.* 2012; Pompeo *et al.* 2015; Manuse *et al.* 2015).

Streptococcus pneumoniae má PASTA-kinázu StkP, ktorá spolu s jej príbuznou fosfatázou PhpP opakujúcimi sa cyklami fosforylácie a defosforylácie regulujú bunkové delenie. Za lokalizáciu StkP v strede bunky a umiestnenie viacerých PBP proteínov v mieste prepážky zodpovedajú jej PASTA domény. PASTA domény rozoznávajú podjednotky peptidoglykánu, u ktorých nedošlo k priečnemu spojeniu. Tento typ peptidoglykánu sa vyskytuje v oblasti, kde dochádza k aktívnej syntéze bunkovej steny, čo je bežné u rastúcich buniek. Ako prvé sa v mieste budúcej bunkovej prepážky zhromažďuje proteín FtsZ tvoriaci Z-prstenec. Tu hrá dôležitú úlohu jeden zo substrátov StkP kinázy - MapZ (z ang. Mid-cell-anchored protein Z), iný názov pre tento proteín je tiež LocZ. Tento proteín vytvára v strede bunky prstencovité štruktúry. Ako sa bunka predlžuje tieto prstence sa pohybujú v smere rastu a sú tak stálym ukazovateľom miesta delenia. MapZ potom proteín-proteínovou interakciou

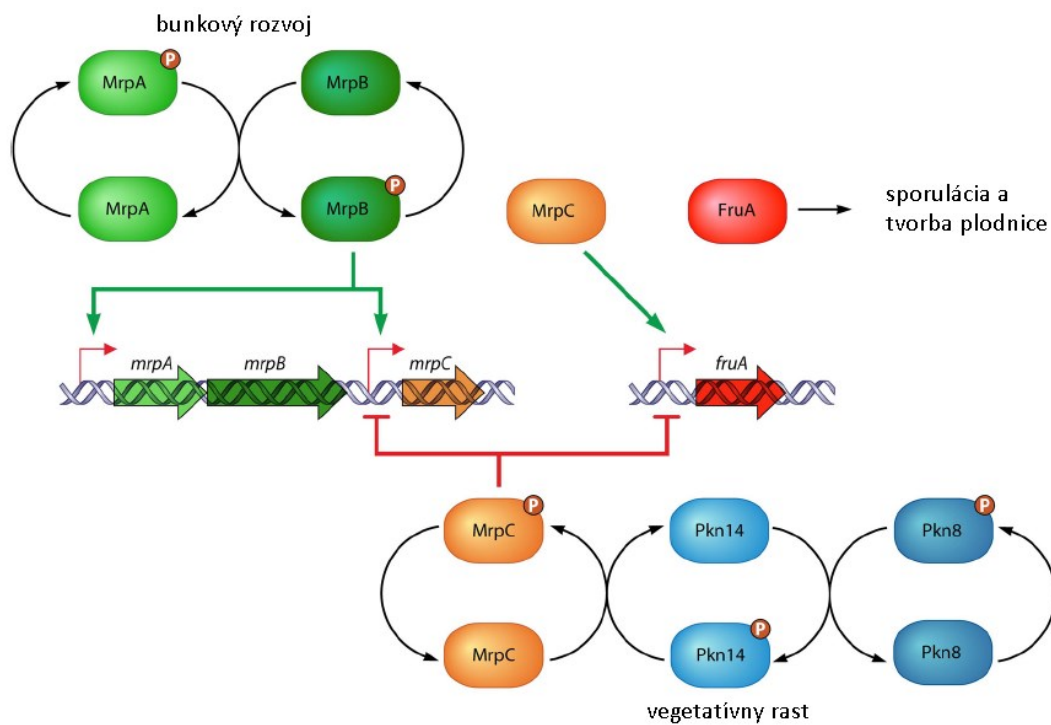
umiestni Z-prsteneč. Následne je regrútovaná StkP kináza, ktorej ďalším substrátom je treonín v pozícii 201 proteínu DivIV A. Fosforylácia DivIV A je pre správne rozdelenie buniek nutná, nakoľko sa ukázalo, že u mutantov, ktorých Tyr201 bol nahradený za alanín, došlo k deformácii bunkového tvaru (Fleurie *et al.* 2012; Beilharz *et al.* 2012; Holečková *et al.* 2014).



Obrázok č. 7 – Schéma fungovania StkP kinázy *S. pneumoniae* v bunkovom delení (prevzaté a upravené z Manuse *et al.* 2016).

PknB kináza a PASTA kinázy jej podobné, sa vyskytujú u viacerých grampozitívnych baktérií čo indikuje možnosť podobného mechanizmu v regulácii ich morfogénzy. Jednou z týchto baktérií je *Mycobacterium tuberculosis*, ktorá kontroluje svoju morfogénzu prostredníctvom kináz PknA a PknB. Medzi ich cieľové molekuly patrí aj proteín Wag31 homologický k proteínu bunkového delenia - DivIV A. Wag31 je regrútovaný do pólov bunky na základe proteín-proteínových interakcií buď vo finálnych štádiách bunkového delenia, alebo po jeho skončení. Tu zohráva úlohu v lokalizácii syntézy peptidoglykánu. Na rozdiel od proteínu DivIV A však nie je potrebný v mieste tvorby bunkovej prepážky. Správna lokalizácia polárnej syntézy peptidoglykánu je podstatná pre udržanie typického, tyčinkového tvaru bunky. Predpokladá sa, že PknB kináza prijíma svojimi PASTA motívmi signál z okolia a následne interfosforyláciou aktivuje PknA kinázu, ktorá sama o sebe nedisponuje extracelulárnou doménou. PknA potom vykonáva reverzibilnú fosforyláciu na Thr73, ktorou je regulovaná aktivita Wag31 (Kang *et al.* 2005; Kang *et al.* 2008).

Myxococcus xanthus je gramnegatívna baktéria, ktorá využíva na tvorbu plodnice a sporulácie duálnu reguláciu Ser/Thr kinázou a dvojzložkovým systémom. Keď baktéria vegetatívne rastie, tvorí agregáty pozostávajúce z tisícov buniek. V prípade, že dôjde k zmene podmienok na nepriaznivé, dochádza k vytvoreniu plodníc a následne malá časť buniek prechádza do štádia sporulácie. Tento proces závisí ako od dvojzložkového systému MrpAB, tak aj od Pkn8 a Pkn14 kinázovej kaskády. MrpA kináza rozpoznáva signál a fosforyluje regulátor odpovede MrpB. Ten funguje ako transkripčný faktor a pozitívne reguluje expresiu génu *mrpC*. Produktom je proteín regulujúci transkripciu génu *fruA*. FruA je kľúčový transkripčný faktor, ktorý ovplyvňuje množstvo ďalších génov podieľajúcich sa na tvorbe plodnice a sporulácii. Pkn8 kináza fosforyluje kinázu Pkn14, ktorá reguluje proteín MrpC fosforyláciou treonínu. Táto úprava znižuje afinitu MrpC k promotoru *fruA* génu. Behom vegetatívneho rastu takýmto spôsobom Pkn8-Pkn14 kinázová kaskáda blokuje funkciu MrpC proteínu a zabraňuje sporulácii v priaznivých podmienkach okolia (Inouye *et al.* 2008; Pereira *et al.* 2011).



Obrázok č. 8 – schéma crosstalku medzi MrpAB dvojzložkovým systémom a STK kinázami Pkn8 a Pkn14 v baktérii *Myxococcus xanthus* (prevzaté a upravené z Pereira *et al.* 2011).

4.2 Biosyntetické a metabolické deje

Vyššie spomínaný systém StkP-PhpP u *S.pneumoniae* má okrem funkcie v delení bunky tiež rolu v syntéze zložiek bunkovej steny. Je známa ich interakcia s L-alainín ligázou MurC,

ktorá je dôležitá pre tvorbu esenciálneho intermediátu peptidoglykánovej biosyntetickej dráhy. V bunke dochádza k fosforylácii tohto enzýmu StkP kinázou a jeho defosforylácii fosfatázou PhpP pričom je pravdepodobné, že fosforyláciou dochádza k zníženiu aktivity MurC enzýmu a tým aj poklesu tvorby peptidoglykánu (Falk *et al.* 2013).

U *S.aureus* bolo identifikovaných 11 proteínov fosforylovaných Ser/Thr kinázou a v menšom rozsahu k nej dochádza aj na tyrozíne. Väčšina sú enzýmy centrálného metabolizmu (predovšetkým glykolýzy). Keďže katalyzujú prevažne reverzibilné deje a vzhľadom k tomu, že fosforylácia je tiež reakciou vratnou, je možné, že takto dochádza k regulácii ich funkcie. Tyrozínovou kinázou sprostredkovaná fosforylácia bola zaznamenaná na viacerých chaperónoch a tiež ribozomálnom proteíne L7/L12, čo značí účasť fosforylácie na syntéze proteínov (Lomas-Lopez *et al.* 2007).

Už zmienená PrkC PASTA kináza *B.subtilis* spolupracuje v tzv. crosstalku s konzervovaným dvojzložkovým systémom WalRK. Fosforyláciou regulátora odpovede WalR na Thr101 sa zvýši jeho aktivita a dochádza k regulácii príslušných génov, ktoré majú úlohu v metabolizme bunkovej steny. Vo fáze stacionárneho rastu klesá aktivita kinázy WalK a naopak dochádza k stimulácii kinázy PkrC. Ide teda o sekundárnu fosforyláciu kinázou PkrC, ktorá nastupuje v dobe, keď WalR prestáva byť fosforylovaný svojou príbuznou histidínovou kinázou. Vstupným signálom pre PkrC aj WalK sú zložky peptidoglykánu bunkovej steny. Predpokladá sa však, že signál potrebný pre stimuláciu je rozdielny. WalK rozpoznáva peptidoglykánove intermediáty produkované v oblasti bunkovej prepážky v dobe bunkového delenia, zatiaľ čo PkrC je stimulovaná peptidoglykánom syntetizovaným v stacionárnej fáze rastu. Z toho sa dá usúdiť, že tieto kinázy vedia rozpoznať rozdielne aspekty a úrovne syntézy a metabolizmu bunkovej steny a podľa toho je modulovaná ich aktivita (Libby *et al.* 2015). Okrem toho PrkC kináza tiež vykazuje fosforyláciu viacerých enzýmov súvisiacich s metabolizmom cukrov. Konkrétne bola fosforylácia touto kinázou zaznamenaná na Ser12 proteínu HPr, čo je enzým fosfotransferázového systému baktérií. Fosforylácia sa ukázala aj na transaldoláze, glutamín syntetáze, izocitrát dehydrogenáze a α -acetoacetát dekarboxyláze (Pietack N. *et al.* 2010).

WalRK je dvojzložkový systém fungujúci v crosstalku s eSTK kinázami, ktorý bol prvýkrát objavený práve u *B.subtilis*, kde zohráva úlohu v metabolizme bunkovej steny počas životného cyklu baktérie. U *Streptococcus pneumoniae* nájdeme homologický systém regulácie medzi kinázou StkP a dvojzložkovým systémom WalRK. Delícia v gène pre danú eSTK viedla k zníženiu regulácie génov kontrolovaných regulátorom odpovede WalR (Libby *et al.* 2015).

V mnohých baktériách fosforylujú PASTA kinázy aj enzýmy centrálného metabolizmu. Napríklad u *Listeria monocytogenes* sa kináza PrkA podieľa na fosforylácii viacerých enzýmov metabolizmu cukrov. YvcK je proteín vyskytujúci sa u viacerých druhov grampozitívnych baktérií, ide o vysoko konzervovaný substrát PASTA kináz zohrávajúci dôležitú úlohu, okrem iného v metabolických dejoch. Napríklad u *B.subtilis* a *M.tuberculosis* (kde je známy aj ako CuvA) zohráva úlohu v glukoneogenéze, pentozofosfátovej dráhe, prípadne v Krebsovom cykle (Pensinger *et al.* 2016).

Dôkazy o tom, že fosforylácia Ser/Thr eukaryotickými proteínkinázami hrá úlohu v metabolizme a syntéze purínu boli objavené u grampozitívnej *Sptreptococcus agalactiae*, ktorého STK kináza Stk1 a jej príbuzná fosfatáza Stp1 zodpovedajú za fosforyláciu a defosforyláciu enzýmov PpaC a PurA. PpaC je pyrofosfatáza, ktorá zodpovedá za štiepenie anorganického pyrofosfátu (PPi), vznikajúceho ako vedľajší produkt purínovej syntézy. Nárast hladiny pyrofosfátu indukuje reverzibilnú fosforyláciu PpaC, čo má pravdepodobne za následok aktiváciu tohoto enzýmu a následne štiepenie PPi. PurA - adenylosukcinát syntáza je enzým sprostredkovávajúci vznik AMP v biosyntéze purínu. Negatívna regulácia PurA fosforyláciou je dôležitá pre rovnováhu medzi zásobou purínových nukleotidov v bunke a ich syntézou *de novo*. Stk1 fosforyláciou inhibuje PurA, ak je v bunke dostatočná zásoba adenínu, alebo vysoká hladina ATP, čím sa zamedzí ďalšej produkcii purínov (Rajagopal *et al.* 2005).

5.Fosforylácia proteínov a jej úloha v rezistencii voči antibiotikám

Baktérie sa dokážu voči antibiotikám brániť viacerými procesmi. Napríklad reguláciou génovej expresie porínov zodpovedných za príjem a výdaj látok, modifikáciou svojich povrchov, produkciou enzýmov schopných antibiotiká zneškodniť, zvýšením produkcie biofilmu a ďalej rôznymi stresovými reakciami. Väčšina týchto procesov je ovplyvňovaná a regulovaná hlavne dvojzložkovými systémami (Tierney *et al.* 2019).

5.1 Regulácia produkcie enzýmov modifikujúcich antibiotiká

Prvou formou rezistencie je tvorba enzýmov, ktorých cieľovými molekulami sú antibiotiká. Tieto enzýmy môžu antibiotiká úplne zneškodniť alebo ich modifikovať tak, aby pre bunku neboli toxické. Známe sú β -laktamázy, ktoré degradujú antibiotiká obsahujúce β -laktámový kruh jeho hydrolýzou. Modifikáciou inaktivujú antibiotiká napríklad chloramphenikol acetyltransferázy a aminoglykozidy - modifikujúce enzýmy a to tak, že menia konformáciu ich aktívneho miesta a antibiotikum nie je schopné naviazať svoju cieľovú molekulu (Santajit *et al.* 2016).

Gramnegatívna *Pseudomonas aeruginosa* disponuje dvojzložkovým systémom CreBC, reagujúcim na β -laktámové antibiotiká aktiváciou expresie génu kódujúceho AmpC β -laktamázu (Zamorano *et al.* 2014). Druh *Aeromonas* využíva BlrAB, dvojzložkový systém analogický k CreBC, ktorý sa podieľa na regulácii troch typov β -laktamáz. Predpokladá sa, že ligand spúšťajúci aktivitu histidínovej kinázy BlrB môže byť nejaká časť zložky bunkovej steny, ktorej koncentrácia stúpa pri kontakte s β -laktámovými antibiotikami. Po prijatí stimulu z vonkajšieho prostredia nasleduje klasický mechanizmus fosfátového transferu na regulátor odpovede BlrA a regulácia transkripcie (Tayler *et al.* 2010).

5.2 Regulácia porínov

Baktérie cez poríny prijímajú veľké množstvo hydrofilných látok vrátane antibiotík. U gramnegatívnych baktérií ich nájdeme vo vonkajšej membráne, u grampozitívnych, ktoré vonkajšou membránou nedisponujú, sa poríny vyskytujú v povrchovej vrstve nad cytoplazmatickou membránou. Poríny sú tvorené štruktúrou β -barrelov s rôznym priemerom otvoru. Reguláciou týchto porínov, ktorými sa do intermembránového priestoru či priamo k povrchu bunky dostávajú aj antibiotiká, môžu baktérie limitovať rozsah kontaktu s ich cieľovými molekulami (Fernández *et al.* 2012). Hlavne poríny slúžiace na efflux sú v tomto kontexte dôležité, nakoľko sa podieľajú na tvorbe tzv. MDR (multiple drug resistance) (Webber *et al.* 2003). Zvýšenú rezistenciu k antibiotikám vyvoláva nadmerná expresia

regulátorov odpovede dvojzložkových systémov, ktoré potom ovplyvňujú transkripciu génov transportných systémov (Hirakawa *et al.* 2003).

V prípade gramnegatívnych baktérií sa často stretáme so systémom EnvZ/OmpR, ktorý je obzvlášť dobre preskúmaný u *Escherichia coli* a reguluje poriny v závislosti od zmien osmolarity prostredia. Najprv dochádza histidín kinázovou aktivitou EnvZ k *trans*-autofosforylácii na histidíne v polohe 243. Odtiaľto je fosfátová skupina prenesená na Asp55 regulátora odpovede OmpR. Ten potom slúži ako transkripčný faktor a reguluje expresiu génov *ompC* a *ompF*. Tieto gény kódujú hlavné proteíny vonkajšej membrány tvoriace poriny. Okrem kinázovej má EnvZ aj fosfatázovú aktivitu a vie teda defosforylovať fosforylovaný OmpR. EnvZ prijíma z okolia signál o zmene osmotických podmienok a tým reguluje pomer medzi svojou kinázovou a fosfatázovou aktivitou. Takto vie bunka regulovať množstvo fosforylovaného OmpR a tým aj génovú expresiu *ompC* a *ompF* (Cai *et al.* 2002). Zníženie expresie *ompC* a *ompF* génov vykazuje zníženie citlivosti k β -laktámovým a ďalším druhom antibiotík (Viveiros *et al.* 2007).

Grampozitívne baktérie reagujú na prítomnosť antibiotík v okolí bunky zvýšením expresie ABC-transportných proteínov. Bakteriocíny sú látky produkované baktériami na zneškodnenie jedincov blízkych druhov. Keďže bakteriocíny produkované bunkou môžu byť pre ňu samotnú škodlivé, musia baktérie kódovať pumpy, ktorými ich transportujú do extracelulárneho priestoru. Túto úlohu zohrávajú ABC-transportéry (z ang. ATP-binding cassette), ktoré na export látok spotrebúvajú ATP.

Staphylococcus aureus kóduje 16 dvojzložkových systémov pričom štyri z toho sú v tesnom susedstve génov pre ABC transportéry. Práve tieto TCS sú asociované s rezistenciou voči antibiotikám. Príkladom takéhoto systému je GraRS. Hoci je známe, že *S.aureus* samotný nekóduje gény pre produkciu antibiotík, využíva za pomoci dvojzložkového systému GraRS regulovaný ABC-transportný proteín VraFG na transport exogénnych antibiotík (Meehl *et al.* 2007). Ďalším príkladom je NsaRS, ktorý spolu s inými TCs reaguje na narušenie bunkového obalu. Pri porušení obalu bunky antibiotikami dochádza k zvýšenej expresii génu *nsaRS*. Samotný dvojzložkový systém sa potom podieľa na vytváraní biofilmu, hrá dôležitú úlohu pri formovaní rezistencie voči bacitracínu a stresových odpovediach na nízín. Zároveň chráni bunku pri kontakte s ľudským imunitným systémom (Kolar *et al.* 2011). Ďalší významný systém je VraRS, ktorý je indukovaný ako primárna odpoveď pri nebezpečenstve prerušenia tvorby bunkovej steny. Je schopný rozpoznať v okolí podmienky, ktoré ohrozujú biosyntézu jej zložiek a tiež má význam v rezistencii voči β -laktámovým antibiotikám (Gardete *et al.* 2006).

5.3 Modifikácia bunkových povrchov

Keďže antibiotiká ako prvé prídu do kontaktu s bunkovými povrchmi (vonkajšia membrána gramnegatívnych a peptidoglykánová bunková stena grampozitívnych baktérií) je cieľom mnohých antibiotík zabrániť biosyntéze ich zložiek, čo je pre baktériu smrteľné.

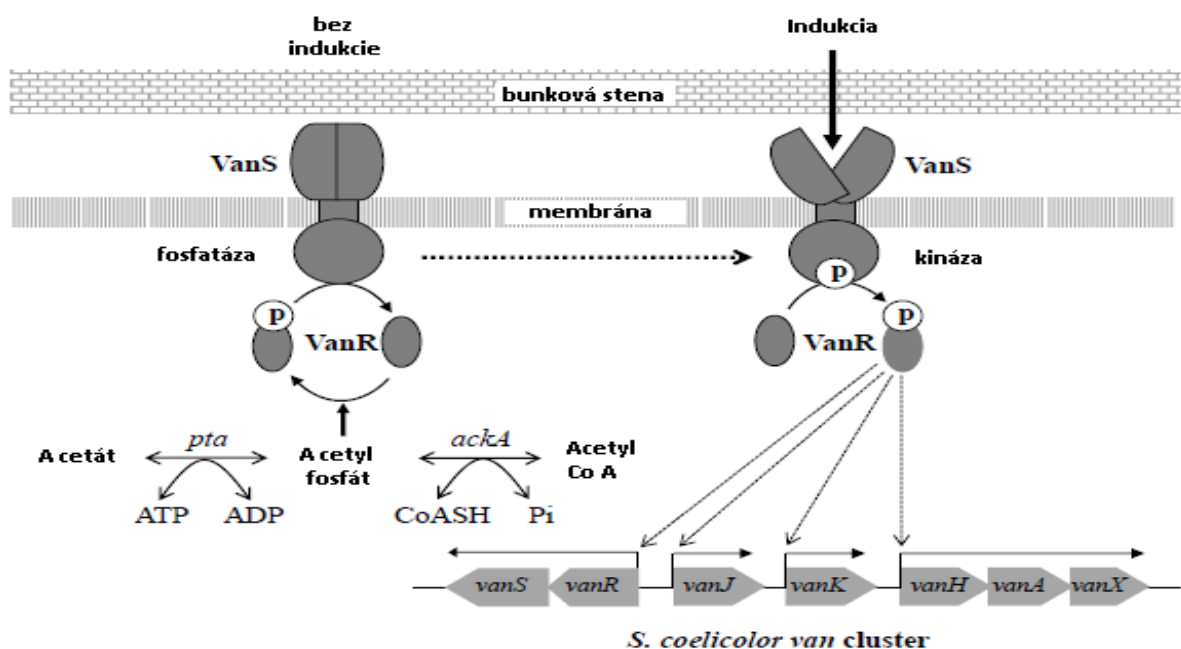
Záporne nabitá vonkajšia membrána gramnegatívnych baktérií je cieľom účinku antibiotík s pozitívnym nábojom ako sú polymyxin, colistín B, aminoglykozidy aj kationové antimikrobiálne peptidy produkované hostiteľskými bunkami (CAMPs – z ang. cationic antimicrobial peptides). Ich interakciou s vonkajšou membránou dochádza k tvorbe neutrálnych oblastí, čo umožňuje vstup antibiotík do periplazmatického priestoru, kde následne vytvárajú póry v cytoplazmatickej membráne a to má za následok rozpad bunky. Aminoglykosidové antibiotiká využívajú rozdiel v náboji na prechod membránou. V bunke sa potom viažu na ribozómy a blokujú tvorbu proteínov, čo je pre baktériu letálne. Záporný náboj vonkajšej membráne dávajú lipopolysacharidy, ktoré obsahujú negatívne nabitý lipid A. Baktérie dokážu viacerými cestami kovalentne modifikovať lipid A, čím menia jeho náboj na pozitívny a zvyšujú tak svoju rezistenciu k antibiotikám (Tierney *et al.* 2019).

PmrA-PmrB a PhoP-PhoQ sú dva najlepšie preskúmané dvojzložkové systémy u viacerých druhov gramnegatívnych baktérií, o ktorých je známe, že sa podieľajú na modifikovaní lipidu A. PmrAB systém reguluje transkripciu viacerých génov, ktoré sprostredkovávajú modifikáciu lipopolysacharidov. Transkripcia týchto génov je indukovaná buď nízkou koncentráciou Mg^{2+} , alebo vysokou hladinou železa, prípadne nízkym pH. Je známe, že PmrA kináza je citlivá k extracelulárnemu Fe^{3+} a nízkemu pH a odpoveď na tieto stimuly vykonáva sama, zatiaľ čo odpoveď na nízke hladiny horčíka je sprostredkovaná ešte jedným dvojzložkovým systémom – PhoPQ. PhoQ kináza po prijatí signálu fosforyluje regulátor PhoP a ten následne spúšťa transkripciu *pmrD* génu, ktorý kontroluje aktivitu PmrA-PmrB systému. V prípade odpovede na vysoké koncentrácie železa alebo nízke pH funguje PmrAB nezávisle na PmrD proteíne (Kox *et al.* 2000).

Gramnegatívna *E.coli* kóduje bakteriálnu tyrozínkinázu Etk, ktorá sa podieľa na produkcii a transporte polysacharidov extracelulárnych aj sacharidových zložiek bakteriálneho obalu (Lee *et al.* 2008). V prostredí, ktoré indukuje rezistenciu k antibiotikám (to znamená prostredie s nízkym pH a nízkou koncentráciou mednatých a železitých kationtov) dochádza k expresii *etk* génu a produkcii Etk kinázy. Etk najprv podlieha autofosforylácii vyššie zmieneným procesom intrafosforylačnej a interfosforylačnej reakcie. Toto stimuluje Etk k následnej fosforylácii Tyr71 dehydrogenázy UDP-glukózy (Ugd). Fosforylácia enzýmu Ugd

vedie k zvýšeniu jeho aktivity, ktorej produktom je UDP-glukurónová kyselina. UDP-glukurónová kyselina sa zúčastňuje syntézy UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabínózy. Jej adíciou na fosfátovú skupinu lipidu A dochádza k zníženiu jeho záporného náboja, čím rastie rezistencia voči kladne nabitým antibiotikám ako je polymyxín aj CAMPs (Lacour *et al.* 2006; Lacour *et al.* 2008). Peptidoglykánová bunková stena baktérií je tvorená striedaním N-acetylglukosamínu (NAG) a N-acetylmurámovej kyseliny (NAM). NAM a NAG tvoria kostru peptidoglykánu a sú pozdĺžne prepojené β -1,4-glykozidickou väzbou. Podjednotky NAM-NAG sú navzájom spojené priečnymi mostíkmi medzi pentapeptidami naviazanými na N-acetylmurámovú kyselinu. Glykopeptidové a β -laktámové antibiotiká sa snažia zabrániť tejto transpeptidačnej reakcii a tým aj syntéze bunkovej steny.

VanRS dvojzložkový systém sa vyskytuje u viacerých druhov grampozitívnych baktérií. V neprítomnosti antibiotika je VanR aktivovaný fosforyláciou acetylfosfátom, ktorý je donorom fosfátovej skupiny. Aktivovaný VanR je schopný indukovať rezistenciu voči antibiotikám, ale v ich neprítomnosti je fosfatázovou aktivitou VanS defosforylovaný a k indukcii nedochádza. V momente kontaktu s antibiotikom a prijatí stimulu sensorovým proteínom VanS, dochádza k zmene jeho aktivity z fosfatázovej na kinázovú, čo vyvolá silnú fosforyláciu VanR, ktorý následne ovplyvňuje transkripciu génov *van* clusteru. Produkty *van* génov znižujú koncentráciu pentapeptidov rozpoznávaných antibiotikami, či napomáhajú vyčerpaniu podjednotiek peptidoglykánu, ktoré obsahujú zvyšky cieľové pre dané antibiotikum aby nedochádzalo k ich degradácii (Novotná *et al.* 2015).



Obrázok č.9 – Schéma dvojzložkového systému VanRS *Streptomyces coelicolor*

Keď VanS neprijíma signál dochádza k cyklickej fosforylácii VanR regulátora pomocou acetylfosfátu a následne jeho defosforylácii VanS fosfatázovou aktivitou. V prípade, že VanS signál prijíma, je jeho kinázovou aktivitou fosforylovaný VanR a ten funguje ako transkripčný faktor a indukuje transkripciu *van* génov (prevzaté a upravené z Novotna *et al.* 2015).

Staphylococcus aureus používa systém PASTA kinázy (Stk1) a jej príbuznej fosfatázy na reguláciu priečneho spájania peptidoglykánových zložiek. Aktivita kinázy a fosfatázy je za normálnych okolností v rovnováhe, ale zistilo sa, že mutanti s deléciou v géne pre príbuznú fosfatázu majú oveľa hrubšiu bunkovú stenu, čo znižuje citlivosť k lyzostafínu. U *S.aureus* slúžia ako priečne spojenia pentaglycínové mostíky. Lyzostafín je glycyglycín endopeptidáza produkovaná príbuzným druhom (*S.simulans*), ktorá tieto mostíky štiepi. Delécia oboch génov však nevyvoláva zvýšenú citlivosť k lyzostafínu a teda je zrejme, že pri inaktivácii tohto primárneho mechanizmu má bunka iné, kompenzačné mechanizmy. Naopak mutanti s deléciou v géne pre kinázu vykazujú zvýšenú citlivosť na β -laktámové antibiotiká. Predpokladá sa, že PASTA motívy tejto kinázy rozpoznávajú pomer spojeného a nespojeného peptidoglykánú a vysielajú signál prostredníctvom fosforylácie ich cytoplazmatickej N-koncovej kinázovej domény (Beltramini *et al.* 2009).

Enterococcus fecalis má Ser/Thr kinázu PASTA eSTKs typu známu ako PrkC, ktorá formuje jeho rezistenciu k antibiotikám cieľujúcim na bunkový obal. PrkC je transmembránového typu, kinázová doména je orientovaná intracelulárne a na extracelárnej doméne nájdeme päť PASTA motívov. Tieto motívy viažu D-Ala-D-Ala sekvenciu, nájdenú na peptidoglykánových zvyškoch, u ktorých nedošlo k priečnému spojeniu. PASTA motívy teda slúžia ako vstup pre signál a regulujú aktivitu výstupnej kinázovej domény. PrkC vie takýmto spôsobom sledovať integritu svojej bunkovej steny a pri jej narušení sa baktéria dokáže prostredníctvom kinázy adaptovať zmenou bunkových aktivít tak, aby si uchovala jednotnosť obalu a obmedzila poškodenie bunkovej steny. Ampicilín patriaci do skupiny β -laktámových antibiotík a širokospektrálne cefalosporíny dokážu svojou aktivitou navodiť signál rozpoznávaný PrkC kinázou (Kristich *et al.* 2007).

6. Záver

Fosforylácia proteínov je dôležitou posttranslačnou úpravou, ktorej význam pre prenos signálu je značný u všetkých domén života. Baktérie sú vďaka rôznym typom fosforylačných systémov schopné regulovať rôzne deje prebiehajúce počas ich životného cyklu a rýchlo reagovať na meniace sa podmienky. V práci bol načrtnutý ich význam v mnohých oblastiach u patogénnych aj nepatogénnych druhov, vrátane regulácie transkripcie génov metabolizmu, bunkového delenia, patogenézy či rezistencie k antibiotikám.

Od objavenia javu fosforylácie u prokaryot bolo získaných mnoho informácií o tom, ako tieto fosforylačné systémy fungujú a aký je ich vplyv na bunku. Hoci je už nespočet mechanizmov podrobne opísaných, je ešte mnoho priestoru pre ďalšie bádanie. Veľa systémov ešte nie je detailne preskúmaných a množstvo ich ostáva neobjavených. Hlavne čo sa týka eSTK kináz, ktoré sú pleiotropnými enzýmami ovplyvňujúcimi rôzne aspekty bakteriálneho života. Ukázalo sa, že eSTKs sú schopné aj priamo interagovať s RNA polymerázou a vplývať tak na transkripciu na oveľa rozsiahlejšej úrovni než sa pôvodne myslelo. Ďalšou zatiaľ málo preskúmanou fosforyláciou je fosforylácia týmito kinázami na arginíne a cysteíne a jej dopad na transkripčné faktory. Priestor na výskum sa ponúka napríklad aj z hľadiska komunikácie medzi rôznymi signálnymi systémami navzájom v tzv. crosstalku a ich regulácii. Fosforylácia má veľký dopad aj na rezistenciu k antibiotikám, ktorá sa stáva stále väčším problémom pre liečbu bakteriálnych ochorení. Determináciou systémov zodpovedných za túto odolnosť a mechanizmus akým pomáhajú baktérii sa brániť či prispôbiť, sa môžu odhaliť možnosti ich zneškodnenia a navrhovať nové, efektívne antibiotiká.

Fosforylácia je stále oblasťou intenzívneho skúmania a s každým ďalším objavom jej význam stúpa. Nakoľko je dnes už jasné, že fosforylácia je fundamentálnym základom adaptácie a prežitia baktérií, nie je prekvapením nevyhnutnosť zamerať sa na jej ďalší výskum. Hoci už bolo získaných mnoho informácií, je stále bohatá škála oblastí, ktoré si zaslúžia ďalšie štúdiá. Vzhľadom na to, že bakteriálne ochorenia sú dennodenne sa objavujúcim problémom, z hľadiska medicíny a liečby je táto oblasť obzvlášť významná.

Zoznam literatúry

*označenie sekundárnych citácií

Alex LA, Simon MI. Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet.* 1994 Apr;10(4):133-8*

Bischoff M, Brelle S, Minatelli S, Molle V. Stk1-mediated phosphorylation stimulates the DNA-binding properties of the *Staphylococcus aureus* SpoVG transcriptional factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 May 13;473(4):1223-1228

Bonne K hler, J., Jers, C., Senissar, M., Shi, L., Derouiche, A. and Mijakovic, I. (2020), Importance of protein Ser/Thr/Tyr phosphorylation for bacterial pathogenesis. *FEBS Lett*, 594: 2339-2369*

Burnett G, Kennedy EP.; The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem.* 1954 Dec;211(2):969-80

Burnside K, Lembo A, de Los Reyes M, Iliuk A, Binhtran NT, Connelly JE, Lin WJ, Schmidt BZ, Richardson AR, Fang FC, Tao WA, Rajagopal L. Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase. *PLoS One.* 2010 Jun 11;5(6):e11071

Cai SJ, Inouye M. EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2002 Jul 5;277(27):24155-61

Cozzone AJ, Grangeasse C, Doublet P, Duclos B. Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria. *Arch Microbiol.* 2004 Mar;181(3):171-81*

Didier JP, Cozzone AJ, Duclos B. Phosphorylation of the virulence regulator SarA modulates its ability to bind DNA in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* 2010 May;306(1):30-6

Dworkin J. Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2015 Apr;24:47-52*

Beilharz K, Nov kov  L, Fadda D, Branny P, Massidda O, Veening JW. Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Apr 10;109(15):E905-13

- Falk SP, Weisblum B. Phosphorylation of the *Streptococcus pneumoniae* cell wall biosynthesis enzyme MurC by a eukaryotic-like Ser/Thr kinase. *FEMS Microbiol Lett.* 2013 Mar;340(1):19-23
- Fernández L, Hancock RE. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2012 Oct;25(4):661-81*
- Fleurie A, Lesterlin C, Manuse S, Zhao C, Cluzel C, Lavergne JP, Franz-Wachtel M, Macek B, Combet C, Kuru E, VanNieuwenhze MS, Brun YV, Sherratt D, Grangeasse C. MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature.* 2014 Dec 11;516(7530):259-262
- Fleurie, A., Cluzel, C., Guiral, S., Freton, C., Galisson, F., Zanella-Cleon, I., Di Guilmi, A.-M. and Grangeasse, C. (2012), Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 83: 746-758
- Galyov EE, Håkansson S, Wolf-Watz H. Characterization of the operon encoding the YpkA Ser/Thr protein kinase and the YopJ protein of *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol.* 1994 Aug;176(15):4543-8
- Gardete S, Wu SW, Gill S, Tomasz A. Role of VraSR in antibiotic resistance and antibiotic-induced stress response in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Oct;50(10):3424-34
- Ge J, Xu H, Li T, Zhou Y, Zhang Z, Li S, Liu L, Shao F. A *Legionella* type IV effector activates the NF-kappaB pathway by phosphorylating the IkappaB family of inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 18;106(33):13725-30
- Getz LJ, Runte CS, Rainey JK, Thomas NA. Tyrosine Phosphorylation as a Widespread Regulatory Mechanism in Prokaryotes. *J Bacteriol.* 2019 Sep 6;201(19):e00205-19*
- Grangeasse C, Doublet P, Cozzone AJ. Tyrosine phosphorylation of protein kinase Wzc from *Escherichia coli* K12 occurs through a two-step process. *The Journal of Biological Chemistry.* 2002 Mar;277(9):7127-7135
- Grangeasse C, Nessler S, Mijakovic I. Bacterial tyrosine kinases: evolution, biological function and structural insights. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012 Sep 19;367(1602):2640-55*
- Grangeasse C, Obadia B, Mijakovic I, Deutscher J, Cozzone AJ, Doublet P. Autophosphorylation of the *Escherichia coli* protein kinase Wzc regulates tyrosine

phosphorylation of Ugd, a UDP-glucose dehydrogenase. *J Biol Chem.* 2003 Oct 10;278(41):39323-9

Grangeasse C, Terreux R, Nessler S. Bacterial tyrosine-kinases: structure-function analysis and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Mar;1804(3):628-34*

Groisman EA. Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. *Annu Rev Microbiol.* 2016 Sep 8;70:103-24.*

Hirakawa H, Nishino K, Hirata T, Yamaguchi A. Comprehensive studies of drug resistance mediated by overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2003 Mar;185(6):1851-6

Chao JD, Wong D, Av-Gay Y. Microbial protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 2014 Apr 4;289(14):9463-72.*

Inouye S, Nariya H. Dual regulation with Ser/Thr kinase cascade and a His/Asp TCS in *Myxococcus xanthus*. *Adv Exp Med Biol.* 2008;631:111-21

Juris SJ, Rudolph AE, Huddler D, Orth K, Dixon JE. A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 15;97(17):9431-6

Kang CM, Abbott DW, Park ST, Dascher CC, Cantley LC, Husson RN. The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes Dev.* 2005 Jul 15;19(14):1692-704

Kang CM, Nyayapathy S, Lee JY, Suh JW, Husson RN. Wag31, a homologue of the cell division protein DivIVA, regulates growth, morphology and polar cell wall synthesis in mycobacteria. *Microbiology (Reading).* 2008 Mar;154(Pt 3):725-735

Kolar SL, Nagarajan V, Oszmiana A, Rivera FE, Miller HK, Davenport JE, Riordan JT, Potempa J, Barber DS, Koziel J, Elasri MO, Shaw LN. NsaRS is a cell-envelope-stress-sensing two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology (Reading).* 2011 Aug;157(Pt 8):2206-2219

Kox LF, Wösten MM, Groisman EA. A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. *The EMBO Journal.* 2000 Apr;19(8):1861-1872

Kristich CJ, Wells CL, Dunny GM. A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in *Enterococcus faecalis* mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 27;104(9):3508-13

Lacour S, Bechet E, Cozzone AJ, Mijakovic I, Grangeasse C. Tyrosine phosphorylation of the UDP-glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* is at the crossroads of colanic acid synthesis and polymyxin resistance. *PLoS One*. 2008 Aug 25;3(8):e3053

Lacour S, Doublet P, Obadia B, Cozzone AJ, Grangeasse C. A novel role for protein-tyrosine kinase Etk from *Escherichia coli* K-12 related to polymyxin resistance. *Res Microbiol*. 2006 Sep;157(7):637-41

Lee DC, Zheng J, She YM, Jia Z. Structure of *Escherichia coli* tyrosine kinase Etk reveals a novel activation mechanism. *EMBO J*. 2008 Jun 18;27(12):1758-66

Libby EA, Goss LA, Dworkin J. The Eukaryotic-Like Ser/Thr Kinase PrkC Regulates the Essential WalRK Two-Component System in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet*. 2015 Jun 23;11(6)

Lomas-Lopez R, Paracuellos P, Riberty M, Cozzone AJ, Duclos B. Several enzymes of the central metabolism are phosphorylated in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2007 Jul;272(1):35-42

Majdalani N, Gottesman S. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol*. 2005;59:379-405*

Meehl M, Herbert S, Götz F, Cheung A. Interaction of the GraRS two-component system with the VraFG ABC transporter to support vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Aug;51(8):2679-89

Morona JK, Paton JC, Miller DC, Morona R. Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*. 2000 Mar;35(6):1431-42

Navarro L, Koller A, Nordfelth R, Wolf-Watz H, Taylor S, Dixon JE. Identification of a molecular target for the *Yersinia* protein kinase A. *Mol Cell*. 2007 May 25;26(4):465-77

Nourikyan J, Kjos M, Mercy C, Cluzel C, Morlot C, Noirot-Gros MF, Guiral S, Lavergne JP, Veening JW, Grangeasse C. Autophosphorylation of the Bacterial Tyrosine-Kinase CpsD Connects Capsule Synthesis with the Cell Cycle in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Genet*. 2015 Sep 17;11(9):e1005518

Novotna GB, Kwun MJ, Hong HJ. In Vivo Characterization of the Activation and Interaction of the VanR-VanS Two-Component Regulatory System Controlling Glycopeptide Antibiotic Resistance in Two Related Streptomyces Species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Dec 28;60(3):1627-37

Ortiz-Lombardía M, Pompeo F, Boitel B, Alzari PM. Crystal structure of the catalytic domain of the PknB serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*. 2003 Apr 11;278(15):13094-100

Pensing DA, Boldon KM, Chen GY, Vincent WJB, Sherman K, Xiong M, et al. (2016) The *Listeria monocytogenes* PASTA Kinase PrkA and Its Substrate YvcK Are Required for Cell Wall Homeostasis, Metabolism, and Virulence. *PLoS Pathog* 12(11)

Pereira SF, Goss L, Dworkin J. Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011 Mar;75(1):192-212*

Pietack N, Becher D, Schmidl SR, Saier MH, Hecker M, Commichau FM, Stülke J. In vitro phosphorylation of key metabolic enzymes from *Bacillus subtilis*: PrkC phosphorylates enzymes from different branches of basic metabolism. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2010;18(3):129-40

Pompeo F, Foulquier E, Serrano B, Grangeasse C, Galinier A. Phosphorylation of the cell division protein GpsB regulates PrkC kinase activity through a negative feedback loop in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 2015 Jul;97(1):139-50

Pompeo F, Freton C, Wicker-Planquart C, Grangeasse Ch, Jault JM, Galinier A. (2012). Phosphorylation of CpgA Protein Enhances Both Its GTPase Activity and Its Affinity for Ribosome and Is Crucial for *Bacillus subtilis* Growth and Morphology. *The Journal of biological chemistry*. 287. 20830-8. 10

Rajagopal L, Vo A, Silvestroni A, Rubens CE. Regulation of purine biosynthesis by a eukaryotic-type kinase in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol*. 2005 Jun;56(5):1329-46

Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2475067*

Shi L, Ji B, Kolar-Znika L, Boskovic A, Jadeau F, Combet C, Grangeasse C, Franjevic D, Talla E, Mijakovic I. Evolution of bacterial protein-tyrosine kinases and their relaxed specificity toward substrates. *Genome Biol Evol*. 2014 Apr;6(4):800-17

- Soulat D, Jault JM, Duclos B, Geourjon C, Cozzone AJ, Grangeasse C. Staphylococcus aureus operates protein-tyrosine phosphorylation through a specific mechanism. *J Biol Chem*. 2006 May 19;281(20):14048-56
- Stock, A.M., Robinson, V.L. and Goudreau, P.N. (2000) Two Component Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69, 183-215*
- Manuse S, Fleurie A, Zucchini L, Lesterlin C, Grangeasse C. Role of eukaryotic-like serine/threonine kinases in bacterial cell division and morphogenesis. *FEMS Microbiol Rev*. 2016 Jan;40(1):41-56*
- Taylor AE, Ayala JA, Niumsup P, Westphal K, Baker JA, Zhang L, Walsh TR, Wiedemann B, Bennett PM, Avison MB. Induction of beta-lactamase production in *Aeromonas hydrophila* is responsive to beta-lactam-mediated changes in peptidoglycan composition. *Microbiology (Reading)*. 2010 Aug;156(Pt 8):2327-2335
- Tierney AR, Rather PN. Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance. *Future Microbiol*. 2019 Apr;14(6):533-552*
- Truong-Bolduc QC, Ding Y, Hooper DC. Posttranslational modification influences the effects of MgrA on norA expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2008 Nov;190(22):7375-81
- Vincent C, Duclos B, Grangeasse C, Vaganay E, Riberty M, Cozzone AJ, Doublet P. Relationship between exopolysaccharide production and protein-tyrosine phosphorylation in gram-negative bacteria. *J Mol Biol*. 2000 Dec 1;304(3):311-21
- Viveiros M, Dupont M, Rodrigues L, Couto I, Davin-Regli A, Martins M, Pagès JM, Amaral L. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PLoS One*. 2007 Apr 11;2(4):e365
- Webber MA, Piddock LJ. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Jan;51(1):9-11*
- Whitmore SE, Lamont RJ. Tyrosine phosphorylation and bacterial virulence. *Int J Oral Sci*. 2012 Mar;4(1):1-6*
- Wright DP, Ulijasz AT. Regulation of transcription by eukaryotic-like serine-threonine kinases and phosphatases in Gram-positive bacterial pathogens. *Virulence*. 2014;5(8):863-85*

Yang Z, Zhou X, Ma Y, Zhou M, Waldor MK, Zhang Y, Wang Q. Serine/threonine kinase PpkA coordinates the interplay between T6SS2 activation and quorum sensing in the marine pathogen *Vibrio alginolyticus*. *Environ Microbiol*. 2018 Feb;20(2):903-919

Zamorano L, Moyà B, Juan C, Mulet X, Blázquez J, Oliver A. The *Pseudomonas aeruginosa* CreBC two-component system plays a major role in the response to β -lactams, fitness, biofilm growth, and global regulation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Sep;58(9):5084-95