

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie**

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Spr0334, nový protein buněčného dělení u *Streptococcus pneumoniae*
Spr0334, new protein of cell division in *Streptococcus pneumoniae*

Bc. Nela Štekerová

Školitel: RNDr. Linda Nováková, Ph.D.

Praha 2012

Tato diplomová práce byla vypracována v Mikrobiologickém ústavu AV ČR v laboratoři Buněčné signalizace pod odborným vedením **RNDr. Lindy Novákové, Ph.D.**

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Lindy Novákové, Ph.D. s použitím pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury. Tato práce ani podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 22.08.2012

Nela Štekerová

Práce vznikla v letech 2010 - 2012 v rámci grantových projektů P204/07/082, P302/12/0256 a P207/12/1568 za podpory Grantové agentury České republiky a grantového projektu IAA600200801 za podpory Grantové agentury Akademie věd.

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce Lindě Novákové za veškeré rady, které mi vždy dala, za odborné vedení v laboratoři a hlavně za trpělivost při sepisování diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat Pavlu Brannymu a celému kolektivu Laboratoře buněčné signalizace za všestrannou pomoc a velmi přátelské prostředí

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům a příteli Jakubovi za podporu, když jsem ji nejvíce potřebovala, za lásku a také důvěru.

Spr0334, new protein of cell division in *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae is an important human pathogen. The genome of this bacteria encodes a single gene for eukaryotic-like serine / threonine protein kinase called StkP. StkP regulates many physiological processes such as pathogenesis, competence for genetic transformation, resistance to various stresses and resistance to antibiotics. It also affects the transcription of many genes involved in cell wall biosynthesis, pyrimidine metabolism, DNA repair and iron uptake. Recent studies have shown that StkP is located in the cell division septum and significantly regulates cell division and morphology. Its substrates include, among others, cell division protein DivIVA, FtsZ and FtsA.

Analysis of phosphoproteome maps of wild type and $\Delta stkP$ mutant strain of *S. pneumoniae* showed that *in vivo* StkP phosphorylates several putative substrates including the protein Spr0334. Mass spectrometry analysis identified phosphorylation sites of the protein Spr0334: threonine 67 and threonine 78. Furthermore, it was found that the protein Spr0334 is located in the cell division septum, which led to the hypothesis that it could be newly identified cell division protein in *S. pneumoniae*.

The main aim of this thesis was to describe the function of the hypothetical protein Spr0334 in *S. pneumoniae* and determine the effect of phosphorylation on its activity. By deletion of the gene *spr0334*, we created a mutant strain of *S. pneumoniae*, which we further characterised. We found out that deletion of the gene for protein Spr0334 results in production of small round cells with frequent presence of minicells that often do not contain any DNA.

Furthermore, we prepared constructs for complementation of *spr0334* deletion in *S. pneumoniae*. We created complementation strains of *S. pneumoniae* carrying wild type or mutant allele of the gene *spr0334* under inducible zinc-promoter in dispensable *bgaA* locus. We performed amino acid exchange of T67 and T78 for neutral alanine, thus creating phosphoablative form of Spr0334, which can not be phosphorylated. We studied the expression and phosphorylation of both, native and phosphoablative, forms of Spr0334 in *S. pneumoniae* and we confirmed that the amino acids T67 and T78 are phosphorylation sites of protein Spr0334 *in vivo*. Phenotypic studies of these strains showed that the phosphoablative protein Spr0334 is active and can compensate for *spr0334* deletion. Thus, phosphorylation is not essential for Spr0334 activity.

Finally, we created strains of *S. pneumoniae* carrying fusion gene *gfp-spr0334* under inducible promoter in dispensable *bgaA* locus. Using fluorescence microscopy, we observed localization of this protein in the wild type background, in strain $\Delta spr0334$ and in strain $\Delta stkP$, in which substrates of StkP are not phosphorylated. We found that protein GFP-Spr0334 is localized predominantly in the cell division septa, and this localization is not significantly altered depending on its phosphorylation state.

In conclusion, our findings indicate that protein Spr0334 is a cell division protein that affects cell morphology and participates in selection of cell division site and/or chromosome segregation in *S. pneumoniae* by yet unknown mechanism.

Keywords: Spr0334, serine/threonine protein kinase, cell division, *Streptococcus pneumoniae*, phosphorylation.

Spr0334, nový protein buněčného dělení u *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae je významný lidský patogen. Tato bakterie kóduje ve svém genomu jediný gen pro serin/threoninovou proteinkinasu eukaryotního typu nazvanou StkP. StkP reguluje mnoho fyziologických procesů, jako např. patogenezi, kompetenci pro genetickou transformaci, rezistenci k různým druhům stresů a rezistenci k antibiotikům. Rovněž ovlivňuje transkripci celé řady genů účastnících se biosyntézy buněčné stěny, pyrimidinového metabolismu, oprav DNA a příjmu železa. Současné studie ukázaly, že StkP je lokalizována v buněčné přepážce a významným způsobem reguluje buněčné dělení a morfologii. Mezi její substráty patří mimo jiné proteiny buněčného dělení DivIVA, FtsZ a FtsA.

Porovnáním fosfoproteomových map divokého kmene a kmene $\Delta stkP$ *S. pneumoniae* bylo prokázáno, že StkP *in vivo* fosforyluje několik substrátů, mezi něž patří i membránový protein Spr0334. Hmotnostní spektrometrií byla určena místa fosforylace proteinu Spr0334, a to threonin 67 a threonin 78. Dále bylo zjištěno, že je protein Spr0334 lokalizován v buněčné přepážce, což vedlo k hypotéze, že by mohl být dalším proteinem buněčného dělení u *S. pneumoniae*.

Hlavním záměrem této diplomové práce bylo přiblížit funkci neznámého proteinu Spr0334 u *S. pneumoniae* a zjistit vliv fosforylace na jeho aktivitu. Delecí genu *spr0334* jsme vytvořili mutantní kmen *S. pneumoniae*, který jsme dále charakterizovali. Zjistili jsme, že delece genu pro protein Spr0334 má za následek tvorbu menších kulatých buněk s častým výskytem minibuněk, které často neobsahují žádnou DNA.

Dále jsme připravili konstrukty pro komplementaci delece *spr0334* u *S. pneumoniae*. Vytvořili jsme komplementační kmeny *S. pneumoniae* nesoucí v *bgaA* lokusu divokou a mutovanou alelu genu *spr0334* pod inducibilním zinkovým promotorem. Mutovaná forma genu pro protein Spr0334 měla zaměněné aminokyseliny T67 a T78 za neutrální aminokyselinu alanin, která nemůže být fosforylována. Studovali jsme expresi a fosforylaci nativního a fosfoablativního proteinu Spr0334 u *S. pneumoniae* a potvrdili jsme, že T67 a T78 jsou místa fosforylace proteinu Spr0334 *in vivo*. Studie fenotypu těchto kmenů ukázala, že defosforylovaný protein Spr0334 je schopný plně zastávat svou funkci.

Nakonec jsme vytvořili kmeny *S. pneumoniae* nesoucí v *bgaA* lokusu gen pro protein Spr0334 fúzovaný na N-konci s GFP. Pomocí fluorescenční mikroskopie jsme

pozorovali lokalizaci tohoto proteinu na pozadí divokého kmene, v kmeni $\Delta spr0334$ a v kmeni s deletovaným genem pro StkP, ve kterém nejsou substráty StkP fosforylovány. Zjistili jsme, že protein GFP-Spr0334 je lokalizován převážně v buněčné přepážce a tato lokalizace se významně nemění v závislosti na jeho stavu fosforylace.

Z našich poznatků vyplývá, že protein Spr0334 je proteinem buněčného dělení, který ovlivňuje morfologii buněk a účastní se výběru budoucího místa dělení či segregace chromosomů u *S. pneumoniae* dosud neznámým mechanismem.

Klíčová slova: Spr0334, serin/threoninová proteinkinasa, buněčné dělení, *Streptococcus pneumoniae*, fosforylace

OBSAH

1	Úvod	12
2	Literární přehled	14
2.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	14
2.1.1	<i>Virulenční faktory</i>	15
2.1.2	<i>Vývoj vakcín</i>	19
2.1.3	<i>Kompetence</i>	21
2.2	Buněčné dělení u <i>S. pneumoniae</i>	23
2.2.1	<i>Segregace chromosomů u S. pneumoniae</i>	24
2.2.2	<i>Syntéza buněčné stěny u S. pneumoniae</i>	24
2.3	Fosforylace proteinů u <i>S. pneumoniae</i>	28
2.3.1	<i>Dvousložkové systémy u S. pneumoniae</i>	28
2.3.2	<i>Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu (ESTPK)</i>	30
2.4	Ser/Thr proteinkinasy s PASTA doménami	31
2.4.1	<i>Ser/Thr proteinkinasy gram-pozitivních koků</i>	33
2.5	Proteinkinasa StkP <i>S. pneumoniae</i>	36
2.5.1	<i>Substráty proteinkinasy StkP</i>	39
2.6	Proteinfosfátasa PhpP <i>S. pneumoniae</i>	42
3	Materiál a metody	44
3.1	Materiál	44
3.1.1	<i>Bakteriální kmeny</i>	44
3.1.2	<i>Vektory</i>	44
3.1.3	<i>Půdy a média</i>	45
3.1.4	<i>Pufry a roztoky</i>	46
3.1.5	<i>Chemikálie</i>	48
3.1.6	<i>Enzymy</i>	49
3.1.7	<i>Protilátky</i>	50
3.1.8	<i>Komerční soupravy a standardy</i>	50
3.1.9	<i>Počítačová analýza</i>	50
3.1.10	<i>Použité oligonukleotidy</i>	51
3.2	Metody	53
3.2.1	<i>Manipulace s DNA</i>	53
3.2.2	<i>Manipulace s RNA</i>	56
3.2.3	<i>Manipulace s proteiny</i>	57
3.2.4	<i>Manipulace s E. coli</i>	59
3.2.5	<i>Manipulace se S. pneumoniae</i>	60

3.2.6	Mikroskopie.....	65
4	Výsledky	67
4.1	Příprava kmene <i>Streptococcus pneumoniae</i> $\Delta spr0334$	70
4.2	Analýza transkripce genů v předpokládaném operonu <i>spr0331-spr0337</i>	72
4.3	Charakterizace mutanta $\Delta spr0334$	74
4.3.1	Růst mutanta $\Delta spr0334$ v komplexním médiu.....	75
4.3.2	Citlivost mutanta $\Delta spr0334$ k různým druhům stresů	75
4.3.3	Citlivost mutanta $\Delta spr0334$ k antibiotikům působícím na buněčnou stěnu	79
4.3.4	Testování přirozené a CSP indukované kompetence mutanta $\Delta spr0334$	81
4.3.5	Morfologie mutanta $\Delta spr0334$	81
4.4	Komplementace mutace $\Delta spr0334$ a analýza fosforylovaných zbytků in vivo ..	85
4.4.1	Příprava kmene <i>S. pneumoniae</i> Sp60 a Sp65	85
4.4.2	Charakterizace kmene Sp60 a Sp65.....	90
4.5	Lokalizace proteinu Spr0334 ve <i>Streptococcus pneumoniae</i>	100
4.5.1	Příprava kmenů Sp59 a Sp58.....	100
4.6	Charakterizace fenotypu kmenů Sp45 a Sp59.....	106
4.6.1	Morfologie kmene Sp45	106
4.6.2	Morfologie kmene Sp59	110
5	Diskuze	113
5.1	Charakterizace funkce proteinu Spr0334	113
5.2	Analýza předpokládného operonu <i>spr0331-spr0337</i>	114
5.3	Vliv fosforylace na funkci proteinu Spr0334	116
5.4	Lokalizace Spr0334 v buňce	117
5.5	Vztah mezi Ser/Thr proteinkinasou StkP a jejím substrátem Spr0334.....	118
6	Souhrn	120
7	Seznam použité literatury	122

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AK	aminokyselina
ATB	antibiotikum
bp	páry bazí
BSA	hovězí serumalbumin
CPSs	polysacharidy pouzdra
CSP	peptid stimulující kompetenci
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ESTPK	Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu
ESTP	Ser/Thr proteinfosfataza eukaryotického typu
GFP	zelený fluorescenční protein
GI	gastrointestinální trakt
GAS	streptokoci skupiny A
GBS	streptokoci skupiny B
His tag	histidinová kotva
HLP	histone-like-protein
ChK	Cheshire kazeta
chr. DNA	chromozomální DNA
mRNA	messenger RNA
OD ₆₀₀	optická denzita při 600 nm
PASTA	domény nacházející se u penicilin vazebných proteinů a některých Ser/Thr proteinkinás
PBP _s	penicilin vazebné proteiny
PCR	polymerázová řetězová reakce
pThr	fosforylovaný threonin
PVDF	polyvinilidendifluorid
RE	restrikční endonukleasa
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	revolutions per minute
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS
T67	threonin na pozici 67
T78	threonin na pozici 78
TCS	dvousložkový systém
WT	divoký typ (wild type)

1 Úvod

Každá buňka, ať eukaryotní či prokaryotní, se musí vyrovnávat se změnami vnějšího prostředí. Rychlá reakce na změnu vnějších podmínek je nutná k přežití nejen jednotlivé buňky, ale i celé bakteriální populace. Z tohoto důvodu bakterie vyvinuly řadu sofistikovaných mechanismů pro přenos signálu a vzájemnou komunikaci.

Jedním z klíčových mechanismů přenosu signálu v buňce je fosforylace a defosforylace proteinů. Fosforylace je reverzibilní kovalentní posttranslační modifikace proteinu katalyzována enzymy proteinkinasami. Defosforylace je opačný proces, kdy dochází k odštěpení fosfátové skupiny pomocí proteinfosfatas. Dlouhou dobu přetrvávala domněnka, že u prokaryot jsou za přenos signálu zodpovědné hlavně dvousložkové systémy. Koncem 80. let 20. století byla u prokaryot prokázána přítomnost ATP dependentních Ser/Thr proteinkinas eukaryotického typu, jejichž význam neustále roste. Tyto proteinkinasy jsou v bakteriální říši široce rozšířené a bylo zjištěno, že mají značný význam pro růst, diferenciaci, patogenitu či sekundární metabolismus.

Významný lidský patogen *Streptococcus pneumoniae* se stal vhodným modelovým organismem pro studium Ser/Thr proteinkinas eukaryotického typu díky tomu, že ve svém genomu kóduje jedinou Ser/Thr proteinkinasu StkP a jedinou Ser/Thr proteinfosfatasu typu PP2C PhpP (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2005). Proteinkinasa StkP patří do skupiny konzervovaných proteinkinas, které nesou cytoplazmatickou kinázovou doménu a extracelulární receptorovou doménu skládající se z několika kopií tzv. PASTA domén (YEATS *et al.*, 2002). Tyto PASTA domény jsou schopné vázat β -laktamový kruh a tedy i strukturní analog koncový D-alanyl-D-alanin peptidoglykanového prekursoru. Jak se ukázalo, právě peptidoglykanové prekurzory jsou signálem pro aktivaci některých Ser/Thr proteinkinas (SHAH *et al.*, 2008; MAESTRO *et al.*, 2011). U *S. pneumoniae* má tato aktivace za následek lokalizaci StkP do místa nově vznikající buněčné přepážky, kde může regulovat buněčné dělení fosforylací svých substrátů (BEILHARZ *et al.*, 2012). Správné umístění a načasování stavby buněčné přepážky a regulace syntézy buněčné stěny jsou pro životaschopnost bakterie nezbytnými ději a zřejmě právě proto je StkP také důležitým faktorem, který ovlivňuje virulenci *S. pneumoniae* (ECHENIQUE *et al.*, 2004). Charakterizace substrátů StkP je nezbytná pro pochopení signálních drah, které tento enzym řídí či ovlivňuje.

Porovnáním fosfoproteomu divokého kmene *S. pneumoniae* a kmene *S. pneumoniae* $\Delta stkP$ bylo *in vivo* identifikováno několik substrátů proteinkinasy StkP. Jedním z těchto substrátů je i membránový protein Spr0334 (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010).

Hlavním záměrem této diplomové práce bylo přiblížit funkci neznámého proteinu Spr0334 a zjistit vliv fosforylace na jeho aktivitu. Za tímto účelem byly stanoveny následující cíle:

1. Vytvořit mutantní kmen *S. pneumoniae* $\Delta spr0334$ a charakterizovat jeho fenotyp
2. Zjistit, zda jsou aminokyselinové zbytky T67 a T78 proteinu Spr0334 fosforylovány *in vivo*
3. Objasnit vliv fosforylace na funkci či aktivitu proteinu Spr0334 prostřednictvím jeho mutageneze
4. Určit lokalizaci proteinu Spr0334 v buňce a objasnit vliv fosforylace na jeho lokalizaci

2 Literární přehled

2.1 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae náleží do kmene *Firmicutes*, čeledě *Streptococcaceae*, rodu *Streptococcus*. Do kmene *Firmicutes* patří gram-pozitivní bakterie a bakterie bez buněčné stěny.

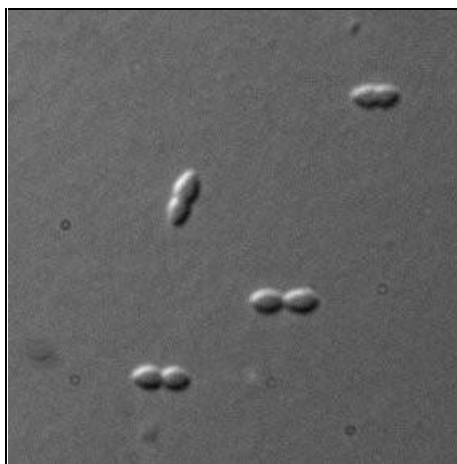
Rod *Streptococcus* zahrnuje širokou škálu gram-pozitivních koků tvořících krátké řetízky nebo páry buněk. Streptokoky jsou fakultativně anaerobní bakterie. Podle změn krevního agaru se dělí na α -, β - a γ -hemolytické. V případě označení γ -hemolýza jde o označení nevhodné, které se používá pro nehemolytické streptokoky, jako je např. *S. bovis*. β -hemolýza, označovaná též jako úplná hemolýza, se projevuje projasněním agaru v okolí kolonií, což je způsobeno tvorbou bakteriálních hemolysinů zapříčiňujících lyzi erytrocytů. Mezi β -hemolytické streptokoky patří např. *S. pyogenes*. α -hemolytické streptokoky produkují peroxid vodíku, který konvertuje hemoglobin na verdoglobin. Verdoglobin způsobuje nazelenalé zbarvení agaru v okolí kolonií nazývané též viridace. Mezi tyto streptokoky patří *S. pneumoniae*, který je jako jediný ze skupiny α -hemolytických streptokoků citlivý k optochinonu a žluči.

S. pneumoniae byl objeven a popsán v roce 1881 nezávisle na sobě Louisem Pasteurem a Georgem Millerem Sternbergem. Tato bakterie je významným lidským patogenem.

Buňky *S. pneumoniae* mají charakteristický lancetovitý tvar a nejčastěji se vyskytují ve dvojicích. Z tohoto důvodu je *S. pneumoniae* také označován jako „diplokokus“ (obr. 2-1). Na krevním agaru tvoří drobné průhledné kolonie obklopené zónou hemolýzy typu α . Diplokok se vyskytuje ve dvou morfologicky odlišných formách. Opouzdřená virulentní forma bakterie vyrůstá na krevním agaru v hladkých koloniích ve fázi S (Smooth = hladký), kdy jsou kolonie hlenovité konzistence a vypadají jako kapky oleje. Neopouzdřená nevirulentní forma bakterie vyrůstá v koloniích ve fázi R (Rough = drsný). Tyto kolonie mají drsný povrch s propadlým středem.

Nevirulentní formy pneumokoka bez pouzdra kolonizují horní cesty dýchací, kde jsou součástí přirozené mikroflóry (MORONA *et al.*, 2003). Bakteriální formy s vytvořeným pouzdrem jsou vysoce virulentní. Polysacharidové pouzdro je hlavním virulenčním faktorem a zároveň i nejvýraznějším antigenem (MORONA *et al.*, 2000). Podle typu pouzdrného antigenu rozlišujeme více než devadesát sérotypů *S. pneumoniae*.

Tyto virulentní opouzdřené formy způsobují záněty horních cest dýchacích, převážně nosohltanu a nosních dutin, a záněty středního ucha. Mohou ale způsobit i mnohem závažnější onemocnění, jako je pneumonie, sepse a meningitida (GILLESPIE a BALAKRISHNAN, 2000).



Obr. 2-1: mikroskopický snímek *Streptococcus pneumoniae*

Snímek byl pořízen pomocí světelného mikroskopu Olympus BX-60 za použití olejového imerzního objektivu UplanApo 100x/1,35 Oil Iris. Diferenciální interferenční kontrast podle Nomarskeho (DIC).
zvětšení 135x

2.1.1 Virulenční faktory

S. pneumoniae se v lidském těle vyskytuje jako komenzál horních cest dýchacích, převážně nosohltanu. Nosohltan zajišťuje pneumokokovi nejvhodnější růstové podmínky a při selhání obranných mechanismů hostitele, nejčastěji způsobeném jiným onemocněním, i snadné pronikání do dolních cest dýchacích a poté i do krve (ORIHUELA *et al.*, 2004). Jakmile se bakterie dostane do krevního oběhu, může infekce vyústit v sepsi či zánět mozkových blan. Přestože jsou tyto infekce léčeny antibiotiky, mají často letální následky (BALAKRISHNAN *et al.*, 2000).

S. pneumoniae produkuje řadu kolonizačních a virulenčních faktorů, které jsou nutné k adhezi bakterie na sliznici a následné invazi do tkání. Stále vzrůstající počet analyzovaných genomových sekvencí odhalil, že jednotlivé kmeny pneumokoků se liší v produkci virulenčních faktorů. Odhalení role jednotlivých virulenčních faktorů nám dovolu je pochopit patogenезi infekce, což může být využito k určení možných bodů zásahu pro léčbu či vakcinaci. Rozdělení virulenčních faktorů mezi jednotlivými kmeny pneumokoků vytváří spojení mezi těmito faktory a schopností pneumokoka vyvolat různé

typy onemocnění (MITCHELL a MITCHELL, 2010). Jednotlivé virulenční faktory jsou popsány v následujících podkapitolách.

2.1.1.1 Polysacharidové pouzdro

Polysacharidové pouzdro je pravděpodobně nejdůležitějším pneumokokovým virulenčním faktorem. Pouzdro je velmi důležité pro schopnost bakterie kolonizovat slizniční povrchy, chrání bakterii před uvíznutím v hlenu, který mechanicky chrání sliznici dýchacích cest (NELSON *et al.*, 2007), zabraňuje fagocytóze (JONSSON *et al.*, 1985) a může také omezit autolýzu a snížit působení antibiotik (VAN DER POLL a OPAL, 2009).

2.1.1.2 Extracelulární enzymy a toxiny

Do skupiny extracelulárních enzymů a toxinů patří dva významné virulenční faktory: pneumolysin a IgA1 proteasa.

Pneumolysin (Ply) je široce zkoumaným pneumokokovým proteinem. Patří do rodiny toxinů formujících pór, které jsou produkovány více než dvaceti druhy gram-pozitivních bakterií. Pneumolysin je produkován téměř všemi klinickými izoláty pneumokoka. Exprimován je během pozdní lag fáze (BENTON *et al.*, 1997), ačkoli z buňky je pneumolysin uvolněn až po její autolýze (BERRY *et al.*, 1989). Po uvolnění z buňky se ve formě monomeru nejprve váže na cholesterol buněčné membrány, kde oligomerizuje a tvoří vysokomolekulární pór, který způsobí osmotickou nerovnováhu cílové buňky a její následnou lyzi (MORGAN *et al.*, 1995). Dále pneumolysin zprostředkovává aktivaci klasické dráhy komplementu (MITCHELL *et al.*, 1991).

IgA1 proteasa je extracelulární toxin, který štěpí imunoglobuliny IgA1 a takto napomáhá kolonizaci sliznic (VAN DER POLL a OPAL, 2009).

2.1.1.3 Povrchové proteiny obsahující konzervovaný motiv LPXTG

Do dnešní doby bylo identifikováno 17 proteinů obsahující aminokyselinový motiv LPXTG. Počet těchto proteinů kódovaných u jednotlivých kmenů pneumokoka se liší (TETTELIN *et al.*, 2001). Motiv LPXTG se běžně vyskytuje blízko C-konce proteinu, ale u několika proteinů se vyskytuje blízko N-konce. Motiv LPXTG na C-konci proteinu je rozpoznáván transpeptidasou sortasou, která protein ukotvuje kovalentní vazbou k peptidoglykanu buněčné stěny (BERGMANN A HAMMERSCHMIDT, 2006). Bylo zjištěno, že i samotná sortasa (StrA) hraje roli v adhezi na buňky nosohltanu (PATERSON a MITCHELL, 2006). Mezi povrchové proteiny obsahující konzervovaný motiv LPXTG patří hyaluronidasa, neuraminidasa a serinová proteasa PrtA.

Hyaluronidasa je sekretována 99% klinických izolátů pneumokoka. Hyaluronidasa štěpí kyselinu hyaluronovou, která je komponentou savčí pojivové tkáně a extracelulární matrix. Toto štěpení napomáhá kolonizaci a šíření bakterie v hostiteli (JEDRZEJAS *et al.*, 2002). Hyaluronidasa nejspíše umocňuje zánět plic během pneumokokového zápalu plic komplexní interakcí s prozánětlivými cytokiny a chemokiny (IRWIN *et al.*, 1994).

Neuraminidasa odštěpuje kyselinu sialovou z glykolipidů, lipoproteinů a oligosacharidů na povrchu hostitelských buněk, čímž odhaluje další receptory pro pneumokokové adhesiny (CAMARA *et al.*, 1994). Ztráta sialové kyseliny podporuje postup pneumokoka Eustachovou trubicí do středního ucha (LINDER *et al.*, 1994). Neuraminidasa hraje důležitou roli v kolonizaci a tvorbě biofilmu a odštěpená kyselina sialová může být důležitým signálem kontrolujícím pneumokokovou virulenci (PARKER *et al.*, 2009; TRAPPETTI *et al.*, 2009).

Přítomnost genu *prtA* pro serinovou proteasu PrtA byla určena při analýze sér uzdravujících se pacientů (ZYSK *et al.*, 2000). Následně byla potvrzena ve všech testovaných klinických izolátech pneumokoka. Delece *prtA* ve virulentním kmeni *S. pneumoniae* D39 vede k atenuaci virulence (BETHE *et al.*, 2001). Ačkoli přesná role PrtA není známa, je exprese *prtA* koregulována s několika dalšími virulenčními geny transkripčním regulátorem PsaR (HENDRIKSEN *et al.*, 2009).

2.1.1.4 *Pneumokokové pili*

Pili byly na povrchu pneumokoků poprvé pozorovány v roce 2006. Locus *rlr* kóduje pili prvního typu. Tento typ pili je zapojen ve virulenci, zprostředkovává vazbu k plicním epitelálním buňkám a stimuluje produkci prozánětlivých cytokinů (BAROCCHI *et al.*, 2006). Pili druhého typu, kódované genomovým ostrovem pili II, jsou též zapojeny v adhezenci bakterie k epitelálním buňkám. Některé kmeny *S. pneumoniae* jsou schopné exprimovat oba typy pili, některé kmeny naopak pili nekódují vůbec (BAGNOLI *et al.*, 2008).

2.1.1.5 *Lipoproteiny*

Mezi lipoproteiny esenciální pro virulenci patří protein PsaA (Pneumococcal Surface Antigen A), který je součástí ABC transportéru, kde PsaA je substrát-vazebný lipoprotein, PsaB je ATP-vazebný protein a PsaC je permeasa. Tento komplex je zodpovědný za transport manganatých iontů (DINTILHAC *et al.*, 1997). Mutace v *psaA* způsobuje snížení adheze, virulence a zvýšení citlivosti k oxidativnímu stresu (TSENG *et*

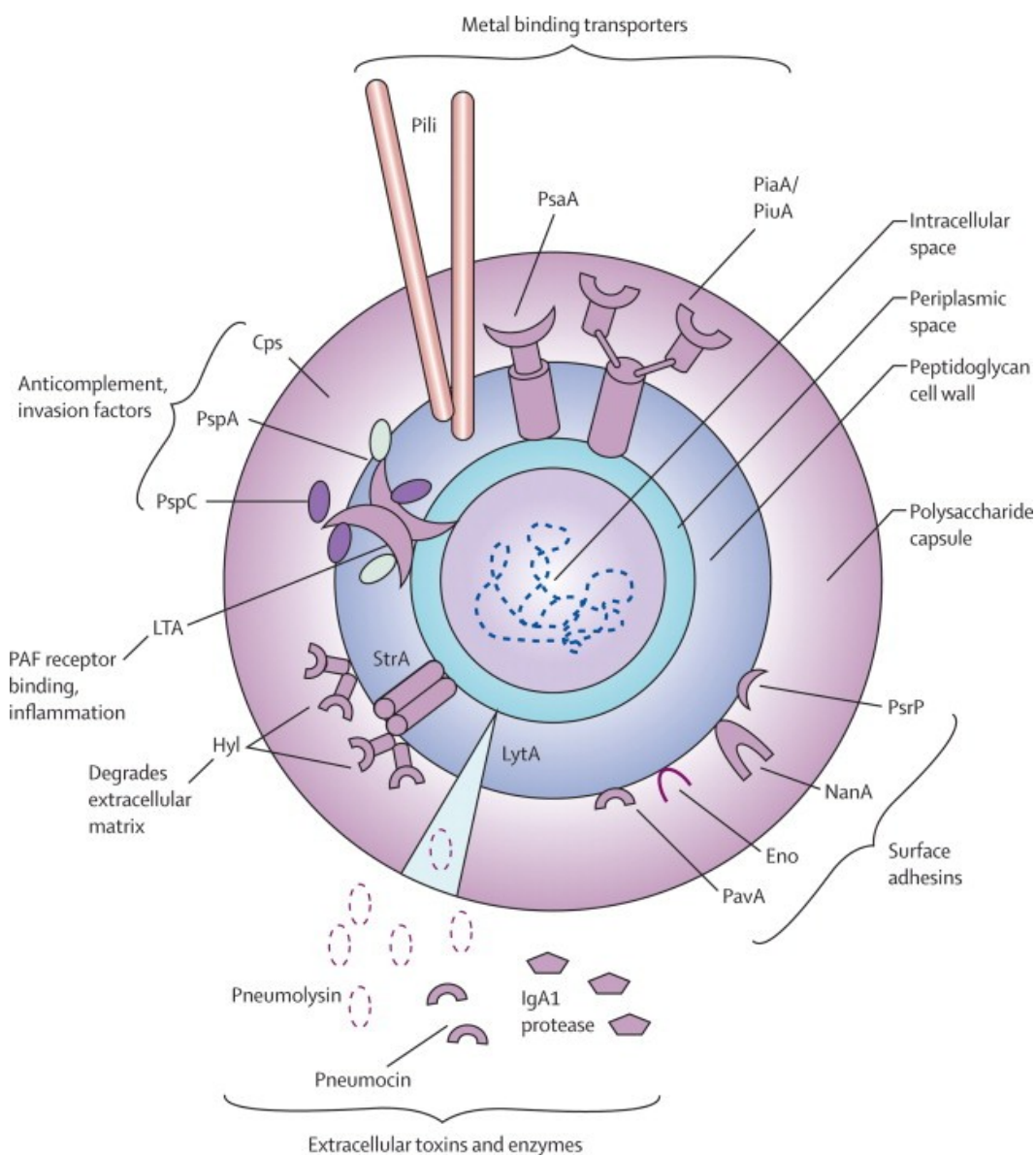
al., 2002). Dalšími lipoproteiny esenciálními pro virulenci jsou PiaA (Pneumococcal Iron Acquisition A) a PiuA (Pneumococcal Iron Uptake A), které jsou zodpovědné za příjem železa (BROWN *et al.*, 2001). V kolonizaci a virulenci hrají roli též lipoproteinové peptidylprolylisomerasy SlrA a PpmA (HERMANS *et al.*, 2006; CRON *et al.*, 2009).

2.1.1.6 Cholin-vazebné proteiny (CBPs)

CBPs jsou k povrchu bakterie vázány pomocí opakujících se domén, které se vážou na cholin přítomný v buněčné stěně. *S. pneumoniae* kóduje 10-15 CBPs. Čtyři z nich, LytA, LytB, LytC a CbpE, jsou hydrolytické enzymy. LytA uvolňuje vysoce zánětlivý degradační produkt buněčné stěny a pneumolysin z buňky (BERRY a PATON, 2000). LytB, LytC a CbpE jsou důležité pro kolonizaci nosohltanu (GOSINK *et al.*, 2000). Dalšími CBPs důležitými pro virulenci jsou PspA a PspC (Pneumococcal Surface Protein A, C). PspA a PspC svým navázáním na určité složky komplementu brání jeho aktivaci a tedy vyvolání imunitní odpovědi hostitele (DAVE *et al.*, 2001; REN *et al.*, 2003). PspA váže lidský laktoferin, který hraje důležitou úlohu v iniciaci imunity hostitele (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 1999).

2.1.1.7 Další povrchové proteiny

Několik povrchových proteinů neobsahuje rozpoznávací kotvicí motiv. Mezi tyto proteiny patří PavA (Pneumococcal Adherence and Virulence factor A), dva glykolytické enzymy (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa a enolasa), proteiny rodiny Pht (Pneumococcal Histidine Triad) a protein PsrP. PavA je velmi důležitý virulenní faktor, který váže fibronektin a zprostředkovává vazbu pneumokoka k buňkám endotelu (HOLMES *et al.*, 2001). Jeho delece způsobuje atenuaci v modelu sepse a meningitidy (PRACHT *et al.*, 2005). Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa a enolasa jsou proteiny vázající plasminogen (BERGMANN *et al.*, 2004, 2005). Takto navázaný plasminogen usnadňuje průchod bakterie přes bazální membránu (EBERHARD *et al.*, 1999). Proteinová rodina Pht se sestává ze čtyř proteinů: PhtA, PhtB, PhtD a PhtE. Tyto proteiny obsahují konzervovaný motiv (HxxHHxH), který nejspíše zodpovídá za vazbu zinečnatých iontů. Proteiny Pht vážou faktor H komplementu, čímž snižují vazbu komplementu k pneumokokovým buňkám (OGUNNIYI *et al.*, 2009). PsrP (Pneumococcal Serin Rich Protein) je povrchový protein obsahující repetice bohaté na serin. PsrP podporuje invazi do tkání a je schopen se vázat k povrchu krevních destiček (VAN DER POLL AND OPAL, 2009).



Obr. 2-2: Virulenční faktory *S. pneumoniae*

PsaA: pneumokokový povrchový protein A; **PiaA a PiuA:** pneumokokové proteiny pro příjem a akumulaci železa; **PsrP:** protein obsahující repetice bohaté na serin; **NanA:** neurominidasa; **Eno:** enolasa; **PavA:** pneumokokový adhesin A; **LytA:** autolysin; **StrA:** sortasa; **Hyl:** hyaluronidasa; **PspA a PspC:** pneumokokvé povrchové proteiny A a C; **LTA:** kyselina lipoteichoová; **PAF:** faktor aktivující krevní destičky, **Cps:** polysacharidové pouzdro; Převzato z VAN DER POLL a OPAL, 2009

2.1.2 Vývoj vakcín

S. pneumoniae každý rok způsobí více než 1,5 milionu úmrtí po celém světě. Nejohroženějšími skupinami jsou děti, převážně mladší 2 let, a lidé starší 65 let. Vysoká mortalita způsobená pneumokokovými infekcemi byla zaznamenána v rozvojových zemích, kde je smrt každého šestého dítěte spojena s tímto patogenem (CUTTS *et al.*,

2005). Proto se do vývoje účinné preventivní pneumokokové vakcíny vkládá velké úsilí. Dosud nebyla vyvinuta vakcína, která by splňovala potřebné podmínky pro obě skupiny (děti a starší lidé) a zároveň chránila před všemi patogenními sérotypy.

Dnešní používané vakcíny jsou založeny na pouzderných polysacharidech (CPSs), které patří mezi hlavní virulenční faktory a jsou základem pro klasifikaci *S. pneumoniae* do více než devadesáti sérotypů. Nicméně účinek polysacharidových vakcín je omezený počtem sérotypů obsažených ve vakcíně. Složení vakcíny se také liší v závislosti na různém geografickém výskytu sérotypů *S. pneumoniae* (HAUSDORFF *et al.*, 2000).

V 80. letech 20. století byla vyvinuta 23-složková vakcína obsahující 23 purifikovaných pouzderných polysacharidových antigenů, které zastupují 85-90 % sérotypů způsobujících invazivní onemocnění v USA a Evropě. Tato vakcína ale není vhodná pro nejohroženější skupinu dětí do dvou let, které mají omezenou protilátkovou odpověď k polysacharidům (BOGAERT *et al.*, 2004).

Dále byly vyvinuty vakcíny konjugované s netoxickým analogem difterického toxinu (CRM197) obsahující 7, 10 nebo 13 pouzderných polysacharidů. Tyto vakcíny navozují imunitní odpověď i u dětí do dvou let, ale jejich cena je vysoká a neumožňuje jejich širší použití hlavně v rozvojových zemích (SOHN *et al.*, 2010). Navíc v několika klinických studiích bylo zjištěno, že následkem vakcinace dochází k záměně sérotypů *S. pneumoniae* ve prospěch sérotypů neobsažených ve vakcíně, které mohou způsobit onemocnění, čímž může dojít i ke snížení protektivní účinnosti vakcíny (GIEFING *et al.*, 2008).

Všechny tyto nedostatky vedly k myšlence vytvořit alternativní pneumokokovou vakcínu. Pomocí znalosti celé genomové sekvence *S. pneumoniae* a použitím různých genomických technologií lze identifikovat nové vhodné antigeny. V současné době patří mezi hlavní kandidáty protein buněčného dělení PcsB, Ser/Thr proteinkinasa StkP, pneumokokový povrchový lipoprotein PsaA a cholin vazebný protein PspC. Proteiny PcsB a StkP jsou téměř 100 % konzervované mezi různými sérotypy *S. pneumoniae* (GIEFING *et al.*, 2008).

V nedávné studii byl prokázán ochranný efekt pneumokokové vakcíny založené na proteinech, která byla testována v neonatálním myším modelu. Byly použity proteiny PcsB, StkP, PsaA a PspA a adjuvans (pomocná látka) IC31. IC31 je složeno z antibakteriálního peptidu (KLKL₅KLK) a syntetického oligodeoxynukleotidu ODN1a. Toto adjuvans zvyšuje humorální odpověď Th1 a Th2 lymfocytů a zvyšuje produkci Th1-asociovaného cytokinu INF- γ , což je u novorozenců velmi žádoucí. Trivalentní vakcína

obsahující proteiny PcsB, StkP a PsaA s IC31 způsobila významnou redukci bakteremie a plicní infekce ve srovnání s nevakcinovanými myši, ale stupeň ochrany byl závislý na dávce IC31. Přídavek PspA k trivalentní vakcíně snížil potřebnou dávku IC31 k vyvolání ochranné imunity. Toto pozorování ukazuje, že nová pneumokoková vakcína založená na proteinech je imunogenní v časném věku myši a zdůrazňuje výhody použití kombinace konzervovaných proteinů a efektivního adjuvans k vyvolání silné imunitní ochrany proti invazivním pneumokokovým onemocněním (OLAFSDOTTIR *et al.*, 2012).

2.1.3 Kompetence

Přirozená kompetence pro genetickou transformaci byla objevena v roce 1928 Frederickem Griffithem, který experimentoval s opouzdřenou a neopouzdřenou formou *S. pneumoniae*. V roce 1931 Dawson a Sia provedli transformaci *in vitro*. A v roce 1944 Avery, McLeod a McCarty prokázali, že za přenos genetické informace je zodpovědná DNA.

Dodnes bylo určeno více jak 60 bakteriálních druhů, které jsou přirozeně kompetentní (JOHNSBORG *et al.*, 2007). Mezi zástupci gram-negativních bakterií můžeme jmenovat *Haemophilus influenzae* a *Neisseria gonorrhoeae*. U gram-pozitivních to jsou například *Bacillus subtilis* a *Streptococcus pneumoniae*.

Všechny tyto bakterie během svého životního cyklu syntetizují proteiny, které jednotlivým buňkám umožňují vázat a přijmout cizorodou DNA a pomocí homologní rekombinace inkorporovat genetickou informaci do svého genomu. Tento proces se nazývá přirozená genetická kompetence.

Kompetence je vysoce koordinovaný proces. U *S. pneumoniae* je přirozená genetická kompetence přechodným fyziologickým stavem trvajícím maximálně 30 minut. Přechod pneumokoka do tohoto stavu je závislý na teplotě, pH, koncentraci kyslíku, fosfátu, manganatých a vápenatých iontů a řízen je systémem *quorum sensing* (CLAVERYS a HAVARSTEIN, 2002). *Quorum sensing* je termín používaný pro mechanismus bakteriální komunikace, který ovládá expresi genů v závislosti na hustotě bakteriální populace (SUNTHARALINGAM a CVITKOVITCH, 2005). Tento systém řídící přechod do stavu kompetence u *S. pneumoniae* je popsán v následujících odstavcích (obr. 2-3).

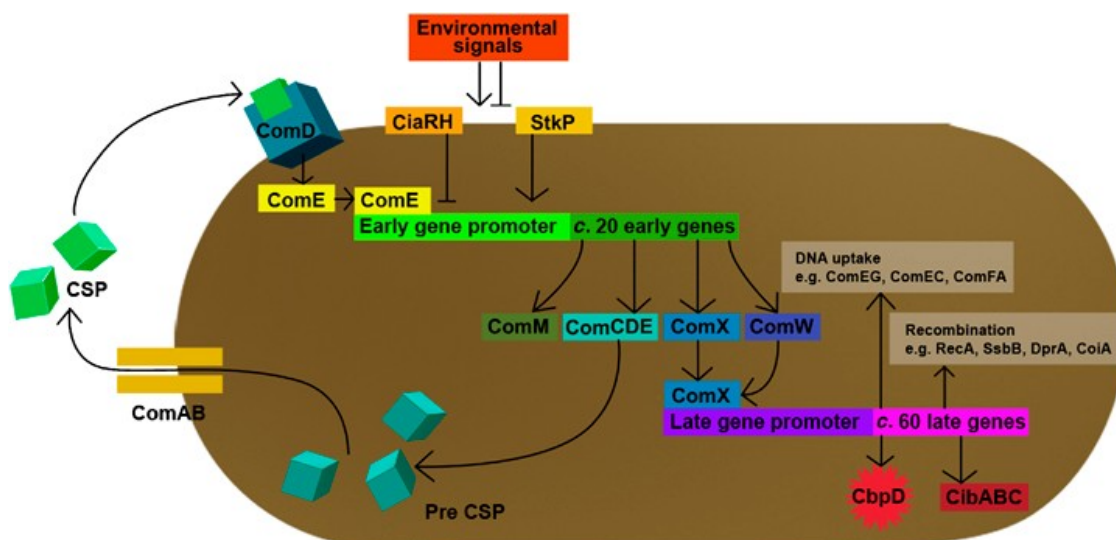
Prekurzor CSP (Competence Stimulation Peptide) kódovaný genem *comC* je z buňky sekretován pomocí ABC transportního systému ComAB. ComA obsahuje

proteolytickou doménu, která během transportu CSP ven z buňky odštěpí signální sekvenci a vznikne aktivní forma CSP. CSP se hromadí v okolním prostředí buněk a po dosažení určité kritické koncentrace peptidu dojde v buněčné populaci k rychlé a simultánní indukci kompetence (CLAVERYYS a HAVARSTEIN, 2002). Další hlavní složkou regulující indukci kompetence je dvousložkový systém ComDE. ComD představuje histidinovou kinasu, která váže extracelulární CSP a důsledkem toho je její autofosforylace. Autofosforylovaná kinasa ComD fosforyluje regulátor ComE (PESTOVA *et al.*, 1996). Ten se svou DNA vazebnou doménou váže na různé promotory a aktivuje expresi dvaceti časných genů kompetence, mezi něž patří *comCDE*, *comAB*, *comX*, *comW* a *comM* (LUO a MORRISON, 2003). Hlavní proteiny indukující kompetenci, kódované *comCDE* operonem, podléhají regulaci globálních regulátorů. Pozitivním globálním regulátorem je Ser/Thr proteinkinasa StkP (ECHENIQUE *et al.*, 2004). Dvousložkový systém CiaRH působí jako negativní globální regulátor operonu (GUENZI *et al.*, 1994; DAGKESSAMANSKAIA *et al.*, 2004;).

Časný kompetenční protein ComW je esenciální pro efektivní indukci kompetence a přechodně chrání protein ComX před degradací proteasou ClpP, která je negativním regulátorem kompetence (SUNG a MORRISON, 2005). ComX je alternativní sigma faktor, který řídí expresi šedesáti pozdních genů kompetence (LUO a MORRISON, 2003). Mezi ně patří i geny kódující proteiny potřebné pro absorpci a rekombinaci cizorodé DNA a také geny kódující proteiny CbpD a CibAB, také označované jako „bratrovražedné faktory“.

V nedávné studii bylo pozorováno, že kompetentní buňky exprimují malou sadu proteinů mezi nimi i CbpD a CibAB, které slouží k aktivnímu získávání DNA ze sesterských nekompetentních buněk blízké příbuzných pneumokokových druhů. Tento proces je označován jako „fratricide“ neboli „bratrovražda“. Kompetentní buňky se proti vlastním „bratrovražedným faktorům“ brání produkcí imunitního proteinu CibC, který je kotranskribován společně s CibAB (GUIRAL *et al.*, 2005). Časný kompetenční gen *comM*, kódující integrální membránový protein, chrání kompetentní buňky před jejich vlastními lyziny (HAVARSTEIN *et al.*, 2006).

Přirozená genetická transformace představuje vysoce účinný mechanismus pro rozšiřování rezistence pro β -laktamová antibiotika mezi streptokokovými kmeny i druhy. V jejím důsledku by mohlo dojít až k potlačení účinnosti pneumokokových vakcín.



Obr. 2-3: Schéma reprezentující regulaci kompetence u *S. pneumoniae*

Převzato z JOHNSBORG a HAVARSTEIN, 2009; popis v textu kapitoly 2-4 (Kompetence)

2.2 Buněčné dělení u *S. pneumoniae*

Nejpozoruhodnější schopností každé živé buňky je její schopnost autoreprodukce, tedy vytvoření kopie sebe samé. K tomu, aby buňka mohla růst a dělit se, musí se vyskytovat ve vhodném chemickém a fyzikálním prostředí. Pokud se buňka v takovém prostředí vyskytuje, přijímá z okolí energii a živiny, syntetizuje všechny své součásti a zvětšuje svoji hmotnost i svůj objem. Když buňka dosáhne určité velikosti, pomocí příčného dělení se rozdělí na dvě dceřiné buňky. Tyto buňky v příhodném prostředí opět rostou a cyklus se opakuje. Tento děj se nazývá buněčný cyklus.

Bakteriální buněčný cyklus můžeme rozdělit do dvou částí. První část, nazvaná DNA cyklus, zahrnuje replikaci DNA a oddělení chromosomů. Ve druhé části cyklu dochází k buněčnému dělení, které zahrnuje cytokinezi a vlastní oddělení buněk. Během buněčného dělení musí buňka (i) rozpoznat střed buňky, ve kterém později nastane dělení, (ii) odlišit toto místo v přípravě pro cytokinezi a (iii) nakonec vytvořit dělicí přepážku koordinovaným vrůstáním cytoplazmatické membrány, peptidoglykanu a popřípadě dalších vrstev.

Většina studií bakteriálního buněčného dělení byla provedena u dvou hlavních modelových organismů tyčinkovitého tvaru, a to u *E. coli*, jakožto zástupce gram-negativních bakterií, a *B. subtilis*, jako zástupce gram-pozitivních bakterií.

S. pneumoniae, stejně jako ostatní streptokoky, laktotoky a enterokoky, patří mezi bakterie s ovoidním tvarem buněk. Ovoidní bakterie se vždy dělí ve stejné rovině kolmé k dlouhé ose buňky. U těchto bakterií není známo, jakým způsobem určují místo vzniku

buněčné přepážky, protože Min systém určující místo vzniku buněčné přepážky u tyčinkovitých bakterií, jako je *E. coli* a *B. subtilis*, ovoidní bakterie zcela postrádají a proteiny zodpovědné za chromozomální okluzi nebyly u ovokoků dosud identifikovány (ZAPUN *et al.*, 2008).

2.2.1 Segregace chromosomů u *S. pneumoniae*

S. pneumoniae kóduje geny pro proteiny podílející se na segregaci chromosomů. Mezi tyto proteiny patří FtsK, DivIVA, ParB-*parS* nukleoproteinový komplex a SMC (Structural Maintenance of Chromosome) kondensin. **FtsK** je protein vysoce konzervovaný u různých druhů bakterií. Jedná se o membránově vázanou ATP-dependentní DNA translokasu schopnou rychlého usměrněného pohybu bakteriálního chromosomu. Ačkoli FtsK působí jako DNA pumpa, má i jiné funkce: (i) je zapojen v řádném sestavení aparátu buněčného dělení, (ii) podporuje rozdělení chromosomů a (iii) stimuluje rozštěpení chromozomálních dimerů interakcí s XerD rekombinasou (BIGOT *et al.*, 2004). **DivIVA** je coiled-coil protein široce rozšířený u gram-pozitivních bakterií. U *S. pneumoniae* má mutace *divIVA* za následek tvorbu řetízků neoddělených morfologicky odlišných buněk s nedokončenou přepážkou a buňky často neobsahují nukleoid. Tento fenotyp naznačuje, že DivIVA hraje roli v určení buněčného tvaru, sestavení a uzavření buněčné přepážky a v segregaci chromosomů (FADDA *et al.*, 2003). **ParB-*parS*/SMC** segregací systém je také důležitý pro segregaci chromosomů u *S. pneumoniae*. ParB je DNA-vazebný protein, který rekrutuje SMC kondensin k DNA sekvencím podobným centomeře označovaným *parS*. Místa *parS* jsou umístěna blízko počátku replikace, podobně jako u *B. subtilis*. Oproti *B. subtilis* pro *S. pneumoniae* není ParB a SMC kondensin esenciální. Delece *parB* způsobuje defekty segregace chromosomů a delece *smc* má za následek nedostatečné oddělení chromosomů (MINNEN *et al.*, 2011).

2.2.2 Syntéza buněčné stěny u *S. pneumoniae*

Bakterie lze podle buněčného tvaru rozdělit do dvou základních skupin, na tyčinky a koky. Tvar buňky určuje buněčná stěna a proteinové komplexy, které se podílejí na její biosyntéze. U koků se buněčného dělení účastní pouze jeden proteinový komplex zodpovědný za tvorbu buněčné přepážky. Tyčinkovité bakterie mají, kromě proteinového komplexu odpovědného za syntézu buněčné přepážky, proteinový komplex zodpovědný za syntézu periferního peptidoglykanu, a tedy i za jejich elongaci. Tyto dva komplexy jsou

oddělené a nekolokalizují. Ovoidní bakterie nemají tvar typicky kulovitý, ani typicky tyčinkovitý, jejich tvar je jakýmsi “přechodem“ mezi těmito dvěma tvary. Předpokládaný model syntézy peptidoglykanu u ovokoků je velmi podobný syntéze peptidoglykanu u tyčinek. Též obsahují dva proteinové komplexy zodpovědné za septální a periferní syntézu peptidoglykanu, ale předpokládá se, že tyto dva komplexy spolu kolokalizují v místě tvořící se buněčné přepážky (ZAPUN *et al.*, 2008). Septální a periferní proteinový komplex ovoidní bakterie *S. pneumoniae* (obr 2-4) je popsán v následujících odstavcích.

U *S. pneumoniae* se proteinový komplex zodpovědný za stavbu buněčné přepážky skládá ze dvou časných proteinů buněčného dělení FtsZ a FtsA a několika pozdních dělicích proteinů DivIB (FtsQ), DivIC (FtsB), FtsL, FtsW, PBP2X a PBP1A.

Proteiny FtsZ a FtsA jsou v bakteriální říši vysoce konzervované. **FtsZ** je GTPasa homologní s eukaryotickým tubulinem (LOWE a AMOS, 1998). Jakmile buňka určí místo, ve kterém bude probíhat buněčné dělení, začne se do tohoto místa přemisťovat jako první právě FtsZ. V tomto místě FtsZ polymeruje a tvoří kruhovou strukturu známou jako Z-kruh (BI a LUTKENHAUS, 1991). **FtsA** patří do aktinové nadrodiny. Ačkoli je FtsA cytoplazmatickým proteinem, obsahuje ve své C-koncové doméně amfipatický helix, pomocí něhož je schopen se vázat k cytoplazmatické membráně (PICHOF a LUTKENHAUS, 2005). FtsA svou interakcí s FtsZ ukotvuje Z-kruh k cytoplazmatické membráně, čímž ho stabilizuje (VAN DEN ENT a LOWE, 2000).

Proteiny **DivIB (FtsQ)**, **FtsL** a **DivIC (FtsB)** tvoří vysoce konzervovaný komplex, který leží v dráze mezi sestaveným stabilizovaným Z-kruhem a syntézou septálního peptidoglykanu. U *S. pneumoniae* není funkce DivIB, FtsL a DivIC přesně známa. Delece genu *divIB* u *S. pneumoniae* způsobuje řetízkování diplokoků a v menším zastoupení tvoří větší buňky s nedokončenou buněčnou přepážkou (LE GOUËLLEC *et al.*, 2008). Geny pro DivIB, FtsL a DivIC se nevyskytují u bakterií bez buněčné stěny. Gen kódující DivIB je často v operonu s geny, které jsou zapojeny v syntéze peptidoglykanových prekurzorů. Gen pro protein FtsL často přiléhá ke genu kódující septální PBP (MARGOLIN, 2000). Tyto skutečnosti naznačují, že neznámá funkce DivIB, FtsL a DivIC souvisí s tvorbou buněčné stěny. U *B. subtilis* je lokalizace DivIB_{BS}, FtsL_{BS} a DivIC_{BS} (FtsB) závislá na vzájemné přítomnosti těchto proteinů. FtsL_{BS} je velmi nestabilní protein, který pro svou stabilitu vyžaduje DivIB_{BS} a DivIC_{BS} v tomto pořadí. A naopak FtsL_{BS} je vyžadován pro stabilitu DivIC_{BS} (DANIEL a ERRINGTON, 2000).

FtsW protein patří do rodiny SEDS (Shape, Elongation, Division and Sporulation) proteinů (HENRIQUES *et al.*, 1998). SEDS proteiny jsou integrální membránové proteiny

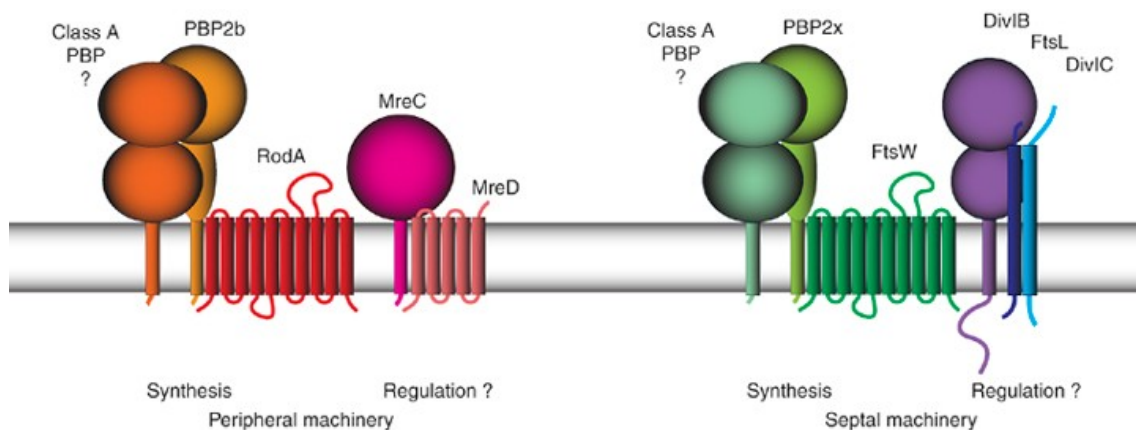
s deseti transmembránovými segmenty (GERARD *et al.*, 2002). Hlavní funkcí SEDS proteinů je transport peptidoglykanových prekurzorů z cytoplazmy skrz cytoplazmatickou membránu do extracelulárních míst, kde jsou tyto prekurzory dále využity transpeptidasami (EHLERT a HOLTJE, 1996). FtsW se účastní buněčného dělení společně s **PBP2X** (Penicilin Binding Protein). Penicilin vazebné proteiny (PBPs) se účastní tvorby dělicí přepážky. PBPs katalyzují polymeraci glykanových řetězců a příčné spojování mezi jednotlivými řetězci, čímž zajišťují tvorbu peptidoglykanu. Jejich název byl odvozen ze schopnosti vázat β -laktamová antibiotika, která inhibují funkci PBPs a tedy i syntézu peptidoglykanu. Přírodním substrátem PBPs je koncový acyl D-alanyl-D-alanin pentapeptidového řetízku, který je vázán na peptidoglykanovém prekurzoru (GHUYSEN, 1991). PBP2X patří do třídy B HMW (High Molecular Weight) PBPs, které mají transpeptidasovou aktivitu. PBP1A patří do třídy A HMW PBPs. Tyto PBPs mají glykosyltransferázovou a transpeptidázovou aktivitu (GOFFIN a GHUYSEN, 1998). Oba tyto PBPs, PBP2X a PBP1A, zodpovídají za syntézu peptidoglykanu v septu.

U *B. subtilis*, jakožto zástupce gram-pozitivních tyčinkovitých bakterií, se periferní syntézu peptidoglykanu účastní proteiny MreB, MreC, MreD, RodA a PBP2B. Na rozdíl od tyčinkovitých bakterií většina ovokoků nekóduje protein MreB a proteinový komplex zodpovědný za syntézu periferního peptidoglykanu se skládá z proteinů MreC, MreD, RodA a PBP2B, které interagují přímo s FtsZ (MAGGI *et al.*, 2008). V nedávné studii bylo prokázáno, že proteiny **MreCD** jsou pro virulentní kmen D39 *S. pneumoniae* esenciální a jejich deplece vede k zakulacování buněk a jejich lyzi. V nevirulentním kmeni R6 MreCD esenciální nejsou, ale delece *mreCD* vede k tvorbě supresorových mutací. Jedna třída těchto supresorových mutací zapříčiňuje eliminaci funkce PBP1A. Imunofluorescenční mikroskopie odhalila, že MreCD lokalizují v septu, podobně jako PBPs a peptidoglykanové pentapeptidy. Tato pozorování jsou ve shodě s modelem, ve kterém MreCD řídí periferní syntézu peptidoglykanu a kontrolují lokalizaci nebo aktivitu PBP1A (LAND a WINKLER, 2011). **RodA**, stejně jako výše popsáný FtsW, patří do rodiny SEDS proteinů, které transportují peptidoglykanové prekurzory přes cytoplazmatickou membránu (HENRIQUES *et al.*, 1998). RodA tvoří funkční pár s PBP2B. **PBP2B**, stejně jako PBP2X, patří do třídy B HMW penicilin vazebných proteinů s transpeptidázovou aktivitou (GOFFIN a GHUYSEN, 1998) a zodpovídá za syntézu periferního peptidoglykanu.

S. pneumoniae kóduje celkem pět penicilin vazebných proteinů (PBPs): PBP1A, PBP1B, PBP2A, PBP2B a PBP2X. Již dříve popsáné PBP2X a PBP2B jsou pro *S. pneumoniae* esenciální. PBP1A, PBP1B a PBP2A esenciální nejsou. Buňky postrádající

PBP1A mají menší průměr než buňky divokého typu, což je zvláště pozorovatelné u neopouzdrěných kmenů. Nepřítomnost **PBP1B** a **PBP2A** nezpůsobuje znatelné změny délky či velikosti buňky. Delece *pbp1a* a zároveň *pbp2a* je pro buňku letální, ale rozdílný efekt na buněčný tvar způsobený delecí každého genu zvlášť naznačuje, že PBP1A a PBP2A nejsou k sobě ekvivalentní ani redundantní (LAND a WINKLER, 2011).

Buněčné dělení nezahrnuje pouze biosyntézu peptidoglykanu, ale i jeho štěpení ve správnou chvíli. Štěpení peptidoglykanu zajišťují peptidoglykanové (mureinové) hydrolasy, které jsou schopné štěpit kovalentní vazby peptidoglykanu. Jejich hlavní fyziologická role zahrnuje regulaci růstu buněčné stěny, obrat peptidoglykanu během růstu, separaci dceřiných buněk v průběhu buněčného dělení a autolyzu (VOLLMER *et al.*, 2008). U ovoidních bakterií je vztah mezi buněčným dělením a štěpením peptidoglykanu téměř neznámý. Mezi peptidoglykanové hydrolasy *S. pneumoniae* patří autoliziny LytA, LytB a LytC a hydrolasa PcsB. Hlavní funkcí **LytA** (N-acetylmuramyl-L-alaninamidasa) je autolýza buněk ve stacionární fázi. Dále se účastní bratrovražedné a penicilin indukované lyze (MELLROTH *et al.*, 2012). **LytC** (N-acetylmuramidasa) je bakteriální obdobou lysozymu. Hlavní funkcí LytC je též autolýza buněk, ale optimální teplota pro jeho aktivitu je 30°C (GARCIA *et al.*, 1999). **LytB** (N-acetylglukosamidasa) hraje hlavní roli v oddělení dceřiných buněk při buněčném dělení. Inaktivace genu *lytB* vede k tvorbě dlouhých řetízků. Naopak purifikovaný LytB přidaný k pneumokokovým kulturám $\Delta lytB$ tvořící dlouhé řetízky byl schopen tyto řetízky rozdělit. Dále bylo pomocí imunofluorescenční mikroskopie prokázáno, že se LytB hromadí v buněčných pólech (DE LAS RIVAL *et al.*, 2002). **PcsB** je povrchový protein, který je složen ze dvou konzervovaných domén. N-konec obsahuje coiled-coil doménu a C-konec CHAP (Cysteine a Histidine dependentní Aminohydrolasa/Peptidasa) doménu. CHAP doména proteinu obvykle funguje jako peptidoglykanová hydrolasa, ale purifikovaný PcsB sám o sobě postrádá detekovatelnou enzymatickou aktivitu (GIEFING-KROLL *et al.*, 2011). Imunofluorescenční mikroskopii bylo prokázáno, že PcsB lokalizuje v buněčné přepážce. Dále bylo dokázáno, že PcsB interaguje s proteinovým komplexem tvořeným membránově vázaným **FtsX** a cytoplazmatickou ATPasou **FtsE**, která se strukturně podobá ABC transporteru. FtsX i FtsE jsou u *S. pneumoniae* esenciálními proteiny. Deplece PcsB nebo FtsX způsobuje nápadně podobné defekty buněčného dělení a deplece FtsX způsobuje delokalizaci PcsB. Tyto výsledky podporují model, ve kterém interakce komplexu FtsEX s PcsB aktivuje jeho hydrolytickou aktivitu a spojuje remodelaci peptidoglykanu s buněčným dělením u pneumokoka (SHAM *et al.*, 2011).



Obr. 2-4: Přehled proteinů periferní a septální syntézy buněčné stěny u *S. pneumoniae*

Převzato ze ZAPUN *et al.*, 2008

2.3 Fosforylace proteinů u *S. pneumoniae*

K přežití každého organismu je velmi důležitá rychlá odpověď a adaptace na změny prostředí. Základním mechanismem mezibuněčné i vnitrobuněčné komunikace je přenos signálu prostřednictvím fosforylace a defosforylace proteinů. Fosforylace je reverzibilní kovalentní posttranslační modifikace proteinu katalyzovaná enzymy proteinkinasami. Defosforylace je opačný proces, kdy dochází k odštěpení fosfátové skupiny pomocí proteinfosfatasas.

Přesto, že je reverzibilní fosforylace proteinů konzervovaná v eukaryotech i prokaryotech, systém přenosu signálu je odlišný. U eukaryot je signál přenášen pomocí proteinových fosforylačních kaskád, které vyžadují koordinaci mnoha Ser/Thr a Tyr proteinkinas a proteinfosfatas. Naproti tomu u prokaryot se dlouho předpokládalo, že je signál přenášen pouze dvousložkovými systémy (TCS). Ale ke konci 80. let 20 století byla i u prokaryot prokázána přítomnost Ser/Thr a Tyr proteinkinas eukaryotického typu (HANKS *et al.*, 1988). Tyto Ser/Thr a Tyr proteinkinasy se vyskytují téměř u dvou třetin sekvenovaných, fylogeneticky odlišných bakteriálních druhů, které využívají různé životní strategie (PEREZ *et al.*, 2008).

2.3.1 Dvousložkové systémy u *S. pneumoniae*

Histidin-aspartátový fosforylační systém, také známý jako dvousložkový systém (TCS), je pravděpodobně nejrozšířenějším mechanismem přenosu signálu u bakterií. Tyto systémy regulují širokou škálu buněčných funkcí včetně osmoregulace, fotosyntézy, chemotaxe, sporulace, produkce antibiotik a patogenity v mnoha různých druzích bakterií

(APPLEBY *et al.*, 1996). Některé z těchto systémů jsou esenciální pro životaschopnost bakterie (QUON *et al.*, 1996; FABRET a HOCH, 1998), a protože se nevyskytují u obratlovců, představují potenciální cíl pro antimikrobiální léčbu (BARRETT a HOCH, 1998).

TCS se běžně skládají ze dvou signálních proteinů, a to z membránově vázané senzorové histidinové kinasy (HK) a cytoplazmatického regulačního proteinu (RR). Při příjmu specifického signálu se kinázová doména histidinové kinasy autofosforyluje na konzervovaném histidinovém zbytku. Fosfátová skupina je následně přenesena na aspartátový zbytek regulačního proteinu. Fosforylace regulačního proteinu vede ke konformační změně RR, která mu dovoluje regulovat genovou expresi nebo funkci dalších proteinů. RR často působí jako DNA-vazebný transkripční regulátor (EGGER *et al.*, 1997).

S. pneumoniae kóduje ve svém genomu 13 dvousložkových systémů (TCS) a jeden „osiřelý“ (orphan) regulační protein RitR. Možné regulační funkce těchto TCS jsou shnuty v následující tabulce.

TCS	Alternativní název	Regulační funkce	Citace
01	---	virulence	THROUP <i>et al.</i> , 2000); PATERSON <i>et al.</i> , 2006)
02	MicAB	kompetence, virulence	ECHENIQUE a TROMBE, 2001; KADIOGLU <i>et al.</i> , 2003)
03	---	?	---
04	PnpRS	virulence; rezistence k oxidativnímu stresu	McCLUSKEY <i>et al.</i> , 2004
05	CiaRH	kompetence; virulence; autolýza; produkce bakteriocinu; rezistence k β -laktamovým antibiotikům	HAAS <i>et al.</i> , 2005; HALFMANN <i>et al.</i> , 2011
06	---	virulence, adheze	THROUP <i>et al.</i> , 2000; STANDISH <i>et al.</i> , 2005
07	---	virulence	THROUP <i>et al.</i> , 2000
08	---	virulence; metabolismus celobiosy	THROUP <i>et al.</i> , 2000; McKESSAR a HAKENBECK, 2007; SONG <i>et al.</i> , 2009
09	ZmpSR	virulence, kompetence, příjem cukrů	THROUP <i>et al.</i> , 2000; BLUE a MITCHELL, 2003; HENDRIKSEN <i>et al.</i> , 2007
10	VncRS	autolýza	(NOVAK <i>et al.</i> , 2000)
11	---	?	---
12	ComDE	quorum sensing systém, kompetence, virulence, autolýza	PESTOVA <i>et al.</i> , 1996; CHANDLER a MORRISON, 1988; PINAS <i>et al.</i> , 2008)
13	BlpRH	quorum sensing systém, produkce bakteriocinů, virulence,	DE SAIZIEU <i>et al.</i> , 2000; THROUP <i>et al.</i> , 2000; DAWID <i>et al.</i> , 2007
orphan RR	RitR	virulence, příjem železa	THROUP <i>et al.</i> , 2000; ULJASZ <i>et al.</i> , 2004

Tabulka 2-1: Přehled dvousložkových systémů u *S. pneumoniae*

? – funkce TCS je neznámá

2.3.2 Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu (ESTPK)

Podobně jako eukaryota i prokaryota využívají reverzibilní fosforylaci proteinů pomocí ESTPK k ovlivnění genové exprese nebo ke změně funkce proteinu v buněčných

procesech, které zahrnují např. buněčný růst a dělení, metabolismus, diferenciaci, adaptaci na změny vnějšího prostředí a virulenci.

ESTPK jsou dvojího typu, cytoplazmatické a transmembránové. Ve většině případů se vyskytují jako transmembránové a jako takové často slouží jako receptory.

Označení „eukaryotického typu“ získaly bakteriální Ser/Thr proteinkinasy z důvodu homologie se Ser/Thr proteinkinasy eukaryot, které byly objeveny dříve. ESTPK obsahují konzervovanou katalytickou doménu a často ještě přídatnou doménu, která může plnit různé funkce. Katalytická doména je tvořena 250-300 aminokyselinovými zbytky, které se skládají z 11 konzervovaných subdomén. Mezi těmito konzervovanými subdoménami se vyskytují méně konzervované oblasti. Konzervované subdomény jsou důležité pro katalytickou funkci proteinkinasy a jsou buď přímou součástí aktivního místa, nebo nepřímo přispívají k formování aktivního místa (HANKS *et al.*, 1988).

Přídatné domény se u proteinkinasy mohou lišit a mohou mít různé funkce. Mezi nejčastěji se vyskytující domény patří např. APH, PASTA, TRP repetice a WD40 repetice. TRP (tetratricopeptide repeats) a WD40 (označeny podle posledních dvou aminokyselin vyskytujících se v motivu: tryptofan, aspartát) repetice zprostředkovávají interakce protein-protein a napomáhají sestavování multiproteinových komplexů (SMITH *et al.*, 1999; D'ANDREA a REGAN, 2003). APH (aminoglycoside phosphotransferase) doména je příkladem přídatné domény s katalytickou funkcí. Tyto domény fosforylací inaktivují aminoglykosidová antibiotika (WRIGHT a THOMPSON, 1999). PASTA (Penicilin-binding protein And Serine/Threonine kinase-Associated) domény jsou příkladem ligand vazebné domény. Váží podjednotky peptidoglykanu a vyskytují se také v několika penicilin-vázebných proteinech (YEATS *et al.*, 2002).

2.4 Ser/Thr proteinkinasy s PASTA doménami

Zvláštní rodinu ESTPK tvoří transmembránové proteinkinasy nesoucí PASTA domény (Penicilin-binding protein And Serine/Threonine kinase-Associated). Tyto proteinkinasy se převážně vyskytují u gram-pozitivních bakterií. Transmembránová doména dělí ESTPK na N-koncovou a C-koncovou část. N-koncová intracelulární část nese katalytickou doménu, která je tvořena 11 konzervovanými subdoménami (HANKS *et al.*, 1988). C-koncová extracelulární část proteinkinasy je tvořena charakteristickými doménami označovanými jako PASTA domény, kterých může být v rozmezí od jedné do pěti a které slouží jako senzorová doména proteinkinázy (JONES a DYSON, 2006).

PASTA domény se vyznačují vysokým stupněm odlišnosti aminokyselinové sekvence, avšak podobností na úrovni trojrozměrné struktury. Modelovou proteinkinasou nesoucí několik opakování PASTA domén se stala PknB *M. tuberculosis* (AV-GAY *et al.*, 1999). Homologní k PknB je i proteinkinasa StkP *S. pneumoniae*.

PASTA domény nejsou součástí pouze Ser/Thr proteinkinas, ale i penicilin-vazebných proteinů (PBPs). Na základě krystalové struktury proteinu PBP2X *S. pneumoniae* byla určena struktura PASTA domén. PBP2X obsahuje dvě za sebou jdoucí PASTA domény, které se nacházejí vedle transpeptidázové domény (GORDON *et al.*, 2000). Každá PASTA doména je malá globulární jednotka složená ze tří β -listů a jednoho α -helixu. Bylo pozorováno, že PBP2X váže dvě molekuly β -laktamového antibiotika cefuroximu. Jedna molekula je kovalentně vázána do transpeptidázové domény, zatímco druhá se nekovalentně váže právě s PASTA doménou. β -laktamový kruh je strukturním analogem peptidoglykanového prekurzoru, který je svým koncovým acyl-D-alanyl-D-alaninem běžně vázán na PBP. Na základě těchto pozorování byla navržena hypotéza, že ESTPK obsahující PASTA domény by mohly monitorovat přítomnost volného peptidoglykanu a na základě tohoto signálu regulovat syntézu buněčné stěny během dělení (YEATS *et al.*, 2002). Tuto hypotézu podporují mnohé studie. Biofyzikálními metodami bylo prokázáno, že Ser/Thr proteinkinasa StkP *S. pneumoniae* váže synteticky připravené prekurzory peptidoglykanu a β -laktamová antibiotika (MAESTRO *et al.*, 2011). Dále bylo pozorováno, že Ser/Thr proteinkinasa *B. subtilis* váže fragmenty peptidoglykanu uvolněné do extracelulárního prostoru dělicími se buňkami a spouští germinaci spor (SHAH *et al.*, 2008). V nedávné studii bylo potvrzeno, že vazba a rozpoznání peptidoglykanových prekurzorů je nutná pro aktivaci a lokalizaci StkP. Přídavek antibiotik působících na buněčnou stěnu, jako je ampicilin a vankomycin, naruší tvorbu nebo dostupnost peptidoglykanových prekurzorů, což způsobí delokalizaci StkP a ovlivní fosforylaci jejích substrátů (BEILHARZ *et al.*, 2012).

Doposud bylo prokázáno, že Ser/Thr proteinkinasy s PASTA doménami se účastní mnoha důležitých dějů v buňce (regulace genové exprese, virulence, adherence atd.) a fosforylací svých substrátů regulují růst, vývoj a buněčné dělení. Význam Ser/Thr proteinkinas s PASTA doménami u bakterií stále roste a jejich funkce je intenzivně zkoumána. Podobně je tomu tak i s jejich příbuznými Ser/Thr proteinfosfatasami eukaryotického typu (ESTP).

ESTP jsou hořčík- nebo mangan-dependentní proteiny, které patří do rodiny PPM fosfatas. Jsou homologní s eukaryotickými fosfatasami typu PP2C. Na rozdíl od

eukaryotických proteinfosfatů vyžadují tři kovové ionty a obsahují smyčku nad aktivním místem, která nejspíše usnadňuje navázání substrátu a katalýzu (SHI, 2009).

2.4.1 Ser/Thr proteinkinasy gram-pozitivních koků

S. pneumoniae patří mezi gram-pozitivní koky, proto uvádím příklady Ser/Thr proteinkinás s PASTA doménami právě u této skupiny bakterií. Pokud u daného druhu bakterie byla zkoumána i Ser/Thr proteinfosfatasa, popsala jsem ji též z důvodu funkční souvislosti.

2.4.1.1 *Streptococcus agalactiae*

S. agalactiae patří mezi streptokoky skupiny B (group B streptococci, GBS). Vyskytuje se ve dvou formách: (i) jako komenzál osidlující pohlavní trakt zdravých žen (CAMPBELL *et al.*, 2000), (ii) jako významný lidský patogen způsobující u novorozenců pneumonii, sepsi a meningitidu (MULLANEY, 2001).

S. agalactiae obsahuje jedinou Ser/Thr proteinkinasu Stk1 nesoucí tři PASTA domény a Ser/Thr proteinfosfatasu Stp1. Stk1 je mangan-dependentní membránově vázaná kinasa. Reguluje růst, buněčnou segregaci a virulenci. Mutace v genu *stk1* a zároveň v genu *stp1* způsobuje prodloužení lag fáze, tvorbu krátkých řetězků pěti až osmi neoddělených buněk a výrazně sníženou virulenci ve srovnání s divokým typem (RAJAGOPAL *et al.*, 2003). Stk1 fosforyluje celou řadu substrátů, mezi které patří mangan-dependentní anorganická pyrofosfatasa PpaC (RAJAGOPAL *et al.*, 2003), adenylosukcinátsyntetasa PurA regulující biosyntézu purinů (RAJAGOPAL *et al.*, 2005), pozitivní regulátor exprese β -hemolysinu CovR (RAJAGOPAL *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2009; LEMBO *et al.*, 2010) a proteiny buněčného dělení DivIVA a FtsZ (SILVESTRONI *et al.*, 2009).

Stp1 je mangan-dependentní cytoplazmatická fosfatasa. V nedávné studii se podařilo získat mutanta deficientního pouze v genu pro Stp1. Delece *stp1* způsobila zvýšenou citlivost buněk k autolýze, sníženou aktivitu β -hemolysinu a značně sníženou schopnost vyvolat systémovou infekci. Z těchto výsledků vyplývá, že Stp1 je důležitá pro regulaci funkce Stk1, aktivity β -hemolysinu, autolýze a virulence. Pomocí hmotnostní spektrometrie obohacených fosfopeptidů byly určeny substráty Stp1, mezi které patří ATP syntasa, DNA a RNA helikasa, proteiny buněčného dělení a proteinové syntézy (BURNSIDE *et al.*, 2011).

2.4.1.2 *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes patří mezi streptokoky skupiny A (group A streptococci, GAS). Je významným lidským patogenem, který napadá epiteliální buňky, což vede k různým druhům onemocnění, od mírného zánětu hltanu až po doslova devastující onemocnění, jako je revmatická horečka, nekrotizující fasciitis či syndrom toxického šoku (CARAPETIS *et al.*, 2005).

S. pyogenes stejně jako *S. agalactiae* obsahuje jedinou Ser/Thr proteinkinasu SP-STK nesoucí tři PASTA domény a Ser/Thr proteinfosfatasu SP-STP. SP-STK je mangan-dependentní membránově vázaná kinasa. SP-STK reguluje bakteriální růst, buněčné dělení, virulenci, schopnost adherence a invaze do hostitelských buněk (PANCHOLI *et al.*, 2010). Mutace genu *sp-stk* způsobuje prodloužení doby zdvojení, tvorbu podlouhlých buněk s nedokončenými přepážkami vyskytujících se ve velkých shlucích, což se projevuje i zvětšením kolonií. Dále způsobuje až 50% zvýšení hemolyzinové aktivity, snížení schopnosti adherence a vyšší citlivosti k fagocytóze neutrofilů ve srovnání s divokým typem (JIN a PANCHOLI, 2006). Histone-like protein o velikosti 10 kDa (SP-HLP) je dosud zatím jediným identifikovaným substrátem proteinkinasy SP-STK (JIN a PANCHOLI, 2006).

SP-STP je mangan-dependentní cytoplasmatická fosfatasa. Nedávno bylo zjištěno, že je hlavním sekretovaným proteinem, který je schopen vyvolat apoptosu hostitelských buněk (AGARWAL *et al.*, 2012a). Mutace genu *sp-stp* způsobuje zesílení buněčné stěny, tvorbu dlouhých bakteriálních řetězků, snížení aktivity hemolysinu, významnou redukci pouzdra, atenuaci virulence a neschopnost vyvolat apoptosu hostitelských buněk. Mezi identifikované substráty náleží regulační proteiny CovR a WalR (AGARWAL *et al.*, 2011).

2.4.1.3 *Streptococcus mutans*

S. mutans patří mezi bakterie tvořící zubní plak a je hlavním původcem zubního kazu (LOESCHE, 1986). Aby v dutině ústní přežil, musí se přizpůsobit extrémním podmínkám prostředí, jako je např. kyselé pH či výskyt jiných bakteriálních druhů v biofilmu. Mutačními studiemi bylo zjištěno, že se na regulaci biochemických drah podporujících přežití *S. mutans* podílí Ser/Thr proteinkinasa PknB se třemi PASTA doménami a Ser/Thr proteinfosfatasu PppL (HUSSAIN *et al.*, 2006).

Mutace v genu *pknB* a zároveň v genu *pppL* způsobuje změnu buněčného tvaru, pomalejší růst, sníženou schopnost utvářet biofilm, zvýšenou citlivost ke kyselému pH a

sníženou schopnost genetické transformability. Dále transkripční analýza odhalila, že mutace *pknB* má za následek sníženou expresi genů zapojených v genetické kompetenci a produkci bakteriocinu (BANU *et al.*, 2010).

2.4.1.4 *Enterococcus faecalis*

E. faecalis je komenzál gastrointestinálního traktu (GI), nicméně může způsobit infekci GI traktu a močových cest, infekční endokarditidu či sepsi (POH *et al.*, 2006). Díky své rezistenci k mnoha antibiotikům působícím na buněčnou stěnu je i významným nosokomiálním patogenem (KRISTICH *et al.*, 2007).

E. faecalis obsahuje Ser/Thr proteinkinasu PrkC s pěti PASTA doménami a Ser/Thr proteinfosfatasu PrpC, jejíž přesná role v buňce není dosud známa. Mutace genu *prkC* má za následek zvýšení citlivosti k β -laktamovým antibiotikům a žluči a způsobuje poruchy dělení. PrkC tedy reguluje perzistenci v GI traktu, vlastní rezistenci k antibiotikům a slouží jako transmembránový receptor integrity buněčné stěny (KRISTICH *et al.*, 2007).

V nedávné studii bylo zjištěno, že proteinfosfataza PrpC *in vitro* defosforyluje proteinkinasu PrkC. Delece genu pro PrkC způsobuje výrazné zvýšení citlivosti k cefalosporinovým antibiotikům, z čehož je usuzováno, že PrkC hraje důležitou roli v rezistenci proti cefalosporinům. Naopak delece genu pro PrpC způsobuje hyperrezistenci k cefalosporinům (KRISTICH *et al.*, 2011).

2.4.1.5 *Staphylococcus aureus*

S. aureus jako komenzál kolonizuje kůži, horní cesty dýchací a GI trakt. Spolu se streptokoky patří mezi patogeny způsobující pyogenní infekce. Podobně jako *E. faecalis* je velice rezistentní k působení antibiotik. Nejvýznamnějším a nejnebezpečnějším kmenem je methicilin rezistentní *S. aureus* (MRSA) (FRIDKIN *et al.*, 2005).

S. aureus kóduje Ser/Thr proteinkinasu PknB/Stk1 se třemi PASTA doménami a Ser/Thr proteinfosfatasu Stp1. Oba tyto enzymy regulují tvorbu buněčné stěny, citlivost k β -laktamovým antibiotikům a tunikamycinu (OHLSEN a DONAT, 2010). Dále regulují expresi hemolysinů a virulenci (BURNSIDE *et al.*, 2010). Předpokládá se, že fosforylační dráhy regulované PknB/Stk1 jsou důležité pro patogenezí a esenciální pro přežití uvnitř hostitele (DEBARBOUILLE *et al.*, 2009).

Bylo identifikováno několik substrátů PknB/Stk1, mezi které patří globální regulátor MgrA řídící expresi genů pro virulenní faktory a efluxní transportéry NorA a NorB (TRUONG-BOLDUC a HOOPER, 2010). Další substráty jsou

adenylosukcinátsyntetasa PurA regulující biosyntézu purinů (DONAT *et al.*, 2009), tři proteiny působící v genové expresi a virulenci HLP-HU, SdrE a hypotetický protein NWMN_1123 (BURNSIDE *et al.*, 2010). Navíc nedávno bylo zjištěno, že PknB/Stk1 je sekretována z buňky, přestože byla identifikována jako transmembránová. Takto může pronikat do buněk hostitele a ovlivňovat jejich proteiny regulující apoptosu, imunitní odpověď, transport a výměnu látek nebo také napomáhat bakterii v obraně proti nitrobuněčnému zabíjení (MILLER *et al.*, 2010).

2.5 *Proteinkinasa StkP S. pneumoniae*

V sekvenci genomu *Streptococcus pneumoniae* byl identifikován jediný gen *stkP* homologní s geny kódujícími Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu (ESTPK). Tento gen se s 4 nukleotidovým přesahem překrývá s genem *phpP*, který kóduje PP2C Ser/Thr proteinfosfatasu eukaryotického typu. Právě proto, že *S. pneumoniae* obsahuje ve svém genomu jedinou Ser/Thr proteinkinasu a jedinou Ser/Thr proteinfosfatasu PP2C typu, stal se vhodným modelovým organizmem pro studium těchto enzymů.

Proteinkinasa StkP byla společně s proteinfosfatasou PhpP detailně charakterizována. StkP je mangan-dependentní membránová kinasa schopná autofosforylace. Skládá se z katalytické kinázové domény lokalizované v cytoplazmě, z transmembránové části a čtyř extracelulárních opakování PASTA domén. Oproti tomu PhpP je mangan-dependentní cytoplazmatická fosfataza a jejím substrátem je autofosforylovaná StkP (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2005).

Porovnáním hladiny genové exprese kmenů *S. pneumoniae* Δ *stkP* a divokého kmene bylo zjištěno, že StkP pozitivně reguluje transkripci genů podílejících se na tvorbě buněčné stěny, biosyntézy pyrimidinů, opravy DNA, příjmu železa a rezistenci vůči stresovým podmínkám. Celkový počet genů regulovaných StkP přesahuje 4%, čímž se StkP řadí mezi proteiny s globální regulační funkcí (SASKOVÁ *et al.*, 2007).

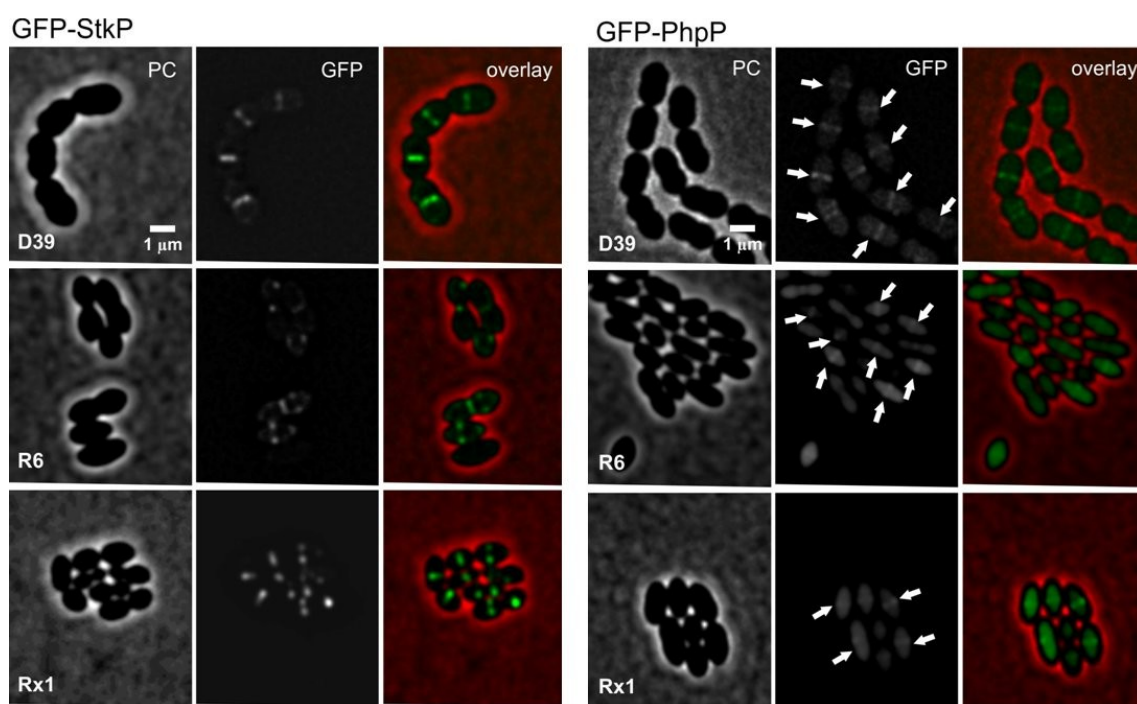
Dále bylo zjištěno, že ztráta extracelulární části StkP negativně ovlivňuje stabilitu kinázové domény. Membránově vázaná kinázová doména StkP, stejně jako celá StkP, je stabilní a schopná autofosforylace. Samotná membránově vázaná kinázová doména se vyskytuje jako monomer, kdežto StkP v plné velikosti jako dimer. Dimerizace je tedy *in vivo* zprostředkována transmembránovou částí a extracelulární částí nesoucí PASTA domény. Výsledky byly potvrzeny i *in vitro* pomocí blue-native PAGE (PALLOVÁ *et al.*, 2007a).

Dimerizace či oligomerizace a následná autofosforylace aktivačních segmentů je mechanismem aktivace Ser/Thr proteinkinasy u eukaryot (PIKE *et al.*, 2008). Tento model aktivace byl popsán i u Ser/Thr proteinkinasy PknB *M. tuberculosis*. Zde se předpokládá, že vazba ligandu na senzorové PASTA domény proteinkinasy způsobí její dimerizaci a následnou autofosforylaci. Tím dojde ke změně konformace a k vazbě substrátu (YOUNG *et al.*, 2003). Prvními určenými signálními molekulami, které aktivují Ser/Thr proteinkinasy PrkC *B. subtilis* spouštějící germinaci spor, byly muopeptidové fragmenty (SHAH *et al.*, 2008). Nedávno byl podobný jev potvrzen i u StkP. Pomocí biofyzikálních metod byla odhalena schopnost StkP vázat β -laktamové antibiotikum ampicilin, syntetické podjednotky peptidoglykanu a peptidoglykanové podjednotky izolované přímo z pneumokoka *in vitro*. StkP váže peptidoglykanové podjednotky derivované pouze ze *S. pneumoniae*, a tudíž je vazba peptidoglykanu na StkP druhově specifická, podobně jako je tomu u PrkC z *B. subtilis* (MAESTRO *et al.*, 2011).

StkP není esenciální pro životaschopnost *S. pneumoniae* v laboratorních podmínkách. Inaktivace genu *stkP* ve virulentních kmenech má však za následek atenuaci virulence. V nevirulentních kmenech vede inaktivace k výraznému snížení přirozené kompetence a předčasné lyzi buněk (ECHENIQUE *et al.*, 2004). Dále kmen $\Delta stkP$ vykazuje citlivost ke zvýšené teplotě, nízkému pH, osmotickému a oxidativnímu stresu a je citlivý na působení antibiotik (SASKOVÁ *et al.*, 2007). StkP také hraje důležitou roli v buněčném dělení. Mikroskopické pozorování buněk kmene *S. pneumoniae* $\Delta stkP$ odhalilo netypický protáhlý tvar buněk s defekty buněčného dělení (GIEFING *et al.*, 2008). Toto může být způsobeno deregulací dělicího proteinu DivIVA, který patří mezi substráty StkP (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010). Imunofluorescenční mikroskopie ukázala, že StkP lokalizuje s aparátem buněčného dělení, kam se připojuje po vytvoření FtsZ kruhu (GIEFING *et al.*, 2010). V další nedávné studii bylo potvrzeno pomocí fluorescenční a tzv. časosběrné fluorescenční mikroskopie, že StkP spolu s PhpP lokalizují v místě buněčného dělení (obr.2-5). Pro tuto *in vivo* lokalizaci je nutná vazba peptidoglykanových prekurzorů k extracelulární části StkP obsahující PASTA domény. Právě časosběrná fluorescenční mikroskopie ukázala, že StkP přichází do středu buňky později než časný dělicí protein FtsA, ale dříve než pozdní dělicí protein DivIVA (obr. 2-6). Navíc StkP zůstává uprostřed buňky, dokud buněčné dělení neproběhne kompletně. Mutant $\Delta stkP$ má narušenou syntézu buněčné stěny a buňky mají atypický prodloužený tvar s četnými FtsA a DivIVA neuzavřenými kruhy (obr. 2-7). Naopak nadprodukce StkP vede k produkci malých kulatých buněk. Souhrnně, všechny tyto výsledky ukazují, že StkP je důležitým

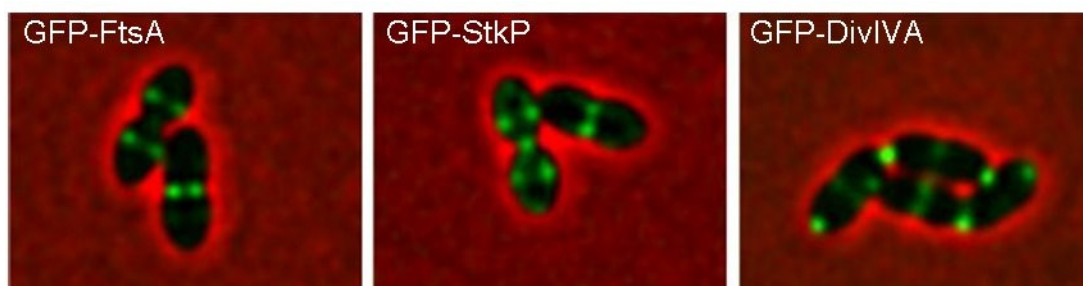
regulátorem buněčného dělení a koordinuje prodlužovací růst se syntézou buněčné přepážky, čímž získává pneumokok svůj typický ovoidní tvar (BEILHARZ *et al.*, 2012).

StkP patří mezi vysoce konzervované proteiny ve všech studovaných klinických izolátech *S. pneumoniae* a je velmi dobrým imunogenním antigenem. Proto byla vybrána pro vývoj vakcíny nové generace založené na konzervovaných proteinech (GIEFING *et al.*, 2008). Jak již bylo zmíněno dříve, nedávno byla vytvořena vakcína složená z konzervovaných proteinů StkP, PcsB, PsaA, PspA a adjuvans (pomocné látky) IC31, která vyvolává silnou imunitní ochranu proti invazivním pneumokokovým onemocněním v myším modelu (OLAFSDOTTIR *et al.*, 2012).



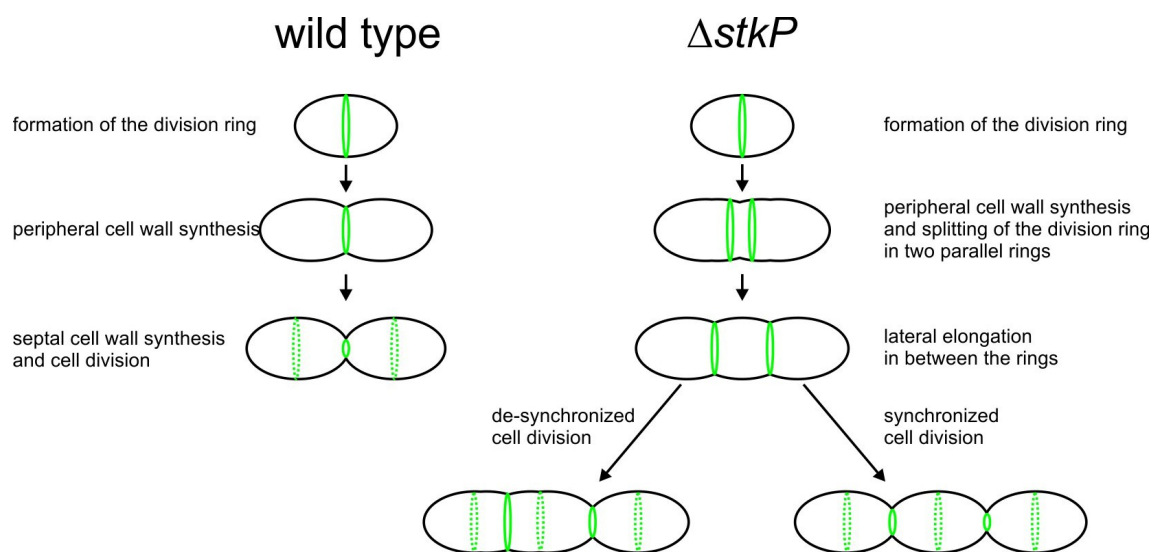
Obr. 2-5: Lokalizace GFP-StkP a GFP-PhpP v *S. pneumoniae*

D39: opouzdřený virulentní kmen *S. pneumoniae*; **R6 a Rx1:** neopouzdřený nevirulentní kmen *S. pneumoniae*; **PC:** fázový kontrast; **GFP:** signál GFP (lokalizace GFP-StkP nebo GFP-PhpP); **overlay:** překryv fázového kontrastu a GFP signálu; Převzato z BEILHARZ *et al.*, 2012



Obr. 2-6: Lokalizace proteinů GFP-FtsA, GFP-StkP a GFP-DivIVA v buňkách *S. pneumoniae*

Časoběrná fluorescenční mikroskopie, 30. minuta buněčného cyklu; Převzato z BEILHARZ *et al.*, 2012



Obr. 2-7: Model nerovnoměrného buněčného růstu a dělení kmene *S. pneumoniae* $\Delta stkP$

Převzato z BEILHARZ *et al.*, 2012

2.5.1 Substráty proteinkinasy StkP

Přesná funkce StkP není stále plně objasněna. Právě identifikace substrátů proteinkinasy pomáhá lépe porozumět signálním drahám, které tyto enzymy regulují. Dosud bylo identifikováno sedm substrátů StkP: fosfoglukosaminmutasa GlmM (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2005), regulátor RitR (ULIJASZ *et al.*, 2009), proteiny buněčného dělení FtsZ (GIEFING *et al.*, 2010), FtsA (BEILHARZ *et al.*, 2012) a DivIVA, mangan-dependentní anorganická pyrofosfatasa PpaC a hypotetický membránový protein Spr0334 (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010).

U *S. agalactiae* se vyskytují homology proteinů RitR, FtsZ, DivIVA, PpaC a Spr0334, které též podléhají fosforylaci Ser/Thr proteinkinase Stk1 (RAJAGOPAL *et al.*, 2006; SILVESTRONI *et al.*, 2009; GIEFING *et al.*, 2010).

GlmM

GlmM neboli fosfoglukosaminmutasa je prvním objeveným substrátem proteinkinasy StkP *in vivo* pomocí fosfoproteomové analýzy. Fosforylace *in vitro* byla potvrzena kinázovou reakcí (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2005).

GlmM katalyzuje přeměnu glukosamin-6-fosfátu na jeho izomer glukosamin-1-fosfát. Tato přeměna představuje první krok v biosyntetické dráze vedoucí k tvorbě UDP-*N*-acetylglukosaminu, esenciálního prekursoru buněčných komponent, jako je peptidoglykan, lipopolysacharidy a teichoové kyseliny. Bylo prokázáno, že fosforylace

GlmM proteinkinasou StkP výrazně stimuluje její specifickou aktivitu *in vitro*. Význam fosforylace GlmM *in vivo* zatím není plně objasněn (PALLOVÁ, 2007b).

V *E. coli* je GlmM esenciální pro růst a je syntetizována v neaktivní defosforylované formě. K tomu, aby byla aktivní, musí být fosforylována (MENGIN-LECREULX a HEIJENOORT, 1996).

Pro kolonizátora zubního povrchu *S. gordonii* není GlmM esenciálním proteinem. Mutace *glmM* má za následek deformaci buněčného povrchu, zvětšení buněk, které jsou defektní v separaci a tvoří dlouhé řetízky oproti divokému typu. Mutace *glmM* dále zvyšuje senzitivitu k penicilinu a k zabíjení polymorfonukleárními leukocyty (SHIMAZU *et al.*, 2012).

RitR

Protein RitR je regulátor dvousložkového systému, který ovšem postará svou kognátní histidinovou kinasu. Z tohoto důvodu se také označuje jako “osiřelý” regulátor (ULIJASZ *et al.*, 2004).

RitR patří do rodiny globálních regulátorů. Jeho hlavní funkcí je udržování stálé hladiny železa v buňce. Ve svém defosforylovaném stavu se pomocí své DNA vazebné domény váže na *piu* promotor, kde působí jako represor genů *piuA* a *piuB*. Tyto geny kódují transportéry železa. *In vitro* studie ukázala, že StkP protein RitR fosforyluje, tím mění jeho konformaci, která způsobí uvolnění RitR z promotoru. Naopak PhpP protein RitR defosforyluje. Fosforylace RitR *in vivo* však zatím prokázána nebyla (ULIJASZ *et al.*, 2004, 2009).

PpaC

PpaC neboli mangan-dependentní anorganická pyrofosfátasa je dalším substrátem proteinkinasy StkP. Fosforylace PpaC proteinkinasou StkP byla prokázána pouze *in vivo*. Předpokládá se, že fosforylace *in vitro* nejspíše vyžaduje specifické reakční podmínky nebo přítomnost jiného interakčního partnera (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010).

Pyrofosfátasy jsou esenciální enzymy, které katalyzují hydrolýzu anorganického pyrofosfátu (PP_i), který se tvoří během různých biosyntetických reakcí vyžadujících ATP. Pyrofosfát funguje jako substrát i jako regulátor mnoha enzymů. Jako regulátor se reakcí neúčastní a jeho efekt je většinou inhibiční. Z tohoto důvodu je jeho koncentrace v buňce rozhodující pro normální růst (LAHTI, 1983).

PpaC *S. pneumoniae* (PpaC_{Sp}) a PpaC *S. agalactiae* (PpaC_{Sa}) jsou z 85% sekvenčně identické. PpaC_{Sa} je fosforylována proteinkinasou Stk1 na serinovém zbytku, přesto přesná pozice aminokyseliny není známa, stejně jako význam fosforylace tohoto enzymu (SILVESTRONI *et al.*, 2009). Podobně je tomu i u PpaC_{Sp}, ta je ale nejspíše fosforylována na threoninovém zbytku (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010).

DivIVA

DivIVA je protein buněčného dělení. Jeho fosforylace proteinkinasou StkP byla prokázána *in vivo* i *in vitro* (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010).

Orthology proteinu DivIVA jsou široce zastoupeny v gram-pozitivních bakteriích. Naopak gram-negativní bakterie DivIVA postrádají a místo něho obsahují protein MinE (ERRINGTON *et al.*, 2003). V bakterii *B. subtilis* byl protein DivIVA intenzivně zkoumán. DivIVA společně s MinC a MinD určují střed buňky pro buněčné dělení. MinC a MinD spolu interagují a tvoří inhibiční komplex, který brání buněčnému dělení na pólech buňky. DivIVA kontroluje tento komplex, který udržuje i po rozdělení buňky na pólech (MARSTON a ERRINGTON, 1999).

Imunofluorescenční mikroskopie odhalila, že DivIVA *S. pneumoniae* lokalizuje nejen na buněčných pólech, ale i v dělicí přepážce. Do dělicí přepážky lokalizuje v pozdější fázi po vytvoření Z-kruhu. Inaktivace *divIVA* způsobuje defekty buněčného tvaru, buněčného dělení včetně segregace chromosomů (FADDA *et al.*, 2003, 2007). Ve fosfoproteomové studii byl určen jediný aminokyselinový zbytek T201 DivIVA (SUN *et al.*, 2010). V nedávné studii bylo *in vivo* prokázáno, že StkP fosforyluje DivIVA na T201, který je hlavním, ne-li jediným fosforylačním místem DivIVA. Záměna T201 za neutrální alanin znemožňující fosforylaci způsobuje změnu morfologie buněk. Buňky jsou prodloužené s polárním vydutím. Zdá se, že fosforylace DivIVA neovlivňuje všechny jeho potenciální funkce, ale tím spíše je důležitá hlavně pro kontrolu buněčného tvaru a určení míst peptidoglykanové syntézy (FLEURIE *et al.*, 2012).

FtsZ

FtsZ je prokaryotický homolog tubulinu a klíčový hráč buněčného dělení, který v časně fázi tvoří tzv. Z-kruh. *In vitro* bylo pozorováno, že StkP váže a fosforyluje protein FtsZ, ale význam této modifikace *in vivo* není znám (GIEFING *et al.*, 2010). V dělicích se buňkách dojde nejprve k vytvoření Z-kruhu a až poté se k němu připojuje StkP (BEILHARZ *et al.*, 2012).

FtsA

FtsA společně s FtsZ jsou časnými proteiny buněčného dělení. FtsA byl určen jako substrát proteinkinasy StkP pouze *in vitro* (BEILHARZ *et al.*, 2012).

FtsA je esenciální protein buněčného dělení a patří do proteinové rodiny aktin/HSP70 (Heat Shock Proteins) (BORK *et al.*, 1992). Kryotomografií bylo odhaleno, že FtsA tvoří protofilamenta podobná aktinu (SWEDZIAK *et al.*, 2012). Ačkoli je FtsA cytoplazmatický protein, obsahuje ve své C-terminální části amfipatický helix, kterým se může vázat do membrány (PICHOF a LUTKENHAUS, 2005). Lokalizace FtsA do Z-kruhu je závislá na proteinu FtsZ (ADDINALL a LUTKENHAUS, 1996). Zatím není známo, zda a jakým způsobem ovlivňuje fosforylace FtsA jeho funkci *in vivo*.

Spr0334

Spr0334 byl potvrzen jako substrát proteinkinasy StkP *in vivo* i *in vitro*. Funkce tohoto hypotetického membránového proteinu nebyla dosud objasněna. Spr0334 nevykazuje významnou homologii s žádnou známou proteinovou rodinou (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010).

Jelikož se tato práce ve své výsledkové části zabývá objasněním fosforylace a funkce proteinu Spr0334, je tento protein detailněji popsán v úvodu čtvrté kapitoly (Výsledky).

2.6 Proteinfosfatasa PhpP *S. pneumoniae*

S. pneumoniae kóduje jedinou PP2C Ser/Thr proteinfosfatasu eukaryotického typu nazvanou PhpP. PhpP je mangan-dependentní cytoplazmatická fosfatasa. Gen *phpP* se s 4 nukleotidovým přesahem překrývá s genem *stkP* kódujícím Ser/Thr proteinkinasu. Bylo dokázáno, že tyto dva geny jsou transkribovány jako jedna mRNA. Bylo rovněž prokázáno, že autofosforylovaná StkP podléhá defosforylaci proteinfosfatasou PhpP, což naznačuje, že vytvářejí funkční pár *in vivo* (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2005).

Fluorescenční mikroskopie odhalila, že PhpP je lokalizována v cytoplazmě, ale lokalizuje i ve tvořící se buněčné přepážce. Obohacení PhpP ve středu buňky je závislé na interakci s aktivní (autofosforylovanou) formou StkP (BEILHARZ *et al.*, 2012).

V nedávné studii se podařilo ve virulentních kmenech 6A a D39 *S. pneumoniae* deletovat gen *phpP* a blíže určit funkci proteinfosfatasy PhpP. PhpP hraje roli v regulaci

biosyntézy buněčné stěny a dělení, adhezenci a tvorbě biofilmu a tyto regulace jsou kmenově specifické (AGARWAL *et al.*, 2012b).

Delece genu *phpP* ve virulentních kmenech způsobuje agregaci buněk a tvorbu dlouhých řetízků bez dalších zřejmých defektů dělení. Stěna buněk je v porovnání s divokým typem tlustší. Kmenově specifická je reakce kmene $\Delta phpP$ na stresové podmínky, kdy kmen $6A\Delta phpP$ je citlivý ke všem zkoumaným stresům (zvýšená teplota, nízké pH, osmotický a oxidativní stres). Naproti tomu kmen $D39\Delta phpP$ je citlivý pouze na osmotický stres. Podobně je tomu i v případě adhezence a tvorbě biofilmu. Kmen $6A\Delta phpP$ má zvýšenou tvorbu biofilmu a efektivně adheruje na hltanové buňky oproti kmeni $D39\Delta phpP$, který se projevuje podobně jako divoký typ.

Bylo zjištěno *in vitro* i *in vivo*, že fosfatázová aktivita PhpP negativně reguluje expresi PspC. Exprese důležitého pneumokokového povrchového adhezinu PspC je pod kontrolou dvousložkového systému TCS06 složeného z histidinové kinasy HK06 a regulátoru RR06. Delece genu *phpP* způsobuje neomezenou aktivitu proteinkinasy StkP a ta slouží jako alternativní kinasa fosforylující RR06. Fosforylací aktivovaný RR06 se váže na *pspC* promotor a spouští transkripci adhezinu PspC (AGARWAL *et al.*, 2012b).

Protichůdná funkce StkP-PhpP jako funkčního páru značí, že substráty těchto dvou enzymů budou pravděpodobně stejné. Identifikované substráty StkP jsou popsány v předchozí kapitole. Mezi identifikované substráty PhpP patří autofosforylovaná StkP (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2005), regulátor RitR (ULIJASZ *et al.*, 2009), protein buněčného dělení DivIVA (BEILHARZ *et al.*, 2012) a již zde zmiňovaný regulační protein RR06 (AGARWAL *et al.*, 2012b).

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Bakteriální kmeny

ESCHERICHIA COLI

E. coli **DH5α** (*fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*)

použití: propagace plazmidových vektorů

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

S. pneumoniae **Sp1** (Rx derivát, *strI hexA*):

použití: výchozí nevirulentní experimentální kmen

S. pneumoniae **Sp5** (*strI hexA; rif23*): (MORRISON *et al.*, 1984) nevirulentní kmen, nese chromozomálně kódovanou rezistenci k rifampicinu

použití: zdroj DNA pro testy kompetence

S. pneumoniae **Sp10** (*strI hexA; stkP::cat*): (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2005)

použití: kontrolní nekompetentní kmen pro testy kompetence

S. pneumoniae **Sp45** (*strI hexA; bgaA::gfp-spr0334*): (L. Nováková, nepublikované výsledky)

použití: určení lokalizace proteinu Spr0334 v buňce

3.1.2 Vektory

Cheshire kazeta (WENG *et al.*, 2009) je lineární DNA konstrukt o velikosti 2495 bp připravený pomocí PCR určený pro in-frame delecí genu ve *S. pneumoniae*. Princip Cheshire kazety, viz výsledky kapitola 4.1.

Tento konstrukt byl použit k vytvoření kmene Sp57 (Rx1 *spr0334::lox72*)

pDELstkP (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2005) je plasmid o velikosti 5400 bp a slouží k delecí genu *stkP* kódujícího Ser/Thr proteinkinasu ve *S. pneumoniae*. Plasmid obsahuje konstrukt složený z *cat* kazety kódující gen pro chloramfenikolovou rezistenci a z oblastí přiléhajících ke genu *stkP*. Díky sekvencím přiléhajících ke genu *stkP* může dojít k homologní rekombinaci na chromosomu *S. pneumoniae*. Tím je vyštěpen gen pro StkP a

nahrazen chloramfenikolovou kazetou. pDELstkP byl štěpen *SacII*, čímž byl linearizován a následně použit k vytvoření kmene Sp58 (*stkP::cat*; *bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*).

pETPhos0334 (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010) a **pETPhos0334-T67A+T78A** (L. NOVÁKOVÁ, nepublikované výsledky) je upravený plasmid o velikosti 7081 bp připravený na základě vektoru pETPhos (CANOVA *et al.*, 2008), který je původně určen pro studium substrátů Ser/Thr proteinkinas. Vektor slouží k expresi proteinů s připojenou histidinovou kotvou, která neobsahuje žádné serinové ani threoninové zbytky, čímž nevznikají žádná potenciální místa nespecifické fosforylace. Kotva může být odštěpena TEV proteasou. Selekčním znakem vektoru je ampicilinová rezistence. Do vektoru byl pomocí restrikčních míst *NdeI* a *BamHI* vložen gen *spr0334*. Plasmid pETPhos0334 a pETPhos0334-T67A+T78A byl použit jako templát k amplifikaci genu *spr0334* a jeho mutované formy s histidinovou kotvou.

pJWV25 (EGERHARDT *et al.*, 2009) je vektor o velikosti 8587 bp. Je určen pro expresi proteinů fúzovaných s GFP na N-konci ve *S. pneumoniae*. Vektor obsahuje inducibilní zinkový protomor *P_{czcD}* a dvě sekvence (*gatC* a *bgaA*) homologní se sekvencemi na chromosomu *S. pneumoniae*. Díky těmto sekvencím lze vektor použít k vložení konstruktů do postradatelného lokusu *bgaA* v genomu *S. pneumoniae* homologní rekombinací. Selekčním znakem vektoru je rezistence pro tetracyklin.

pJWV25-0334 (L. NOVÁKOVÁ, nepublikované výsledky) je plasmid o velikosti 9280 bp připravený na základě vektoru pJWV25 (Eberhardt *et al.*, 2009), který byl původně určen pro expresi proteinů fúzovaných s GFP na N-konci ve *S. pneumoniae*. Do vektoru pJWV25 byl pomocí restrikčních míst *NotI* a *SpeI* vložen gen *spr0334*. Vzniklý plasmid byl použit k vložení komplementačního konstruktů *P_{czcD}-gfp-spr0334* do genomu *S. pneumoniae*.

3.1.3 Půdy a média

Množství jednotlivých přísad, pokud není uvedeno jinak, je udáváno na 1 litr média, doplňují se do celkového objemu destilovanou vodou a sterilizují se. Do pevných půd byl přidán 1,5% agar (Becton, Dickinson and company, dále jen BD company).

Selekční půdy byly připraveny přidáním příslušného antibiotika v potřebné koncentraci do média vychlazeného na cca 45°C.

***S. pneumoniae*:** erythromycin 0,05 µg/ml; rifampicin 1 µg/ml; tetracyklin 2,5 µg/ml; chloramfenikol 10 µg/ml

***E. coli*:** ampicilin 100 µg/ml

KULTIVACE *E. COLI*

Kultivace probíhala vždy aerobně při 37°C.

LB: trypton 10 g; yeast extrakt 5 g; NaCl 10 g; pH 7,5

SOB: trypton 20 g; yeast extrakt 5 g; NaCl 0,58 g; KCl 0,186 g;
po sterilizaci: 1 M MgCl₂ 10 ml; 1 M MgSO₄ 10 ml

KULTIVACE *S. PNEUMONIAE*

Kultivace probíhala staticky při 37°C, pokud není uvedeno jinak.

CAT médium:

casitone 10 g; trypton 5 g; yeast extrakt 1 g; NaCl 5 g

CATcomplet médium (CATc):

na 1 litr CAT média bylo přidáno: 0,5 M K₂HPO₄ 34 ml; 20% glukosa 10 ml; pH 7,5

CTM médium:

na 10 ml CATc média bylo přidáno: 0,1 M CaCl₂ 50 µl; 8% BSA 0,25 ml; pH 7,8 (pH upraveno 1 M NaOH)

M17G médium (Difco):

37,5 g M17, po sterilizaci přidat 10 ml 20% glukosy

TSB médium (Oxoid):

30 g TSB

GELOSA D (pevné médium):

glukosa 1 g; NaCl 5g; neopeptone 5 g; Tris-base 1,25 g; casitone 10 g; agar 10 g

KREVNÍ AGAR (LabMediaServis):

Columbia krevní agar 5% beraní defibrinovaná krev (BDK)

3.1.4 Pufry a roztoky

Agarozová gelová elektroforéza:

TAE pufr: 40 mM Tris; 2 mM EDTA, pH 8,5 (pH upraveno kyselinou octovou)

Loading dye 6x (Fermentas)

Fixace buněk pro mikroskopii

Fixační roztok 2x: 5% paraformaldehyd; 0,03% glutaraldehyd; 30 mM Na₃PO₄
pH 7,5 (skladován při -20°C)

roztok GTE: 50 mM glukosa; 20 mM Tris HCl pH 7,5; 10 mM EDTA

roztok PBS: 137 mM NaCl; 3 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O; 1,8 mM
KH₂PO₄; pH 7,4

Izolace chromozomální DNA *S. pneumoniae*

Roztok DCNa-SDS: 0,5% deoxycholát sodný; 0,25% SDS

Roztok NaCl-EDTA: 150 mM NaCl; 30 mM EDTA; pH 8,0

Roztok SEDS: NaCl-EDTA + DCNa-SDS (24:1)

TE pufr: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0

Izolace RNA *S. pneumoniae*

Promývací roztok: 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 2x autoklávovaný

Přenos proteinů a imunodetekce

Blotovací pufr: 48 mM Tris; 39 mM glycin; 0,0375% SDS; 20% methanol

Roztok TBS-T: 20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,05% Tween-20; pH 7,6

Příprava kompetentních buněk:

TB pufr: 10 mM PIPES; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl; sterilizace filtrací, poté přidán
MnCl₂ (výsl. konc. 55 mM); pH 6,7

SDS-PAGE

Elektroforetický pufr: 0,025 M Tris; 0,192 M glycin; 0,1% SDS; pH 8,3

Vzorkový pufr 5x: 350 mM Tris; 20% glycerol; 15% SDS; 25% β-merkptoethanol;
bromfenolová modř; pH 6,8

3.1.5 Chemikálie

chemikálie	firma	zkratka
Agarosa	Sevac	
SeaKem® GTG® agarosa	Lonza	
Akrylamid	Sevac	
Ampicilin	Sigma	Amp
Bacto-agar	BD company	
Bacto-casitone	BD company	
Bromfenolová modř	Lachema	BPB
Casitone	BD company	
Competence Stimulating Peptide	Biopharm	CSP
2' - deoxyadenosin - 5' - trifosfát	Promega	dATP
2' - deoxycytidin - 5' - trifosfát	Promega	dCTP
2' - deoxyguanosin - 5' - trifosfát	Promega	dGTP
2' - deoxythymidin - 5' - trifosfát	Promega	dTTP
Deoxycholát sodný	Merck	DCNa
Dimethylsulfoxid	Sigma	DMSO
Dodecylsulfát sodný	Serva	SDS
D-Glukosa	Lachema	
Erythromycin	Sigma	Ery
Ethidium bromid, p.a.	Sigma	EtBr
Gel red	Roche	
Glycin	Serva	
Hovězí sérový albumin frakce V	Roth	BSA
Chloramfenikol	Sigma	Cm
Imidazol	Lachema	
Kys. ethylenaminotetraoctová, dvojná sůl, p.a.	Serva	EDTA
L-fukosa 95%	Aldrich	
6x Loading Dye Solution	Fermentas	
Lysozym	Sigma	
N, N' - methylenbisakrylamid	Serva	bisAA
Neopeptone	Dufci	
Penicilin G	Sigma	PenG
Peroxid vodíku 3%		

Peroxosíran amonný, p.a.	Lachema	APS
Proteinasa K	Boehringer	
Rifampicin	Sigma	Rif
RNA Blue	Top Bio	
RNasa A	Promega	
N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin	Serva	TEMED
Tetracyklin	Serva	Tet
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma	Tris base
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, hydrochlorid	Sigma	Tris-HCl
Tryptone Peptone	Dufci	
Tween 20	Sigma	
Vankomycin	Sigma	Van
Yeast extrakt	BD company	YE

3.1.6 Enzymy

Modifikační enzymy

KOD Xtreme™ Hot start DNA polymerasa	Novagene
LA polymerasa	Top Bio
Pfu DNA polymerasa	Fermentas
Reverzní transkriptasa	Promega
Taq polymerasa	Bioline, Top Bio
T4 DNA ligasa	New England BioLabs (dále jen NEB)
Benzonasa	Merck

Restrikční enzymy

<i>Bam</i> HI	NEB
<i>Eco</i> RI	NEB
<i>Mlu</i> I	NEB
<i>Noc</i> I	NEB
<i>Not</i> I	NEB
<i>Pvu</i> I	NEB
<i>Sac</i> II	NEB

3.1.7 Protilátky

Phospho-Threonine Antibody (Cell Signalling Technology):

primární králičí polyklonální protilátka proti pThr

Anti-Rabbit IgG peroxidase conjugate (Sigma):

sekundární kozí protilátka proti králičím IgG konjugovaná s křenovou peroxidasou

Monoclonal anti-polyhistidine peroxidase conjugate (Sigma):

myší monoklonální protilátka proti histidinové kotvě konjugovaná s křenovou peroxidasou.

GFP (B-2) antibody (Santa Cruz Biotechnology):

myší monoklonální protilátka proti GFP konjugovaná s křenovou peroxidasou

3.1.8 Komerční soupravy a standardy

Min Elute TM Reaction Cleanup Kit (QIAGEN)	přečištění DNA
RNeasy [®] Mini Kit (QIAGEN)	izolace RNA z agarózového gelu
QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)	izolace DNA z agarózového gelu
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN)	izolace plazmidové DNA
BCA Protein Assay (Pierce)	měření koncentrace proteinů
SuperSignal [®] West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce)	vyvolání chemiluminiscenčního signálu
1 kB DNA Ladder Plus (NEB, Fermentas)	
Prestained Protein Marker (NEB)	

3.1.9 Počítačová analýza

<http://cmr.jcvi.org> (CMR): informace o genomu mikroorganismů

<http://myhits.isb-sib.ch>: analýza sekvence genu

<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>: srovnání sekvencí genů

DNASTAR[®] Lasergene v 8.1: sestavování map klonovacích vektorů

MicrobeTracker Suite: měření velikosti buněk

Prism: statistika velikosti buněk

3.1.10 Použité oligonukleotidy

název	sekvence 5'-3'	použití
DAM868 F	GGGG <u>ACGCGT</u> TGGCTTACCGTTCGTATAG	amplifikace Cheshire kazety (<i>MluI</i>)
DAM869 R	GGGG <u>CCATGG</u> TCGATACCGTTCGTATAATGT	amplifikace Cheshire kazety (<i>NcoI</i>)
PB012 F	CGTCGCTCTTTTGCATTTGAGG	amplifikace části genu <i>spr0333</i>
PB013 R	CGCG <u>ACGCGT</u> TCGTCTTTTTTTTACTCATGAGTATC	amplifikace části genu <i>spr0333</i> (<i>MluI</i>)
PB014 F	GCGC <u>CCATGG</u> GTCATGCGGATGACTTGGACTACTAA	amplifikace části genu <i>spr0335</i> (<i>NcoI</i>)
PB015 R	CCAGGCATGATAGAAGGACCTTC	amplifikace části genu <i>spr0335</i>
PHPP-F	GGACTGAC <u>CATATG</u> GAAATTTTCATTA	ověření vyštěpení genu pro StkP z chr. <i>S. pneumoniae</i> (<i>NdeI</i>)
DFKRP	TGC <u>CCGCGG</u> TCATAATATCACGGACCGCAT	ověření vyštěpení genu pro StkP z chr. <i>S. pneumoniae</i> (<i>SacII</i>)
LN123 F	TTCGCTACTTGGAGCCACTAT	amplifikace promotor. oblasti <i>P_{czcD}</i>
LN139 R	ATGATGATGATGGTGAagatgttcatattgectct	amplifikace promotor. oblasti <i>P_{czcD}</i>
LN140 F	ATGATGATGATGGTGAagatgttcatattgectct	amplifikace <i>spr0334-his-tag</i> z templátu pETPhos0334
LN142 R	AGGACAAGAGTTTTTCTTTGG	ověření integrace kompl. konstruktů do <i>spr0564-0565</i> lokusu chr. <i>S. pneumoniae</i>
LN155 R	CGGC <u>GCGGCCGCT</u> TAGTAGTCCAAGTCATCCG	amplifikace <i>spr0334-his-tag</i> z templátu pETPhos0334 (<i>NotI</i>)
LN156 F	cggtctagaAGTAAAAAAGACGAAATCGT	ověření integrace kompl. konstruktů-GFP do <i>bgaA</i> lokusu chr. <i>S. pneumoniae</i>
LN157 R	ATTAG <u>GCGGCCGCT</u> TAGTAGTCCAAGTCATCCGC	ověření delece <i>spr0334</i> Cheshire kazetou na ch. <i>S. pneumonie</i> (<i>NotI</i>)
LN165 F	CGTGTTTCGTTTTCAAGGAGAC	ověření vyštěpení ChK0334 z chr. <i>S. pneumoniae</i>

LN166 R	GACACTCCTCTTGTTCATTT	ověření vyštěpení ChK0334 z chr. <i>S. pneumoniae</i>
LN194 F	AACGCCTGAATAGATTGG	amplifikace intergenové oblasti <i>spr0332-spr0333</i>
LN195 R	AAGCCAAAGGTTGGTTTC	amplifikace intergenové oblasti <i>spr0332-spr0333</i>
LN196 F	CCTGACTAGTGATGAAGC	amplifikace intergenové oblasti <i>spr0333-spr0334</i>
LN197 R	CGAATAGCTTGACCAACT	amplifikace intergenové oblasti <i>spr0333-spr0334</i>
LN198 F	GTCAATATCGTTAACGGC	amplifikace intergenové oblasti <i>spr0334-spr0335</i>
LN199 R	GATAGCAACTGTGTAACC	amplifikace intergenové oblasti <i>spr0334-spr0335</i>
LN200 F	TTGGTGCTCACACTTACC	amplifikace intergenové oblasti <i>spr0335-spr0336</i>
LN201 R	TGAGCCATCATATCTCCC	amplifikace intergenové oblasti <i>spr0335-spr0336</i>
LN202 F	TGGAAGTATGAAAGTGCG	amplifikace intergenové oblasti <i>spr0336-spr0337</i>
LN203 R	ACTGCTAGTAGAACTTGC	amplifikace intergenové oblasti <i>spr0336-spr0337</i>
LN204 R	TAAAAACTCGTCAACTTCTAC	amplifikace intergenové oblasti <i>spr0331-spr0332</i>
LN205 F	AATATGCTTATCCTCGCTATG	amplifikace intergenové oblasti <i>spr0331-spr0332</i>
LN206 R	CTCTAAATCTTTACGTATCGC	amplifikace intergenové oblasti <i>spr0330-spr0331</i>
LN207 F	GGTAGCATTGATCATCTTTTC	amplifikace intergenové oblasti <i>spr0330-spr0331</i>

Všechny oligonukleotidy byly objednány u firmy Metabion international AG.

3.2 Metody

3.2.1 Manipulace s DNA

3.2.1.1 Agarózová gelová elektroforéza

Agarózová gelová elektroforéza je nejrozšířenější elektromigrační metoda. Jejím principem je odlišná elektroforetická pohyblivost molekul v gelu ve stejnosměrném elektrickém poli. Dále pohyblivost molekul závisí na molekulové hmotnosti a konformaci molekuly, koncentraci gelu a na použitém napětí.

Pro analýzu DNA jsme použili horizontální agarózovou elektroforézu v pufru TAE. Dle velikosti dělených fragmentů DNA jsme upravili hustotu agarózového gelu. Pro zviditelnění DNA fragmentů v UV světle jsme do gelu přidali Red Gel (Roche). Vzorky DNA jsme na gel nanášeli po přidání 6x Loading Dye Solution (Fermentas). DNA fragmenty jsme separovali při napětí 5 V/cm² a velikost fragmentu jsme určili pomocí standardu.

Separované fragmenty DNA jsme z agarózového gelu izolovali pomocí komerční soupravy Gel Extraction Spin Kit (QIAGEN) dle pokynů výrobce.

3.2.1.2 Polymerázová řetězová reakce – PCR

PCR je metoda rychlého a snadného zmnožení úseku DNA založená na principu opakovaně řízené denaturace dvouřetězcové DNA (dsDNA) a následné renaturace řetězců se specifickými oligonukleotidy. Tyto oligonukleotidy slouží jako primery pro *in vitro* syntézu nového řetězce DNA a zároveň ohraničují amplifikovaný úsek DNA.

PCR se sestává ze tří kroků: denaturace, hybridizace primerů a elongace. Během denaturace dojde ke krátkému zvýšení teploty a k oddělení obou řetězců DNA od sebe. V následujícím kroku se vzorek ochladí a primery nasednou na komplementární sekvenci DNA. Ve třetím kroku probíhá syntéza požadovaného úseku DNA.

Aby se tyto tři kroky mohly cyklicky opakovat, používá se termostabilní DNA polymerasa z termofilní bakterie. Dále musí být zvolena vhodná teplota (T_m) pro správné nasednutí primerů v druhém kroku, která je odvozena ze sekvence obou oligonukleotidů: $T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$; T_m (°C); G, C, A, T – počet jednotlivých nukleových basí v oligonukleotidu

PCR s KOD Xtreme™ Hot start a Pfu polymerasou

Tyto dvě polymerasy jsme použili v reakcích, v nichž jsme vyžadovali co nejpřesnější amplifikaci daného fragmentu DNA. KOD Xtreme™ Hot start polymerasu

jsme použili pro amplifikaci delečního konstruktů určeného k delecí genu *spr0334* v chromosomu *S. pneumoniae*. Reakční podmínky jsme stanovili dle pokynů výrobce (Novagene).

Pfu polymerasu jsem použili pro amplifikaci komplementačního konstruktů P_{czcD}-*his-spr0334*. Reakční podmínky jsme stanovili dle pokynů výrobce (Fermentas).

PCR s LA polymerasou

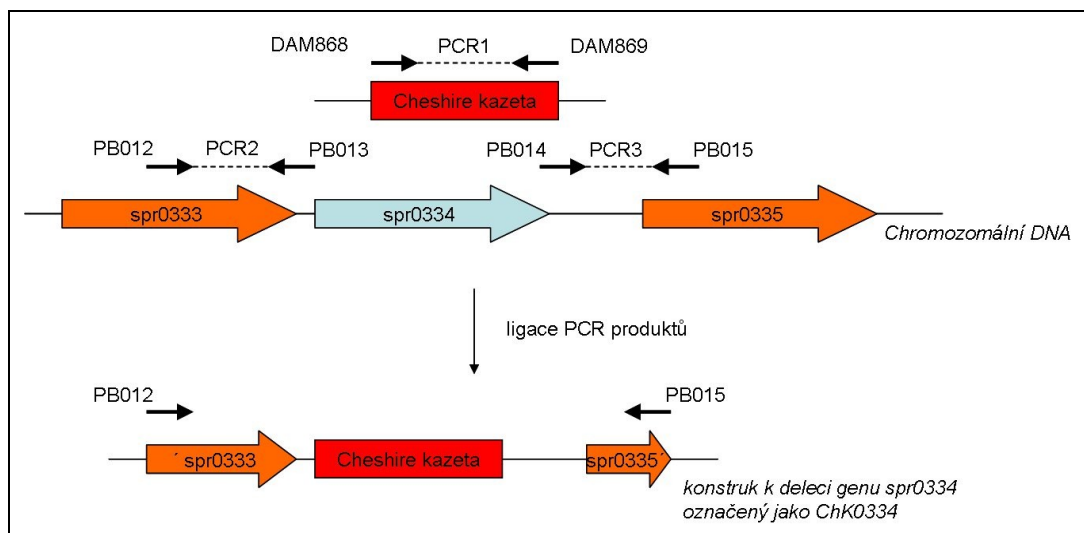
LA polymerasu jsme použili pro ověření vložení či vyštěpení (delecí) DNA fragmentu na určeném místě a ve správné orientaci. Reakční podmínky jsme stanovili dle pokynů výrobce (Top Bio).

PCR na koloniích

Tuto reakci jsme použili pro ověření vložení či vyštěpení (delecí) DNA fragmentu na určeném místě a ve správné orientaci. Zdrojem templátové DNA byly celé jednotlivé kolonie vypíchnuté z pevného média. Do reakční směsi jsme přidali 10% Tween 20, který způsobil buněčnou lyzi. Pro tento typ PCR jsme použili Taq polymerasu. Reakční podmínky jsme stanovili dle pokynů výrobce (Bioline).

3.2.1.3 Příprava konstruktů pro delecí genu *spr0334*

Konstrukt pro delecí genu *spr0334* v chromosomu *S. pneumoniae* jsme připravili pomocí PCR s KOD Xtreme™ Hot start polymerasou. Deleční konstrukt byl složen z Cheshire kazety spojené s okolím deletovaného genu. Pro amplifikaci Cheshire kazety jsme použili oligonukleotidy DAM868 a DAM869 a poté ji štěpili restričními endonukleasami *MluI* a *NocI*. Část genu *spr0333* jsme amplifikovali pomocí oligonukleotidů PB012 a PB013 a poté ho štěpili *MluI*. Část genu *spr0335* jsme amplifikovali pomocí oligonukleotidů PB014 a PB015 a poté ho štěpili *NocI*. Takto upravené fragmenty DNA jsme spojili ligasou a amplifikovali za použití oligonukleotidů PB012 a PB015. Takto připravený lineární DNA konstrukt jsme pojmenovali ChK0334 (obr. 3-1). Reakční podmínky PCR jsme stanovili dle pokynů výrobce (Novagen).



Obr. 3-1: Schéma přípravy konstruktů ChK0334 pro delecí genu *spr0334*

šipky: označují použité oligonukleotidy

3.2.1.4 Příprava komplementačního konstruktů

Komplementační konstrukt P_{czcD} -*his*-*spr0334* a P_{czcD} -*his*-*spr0334*-T67A+T78A jsme připravili pomocí fúzní PCR s Pfu polymerasou. V obou případech jsme v první PCR reakci amplifikovali gen *spr0334* a gen nesoucí dvě bodové mutace *spr0334*-T67A+T78A s histidinovou kotvou z plasmidu pETPhos0334. K amplifikaci jsme použili oligonukleotidy LN140 a LN155.

Druhou PCR reakcí jsme amplifikovali inducibilní zinkový promotor P_{czcD} , kde jsme jako templát použili vektor pJWV25 a oligonukleotidy LN123 a LN139.

Díky tomu, že se sekvence oligonukleotidu LN139 a LN140 překrývají, může dojít ve třetí PCR reakci ke spojení obou předchozích amplifikačních produktů. V tomto případě jsme použili oligonukleotidy LN123 a LN155.

Oligonukleotidy LN123 a LN155 zahrnují restrikční místa pro *EcoRI* a *NotI*, pomocí nichž jsme klonovali fúzní fragment do vektoru pJWV25. Vzniklý plasmid jsme pojmenovali pZn-His-0334 a pZn-His-0334-T67A+T78A. Reakční podmínky jsme stanovili dle pokynů výrobce (Fermentas).

3.2.1.5 Štěpení DNA restrikčními endonukleasami

Restrikční endonukleasy (RE) jsou enzymy, které rozeznávají specifické sekvence dsDNA. V těchto sekvencích dochází ke štěpení obou vláken a vznikají fragmenty DNA s definovanými konci. RE substrátovou dsDNA nijak nemodifikují, pouze ji štěpí. Ke své činnosti nepotřebují ATP.

Při práci s RE jsme používali doporučené pufry a řídili se pokyny výrobce (NEB). Pokud bylo třeba, byly fragmenty DNA přečištěny pomocí komerčního kitu Min Elute™ Reaction Cleanup Kit (QIAGEN).

3.2.1.6 Ligace

Ligasy jsou ATP-dependentní enzymy, které specificky spojují jednotlivé fragmenty DNA.

Ligaci jsme standardně prováděli ve 20 µl reakční směsi při pokojové teplotě enzymem T4 DNA ligasa. Reakční podmínky jsme dodržovali dle pokynů výrobce (NEB).

3.2.2 Manipulace s RNA

3.2.2.1 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je enzymová reakce, při níž dochází k přepisu genetické informace z molekuly RNA do cDNA (complementary DNA). Produktem reverzní transkripce je hybrid RNA-DNA, který není vhodný pro další práci, a proto je nutné DNA amplifikovat pomocí PCR.

Z RNA izolované po pěstování kmenů *S. pneumoniae* v 50 ml TSB na $OD_{600} = 0,5$ jsme syntetizovali cDNA, kterou jsme použili jako templát v RT-PCR reakci. Pro reverzní transkripci jsme namíchali 1 µg RNA s 0,5 µg náhodných hexamerů (Invitrogen) a doplnili vodou do 5 µl. Směs jsme inkubovali 5 min při 70 °C, čímž došlo k rozrušení vlásečkovitých struktur RNA. Následně jsme směs ochladili na ledu, kdy náhodné hexamery nasednou na RNA. Dále jsme do reakční směsi přidali: 4 µl ImProm-II™ 5x reakčního pufru; 2,4 µl $MgCl_2$ (25 mM); 1 µl dNTP (10 mM); 1 µl rRNasin; 1 µl ImProm-II™ reverzní transkriptasy a doplnili vodou do 20 µl. Reakční směs jsme inkubovali 5 min při 25°C a samotná reverzní transkripce probíhala 1 hod při 42°C. Následovala inaktivační reakce 15 min při 70°C. Jako negativní kontrolu jsme použili směs bez reverzní transkriptasy. Vzorky byly uchovávány v -80°C.

Pro syntézu cDNA jsme používali reverzní transkriptasu ImProm-II™ (Promega) podle pokynů výrobce.

3.2.2.2 RT-PCR

Metoda RT-PCR souží k amplifikaci cDNA vzniklé při reverzní transkripci. Při RT-PCR jsme používali Taq DNA polymerasu (Top Bio) a PCR směs jsme namíchali dle pokynů firmy Promega. Reakční směs obsahovala 20 - 50 ng cDNA; 1,25 µl každého

oligonukleotidu (1 μ M); 2,5 μ l 10x reakční pufr; 0,5 μ l dNTP (10 mM); 1 μ l Taq polymerasy (5 U) a H₂O pro doplnění do celkového objemu 25 μ l. Amplifikace probíhala v 30 cyklech za následujících podmínek: počáteční denaturace 94°C 2 min; denaturace 94°C 15 s; hybridizace primerů 50°C 15 s; elongace 72 °C 1 min; závěrečná elongace probíhala při 72 °C 5 min.

Seznam oligonukleotidů použitých pro RT-PCR je uveden v tabulce 3-1.

Tyto oligonukleotidy jsme použili pro analýzu transkripce genů v předpokládaném operonu.

název	sekvence (5'-3')	použití	velikost PCR produktu
LN194 F	AACGCCTGAATAGATTGG	ověření kotranskripce genů <i>spr0332</i> a <i>spr0333</i>	676 bp
LN195 R	AAGCCAAAGGTTGGTTTC		
LN196 F	CCTGACTAGTGATGAAGC	ověření kotranskripce genů <i>spr0333</i> a <i>spr0334</i>	246 bp
LN197 R	CGAATAGCTTGACCAACT		
LN198 F	GTCAATATCGTTAACGCG	ověření kotranskripce genů <i>spr0334</i> a <i>spr0335</i>	300 bp
LN199 R	GATAGCAACTGTGTAACC		
LN200 F	TTGGTGCTCACACTTACC	ověření kotranskripce genů <i>spr0335</i> a <i>spr0336</i>	268 bp
LN201 R	TGAGCCATCATATCTCCC		
LN202 F	TGGAAGTATGAAAGTGCG	ověření kotranskripce genů <i>spr0336</i> a <i>spr0337</i>	274 bp
LN203 R	ACTGCTAGTAGAACTTGC		
LN204 R	TAAAACTCGTCAACTTCTAC	ověření kotranskripce genů <i>spr0331</i> a <i>spr0332</i>	383 bp
LN205 F	AATATGCTTATCCTCGCTATG		
LN206 R	CTCTAAATCTTTACGTATCGC	ověření kotranskripce genů <i>spr0330</i> a <i>spr0331</i>	285 bp
LN207 F	GGTAGCATTGATCATCTTTTC		

Tabulka 3-1: Oligonukleotidy pro RT-PCR

3.2.3 Manipulace s proteiny

3.2.3.1 Měření koncentrace proteinů

Koncentraci proteinů jsme stanovovali pomocí komerční soupravy BCA Protein Assay Reagent (Pierce). Principem metody je kolorimetrická reakce probíhající 30 min při 37°C. Poté se změří absorbance vzorku při 562 nm.

Abychom mohli určit koncentraci proteinu z odečtené absorbance, vytvořili jsme dle pokynů výrobce kalibrační křivku z roztoku proteinu BSA o různých známých koncentracích. Proložením kalibrační křivky přímkou jsme získali rovnici regrese, podle

kteé jsme vypoítali koncentraci proteinů ve vzorcích. Při měření jsme postupovali dle pokynů výrobce (Pierce).

3.2.3.2 *SDS-polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)*

SDS-PAGE je metoda dělení proteinů v elektrickém poli podle jejich molekulové hmotnosti. Proteinový vzorek byl před nanesením na gel smíchán s SDS vzorkovým pufrém a inkubován 10 min při 100°C. SDS proteiny denaturuje a uděluje každému proteinu shodný počet negativních nábojů na jednotku hmoty. Díky této vlastnosti SDS se proteiny dělí v polyakrylamidovém gelu pouze podle své molekulové hmotnosti.

Elektroforéza probíhala v přístroji (ATTO corporation) při napětí 15 V/cm² v SDS elektroforetickém pufru. Používali jsme 4% zaostřovací gel s 10% nebo 12% separačním gelem. Složení gelů je uvedeno v následující tabulce (tab. 3-2).

	30% akrylamid	1,5M Tris pH 8,8	0,5M Tris pH 6,8	10% SDS	H ₂ O	10% APS	TEMED	celk. objem
zaostřovací gel 4%	0,53 ml	-	1 ml	40 µl	2,6 ml	40 µl	5 µl	4 ml
separační gel 10%	4,6 ml	3,5 ml	-	140 µl	5,7 ml	140 µl	14 µl	14 ml
separační gel 12%	5,6 ml	3,5ml	-	140 µl	4,7 ml	140 µl	14 µl	14 ml

Tabulka 3-2: Složení polyakrylamidového gelu pro SDS-PAGE

3.2.3.3 *Přenos proteinů na membránu („Western blotting“)*

Za účelem imunodetekce jsme přenesli proteiny z polyakrylamidového gelu na PVDF membránu Immobilon-P (Millipore). Membrána byla aktivována smočením v methanolu a poté v blotovacím pufru (viz kap. 3.1.4). Přenos proteinů probíhal v blotovacím pufru 30 min při 360 mA v blotovacím přístroji Enduro (Labnet) a postupovali jsme dle pokynů výrobce. Známkou správného přenosu proteinů byly viditelné proužky standardu na membráně.

3.2.3.4 *Imunodetekce proteinů*

Pro imunodetekci fosforylovaných proteinů jsme používali primární králičí polyklonální protiláku proti pThr a sekundární kozí protilátku konjugovanou s křenovou peroxidasou proti králičím IgG. V případě detekce histidinové kotvy jsme používali

monoklonální myši protilátku proti poly-His konjugovanou s křenovou peroxidasou. A pro detekci GFP jsme používali myši monoklonální protilátku konjugovanou s křenovou peroxidasou.

Signál byl vyvolán použitím komerční soupravy SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce). V přítomnosti křenové peroxidasy a peroxidu byl substrát luminol štěpen a vytvářel signál zachytitelný na rentgenový film. Vyvolání rentgenového filmu umožnilo lokalizaci detekovaného proteinu.

Při imunodetekci pThr byl dodržován následující postup:

- 1) blokace proteinů na membráně 30 min v 5% BSA v TBS-T
- 2) inkubace s primární protilátkou přes noc při 4°C, ředění 1:2000 v 1% BSA v TBS-T
- 3) promytí membrány 3 x 10 min v TBS-T
- 4) inkubace se sekundární protilátkou, ředění 1:5000 v 1% BSA v TBS-T
- 5) promytí membrány 3 x 10 min v TBS-T
- 6) vyvolání signálu použitím komerční soupravy dle návodu výrobce
- 7) detekce signálu na rentgenový film

Při imunodetekci histidinové kotvy byla membrána blokována v 3% BSA v TBS-T přes noc při 4°C. Dále byla jednu hodinu inkubována s protilátkou proti poly-His (ředění 1:10 000) konjugovanou s křenovou peroxidasou v 1% BSA v TBS-T, další postup viz výše od kroku 5.

Při imunodetekci GFP byla membrána blokována v 3% BSA v TBS-T přes noc při 4°C. Dále byla jednu hodinu inkubována s protilátkou proti GFP (ředění 1:1000) konjugovanou s křenovou peroxidasou v 1% BSA v TBS-T, další postup viz výše od kroku 5.

3.2.4 Manipulace s *E. coli*

3.2.4.1 Kultivace *E. coli*

Kultivace *E. coli* probíhala při 37°C v LB médiu za stálého třepání, tak aby docházelo k okysličování kultury v celém jejím objemu. Při kultivaci na pevném médiu jsme použili LB médium s přídavkem 1,5% agaru a inkubace probíhala při 37°C. Selektivní půdy jsme připravili přidáním daného ATB v příslušné koncentraci.

3.2.4.2 Příprava kompetentních buněk *E. coli* DH5α

Kompetentní buňky *E. coli* DH5α jsme připravovali metou podle INOUE *et. al.*, (1990). 100 ml půdy SOB jsme inokulovali 400 µl bakteriální kultury ve stacionární fázi a kultivovali při 18°C za intenzivního třepání (250 ot/min). Jakmile kultura dosáhla $OD_{600} = 0,6$, byla kultivace přerušena a buňky jsme inkubovali 10 min na ledu. Po centrifugaci (10 min, 2500 g, 4°C) jsme buňky resuspendovali v 32 ml ledového pufru TB. Suspenzi jsme ochladili 10 min na ledu a centrifugovali (10 min, 2500 g, 4°C). Buňky jsme resuspendovali v 8 ml pufru TB, přidali jsme DMSO do konečné koncentrace 7% a nechali 10 min stát na ledu. Suspenze jsme rozdělili po 100 µl do mikrozkušavek a zamrazili v kapalném dusíku. Kompetentní buňky jsme uchovávali při -80°C.

3.2.4.3 Transformace buněk *E. coli* plazmidovou DNA

Metoda transformace buněk *E. coli* je založena na principu teplotního šoku, který usnadní průchod plazmidové DNA bakteriální buněčnou stěnou.

Kompetentní buňky *E. coli* jsme na ledu pomalu rozmrazovali a přidali k nim buď čistou plazmidovou DNA, nebo ligační směs. Vše jsme opatrně promíchali a inkubovali 30 min na ledu. Dále jsme provedli teplotní šok 1,5 min při 42°C a 1,5 min na ledu. K buněčné suspenzi jsme přidali 900 µl LB média a buňky kultivovali 1 hod při 37°C za stálého třepání. Po inkubaci jsme suspenzi vyseli na pevné LB médium s příslušným ATB a inkubovali při 37°C přes noc.

3.2.4.4 Izolace plazmidové DNA

Izolaci plazmidové DNA jsme prováděli pomocí komerční soupravy QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) dle pokynů výrobce.

3.2.5 Manipulace se *S. pneumoniae*

3.2.5.1 Kultivace *S. pneumoniae*

S. pneumoniae jsme kultivovali stacionárně při 37°C v médiu TSB, M17G nebo CATc. Konzervy jsme připravovali následujícím způsobem: do 10 ml média jsme inokulovali 200 µl kultury *S. pneumoniae* ($OD_{600} = 0,4$) a nechali růst do $OD_{600} = 0,4$, poté jsme kulturu rozdělili po 750 µl a přidali 250 µl 60% glycerolu. Takto připravené konzervy jsme skladovali při -80°C.

Pokud jsme do média přidávali $ZnCl_2$, abychom indukovali přepis genů pod indukibilním zinkovým promotorem, přidávali jsme do média či kultivační půdy rovněž 0,1 mM $MnCl_2$. Přítomnost Zn^{2+} totiž vede k „hladovění“ buňky na Mn^{2+} a přidáním Mn^{2+}

do média či kultivační půdy dojde k vyrovnání hladin iontů v buňce (JACOBSEN *et al.*, 2011).

3.2.5.2 Izolace chromozomální DNA *S. pneumoniae*

10 ml TSB média jsme inokulovali 200 μ l kultury *S. pneumoniae* z konzervy a kultivovali při 37°C do OD₆₀₀ = 0,5. Kulturu jsme centrifugovali (10 min, 7800 g, 4°C) a buňky jsme promyli pufrém (10 mM Tris-HCl, pH 7,5) a opět centrifugovali (10 min, 4100 g, 4°C). Buňky jsem resuspendovali v roztoku SEDS a inkubovali při 37°C, dokud nedošlo k lyzi kultury. K lyzátu jsme přidali proteinasu K (2 mg/ml), buněčnou suspenzi jsme inkubovali 15 min při 56°C. Přidali jsme 250 μ l TE pufru a následovala extrakce směsí fenol-chloroform (v poměru 1:1). Směs jsme centrifugovali (10 min, 4100 g, při pokojové teplotě). Odebrali jsme horní (vodnou) fázi. Počet extrakcí závisel na množství mezifáze. Nakonec jsme suspenzi extrahovali samotným chloroformem. Chromozomální DNA jsme precipitovali přidáním 0,1 objemu 3 M NaOAc a 0,6 objemu izopropanolu. Chromozomální DNA se v roztoku vysrážela. Po centrifugaci (10 min, 4100 g, při pokojové teplotě) jsme pelet chromozomální DNA promyli 80% ethanolem a nechali oschnout na vzduchu. Chromozomální DNA jsme nechali rozpouštět v TE pufru s RNAsou (20 μ g/ml).

3.2.5.3 Izolace celkové RNA ze *S. pneumoniae*

50 ml TSB jsme inokulovali 1 ml kultury *S. pneumoniae* a kultivovali při 37°C do OD₆₀₀ = 0,5. Buňky jsme krátce zchladili na ledu a centrifugovali (5 min, 3000 g, 4°C), promyli ledovým pufrém (10 mM Tris, pH 7,5) a znovu centrifugovali (5 min, 3000 g, 4°C). Pelet jsme resuspendovali v 1 ml roztoku RNA Blue (Top Bio) a buňky rozbili skleněnými kuličkami pomocí přístroje Fast Prep (ThermoScientific) (4 x 20 s, rychlost 4,5). Rozbité buňky jsme inkubovali 5 min při pokojové teplotě (dochází k rozvolnění nukleoproteinového komplexu). Na 1 ml RNA blue jsme přidali 200 μ l chloroformu, mikrozkušavku vortexovali a opět inkubovali 5 min při pokojové teplotě. Dále jsme provedli centrifugaci (10 min, 12000 g, 4°C), odebrali vodnou (horní) fázi do nové mikrozkušavky a RNA precipitovali izopropanolem a NaOAc (1 díl odebrané vodné fáze : 1 díl izopropanolu : 0,1 díl NaOAc). Vzorek RNA jsme inkubovali 10 min při 4°C a poté centrifugovali (15 min, 12000 g, 4°C). RNA jsme promyli 1 ml 70% ethanolu, nechali oschnout na vzduchu a poté rozpustili v 50 μ l H₂O. Vzorky jsme skladovali v -80°C.

Koncentraci RNA jsme určili měřením absorbance při 260 nm. Měřením poměru absorbancí A_{260}/A_{280} jsme dále ověřili čistotu izolované RNA. Kvalitu izolované RNA jsme analyzovali elektroforézou v 1,5% TAE-agarózovém gelu: 5 μ g RNA jsme smíchali s 6x Loading dye (Fermentas) a separovali při napěří 5 V/cm². Kvalitu RNA (míru degradace) jsme posuzovali podle ribozomálních 23S a 16S rRNA. Kontaminující DNA jsme ze vzorků odstranili působením DNasy I a RNA přečistili pomocí komerčního kitu RNeasy[®] Mini kit (QIAGEN) dle pokynů výrobce.

Při manipulaci s RNA jsme s veškerými chemikáliemi a materiálem zacházeli tak, abychom zabránili degradaci RNA všudypřítomnými RNasami. Skleněný materiál jsme sterilizovali 4 hod při 180°C, umělohmotný přes noc při 130°C. Pro práci s RNA jsme používali RNase-free špičky s filtrem (Axygen) a RNase-free mikrozskumavky. Pro přípravu roztoků jsme používali sterilizovanou deionizovanou H₂O (sterilizace 2 x 20 min 120°C). Pipetmany a pracovní plochu jsme omyli roztokem RNaseZap[®] (Sigma).

3.2.5.4 Transformace DNA do buněk *S. pneumoniae* pomocí syntetického CSP

Do 10 ml média CTM jsme inokulovali 200 μ l kultury *S. pneumoniae* z konzery a nechali růst při 37°C do OD₆₀₀ = 0,05. Poté jsme z této kultury odebrali 1 ml, ke kterému jsme přidali 250 ng CSP a 1 μ g chromozomální DNA nebo 200 ng plazmidové DNA (určené k transformaci). Celou směs jsme inkubovali 30 min při 30°C a 1 hod při 37°C. Kulturu jsme naředili a vyseli na misky s gelosou D a příslušným ATB. Ředění 0; 10⁻¹; 10⁻² a 10⁻³ jsme vyseli do gelosy s ATB a ředění 10⁻⁴ a 10⁻⁵ do gelosy bez ATB jako negativní kontrolu. Jako pozitivní kontrolu a pro testování transformační účinnosti jsme použili chromozomální DNA z kmene Sp5, který nese gen pro rezistenci na rifampicin. Vyseli jsme ředění 10⁻² a 10⁻³ na gelosu s rifampicinem a ředění 10⁻⁴ a 10⁻⁵ na gelosu bez ATB. Z poměru získaných transformantů na miskách s ATB ku všem narostlým koloniím na miskách bez ATB jsme vypočítali transformační účinnost. Tento způsob transformace jsme využívali hlavně k mutagenезi a porovnávání účinnosti transformace.

3.2.5.5 Přirozená transformace DNA do buněk *S. pneumoniae*

Do 10 ml média CTM jsme inokulovali 200 μ l kultury *S. pneumoniae* z konzery a nechali růst při 37°C do OD₆₀₀ = 0,05. Při této OD populace synchronně přecházela do stavu kompetence. Poté jsme z této kultury odebrali 1 ml, ke kterému jsme přidali 1 μ g chromozomální DNA z kmene Sp5, která nesla gen pro rezistenci k rifampicinu. Celou směs jsme inkubovali 30 min při 30°C a 1 hod při 37°C. Kulturu jsme naředili a vyseli na

misky s gelosou D a příslušným ATB. Ředění 10^{-1} ; 10^{-2} a 10^{-3} jsme vyseli do gelosy s ATB a ředění 10^{-4} a 10^{-5} do gelosy bez ATB jako negativní kontrolu. Z poměru získaných transformantů na miskách s ATB ku všem narostlým koloniím na miskách bez ATB jsme vypočítali transformační účinnost. Tento způsob transformace jsme využívali k testům přirozené kompetence.

3.2.5.6 *Expresa proteinů pod zinkovým inducibilním promotorem ve S. pneumoniae*

Do 50 ml média M17G nebo TSB jsme inokulovali 1 ml kultury kmene *S. pneumoniae* $OD_{600} = 0,4$. Zinek indukující expresi proteinu byl přidán do média na začátku kultivace v koncentracích 0 mM; 0,15 mM; 0,25 mM; 0,35 mM a 0,45 mM $ZnCl_2$. Buňky byly stacionárně kultivovány při 37°C do $OD_{600} = 0,5$. Poté jsme kulturu stočili (5 min, 7000 g) a pelet resuspendovali v 1 ml pufru (25 mM Tris; 100 mM NaCl; pH 7,5). Buňky jsme rozbili skleněnými kuličkami pomocí přístroje Fast Prep (4 x 20 s, rychlost 4,5). Rozbité buňky jsme centrifugovali (10 min, 10000 g). V supernatantu jsme změřili koncentraci proteinů. Proteiny jsme rozdělili na SDS-PAGE a poté provedli přenos proteinů na membránu a imunodetekci.

3.2.5.7 *Testy citlivosti k různým druhům stresů*

Testy citlivosti jsme prováděli v 10 ml média TSB metodou měření růstové křivky (pokud není uvedeno jinak) ve třech opakujících se měřeních.

Teplotní stres: Citlivost buněk různých kmenů *S. pneumoniae* na teplotní stres jsme testovali vystavením kultur teplotám 37°C (kontrola) a 40°C. Médium temperované na určitou teplotu jsme vždy inokulovali 200 μ l kultury o $OD_{600} = 0,4$ a v půlhodinových intervalech jsme monitorovali bakteriální růst měřením optické denzity při 600 nm.

Osmotický stres: Citlivost buněk různých kmenů *S. pneumoniae* na osmotický stres jsme testovali vystavením kultur hyperosmotickému šoku. Kmeny *S. pneumoniae* jsme nejprve inokulovali do tekutého média, aby se inicioval růst. Po dosažení $OD_{600} = 0,2$ jsme provedli osmotický šok přidáním NaCl k testovaným kulturám (konečná koncentrace NaCl v médiu byla 400 mM). Zároveň jsme vždy jednu kulturu z každého kmene nechali jako kontrolní (osmotický šok nebyl proveden). Kultivace probíhala při 37°C. V půlhodinových intervalech jsme bakteriální růst monitorovali měřením optické denzity při 600 nm.

pH stres: Citlivost buněk různých kmenů *S. pneumoniae* na pH stres jsme testovali pěstováním kultur v médiích o různém pH. 200 μ l kultury o $OD_{600} = 0,4$ jsme vždy

inokulovali klasické TSB médium (pH 7,5), médium TSB o nízkém pH (6,5) a TSB médium o vysokém pH (8). Kultivace probíhala v 37°C. V půlhodinových intervalech jsme bakteriální růst monitorovali měřením optické hustoty při 600 nm.

Oxidativní stres: Citlivost buněk různých kmenů *S. pneumoniae* na oxidativní stres jsme testovali vystavením kultur oxidativnímu šoku. Kmeny *S. pneumoniae* jsme nejprve inokulovali do tekutého média, aby se inicioval růst. Po dosažení $OD_{600} = 0,2$ jsme provedli oxidativní šok přidáním H_2O_2 k testovaným kulturám (konečná koncentrace H_2O_2 v médiu byla 2 mM a 5 mM). Zároveň jsme vždy jednu kulturu z každého kmene nechali jako kontrolní (oxidativní šok nebyl proveden). Kultivace probíhala při 37°C. V půlhodinových intervalech jsme bakteriální růst monitorovali měřením optické hustoty při 600 nm.

Dalším způsobem určení citlivosti buněk na oxidativní stres bylo srovnání růstu jednotlivých kmenů *S. pneumoniae* na pevné půdě po vystavení oxidativnímu stresu. Kmeny *S. pneumoniae* jsme nejprve inokulovali do tekutého média TSB. Kultivace probíhala při 37°C. Po dosažení $OD_{600} = 0,4$ jsme kultury vystavili na 15 min účinku 10 mM a 20 mM H_2O_2 při pokojové teplotě. Poté jsme kultury naředili a vyseli na agarové plotny, které jsme umístili přes noc do 37°C. Stejný postup jsme dodrželi i pro kultury kontrolní, které nebyly H_2O_2 vystaveny. Citlivost každého kmene k účinkům H_2O_2 jsme vyjádřili jako procenta přeživších buněk z celkového počtu buněk (bez oxidativního stresu).

3.2.5.8 Testy citlivosti na antibiotika

Testy citlivosti jsme prováděli ve třech opakujících se měřeních.

Citlivost buněk k antibiotikům jsme testovali pěstováním kultur v tekutém médiu v přítomnosti různých koncentrací antibiotika. Médium s příslušnou koncentrací ATB jsme inokulovali 200 μ l kultury o $OD_{600} = 0,4$. Po pětihodinové kultivaci při 37°C jsme změřili optickou hustotu vzorku při 600 nm. Závislost dosažené optické hustoty na koncentraci ATB jsme vynesli do grafu a z něj odečetli střední inhibiční koncentraci IC_{50} . Pomocí IC_{50} jsme porovnali citlivost různých kmenů k antibiotikům.

Použité koncentrace antibiotik:

Penicilin G: 0; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05 μ g/ml

Vankomycin: 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 μ g/ml

3.2.6 Mikroskopie

3.2.6.1 Příprava fixovaných preparátů *S. pneumoniae*

Fixované preparáty jsme používali k pozorování obarvené DNA v buňkách, k určení fenotypu a srovnání velikosti buněk jednotlivých kmenů.

Fixované preparáty jsem připravovali metodou podle (MORLOT *et al.*, 2003). Kulturu jsme pěstovali do $OD_{600} = 0,3$, odebrali 500 μ l do mikrozkuhavky a smíchali je s 500 μ l 2x fixačního roztoku. Po fixaci buněk při pokojové teplotě 15 minut na rotátoru jsme mikrozkuhavku inkubovali 45 minut na ledu a poté centrifugovali (5 min, 900 g). Pelet jsme resuspendovali v 1 ml PBS, centrifugovali (3 min, 900 g) a následně dvakrát promyli 1 ml PBS (centrifugace 3 min, 3200 g). Buněčný pelet jsme resuspendovali ve 20 μ l GTE s čerstvě přidaným lysozymem (0,1 mg/ml). 10 μ l buněčné suspenze jsme nanесли na PolyPrep sklíčko (Sigma) a nechali na stole zaschnout 5 min. Poté jsme odsáli přebytečnou tekutinu ze skvrn a sklíčko promyli 2x v PBS, ponořili do methanolu a dali na 5 min do -20°C . Sklíčko jsme rehydratovali v PBS a na oschlé sklíčko jsme pipetovali 2 μ l Vecta Shield v místě, kde byly zachyceny buňky. Vecta Shield obsahuje barvivo DAPI, které specificky barví DNA. Preparát jsme přikryli krycím sklíčkem a okraje zalakovali, aby preparát nevysychal.

3.2.6.2 Mikroskopie

Buňky kmenů *S. pneumoniae* jsme pozorovali pomocí mikroskopu Olympus IX81. Využívali jsme olejový imersní objektiv (100x O2PH-UPLFLN/1.3 N.A. Oil). Různým nastavením filtrů jsme mohli v jediném preparátu pozorovat fluorescenci GFP, DNA obarvenou DAPI i morfologii buněk ve fázovém kontrastu. Obraz jsme snímali pomocí kamery Olympus FV2T Digital B/W Fireware za použití programu Cell^R Version 2.0. Obrázky jsme upravili v grafickém programu AdobePhotoshop.

Pro přípravu dočasných živých preparátů *S. pneumoniae* jsme dodržovali následující postup: Kulturu pěstovanou v tekutém médiu jsme naředili na $OD_{600} = 0,3/\text{ml}$ a centrifugovali 5 min 2200 g. Odsáli jsme 950 μ l média. Pelet jsme resuspendovali ve zbylých 50 μ l média. Na krycí sklíčko jsme nanесли 2 μ l kultury a překryli tenkým agarózovým bločkem (1% agarosa v PBS). Takto připravený preparát jsme upevnili do speciální komůrky a mikroskopovali.

Příprava dočasných živých preparátů *S. pneumoniae* pěstovaných na miskách s krevním agarem probíhala podobně. Kulturu jsme nabrali sterilní kličkou a resuspendovali v 10 μ l média. Na krycí sklíčko jsme nanесли 2 μ l kultury a překryli tenkým

agarózovým bločkem. Takto připravený preparát jsme upevnili do speciální komůrky a mikroskopovali.

Příprava fixovaných preparátů je popsána výše, viz příprava fixovaných preparátů *S. pneumoniae*.

Pro pozorování morfologie buněk jsme používali tekuté médium TSB, které ale není vhodné pro pozorování fluorescence GFP. Pro tento případ jsme buňky pěstovali v tekutém médiu M17G.

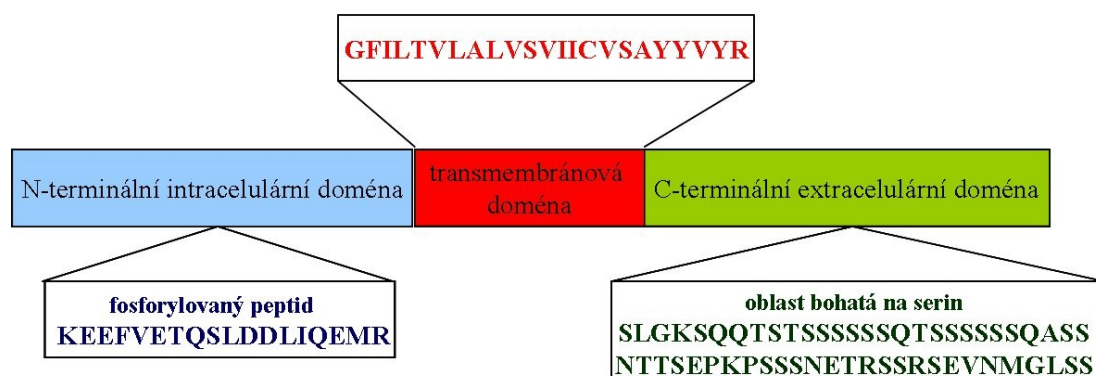
3.2.6.3 Měření velikosti buněk a statistická analýza

Mikroskopické pozorování jednotlivých kmenů *S. pneumoniae* naznačovalo rozdíly ve velikosti a morfologii buněk, proto jsme se rozhodli tyto rozdíly kvantifikovat. Pro analýzu jsme použili obrazy snímány pomocí kamery Olympus FV2T digital B/W Fireware a olejového imersního objektivu (100x O2PH-UPLFLN/1.3 N.A. Oil) v režimu fázového kontrastu. Měření velikosti buněk jsme provedli pomocí volně dostupného programu MicrobeTracker Suite (SLIUSARENKO *et al.*, 2011), který umožňuje automatickou detekci buněk a následnou analýzu parametrů. Jako prvotní morfologický parametr jsme zvolili délku buňky (nejdelší rozměr buňky), jako druhotný morfologický parametr jsme zvolili šířku buňky. Počet analyzovaných buněk se lišil dle pěstování kultur *S. pneumoniae* a přípravy preparátu. V živých preparátech připravených z kultur pěstovaných v médiu TSB jsme analyzovali 500 buněk a v případě fixovaných preparátů připravených z kultur napěstovaných na krevním agaru jsme analyzovali 300 buněk.

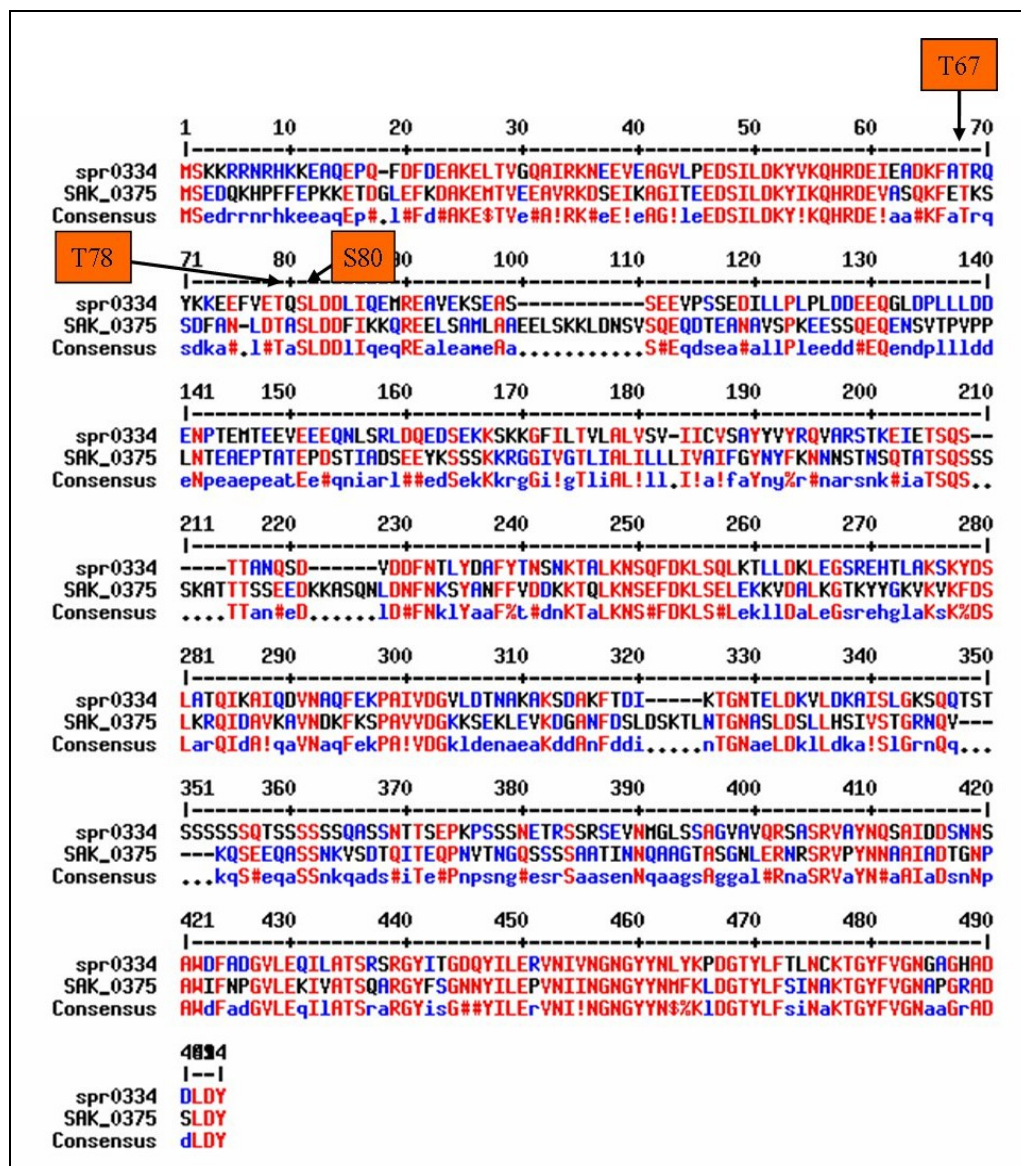
Získaná data jsme analyzovali ve statistickém programu Prism. Pro soubor dat každého kmene jsme pomocí popisné statistiky určili minimální a maximální délku buňky, medián (střední hodnota), první a třetí kvartil (oddělují nejmenší a největší čtvrtinu naměřených hodnot), průměr a průměrnou šířku buňky. Tyto hodnoty jsme graficky znázornili pomocí krabicového grafu, kde jednotlivé prvky grafu (vodorovné úsečky) znázorňují postupně následující charakteristiky: minimum, dolní kvartil, medián, tj. prostřední kvartil, horní kvartil a maximum. Zastoupení buněk v různých velikostních třídách jsme znázornili v histogramech, jejichž hranice byly dány velikostí nejmenší a největší buňky. Statistickou významnost rozdílů mezi jednotlivými soubory dat jsme porovnávali pomocí neparametrického Mann-Whitneyho testu.

4 Výsledky

Streptococcus pneumoniae nese ve svém genomu jediný gen pro Ser/Thr proteinkinazu eukaryotního typu nazývanou StkP. Mezi její substráty patří protein Spr0334 (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010). Spr0334 je hypotetický membránový protein o neznámé funkci a o předpokládané velikosti 51,54 kDa. Srovnáním sekvencí genu *spr0334* s geny v ostatních organismech se ukázalo, že je tento gen konzervován pouze u streptokoků a poté u *Lactococcus lactis* a *Enterococcus faecalis* (Comprehensive Microbial Ressource, <http://cmr.jcvi.org>). Z analýzy sekvence *spr0334* (<http://myhits.isb-sib.ch>) vyplynulo, že je protein Spr0334 pravděpodobně složen z N-koncové intracelulární domény, transmembránové domény a C-koncové extracelulární domény, která obsahuje oblast bohatou na serin (obr. 4-1). Homologem Spr0334 je protein SAK_0375 *S. agalactiae*, který je substrátem Ser/Thr proteinkinasy eukaryotního typu Stk1 (SILVESTRONI *et al.*, 2009) (obr. 4-2)



Obr. 4-1: Schématické znázornění proteinu Spr0334

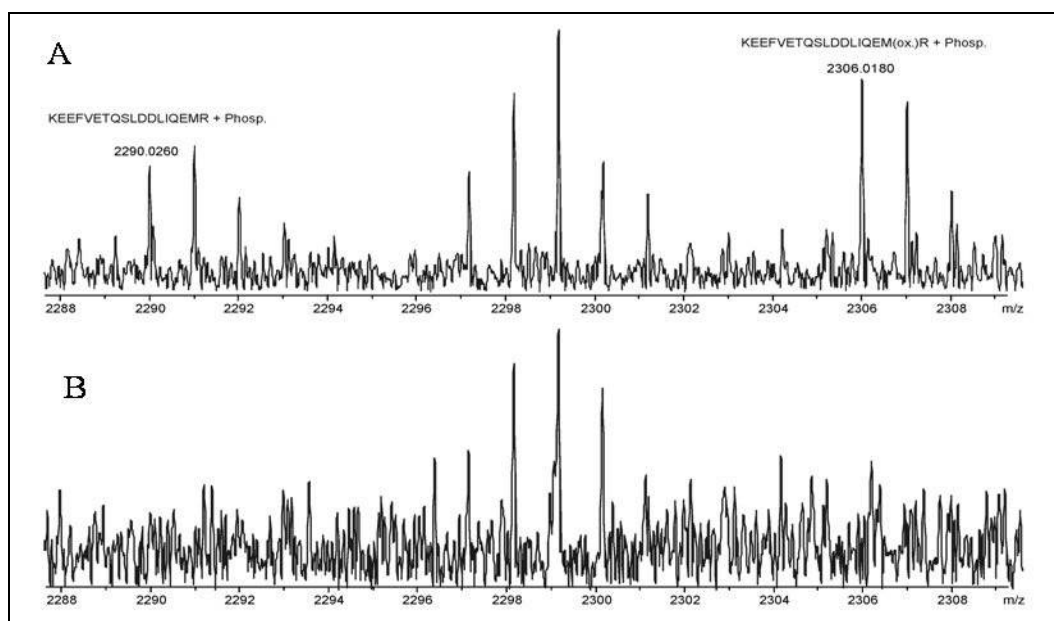


Obr. 4-2: Srovnání sekvencí genu *spr0334* a jeho homologu SAK_0375

spr0334: gen *spr0334* *Streptococcus pneumoniae*; **SAK_0375:** gen *sak_0375* *Streptococcus agalactiae*; šipkami jsou označeny AK pravděpodobně fosforylované v proteinu Spr0334

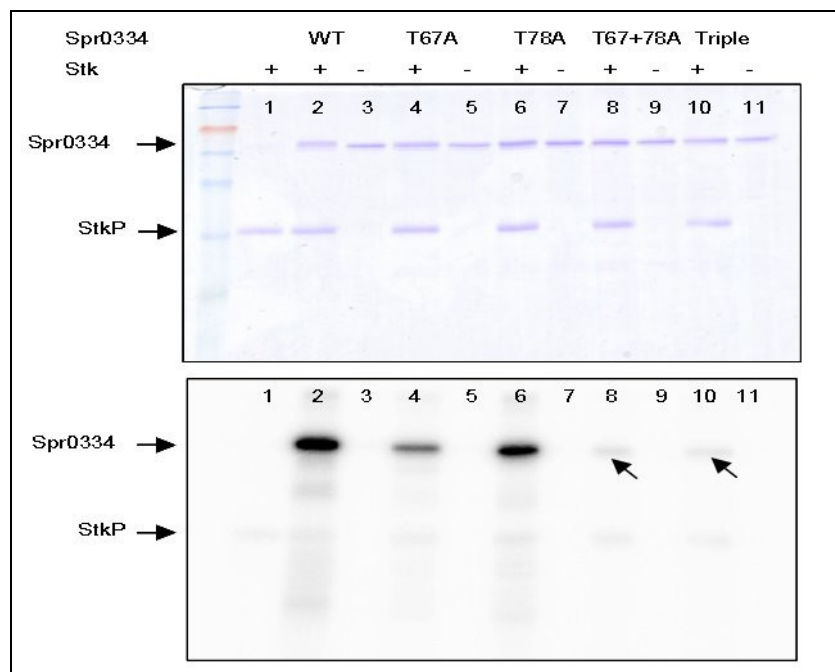
Fosforylace proteinu Spr0334 separovaného pomocí 2-D SDS-PAGE byla analyzována hmotnostní spektrometrií. Byl detekován fosforylovaný peptid KEEFVET**Q**SLDDLIQEMR nacházející se v N-terminální doméně proteinu (L. NOVÁKOVÁ, nepublikované výsledky) (obr. 4-1; 4-3). Fosforylovaný peptid nesl jeden fosforylovaný aminokyselinový zbytek (obr. 4-3). Protože protein Spr0334 je substrátem Ser/Thr proteinkinasy StkP předpokládáme, že by tímto aminokyselinovým zbytkem mohl být T78 nebo S80 (označeny červeně v sekvenci fosforylovaného peptidu). Ve fosfoproteomové studii (SUN *et al.*, 2010) byl identifikován stejný fosfopeptid, ale se dvěma místy fosforylace, a to T78 a S80. Dále byla provedena analýza fosforylace *in vitro*

pomocí hmotnostní spektrometrie, která určila dva fosforylované aminokyselinové zbytky T67 a T78 (V. MOLLE, nepublikované výsledky). Následně byly vytvořeny mutované formy proteinu Spr0334. V sekvenci genu pro Spr0334 byly postupně nahrazovány aminokyseliny T67, T78 a S80 za neutrální aminokyselinu alanin, která nemůže být fosforylována, a takový protein se nazývá fosfoablativní. *In vitro* kinázová reakce v přítomnosti radioaktivně značeného γ - ^{32}P -ATP s fosfoablativními formami proteinu Spr0334 ukázala velmi sníženou fosforylací proteinu se zaměněným T67 a T78 za alanin současně. Trojitá záměna T67, T78 a S80 za alanin neměla na fosforylací proteinu další vliv (L. NOVÁKOVÁ, nepublikované výsledky) (obr. 4-4). Z tohoto pozorování usuzujeme, že hlavními fosforylovanými aminokyselinovými zbytky proteinu Spr0334 jsou T67 a T78.



Obr. 4-3: Hmotnostní spektra proteinu Spr0334

A) hmotnostní spektrum fosforylovaného proteinu Spr0334 izolovaného z divokého kmene *S. pneumoniae* (Sp1); **B)** hmotnostní spektrum nefosforylovaného proteinu Spr0334 izolovaného z mutantního kmene *S. pneumoniae* Δ *stkP* (Sp10)



Obr. 4-4: *In vitro* fosforylace Spr0334

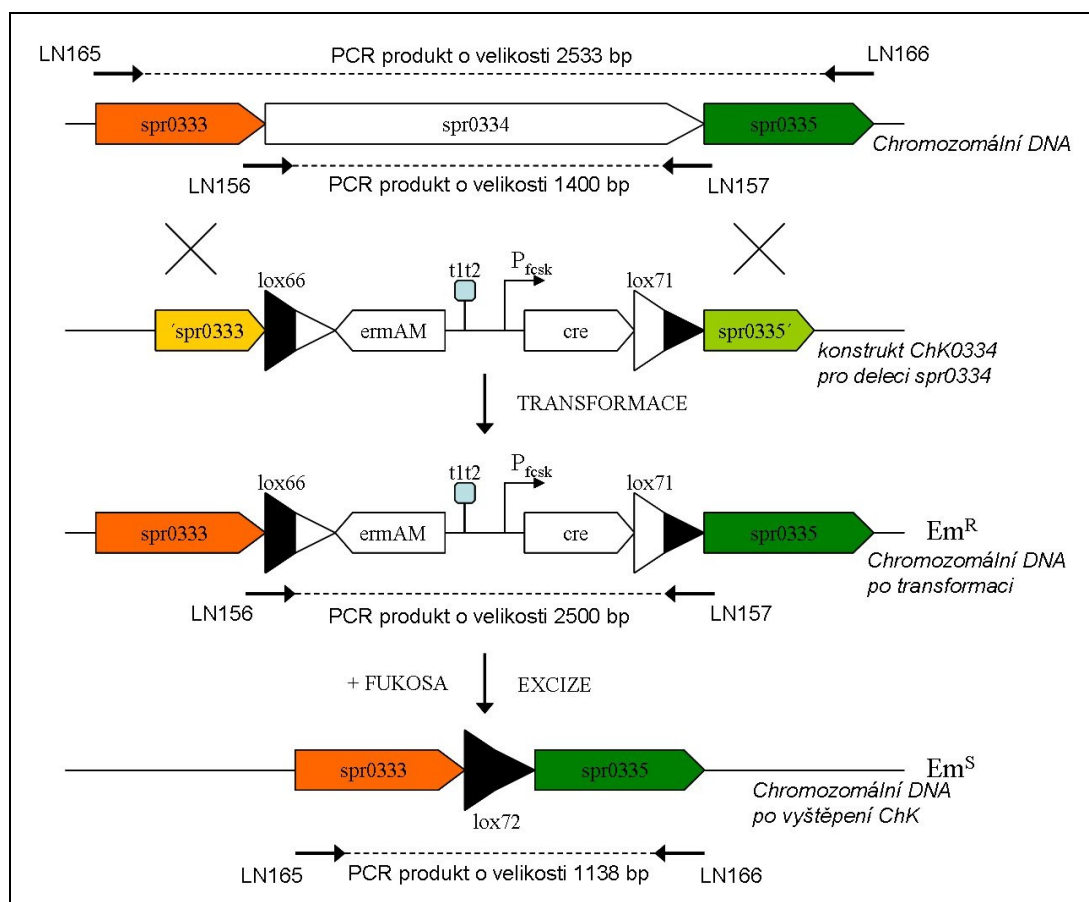
1) StkP; 2) StkP + Spr0334; 3) Spr0334; 4) StkP + Spr0334 T67A; 5) Spr0334 T67A; 6) StkP + Spr0334 T78A; 7) Spr0334 T78A; 8) StkP + Spr0334 T67A+T78A; 9) Spr0334 T67A+T78A; 10) StkP + Spr0334 T67A+T78A+S80A; 11) Spr0334 T67A+T78A+S80A; **šipky** označují zbytkovou fosforylací fosfoablativních forem proteinu Spr0334

4.1 Příprava kmene *Streptococcus pneumoniae* $\Delta spr0334$

Prvním cílem této diplomové práce byla příprava kmene *S. pneumoniae* $\Delta spr0334$, který byl označen Sp57. Protože se gen *spr0334* nachází uvnitř operonu a použitím antibiotické kazety k delecí *spr0334* by mohlo dojít ke změnám transkripce či k polárnímu efektu, rozhodli jsme se použít tzv. Cheshire kazetu (ChK) (WENG *et al.*, 2009) (obr.4-5). ChK slouží jako dočasný erythromycin rezistentní znak dokazující různé genetické přeskupení v chromosomu *S. pneumoniae*. ChK je do chromosomu integrována homologní rekombinací prostřednictvím sekvencí přiléhajících k deletovanému genu, které byly pomocí PCR amplifikovány a spojeny s ChK. Vzniklý erythromycin rezistentní mutant je pěstován v médiu s přidavkem fukosy, čímž se aktivuje přepis Cre rekombinasy z ChK pod inducibilním fukózovým promotorem. Cre rekombinasa rozeznává dvě specifické sekvence, zvané *lox* místa (*lox66* a *lox71*), ohraničující ChK. V *lox* místech dochází excizivní rekombinací k vyštěpení celé ChK včetně erythromycinové rezistence a vzniká místo *lox72* dlouhé 24 bp jako reziduum po ChK (obr 4-5).

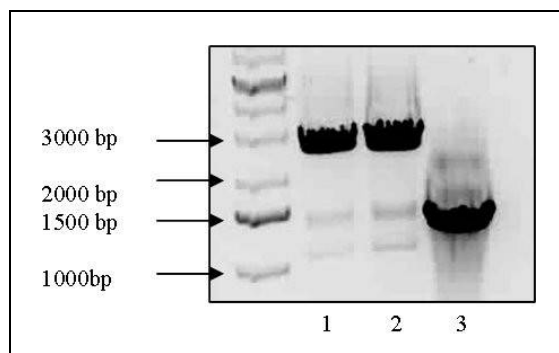
Pomocí PCR a následné ligace jsme připravili lineární DNA konstrukt pojmenovaný ChK Δ 0334, jehož schéma je zobrazeno na obrázku 4-5 (podrobněji viz

materiál a metody, kapitola 3.2.1.3). Tento konstrukt jsme transformovali do kmene *S. pneumoniae* Sp1. Pomocí homologní rekombinace došlo k záměně genu *spr0334* za ChK nesoucí erytromycinovou rezistenci. Integraci ChK do chromosomu Sp1 jsme ověřili pomocí PCR u klonů rezistentních k erytromycinu za použití oligonukleotidů LN156 a LN157 (obr. 4-6). Ověřené klony jsme opakovaně pěstovali v přítomnosti fukosy, abychom indukovali vyštěpení ChK. Vyštěpení ChK z chromosomu jsme ověřili u klonů senzitivních k erythromycinu pomocí PCR (obr. 4-7). Oligonukleotidy LN165 a LN166 byly navrženy tak, aby docházelo k amplifikaci celého genu *spr0333*, *spr0334* a intergenové oblasti mezi geny *spr0334* a *spr0335*. Pokud proběhla delece genu *spr0334* správně, získali jsme PCR produkt o velikosti 1400 bp. Jako kontrolu jsme použili kmen Sp1, jehož PCR produkt má velikost 2500 bp (obr. 4-5).



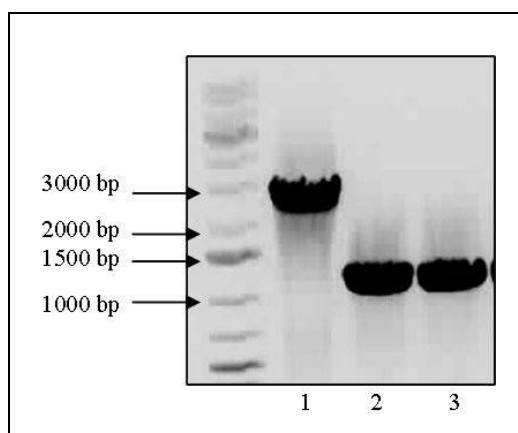
Obr. 4-5: Schéma delece genu *spr0334* z chromosomu *S. pneumoniae*

ermAM: gen kódující erythromycinovou rezistenci; ***t1t2***: terminátor; ***P_{fesk}***: indukibilní fukosový promotor; ***cre***: Cre rekombinasa pod indukibilním fukosovým protomoter; ***lox66* a *lox71***: místa, ve kterých Cre rekombinasa rozeznává specifické sekvence; ***lox72***: reziduum po excizi Cheshire kazety; **šipky** označují použité oligonukleotidy; **LN156, LN157** byly použity k ověření integrace ChK0334 konstruktů do chromosomu Sp1; **LN165, LN166** byly použity k ověření vyštěpení ChK z chromosomu Sp1



Obr. 4-6: Kontrolní PCR - ověření integrace Cheshire kazety do chromozomu

1) – 2) Sp57 klon 1;2 – záměna *spr0334* Cheshire kazetou (2500 bp); **3)** Sp1 (WT) – gen *spr0334* (1400 bp)



Obr. 4-7: Kontrolní PCR - ověření vyštěpení Cheshire kazety z chromozomu

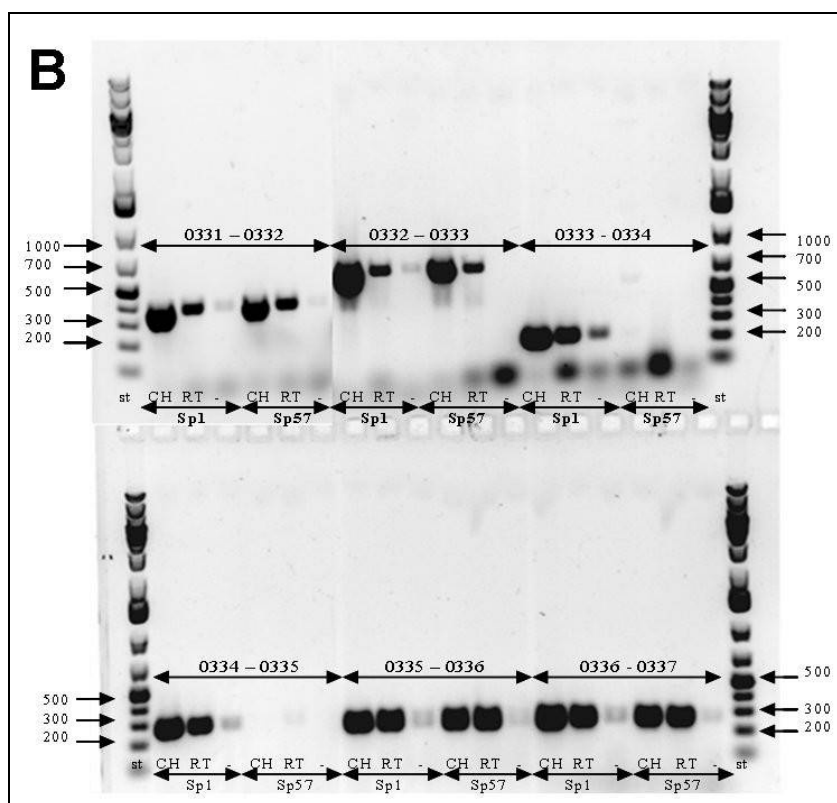
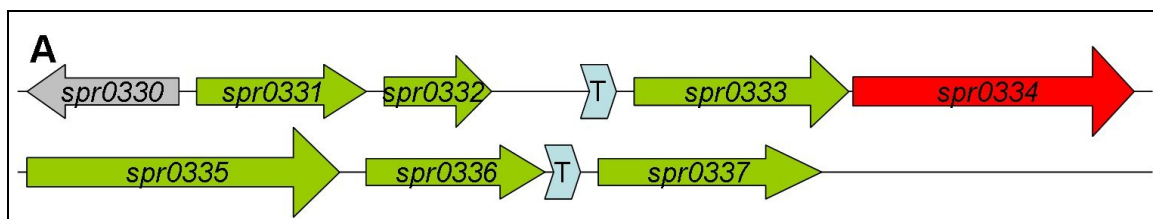
1) Sp1 (WT); **2)-3)** Sp57 (*spr0334::lox72*) klon 1 a 2

4.2 Analýza transkripce genů v předpokládaném operonu *spr0331-spr0337*

Podle analýzy okolí genu *spr0334* na chromosomu jsme předpokládali, že by gen *spr0334* mohl být součástí operonu (obr. 4-8 A) (Comprehensive Microbial Ressource, <http://cmr.jcvi.org>). První předpokládaný gen operonu by mohl být gen *spr0331*, protože gen *spr0330* je přepisován v opačném směru. Gen *spr0331* kóduje hypotetický protein o neznámé funkci. Dále se v okolí genu pro Spr0334 nacházejí geny pro hypotetické proteiny Spr0332 a Spr0333. Za genem pro Spr0334 je gen *spr0335* pro 6-fosfoglukonát dehydrogenasu, gen *spr0336* pro osířelý transkripční regulátor nazývaný RitR a gen *spr0337* pro cholin vazebný protein C. Terminátor je predikován za genem *spr0332* a *spr0336* (Comprehensive Microbial Ressource, <http://cmr.jcvi.org>). Protože geny v jednom operonu spolu často funkčně souvisí, zajímalo nás, zda je gen *spr0334* přepisován jako součást polycistronní mRNA a se kterými výše uvedenými geny. Zároveň nás zajímalo, zda-li v kmeni Sp57 nedochází k polárnímu efektu způsobenému delecí genu *spr0334*.

Transkripční analýzu jsme provedli pomocí RT-PCR. Z RNA izolované z kmenů Sp1 a Sp57 byla syntetizována cDNA, která byla použita jako templát pro RT-PCR reakci. Oligonukleotidy byly navrženy pro amplifikaci intergenové oblasti genů, která je tvořena koncem jednoho a začátkem druhého genu (viz kapitola materiál a metody, tab. 3-1).

Získané specifické amplifikační produkty kmene Sp1 odpovídaly kotranskripci genů *spr0331-0332*, *spr0332-0333*, *spr0333-0334*, *spr0334-0335*, *spr0335-0336* a *spr0336-0337*. Při analýze kmene Sp57 jsme nezískali produkt v případě genů *spr0333-0334* a *spr0334-0335* (obr. 4-8 B), čímž byla potvrzena delece genu *spr0334*. Dále jsme v kmeni Sp57 získali produkty v případě analýzy genů *spr0335-spr0336* a *spr0336-spr0337*. Získání těchto dvou produktů naznačuje, že delece genu *spr0334* nezpůsobila vznik polárního efektu a ani jinak neovlivnila transkripci následujících genů. Stejně amplifikační produkty jsme získali u PCR reakcí s chromozomální DNA (pozitivní kontrola). U PCR reakcí s templátem ve formě RNA bez reverzní transkripce (negativní kontrola) jsme nedetekovali PCR produkt. Toto pozorování naznačuje, že v kmeni Sp1 je všech sedm genů přepisováno ve formě polycistronní mRNA, avšak nemůžeme vyloučit např. přítomnost vnitřních promotorů a dalších efektů ovlivňujících transkripci.



Obr. 4-8: Analýza transkripce genů v předpokládaném operonu *spr0331-spr0337*

A) schématické znázornění genů v předpokládaném operonu *spr0331-spr0337*: šipky označují jednotlivé geny; dvojitá šipka s T označuje predikovaný terminátor

B) analýza transkripce; **Sp1**: WT *S. pneumoniae*; **Sp57**: kmen $\Delta spr0334$; **CH**: chromozomální DNA jako templát amplifikace; **RT**: cDNA syntetizovaná v přítomnosti reverzní transkriptasy; (-): cDNA syntetizovaná v nepřítomnosti reverzní transkriptasy; **st**: standard molekulové hmotnosti

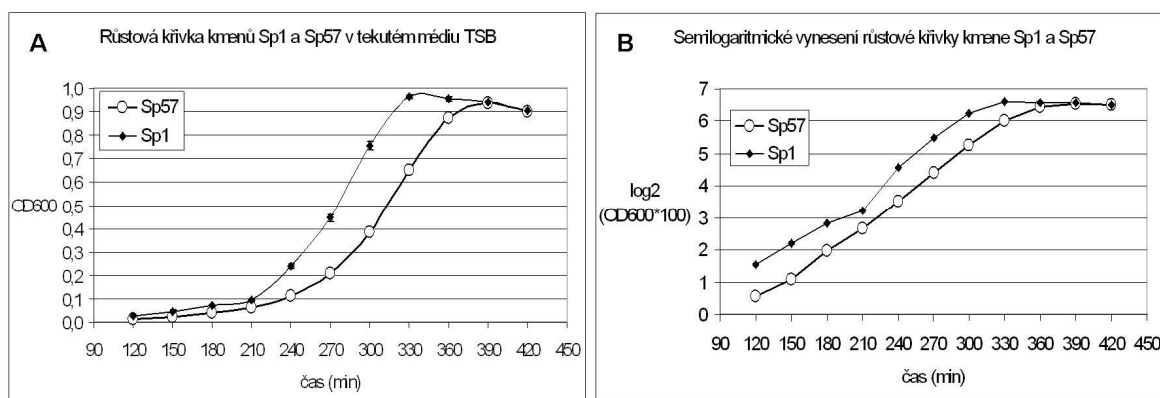
4.3 Charakterizace mutantu $\Delta spr0334$

Mutantní kmen Sp57 (*spr0334::lox72*) připravený metodou inzerce a následné excize kazety (viz kapitola 4.1, obr. 4-5) jsme dále charakterizovali. Testovali jsme jeho růstové vlastnosti, reakci na působení různých druhů stresů a antibiotik, schopnost navodit stav přirozené a indukované kompetence pro genetickou transformaci a pozorovali jsme morfologii buněk.

4.3.1 Růst mutanta $\Delta spr0334$ v komplexním médiu

Schopnost růstu kmene $\Delta spr0334$ (Sp57) jsme sledovali v médiu TSB a porovnávali jsme jej s kontrolním divokým kmenem (Sp1). Během kultivace, která probíhala staticky při 37°C, jsme v půlhodinových intervalech měřili optickou densitu testovaných kultur při vlnové délce 600 nm.

Jak je patrné z porovnání průběhu růstových křivek *S. pneumoniae* divokého a mutantního kmene (obr. 4-9), mutantní kmen $\Delta spr0334$ (Sp57) má prodlouženou lag fázi. Doba zdvojení $T = 35$ minut i dosažení nejvyšší optické denzity je pro oba kmeny stejná.



Obr. 4-9: Růstová křivka divokého kmene a kmene $\Delta spr0334$ *S. pneumoniae* v tekutém médiu TSB

Růstové křivky byly proměřeny ve třech opakujících se měřeních.

A) Růstová křivka divokého kmene (Sp1) (černé kosočtverce) a kmene $\Delta spr0334$ (Sp57) (bílé kruhy)

B) Semilogaritmické vynesení růstové křivky divokého kmene (Sp1) (černé kosočtverce) a kmene $\Delta spr0334$ (Sp57) (bílé kruhy)

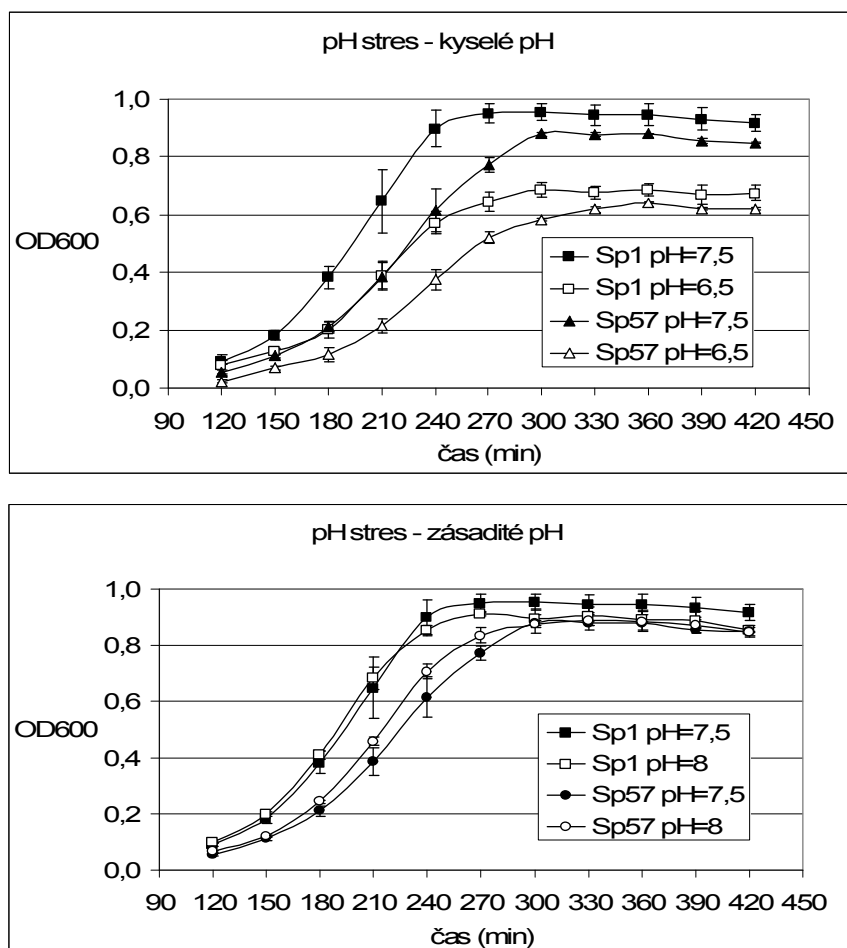
4.3.2 Citlivost mutanta $\Delta spr0334$ k různým druhům stresů

StkP je globálním regulátorem genové exprese ve *S. pneumoniae* a hraje úlohu v regulaci buněčného dělení. Její delece z chromosomu *S. pneumoniae* ovlivňuje četné buněčné funkce, mezi které patří např. změna morfologie buněk, schopnost navození stavu přirozené kompetence a v neposlední řadě snížená odolnost buněk k teplotnímu, osmotickému, oxidativnímu i pH stresu (SASKOVÁ *et al.*, 2007). Jelikož je protein Spr0334 substrátem StkP a nevíme, jakou funkci v buňce zastává, rozhodli jsme se mutantní kmen vystavit působení různých druhů stresů, abychom zjistili možnou úlohu Spr0334 v adaptaci na stresové podmínky.

Divoký kmen (Sp1) a kmen $\Delta spr0334$ (Sp57) jsme vystavili účinkům pH, osmotického, oxidativního a teplotního stresu a oba kmeny jsme porovnali.

pH stres: Kulturu divokého a mutantního kmene jsme pěstovali v TSB médiu při kyselém pH 6,5 a při zásaditém pH 8 a porovnávali s růstem při optimálním pH (7,5). Jak bylo řečeno výše, protein Spr0334 je substrátem StkP a jeho funkce v buňce není známa. Proto jsme hodnoty pH převzali ze studií, kde byl kmen $\Delta stkP$ vystaven působení pH stresu. Při pH 8 dochází u kmene $\Delta stkP$ k lyzi buněk (ECHENIQUE *et al.*, 2004). Při pH 6,5 je rozdíl v růstu divokého kmene a kmene $\Delta stkP$ největší a stále měřitelný (SASKOVÁ *et al.*, 2007).

Růstové křivky kmene $\Delta spr0334$ (Sp57) v porovnání s růstovými křivkami divokého kmene (Sp1) jsou vyneseny v grafech na obrázku 4-10. Zjistili jsme, že za sníženého či zvýšeného pH není růst kmene Sp57 nijak výrazně ovlivněn oproti divokému kmeni.



Obr: 4-10: Citlivost mutantu $\Delta spr0334$ (Sp57) k pH stresu

Růstové křivky byly proměřeny ve třech opakujících se měřeních.

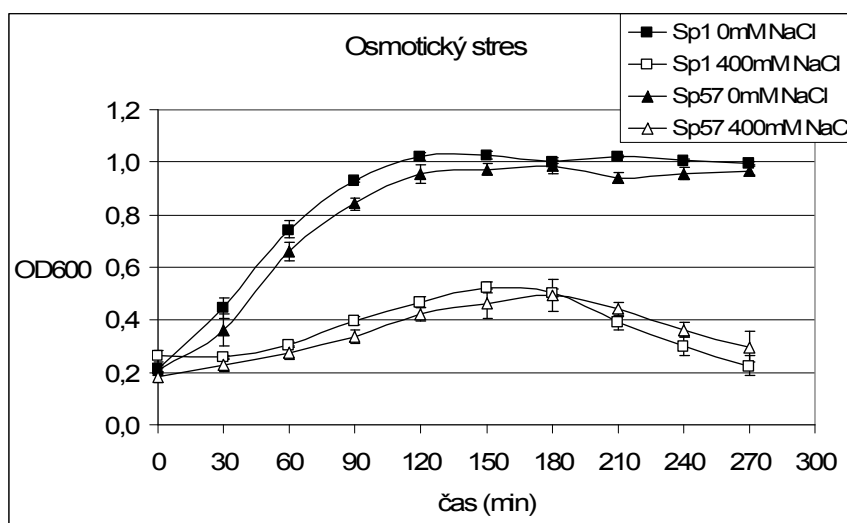
pH stres – kyselé pH: Růstová křivka divokého kmene Sp1 pH = 7,5 (černé čtverce); pH = 6,5 (bílé čtverce).

Růstová křivka kmene $\Delta spr0334$ (Sp57) pH = 7,5 (černé trojúhelníky); pH = 6,5 (bílé trojúhelníky)

pH stres – zásadité pH: Růstová křivka divokého kmene Sp1 pH = 7,5 (černé čtverce); pH = 8 (bílé čtverce).

Růstová křivka kmene $\Delta spr0334$ (Sp57) pH = 7,5 (černé kruhy); pH = 8 (bílé kruhy)

Osmotický stres: Kulturu divokého kmene a kmene *Δspr0334* jsme pěstovali v tekutém médiu TSB do $OD_{600} = 0,2$ a poté jsme obě kultury vystavili osmotickému šoku (konečná koncentrace 400 mM NaCl). Růst jsme porovnávali s kulturami obou kmenů pěstovaných v médiu TSB bez přídavku NaCl a růstové křivky jsme vynesli do grafu (obr. 4-11). U divokého kmene (Sp1) i kmene *Δspr0334* (Sp57) došlo po vystavení osmotickému šoku k prodloužení doby zdvojení z 35 na 97 minut, oba kmeny nebyly schopny dosáhnout tak vysokých hodnot optické denzity jako v případě růstu bez přídavku NaCl a předčasně lyzovaly.



Obr. 4-11: Citlivost mutantu *Δspr0334* (Sp57) k osmotickému stresu

Růstové křivky byly proměřeny ve třech opakujících se měřeních.

Růstová křivka divokého kmene (Sp1) bez přídavku NaCl (černé čtverce) a s přídavkem NaCl (bílé čtverce). Růstová křivka kmene *Δspr0334* (Sp57) bez přídavku NaCl (černé trojúhelníky) a s přídavkem NaCl (bílé trojúhelníky).

Oxidativní stres: Oxidativní stres jsme u kmene *Δspr0334* (Sp57) testovali dvěma způsoby, vždy v porovnání s divokým kmenem (Sp1).

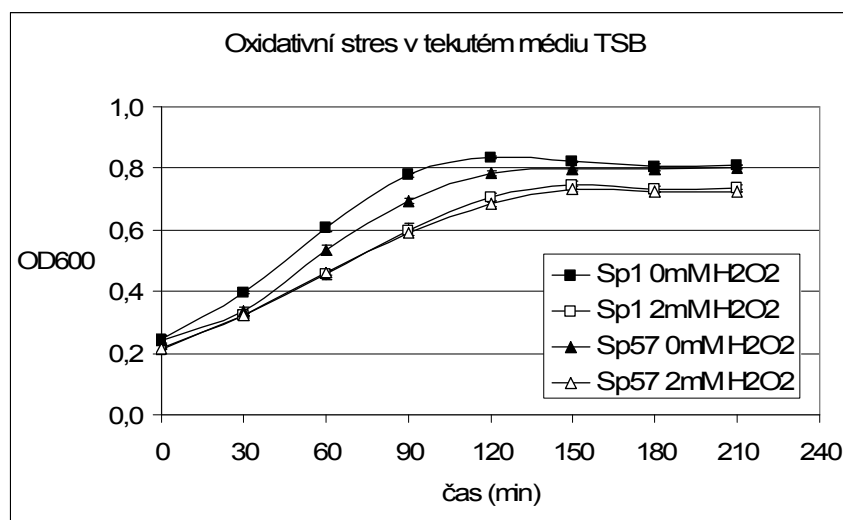
V prvním případě jsme obě kultury pěstovali v tekutém médiu TSB do $OD_{600} = 0,4$, poté vystavili 15 minutovému účinku 10 mM a 20 mM H_2O_2 a počet přeživších buněk jsme určili pomocí výsevu na agarové plotny. Jako kontrola nám sloužily stejně pěstované kmeny bez vystavení účinku H_2O_2 . Citlivost obou kmenů k účinkům H_2O_2 jsme vyjádřili jako procenta přeživších buněk z celkového počtu buněk (bez oxidativního stresu). Jak je vidět z tabulky 4-1, kmen *Δspr0334* (Sp57) vykazoval stejné množství přeživších buněk po působení 10 mM i 20 mM H_2O_2 jako divoký kmen (Sp1).

V druhém případě jsme pěstovali obě kultury v tekutém médiu TSB do $OD_{600} = 0,2$. Poté jsme ke každému kmeni přidali H_2O_2 na konečnou koncentraci 5 mM a 2 mM a v půlhodinových intervalech jsme měřili optickou densitu při 600 nm. Jako kontrola nám sloužily kmeny pěstované bez přídavku H_2O_2 . Při vystavení divokého kmene i kmene $\Delta spr0334$ účinkům 5 mM H_2O_2 nebyl ani jeden kmen schopen růstu (data nejsou prezentována). Vystavením účinkům 2 mM H_2O_2 došlo u obou kmenů ke srovnatelnému snížení dosažené optické denzity, jak je vidět z průběhu růstových křivek obou kmenů vynesných do grafu na obr. 4-12.

kmen <i>S. pneumoniae</i>	10 mM H_2O_2	20 mM H_2O_2	kontrola
Sp1 (WT)	2,42 %	0,21 %	100 %
Sp57 ($\Delta spr0334$)	2,46 %	0,28 %	100 %

Tab. 4-1: Citlivost mutantu $\Delta spr0334$ k oxidativnímu stresu na pevném médiu

Sp1: divoký kmen; **Sp57:** kmen $\Delta spr0334$; **procenta** vyjadřují počet přeživších buněk vystavených působení 10 mM nebo 20 mM H_2O_2 z celkového počtu buněk (bez oxidativního stresu)



Obr. 4-12: Citlivost mutantu $\Delta spr0334$ k oxidativnímu stresu v tekutém médiu TSB

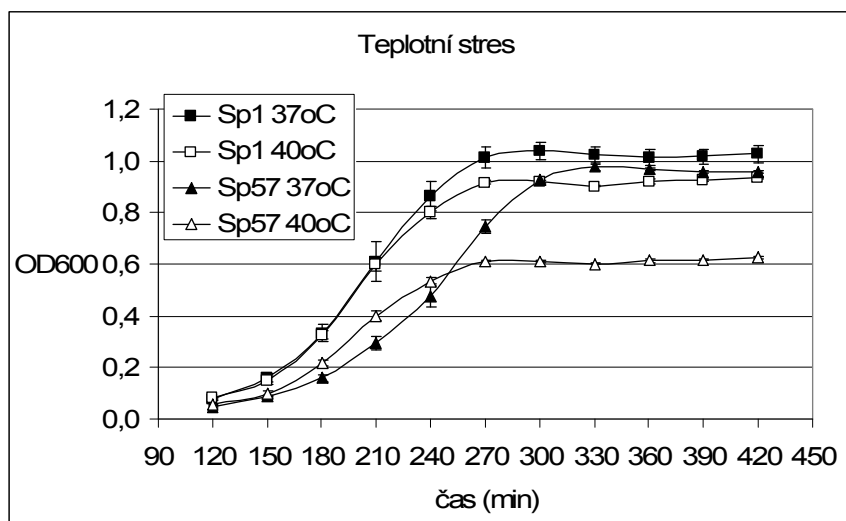
Růstové křivky byly proměřeny ve třech opakujících se měřeních.

Růstová křivka divokého kmene (Sp1) bez přídavku H_2O_2 (černé čtverce) a s přídavkem H_2O_2 (bílé čtverce).

Růstová křivka kmene $\Delta spr0334$ (Sp57) bez přídavku H_2O_2 (černé trojúhelníky) a s přídavkem H_2O_2 (bílé trojúhelníky).

Teplotní stres: Kulturu divokého kmene a kmene $\Delta spr0334$ jsme pěstovali v tekutém médiu TSB o teplotě 40°C a porovnávali s růstem obou kultur při teplotě 37°C. Růstové křivky jsme vynesli do grafu na obr. 4-13. Odlišnost růstu divokého kmene (Sp1)

a kmene $\Delta spr0334$ (Sp57) při 37°C je dána delší lag fází kmene Sp57. U kmene Sp57 pěstovaného při teplotě 40°C se doba zdvojení prodloužila o 3 minuty oproti růstu při 37°C (35min), navíc kmen Sp57 přechází do stacionární fáze při mnohem nižší optické denzitě, než při růstu v 37°C.



Obr. 4-13: Citlivost mutanta $\Delta spr0334$ (Sp57) k teplotnímu stresu

Růstové křivky byly proměřeny ve třech opakujících se měřeních.

Růstová křivka divokého kmene (Sp1) pěstovaného při 37°C (černé čtverce) a při 40°C (bílé čtverce). Růstová křivka kmene $\Delta spr0334$ (Sp57) pěstovaného při 37°C (černé trojúhelníky) a při 40°C (bílé trojúhelníky).

Závěrem lze shrnout, že kmen $\Delta spr0334$ (Sp57) se vyrovnává se studovanými druhy stresů podobně jako divoký kmen Sp1. Pouze na teplotní stres reagoval kmen Sp57 snížením maximální dosažené hodnoty optické denzity.

4.3.3 Citlivost mutanta $\Delta spr0334$ k antibiotikům působícím na buněčnou stěnu

StkP hraje důležitou roli v regulaci syntézy buněčné stěny. Kontroluje správný vývoj septa a jeho uzavření (BEILHARZ *et al.*, 2012). Protein Spr0334 je substrátem StkP, a protože o něm není téměř nic známo, zajímalo nás, zda antibiotika penicilin G a vankomycin ovlivňující syntézu buněčné stěny ovlivní růst buněk kmene $\Delta spr0334$ (Sp57).

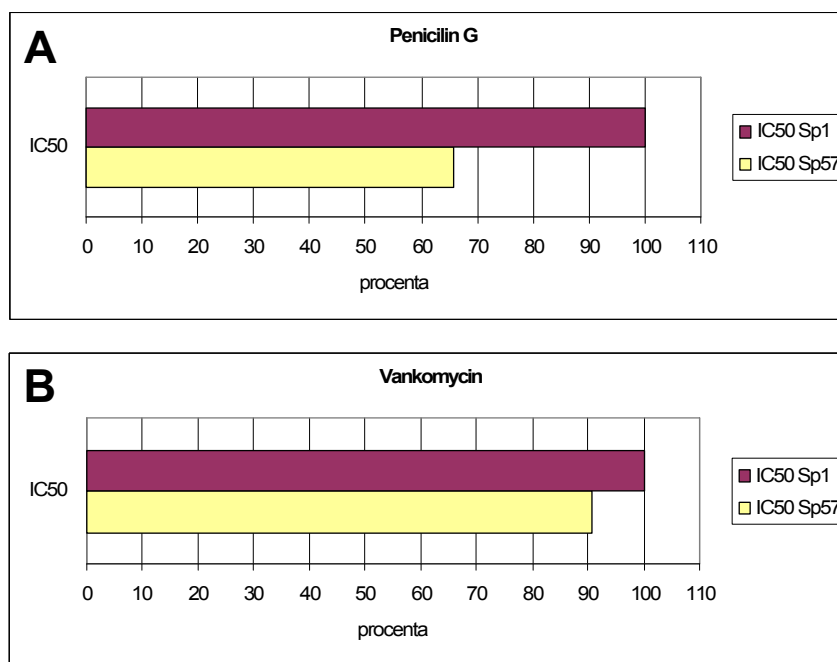
Citlivost buněk k antibiotikům jsme testovali pěstováním divokého kmene (Sp1) a kmene $\Delta spr0334$ (Sp57) v tekutém médiu TSB v přítomnosti příslušného antibiotika (viz kap. 3.2.5.8) a po pětihodinové kultivaci jsme změřili optickou denzitu při 600 nm. Závislost dosažené optické denzity na koncentraci antibiotika jsme vynesli do grafu a z něj

jsme odečetli střední inhibiční koncentraci IC_{50} , která představuje koncentraci látky mající za následek 50% snížení růstu.

Hodnota IC_{50} penicilinu G pro divoký kmen je 0,014 $\mu\text{g/ml}$ a 0,0092 $\mu\text{g/ml}$ pro kmen $\Delta spr0334$. Hodnota IC_{50} vankomycinu pro divoký kmen je 0,343 $\mu\text{g/ml}$ a 0,311 $\mu\text{g/ml}$ pro kmen $\Delta spr0334$. Hodnotu IC_{50} pro divoký kmen jsme stanovili jako 100%. Hodnotu IC_{50} pro kmen $\Delta spr0334$ jsme přepočítali na procenta a takto upravené hodnoty IC_{50} obou kmenů vynesli do grafů na obrázku 4-14.

Z grafů (obr. 4-14) vidíme, že hodnota IC_{50} vyjádřená v procentech pro penicilin G kmene $\Delta spr0334$ (Sp57) je o 35% nižší než pro divoký kmen (Sp1) a IC_{50} vyjádřené v procentech pro vankomycin je sníženo o 10% oproti divokému kmeni (Sp1).

Závěrem lze říci, že kmen $\Delta spr0334$ (Sp57) je citlivější k působení penicilinu G, ale rozdíl v citlivosti k vankomycinu není v porovnání s divokým kmenem (Sp1) příliš významný.



Obr. 4-14: Citlivost mutanta $\Delta spr0334$ (Sp57) k antibiotikům působícím na buněčnou stěnu v tekutém médiu TSB

IC_{50} neboli střední účinná inhibiční koncentrace je koncentrace látky mající za následek 50% snížení růstu.

Grafické znázornění citlivosti kmene $\Delta spr0334$ (Sp57) k antibiotikům vyjádřené pomocí IC_{50} přepočítané na procenta: **A:** penicilin G; **B:** vankomycin

4.3.4 Testování přirozené a CSP indukované kompetence mutantu $\Delta spr0334$

Dalším fenotypovým projevem *S. pneumoniae* je schopnost přirozeně přijímat cizorodou DNA z prostředí v tzv. stavu kompetence. Spr0334 je substrátem StkP, jejíž delece způsobuje neschopnost navození stavu kompetence (ECHINIQUE *et al.*, 2004; SASKOVÁ *et al.*, 2007). Zajímalo nás, zda delece genu *spr0334* bude mít nějaký vliv na navození stavu přirozené či CSP indukované kompetence. Pokusy jsme prováděli v tekutém médiu CTM. Kompetenci pro genetickou transformaci jsme hodnotili pomocí účinnosti transformace, která je vyjádřena jako procento transformovaných rifampicin rezistentních buněk (MORRISON *et al.*, 1984) vztažených k celkovému počtu buněk. Účinnost transformace kmene $\Delta spr0334$ (Sp57) jsme porovnávali s účinností transformace divokého kmene (Sp1), jakožto kmene kompetentního, a kmene $\Delta stkP$ (Sp10), jakožto kmene nekompetentního (tab. 4-2). Kmen $\Delta spr0334$ (Sp57) dosahoval podobných hodnot účinnosti přirozené i indukované transformace jako Sp1, z čehož vyplývá, že se protein Spr0334 významně nepodílí na schopnosti navození stavu kompetence.

kmen	účinnost přirozené transformace (%)	účinnost CSP indukované transformace (%)
Sp1 (WT)	0,440	1,080
Sp57 ($\Delta spr0334$)	0,380	0,710
Sp10 ($\Delta stkP$)	0,003	0,002

Tab. 4-2: Transformabilita divokého kmene a kmene $\Delta spr0334$ *S. pneumoniae* v CTM médiu před a po přidání syntetického CSP

Účinnost transformace je vyjádřena jako procento transformovaných (rifampicin rezistentních) buněk vztažené k celkovému počtu buněk.

4.3.5 Morfologie mutantu $\Delta spr0334$

V neposlední řadě nás zajímalo, zda delece genu *spr0334* ovlivní morfologii buňky. Delece genu *stkP* se projevuje změnou morfologie buněk, které jsou velmi protáhlé a obsahující několik neuzavřených buněčných přepážek (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010; BEILHARZ *et al.*, 2012).

Morfologii buněk živých preparátů připravených z kultur divokého kmene (Sp1) a kmene $\Delta spr0334$ (Sp57) jsme porovnali pomocí světelného mikroskopu.

Fotografie na obrázku 4-15 byly vybrány tak, aby znázornily reprezentativní rozdíly mezi buňkami divokého kmene (Sp1) a kmene $\Delta spr0334$ (Sp57). Na obrázku 4-15 A je vidět, že buňky divokého kmene tvoří diplokoky s typicky lancetovitým tvarem buněk. Oproti tomu kmen $\Delta spr0334$ tvoří, ve srovnání s divokým kmenem, menší kulatější buňky. Často pozorujeme také tvorbu tzv. minibuněk, což poukazuje na asymetrické dělení buňky (obr. 4-15 B).

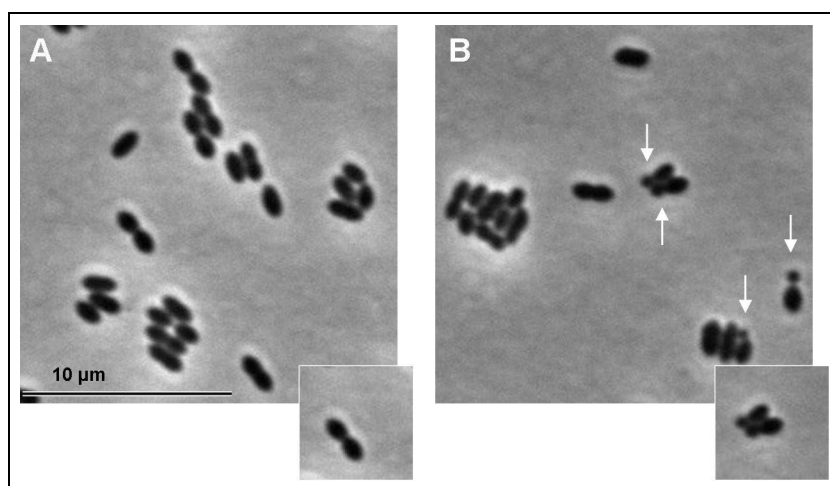
Morfologie buněk kmene Sp57 byla později podrobněji analyzována pomocí skenovací elektronové mikroskopie ve spolupracující laboratoři (Orietta Massidda; Università di Cagliari, Itálie). Na obrázku 4-16 můžeme ještě detailněji pozorovat morfologické rozdíly mezi divokým kmenem a kmenem $\Delta spr0334$.

Tvorba minibuněk u kmene $\Delta spr0334$ nás přivedla k myšlence, zda by nemohla být ovlivněna segregace DNA v buňkách. Proto jsme připravili fixované preparáty z kultur divokého kmene a kmene $\Delta spr0334$ a jejich DNA jsme barvili fluorescenčním barvivem DAPI, které umožňuje specificky vizualizovat DNA. Preparáty jsme pozorovali mikroskopem s filtrem pro pozorování fluorescenčního signálu DAPI.

Jak je patrné z fotografie na obrázku 4-17 A, divoký kmen (Sp1) tvoří lancetovité diplokoky, které obsahují DNA. Naproti tomu kmen $\Delta spr0334$ (Sp57) tvoří menší kulaté buňky a minibuňky, ve kterých často DNA zcela chybí. Toto pozorování naznačuje, že by se protein Spr0334 mohl účastnit výběru budoucího místa dělení či segregace chromosomů dosud neznámým mechanismem (obr. 4-17 B).

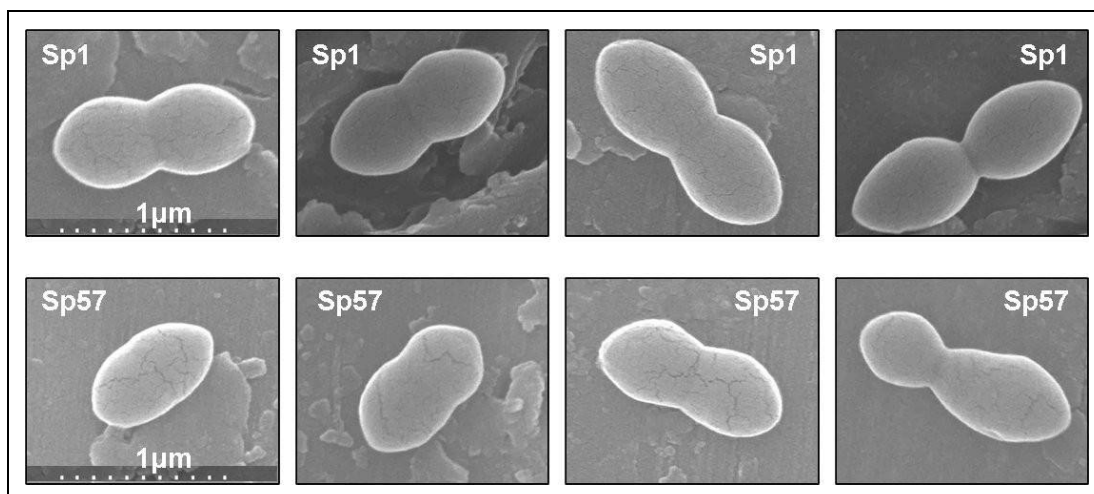
Nakonec jsme provedli kvantifikaci rozdílu ve velikosti buněk divokého kmene a kmene $\Delta spr0334$ pomocí měření délky buněk v programu MicrobeTracker (viz materiál a metody kap. 3.2.6.3). Výsledky jsme znázornili pomocí histogramu ukazujícího rozložení velikostí buněk ve velikostních třídách a výškou sloupců odpovídající zastoupení buněk určité velikostní třídy v dané populaci (obr. 4-18). Pomocí statistického programu Prism jsme určili velikostní rozdíly mezi divokým kmenem a kmenem $\Delta spr0334$ v živých preparátech pěstovaných v tekutém médiu TSB. Průměrná délka buněk divokého kmene je $1,73 \pm 0,37 \mu\text{m}$, zatímco délka buněk kmene $\Delta spr0334$ je $1,58 \pm 0,37 \mu\text{m}$ (tab. 4-3).

Data získaná pro divoký kmen a kmen $\Delta spr0334$ jsme porovnali pomocí nepárového Mann-Whitneyho testu. Tyto dva soubory dat se od sebe statisticky významně lišily ($P = 0,0001$). Z těchto pokusů vyplývá, že kmen $\Delta spr0334$ tvoří menší buňky než divoký typ a tento rozdíl je statisticky významný.



Obr. 4-15: Morfologie buněk divokého kmene a kmene $\Delta spr0334$

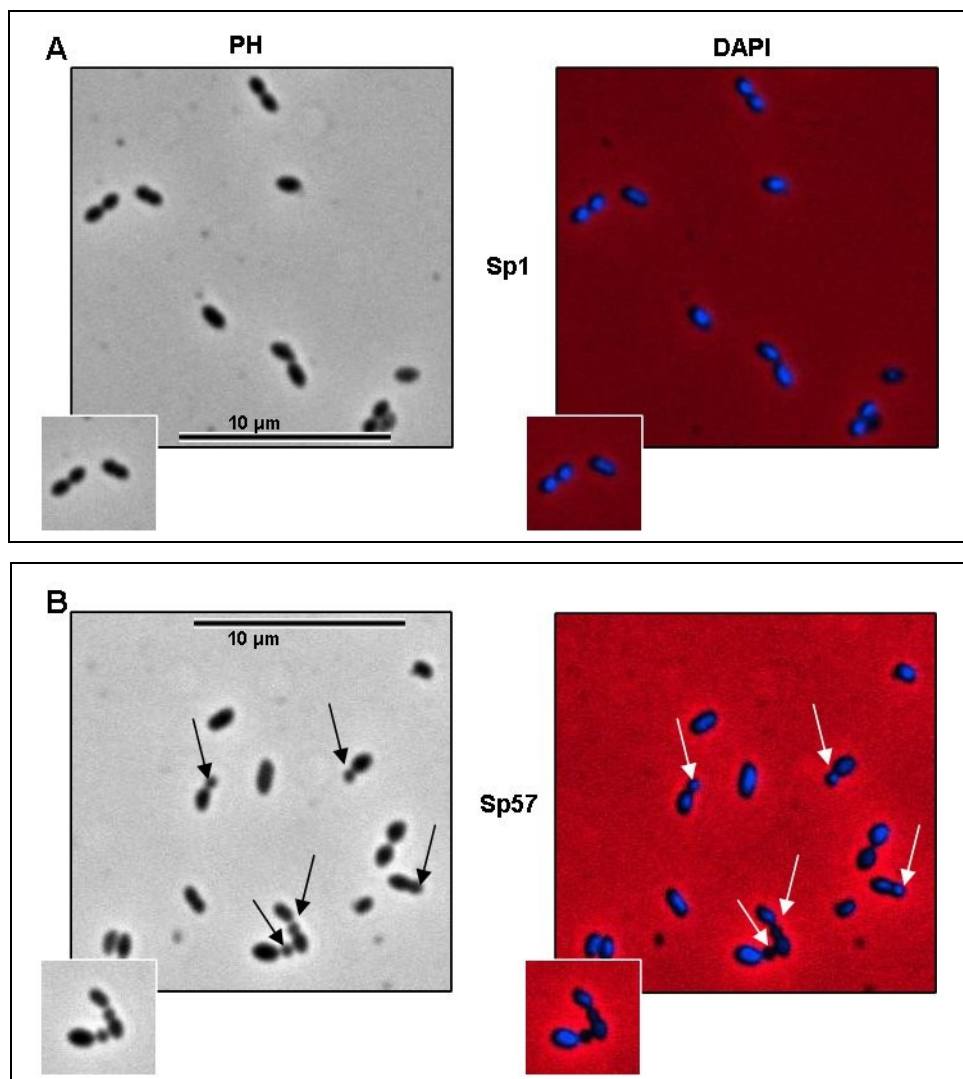
A) Sp1: divoký kmen; **B) Sp57:** kmen $\Delta spr0334$; **šipky** označují minibuňky



Obr. 4-16: Elektronová mikroskopie divokého kmene a kmene $\Delta spr0334$

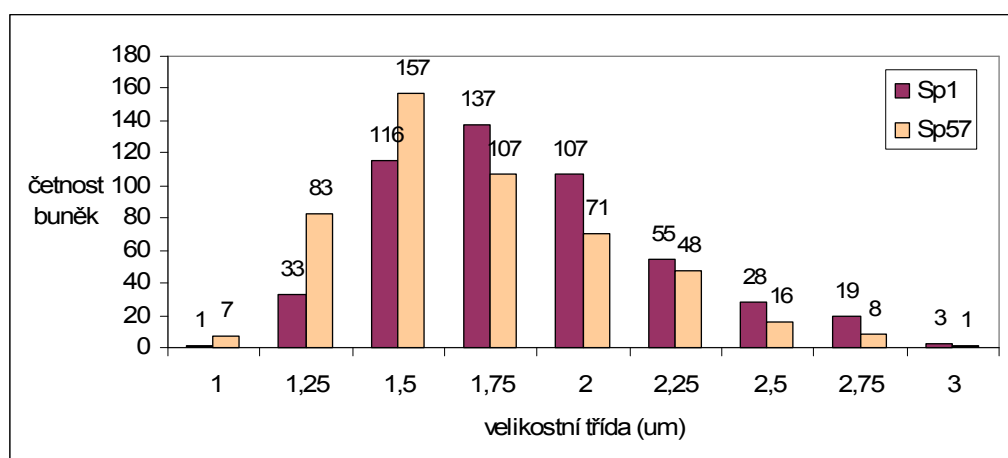
Sp1: divoký kmen; **Sp57:** kmen $\Delta spr0334$

Snímky byly pořízeny pomocí skenovací elektronové mikroskopie ve spolupracující laboratoři (Orietta Massidda; Università di Cagliari, Itálie).



Obr. 4-17: Mikroskopické snímky obarvené DNA fixovaných preparátů divokého kmene *S. pneumoniae* a kmene $\Delta spr0334$

A: divoký kmen (Sp1); **B:** kmen $\Delta spr0334$ (Sp57); **PH** – fázový kontrast; **DAPI** – překryv fázového kontrastu a DAPI; šípky označují minibuňky



Obr. 4-18: Histogram – porovnání velikosti živých buněk (μm) divokého kmene a kmene $\Delta spr0334$

Sp1: divoký kmen ; **Sp57:** kmen $\Delta spr0334$

kmen	min	1. kvartil	medián	3. kvartil	max	průměr	SMODCH	šířka
Sp1	0,97	1,45	1,69	1,95	3,07	1,73	0,37	0,66
Sp57	0,86	1,30	1,50	1,80	3,17	1,58	0,37	0,64

Tab. 4-3: Srovnání velikostí (μm) živých buněk pěstovaných v tekutém médiu TSB divokého kmene a kmene $\Delta spr0334$ *S. pneumoniae*

Sp1: divoký kmen; **Sp57:** kmen $\Delta spr0334$; všechny velikosti jsou uvedeny v μm

4.4 Komplementace mutace $\Delta spr0334$ a analýza fosforylovaných zbytků *in vivo*

4.4.1 Příprava kmene *S. pneumoniae* Sp60 a Sp65

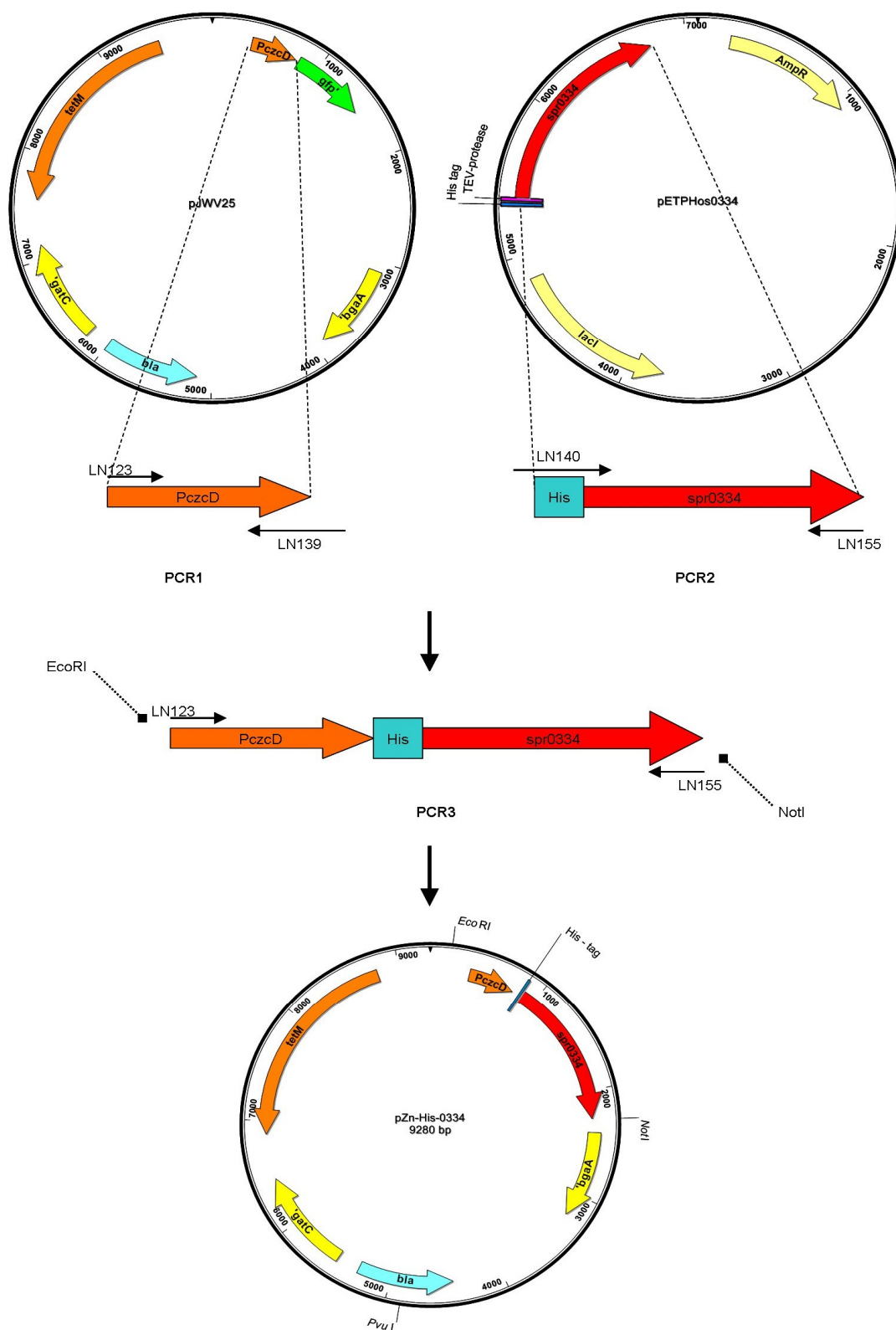
Delece genu *spr0334* způsobuje morfologickou změnu buněk a tvorbu minibuněk. Abychom potvrdili, že je tento fenotyp způsoben právě delecí *spr0334*, vytvořili jsme komplementační kmen *S. pneumoniae* označený Sp60. Ke komplementaci jsme použili systém, jehož principem je exprese studovaného genu pod inducibilním promotorem, který je vložen do postradatelného lokusu *bgaA* na chromosomu *S. pneumoniae* (EBERHARDT *et al.*, 2009). Komplementační konstrukt byl složen z inducibilního zinkového promotoru P_{czcD} a genu *spr0334* fúzovaného s histidinovou kotvou na N-konci. Histidinová kotva nám umožnila imunodetekci proteinu Spr0334.

Dalším naším cílem bylo ověřit, zda aminokyselinové zbytky T67 a T78 proteinu Spr0334 jsou fosforylovány *in vivo*. Ke studii fosforylace *in vivo* jsme připravili kmen *S. pneumoniae* označený Sp65. Opět byl komplementační konstrukt složen z inducibilního zinkového promotoru P_{czcD} a genu pro His-Spr0334 s fosfoablativními záměnami T67 a T78 za neutrální alanin, který nemůže být fosforylován.

4.4.1.1 Příprava plasmidu

K přípravě komplementačního konstruktů jsme použili plasmid pJWV25, který byl původně určen pro expresi proteinů fúzovaných s GFP v *S. pneumoniae* (EBERHARDT *et al.*, 2009). Tento plasmid jsme zvolili proto, že nám umožňuje fúzi genu *spr0334* s inducibilním zinkovým promotorem P_{czcD} . Dále obsahuje sekvence *gatC* a *bgaA* homologní k sekvencím na chromosomu *S. pneumoniae*, které umožňují integraci konstruktů do postradatelného *bgaA* lokusu. Genetická informace kódovaná chromosomem mezi těmito sekvencemi není pro bakterii v laboratorních podmínkách esenciální, a proto může dojít k vložení konstruktů do chromosomu homologní rekombinací. Navíc plasmid nese gen pro tetracyklinovou rezistenci, která umožňuje selekci pozitivních klonů

S. pneumoniae. Pro klonování *his-spr0334* pod inducibilní zinkový promotor jsme použili metodu fúzní PCR (podrobněji viz. materiál a metody, kap. 3.2.1.4). Metoda spočívá v amplifikaci dvou fragmentů (*his-spr0334* a promotoru P_{czcD}) pomocí primerů s překrývajícími se konci. V další amplifikační reakci dojde k fúzi obou fragmentů. Oba komplementační konstrukty byly vytvořeny stejným postupem a pomocí restrikčních míst *EcoRI* a *NotI* klonovány do plasmidu pJWV25 (obr. 4-19). Vzniklé plasmidy jsme pojmenovali pZn-His-0334 a pZn-His-0334-T67A+T78A.

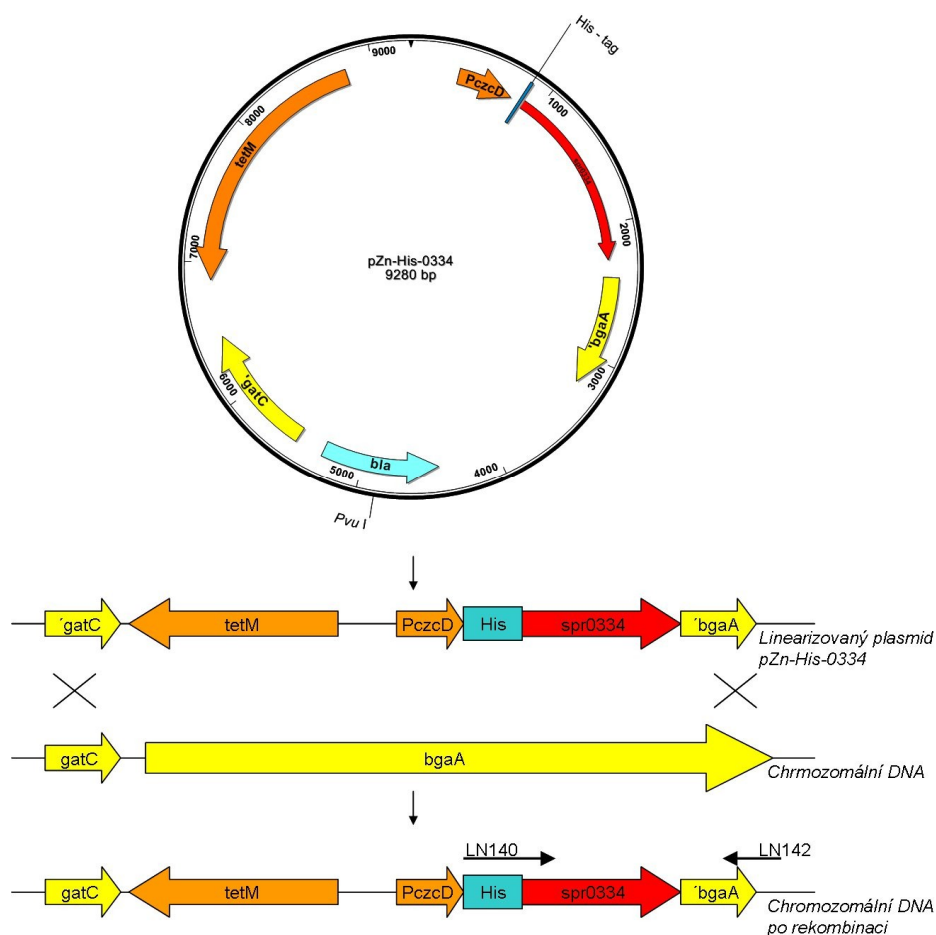


Obr. 4-19: Schéma fúzní PCR

P_{czcD}: indukibilní zinkový promotor; ***gfp***: gen pro GFP; ***tetM***: gen pro tetracyklinovou rezistenci; ***gatC*** a ***bgaA***: místa pro homologní rekombinaci; ***bla*** a **Amp^R**: gen pro ampicilinovou rezistenci; **His**: histidinová kotva; ***spr0334***: gen pro Spr0334; ***EcoRI***, ***NotI***, ***PvuI***: použité restriční enzymy a místa; **LN123**, **LN139**, **LN140**, **LN155**: použité oligonukleotidy

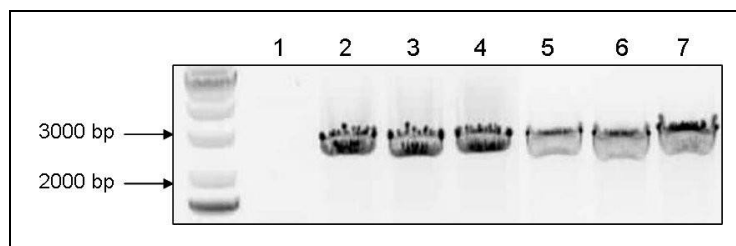
4.4.1.2 Integrace konstruktů pZn-His-0334 a pZn-His-0334-T67A+T78A do chromosomu *S. pneumoniae*

Plasmid pZn-His-0334 stejně jako pZn-His-0334-T67A+T78A jsme linearizovali restričním enzymem *PvuI* (obr.4-20). Linearizovaným plasmidem jsme transformovali *S. pneumoniae* Sp57 (*spr0334::lox72*), čímž vznikl komplementační kmen *S. pneumoniae*, dále označovaný jako Sp60 (*spr0334::lox72*; *bgaA::P_{czcD}-his-spr0334*) a Sp65 (*spr0334::lox72*; *bgaA::P_{czcD}-His-spr0334-T67A+T78A*) (obr. 4-20). Integraci komplementačních konstruktů do chromosomu kmene Sp57 jsme ověřili pomocí PCR u klonů rezistentních k tetracyklinu (obr. 4-21). V PCR reakci jsme použili oligonukleotidy LN142, který je komplementární k sekvenci mimo rekombinační oblast, a LN140, který je komplementární k histidinové kotvě. Získaný PCR produkt měl předpokládanou velikost 2400 bp. Jako negativní kontrolu jsme použili divoký kmen Sp1, kde by nemělo dojít k amplifikaci produktu.



Obr. 4-20: Schéma integrace komplementačního konstruktů do chromosomu *S. pneumoniae* kmene Sp57

P_{czcD}: indukibilní zinkový promotor; **His**: histidinová kotva; **spr0334**: gen pro Spr0334; **tetM**: gen pro tetracyklinovou rezistenci; **gatC** a **bgaA**: místa pro homologní rekombinaci; **bla**: gen pro ampicilinovou rezistenci; **PvuI**: restriční místo; šipky označují použité oligonukleotidy



Obr. 4-21: Kontrolní PCR – ověření integrace komplementačního konstruktů do chromosomu *S. pneumoniae* kmene Sp57

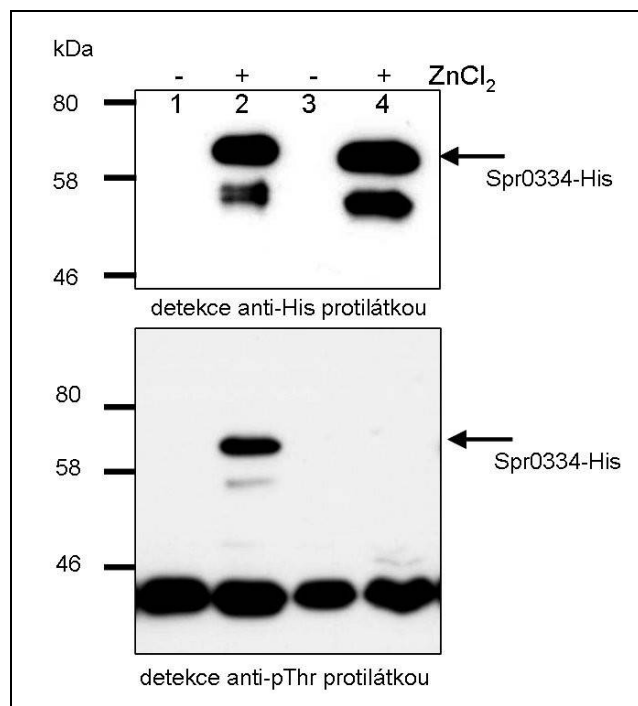
1): Divoký kmen Sp1 – neobsahuje sekvenci pro histidinovou kotvu (žádný PCR produkt); **2)-4):** Sp60 ($\Delta spr0334$; $bgaA::P_{czcD}-his-spr0334$) klon 1-3 – integrace kompl. konstruktů do *bgaA* lokusu na chromosomu (2400 bp); **5)-7):** Sp65 ($\Delta spr0334$; $bgaA::P_{czcD}-his-spr0334-T67A+T78A$) klon 1-3 – integrace kompl. konstruktů do *bgaA* lokusu na chromosomu (2400 bp)

4.4.1.3 Expres a fosforylace proteinů His-Spr0334 a His-Spr0334-T67A+T78A ve *S. pneumoniae*

V kmenech Sp60 ($spr0334::lox72$; $bgaA::P_{czcD}-his-spr0334$) a Sp65 ($spr0334::lox72$; $bgaA::P_{czcD}-his-spr0334-T67A+T78A$) jsme testovali expresi a fosforylaci proteinu His-Spr0334 pod indukibilním zinkovým promotorem (obr. 4-22). V celkových lyzátech kmenů Sp60 a Sp65 jsme expresi proteinu His-Spr0334 detekovali pomocí anti-His protilátky a jeho fosforylaci pomocí anti-pThr protilátky. Jako kontrolu jsme použili buněčné lyzáty jednotlivých kmenů pěstovaných v médiu bez přídavku induktoru $ZnCl_2$.

Na obrázku 4-22 je znázorněna detekce proteinů His-Spr0334 a His-Spr0334-T67A+T78A v lyzátech kmenů Sp60 a Sp65 pěstovaných v přítomnosti 0,2 mM $ZnCl_2$. Tyto proteiny jsme detekovali pomocí anti-His protilátky. Ostatní proteiny detekované anti-His protilátkou v lyzátech jsou patrně degradačními produkty. Fosforylaci proteinu pomocí anti-pThr protilátky jsme detekovali pouze u kmene Sp60 pěstovaného v přítomnosti induktoru. Ostatní proteiny detekované anti-pThr protilátkou v lyzátech jsou další substráty StkP.

Na závěr tohoto pokusu můžeme říci, že proteiny His-Spr0334 a His-Spr0334-T67A+T78A jsou specificky exprimovány pouze v přítomnosti induktoru v médiu. Na rozdíl od proteinu His-Spr0334, protein His-Spr0334-T67A+T78A nebyl fosforylován. Tímto jsme dokázali, že aminokyselinové zbytky T67 a T78 jsou místy fosforylace proteinu Spr0334 *in vivo*.



Obr. 4-22: Detekce exprese a fosforylace divoké a mutantní formy proteinu His-Spr0334

1) Sp60, 0mM ZnCl₂; 2) Sp60 0,2 mM ZnCl₂; 3) Sp65, 0 mM ZnCl₂; 4) Sp65, 0,2 mM ZnCl₂

4.4.2 Charakterizace kmene Sp60 a Sp65

Kmen Sp57 ($\Delta spr0334$) tvoří menší kulatější buňky s častým výskytem minibuněk. Abychom ověřili, že je za tento fenotyp zodpovědná delece genu *spr0334*, připravili jsme komplementační kmen Sp60 a dále jej charakterizovali.

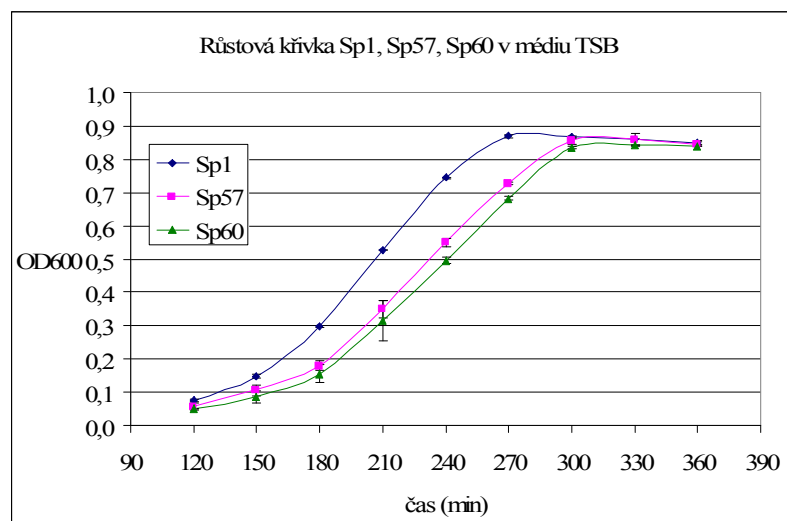
Detekcí fosforylace proteinu His-Spr0334-T67A+78A v předchozí kapitole (obr. 4-22) jsme prokázali, že je protein Spr0334 fosforylován *in vivo* na aminokyselinových zbytcích T67 a T78. Kmen Sp65 (*spr0334::lox72; bgaA::P_{czcD}-his-spr0334T67A+T78A*) jsme dále charakterizovali, protože nás zajímalo, jaký vliv na buňku bude mít defosforylovaný stav proteinu Spr0334.

4.4.2.1 Růst komplementačního kmene Sp60 v komplexním médiu

Nejprve jsme sledovali schopnost růstu komplementačního kmene (Sp60) v tekutém médiu TSB a porovnávali s růstem kmene $\Delta spr0334$ (Sp57) a divokého kmene (Sp1). Během kultivace, která probíhala staticky při 37°C, jsme v půlhodinových intervalech měřili optickou denzitu testovaných kultur při vlnové délce 600 nm.

Z průběhu růstových křivek jednotlivých kmenů na obrázku 4-23 můžeme říci, že komplementační kmen Sp60 rostoucí v tekutém médiu TSB bez přídavku induktoru roste téměř srovnatelně jako kmen $\Delta spr0334$ (Sp57). Oproti divokému kmeni (Sp1) má delší lag

fázi, doba zdvojení pro všechny tři kmeny je 35 min a přechod do stacionární fáze probíhá při stejné optické denzitě. Z tohoto pozorování vyplývá, že nedochází k expresi His-Spr0334 bez přítomnosti induktoru, což potvrdila i imunodetekce popsaná v předchozí kapitole (obr. 4-22).



Obr. 4-23: Růstová křivka divokého kmene Sp1, kmene Sp57 ($\Delta spr0334$) a komplementačního kmene Sp60 v tekutém médiu TSB

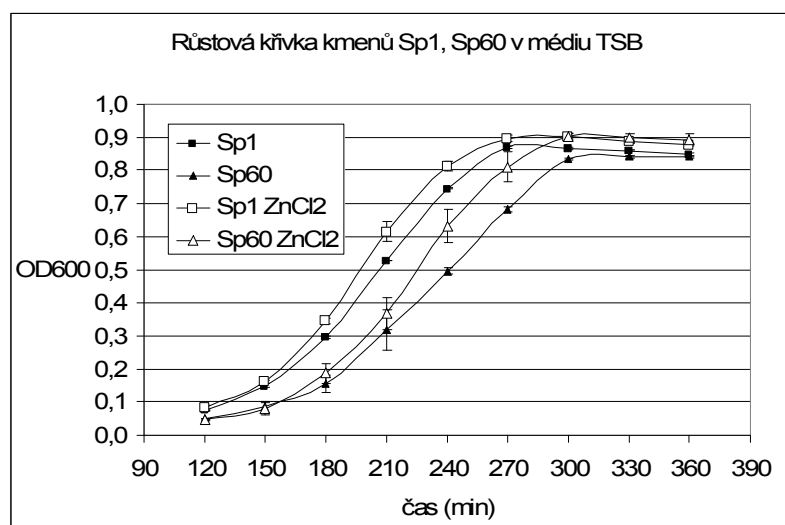
Růstové křivky byly proměřeny ve třech opakujících se měřeních.

Růstová křivka divokého kmene (Sp1) (modré kosočtverce), růstová křivka kmene $\Delta spr0334$ (Sp57) (fialové kruhy) a růstová křivka komplementačního kmene (Sp60) (zelené trojúhelníky), který se v nepřítomnosti induktoru projevuje jako kmen $\Delta spr0334$ (Sp57)

Následně jsme pozorovali schopnost růstu komplementačního kmene (Sp60) v tekutém médiu TSB bez a s přidavkem induktoru (0,25 mM $ZnCl_2$) a porovnávali s růstem divokého kmene (Sp1) ve stejných růstových podmínkách. Kultivace opět probíhala staticky při 37°C a v půlhodinových intervalech jsme měřili optickou denzitu testovaných kultur při vlnové délce 600 nm.

V grafu na obrázku 4-24 z průběhu růstových křivek vidíme, že komplementační kmen (Sp60) v přítomnosti induktoru zkrátí svou dobu zdvojení o 4 minuty, při přechodu do stacionární fáze dosahuje vyšší optické denzity, než bez přidavku induktoru srovnatelné s divokým kmenem. Lag fáze zůstává stále delší než u divokého kmene (Sp1). U kmene Sp1 pozorujeme v přítomnosti induktoru zkrácení lag fáze oproti růstu bez přidavku induktoru. Z tohoto pozorování vyplývá, že komplementační kmen (Sp60) dokáže v přítomnosti induktoru komplementovat pouze částečně delecí genu *spr0334*. To může

být způsobeno nedostatečnou účinností exprese pod inducibilním promotorem, umístěním komplementačního konstruktů v chromosomu nebo fúzí proteinu s histidinovou kotvou.



Obr. 4-24: Růstová křivka divokého kmene Sp1 a komplementačního kmene Sp60 v tekutém médiu TSB

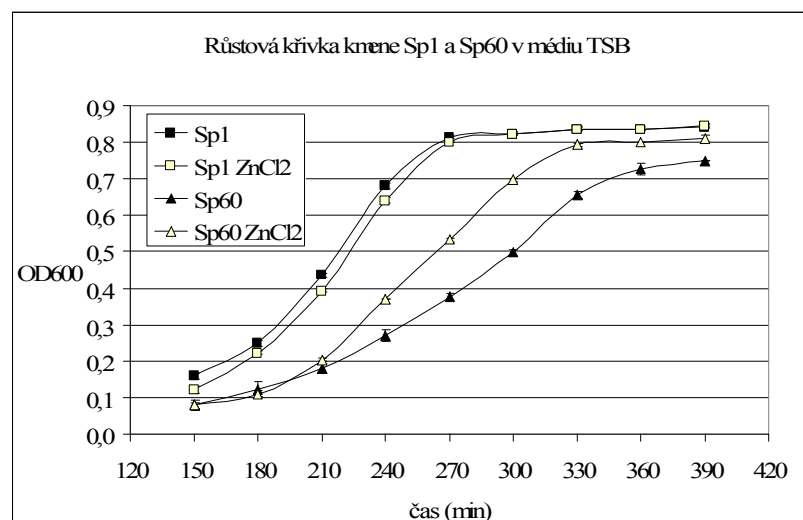
Růstové křivky byly proměřeny ve třech opakujících se měřeních.

Růstová křivka divokého kmene (Sp1) bez přidavku ZnCl_2 (černé čtverce) a v přítomnosti 0,25 mM ZnCl_2 (bílé čtverce). Růstová křivka komplementačního kmene (Sp60) bez přidavku ZnCl_2 (černé trojúhelníky) a v přítomnosti 0,25 mM ZnCl_2 (bílé trojúhelníky)

4.4.2.2 Citlivost komplementačního kmene Sp60 k teplotnímu stresu

Kmen $\Delta\text{spr0334}$ je citlivý k teplotě 40°C, což se projevuje výrazným snížením optické denzity při přechodu do stacionární fáze. Proto nás zajímalo, jak bude komplementační kmen reagovat na teplotní stres. Kulturu divokého (Sp1) a komplementačního kmene (Sp60) jsme pěstovali v tekutém médiu TSB bez a s přidavkem induktoru (0,25 mM ZnCl_2) při teplotě 40°C.

Z průběhu růstových křivek vynesných v grafu na obrázku 4-25 vidíme, že růst divokého kmene není nijak ovlivněn přítomností induktoru. U komplementačního kmene Sp60 pozorujeme, že bez přidavku induktoru v médiu je jeho růst velmi pomalý s dobou zdvojení 54 minut a do stacionární fáze přechází při nižší optické denzitě. V přítomnosti induktoru v médiu pozorujeme u kmene Sp60 zrychlení doby zdvojení na 35 min, které je stejné pro divoký kmen (Sp1), a zvýšení optické denzity při přechodu do stacionární fáze. Průběh růstové křivky kmene Sp60 ale není stejný jako u růstové křivky kmene Sp1, což může být způsobeno pouze částečnou komplementací nebo nedostatečnou účinností exprese.



Obr. 4-25: Citlivost komplementačního kmene Sp60 k teplotnímu stresu

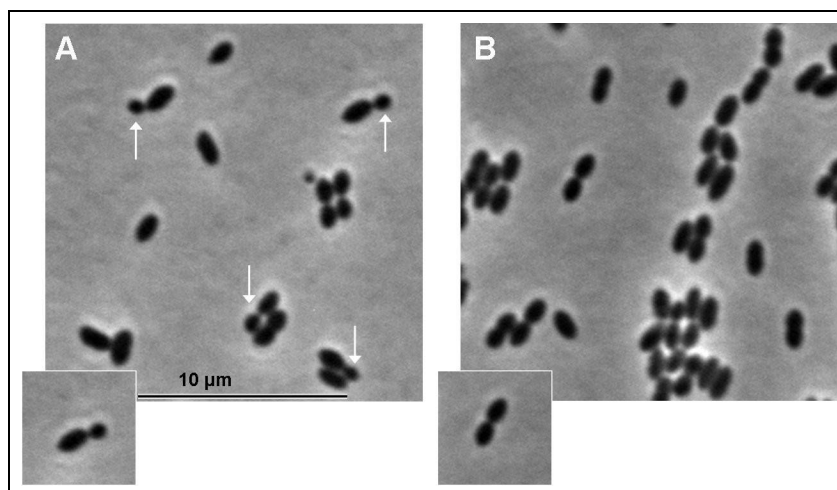
Růstové křivky byly proměřeny ve třech opakujících se měřeních.

Růstová křivka divokého kmene (Sp1) bez přídavku ZnCl_2 (černé čtverce) a v přítomnosti 0,25 mM ZnCl_2 (bílé čtverce). Růstová křivka komplementačního kmene (Sp60) bez přídavku ZnCl_2 (černé trojúhelníky) a v přítomnosti 0,25 mM ZnCl_2 (bílé trojúhelníky)

4.4.2.3 *Morfologie komplementačního kmene Sp60*

Zajímalo nás, jak komplementační kmen Sp60 produkující protein His-Spr0334 bude z hlediska morfologie nahrazovat funkci nativního proteinu Spr0334. Kmen Sp60 jsme pěstovali v tekutém médiu TSB bez a s přídavkem induktoru (0,2 mM ZnCl_2). Živé preparáty jsme pozorovali pomocí mikroskopu ve fázovém kontrastu.

Na obrázku 4-26 A, kde je kmen Sp60 pěstován v médiu TSB bez přídavku induktoru, vidíme, že podobně jako kmen $\Delta\text{spr0334}$ (Sp57) tvoří menší kulatější buňky s častým výskytem minibuněk. V případě kmene Sp60 pěstovaného v přítomnosti induktoru dochází k morfologické komplementaci, tj. dochází k tvorbě lancetovitých diplokoků a nepozorujeme vznik minibuněk. Z tohoto pozorování vyplývá, že komplementace v kmeni Sp60 z hlediska morfologického probíhá úspěšně.

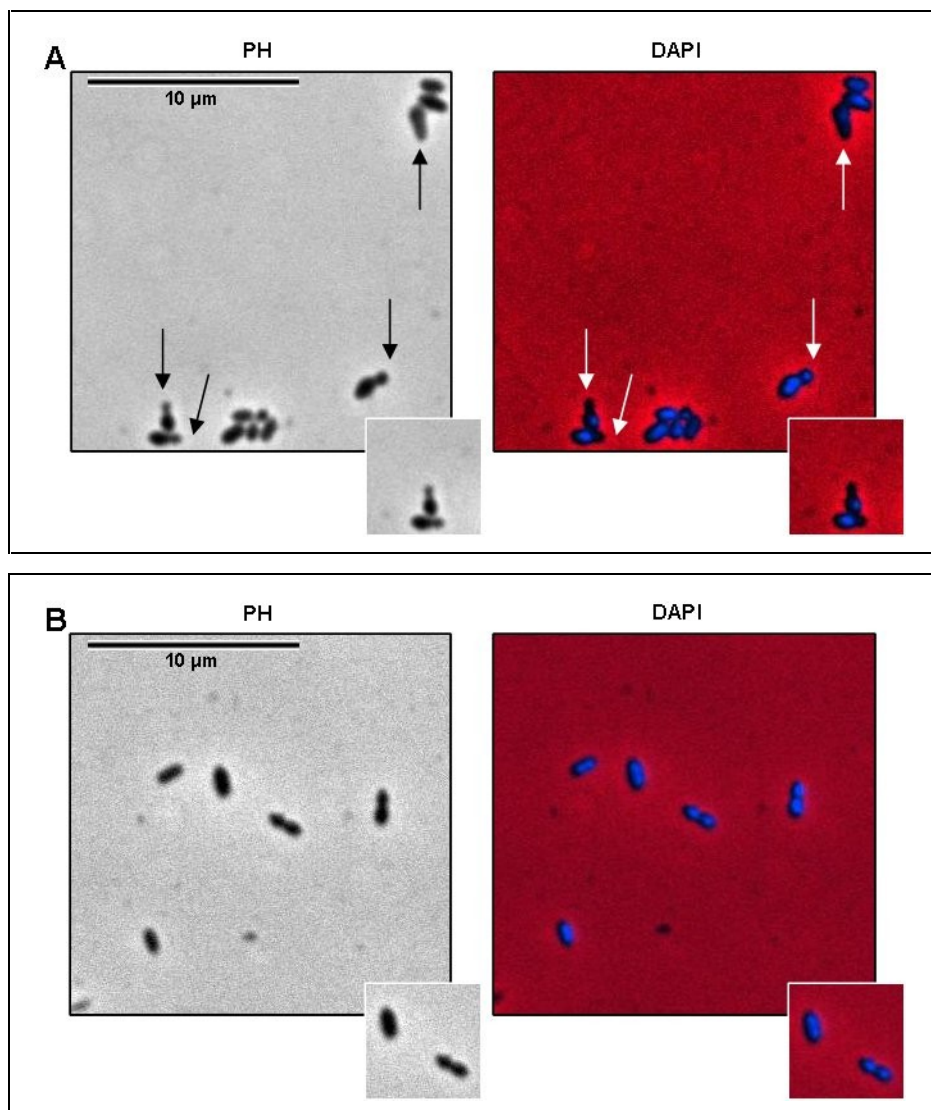


Obr. 4-26: Morfologie buněk komplementačního kmene Sp60

Komplementační kmen Sp60 (*spr0334::lox72*; *P_{czcD}-his-spr0334*) pěstovaný v médium TSB (A) bez ZnCl_2 a (B) s přidavkem 0,2 mM ZnCl_2 ; šipky označují minibuňky

Dále nás zajímalo, zda v komplementačním kmeni (Sp60) dochází v rámci komplementace k normálnímu dělení DNA do buněk. Proto jsme vytvořili fixované preparáty komplementačního kmene (Sp60) z kultur pěstovaných na krevním agaru bez a s přidavkem induktoru (0,2 mM ZnCl_2) a pozorovali je mikroskopem s filtrem pro pozorování fluorescenčního signálu DAPI.

Buňky komplementačního kmene (Sp60) pěstovaného na krevním agaru bez přidavku induktoru (obr. 4-27 A) se dělí asymetricky. Též pozorujeme, podobně jako u kmene $\Delta\text{spr0334}$ (Sp57), že minibuňky často zcela postrádají DNA. Na obrázku 4-27 B, kde byl kmen Sp60 pěstován na krevním agaru s přidavkem induktoru, pozorujeme symetrické dělení buněk i přítomnost DNA ve všech buňkách. Závěrem můžeme říci, že mutantní fenotyp je způsoben delecí genu pro Spr0334 a tato delece je komplementována produkcí proteinu His-Spr0334 v přítomnosti induktoru.



Obr. 4-27: Mikroskopické snímky obarvené DNA fixovaných preparátů komplementačního kmene Sp60

Snímky fixovaných preparátů komplementačního kmene (Sp60) (*spr0334::lox72*; *P_{cscD}-his-spr0334*) pěstovaného na krevním agaru (A) bez ZnCl₂ a (B) s přidavkem 0,2 mM ZnCl₂; PH - fázový kontrast; DAPI – překryv fázového kontrastu a DAPI; šipky označují minibuňky

4.4.2.4 *Morfologie kmene Sp65*

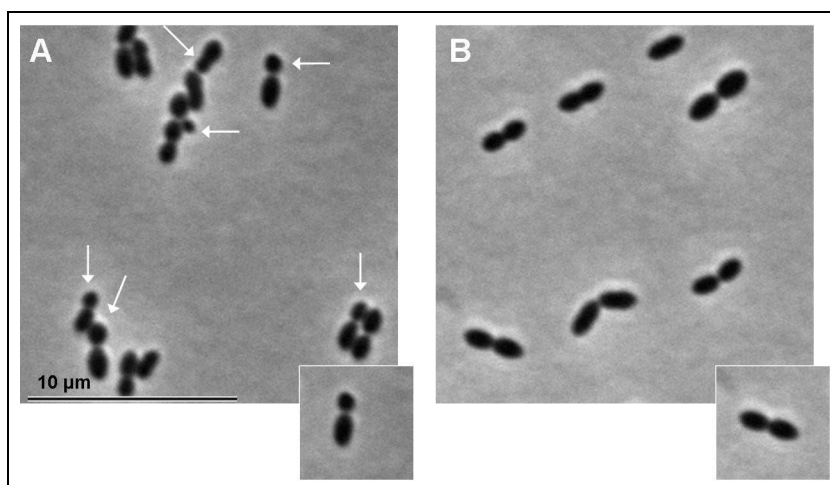
Fosforylace proteinu může měnit jeho konformaci a modifikovat jeho aktivitu. Zajímalo nás, jaký vliv má fosforylace na funkci proteinu Spr0334 a jak se morfologicky projeví.

Nejprve jsme komplementační kmen Sp65 produkující fosfoablativní protein His-Spr0334-T67A+T78A pěstovali v tekutém médiu TSB bez a s přidavkem induktoru (0,2 mM ZnCl₂). Živé preparáty jsme pozorovali pomocí mikroskopu ve fázovém kontrastu.

Kmen Sp65 pěstovaný v tekutém médiu TSB bez přidavku induktoru tvoří stejně jako komplementační kmen Sp60 menší kulatější buňky s častým výskytem minibuněk typických pro kmen $\Delta spr0334$ (Sp57) (obr. 4-28 A). V přítomnosti induktoru tvoří kmen Sp65 pěstovaný v médiu TSB lancetovité diplokoky typické pro divoký kmen (Sp1) (obr. 4-28 B). Změna morfologie kmene Sp65 na obrázku 4-28 napovídá, že fosfoablativní protein His-Spr0334-T67A+T78A je schopen nahradit funkci proteinu Spr0334. Z tohoto pozorování vyplývá, že protein Spr0334 ve svém defosforylovaném stavu je stejně schopný zastat svou funkci jako v případě fosforylovaného stavu proteinu.

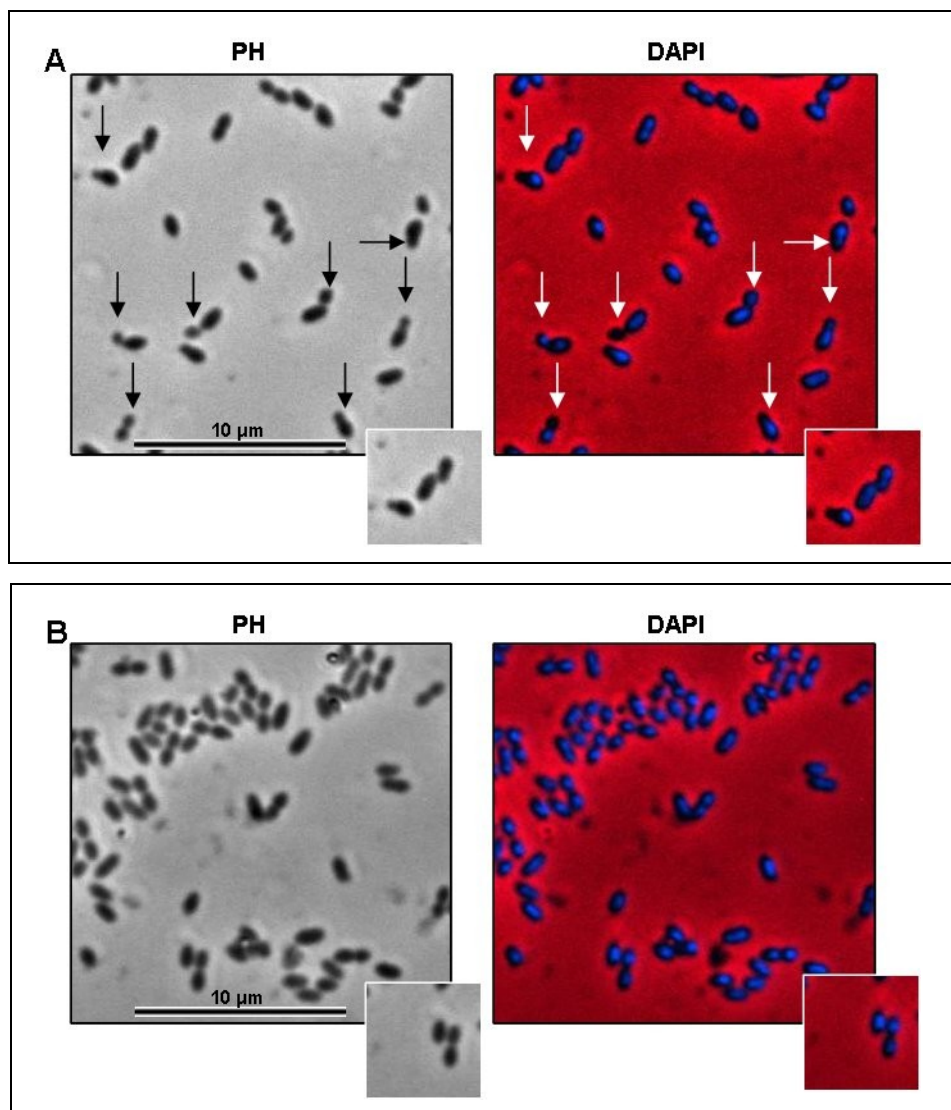
Protože je fosfoablativní protein His-Spr0334-T67+T78A schopen komplementovat morfologii buňky, zajímalo nás, jak bude rozdělena DNA v buňkách. Vytvořili jsme fixované preparáty kmene Sp65 z kultur pěstovaných na krevním agaru bez a s přidavkem induktoru (0,2 mM $ZnCl_2$) a pozorovali je mikroskopem s filtrem pro pozorování fluorescenčního signálu DAPI.

Na obrázku 4-29 A pozorujeme, že se buňky kmene Sp65 pěstované na krevním agaru bez přidavku induktoru dělí asymetricky. Též pozorujeme, podobně jako u kmene Sp60 a kmene $\Delta spr0334$ (Sp57), že minibuňky často zcela postrádají DNA. V případě pěstování kmene Sp65 na krevním agaru s přidavkem induktoru pozorujeme symetrické dělení buněk i přítomnost DNA ve všech buňkách (obr. 4-29 B). Z tohoto pozorování vyplývá, že stav fosforylace proteinu Spr0334 neovlivňuje buněčné dělení ani segregaci DNA do buněk.



Obr. 4-28: Morfologie buněk kmene Sp65

Kmen Sp65 (*spr0334::lox72*; *P_{ccd}-his-spr0334T67+78A*) pěstovaný v médiu TSB (A) bez $ZnCl_2$ a (B) s přidavkem 0,2 mM $ZnCl_2$; šipky označují minibuňky



Obr 4-29: Mikroskopické snímky obarvené DNA fixovaných preparátů kmene Sp65

Snímky fixovaných preparátů kmen Sp65 (*spr0334::lox72*; P_{cscD} -*his-spr0334*-T67A+T78A) pěstovaného na krevním agaru (A) bez $ZnCl_2$ a (B) s přidavkem 0,2 mM $ZnCl_2$; **PH** - fázový kontrast; **DAPI** – překryv fázového kontrastu a DAPI; **šipky** označují minibuňky

Na závěr můžeme shrnout, že obě ektopicky exprimované alely genu pro protein His-Spr0334 jsou schopny komplementovat delecii *spr0334*, a to ve stejném rozsahu nezávisle na stavu fosforylace proteinu Spr0334.

4.4.2.5 Určení velikosti buněk kmene Sp60 a Sp65

Abychom potvrdili mikroskopické pozorování, provedli jsme měření velikosti fixovaných buněk komplementačních kmenů Sp60 a Sp65 pěstovaných v tekutém médiu TSB bez a s přidavkem induktoru (0,2 mM $ZnCl_2$) pomocí programu MicrobeTracker. Ve statistickém programu Prism jsme určili rozdíly ve velikosti buněk obou kmenů (tab. 4-4).

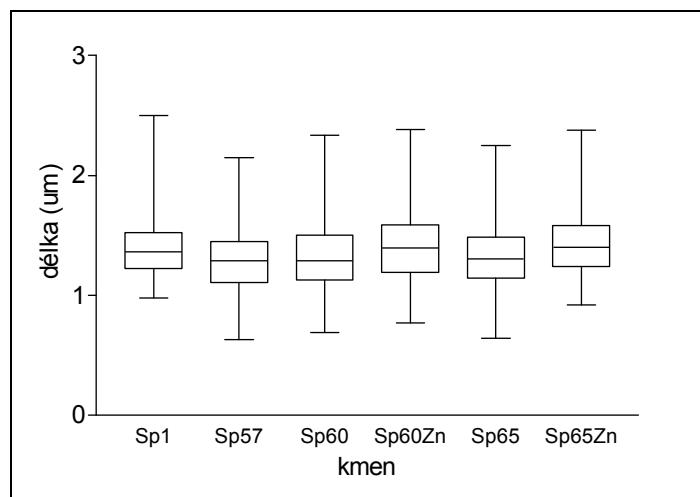
Tyto hodnoty jsme porovnali s hodnotami pro divoký kmen (Sp1) a kmen $\Delta spr0334$ (Sp57) a graficky znázornili na obrázku 4-30. Nakonec jsme výsledky znázornili pomocí histogramu, kde výška sloupce odpovídá zastoupení buněk v určité velikostní třídě (obr. 4-31).

Z histogramů na obrázku 4-31 vidíme, že v obou kmenech Sp60 i Sp65 dochází v přítomnosti induktoru v médiu ke zvýšení četnosti buněk ve větších velikostních třídách. Data získaná programem MicrobeTracker pro kmeny Sp60 a Sp65 pěstovaných bez a s přidavkem induktoru jsme porovnali pomocí nepárového Mann-Whitneyho testu. Oba soubory dat kmene Sp60 se od sebe statisticky významně lišily ($P = 0,0022$). I oba porovnané soubory dat kmene Sp65 se lišily ($P = 0,0002$). Porovnáním průměrné délky buněk všech testovaných kmenů (tab. 4-4) jsme dokázali, že kmeny Sp60 i Sp65 v nepřítomnosti induktoru produkují menší buňky a vykazují tedy mutantní fenotyp. V přítomnosti induktoru produkují větší buňky, a tudíž dochází ke komplementaci delece genu *spr0334*. Komplementace je nezávislá na fosforylovaném či defosforylovaném stavu proteinu Spr0334. Tato data jsou zobrazena pro větší názornost pomocí krabicového grafu na obr. 4-30.

kmen	min	1. kvartil	medián	3. kvartil	max	průměr	SMODCH	šířka
Sp1	0,98	1,22	1,36	1,53	2,50	1,39	0,23	0,60
Sp57	0,64	1,11	1,29	1,45	2,15	1,28	0,30	0,57
Sp60	0,69	1,13	1,29	1,50	2,34	1,31	0,30	0,57
Sp60Zn	0,77	1,20	1,40	1,59	2,38	1,40	0,28	0,60
Sp65	0,64	1,14	1,31	1,49	1,58	1,30	0,29	0,57
Sp65Zn	0,92	1,25	1,40	1,58	2,38	1,42	0,25	0,60

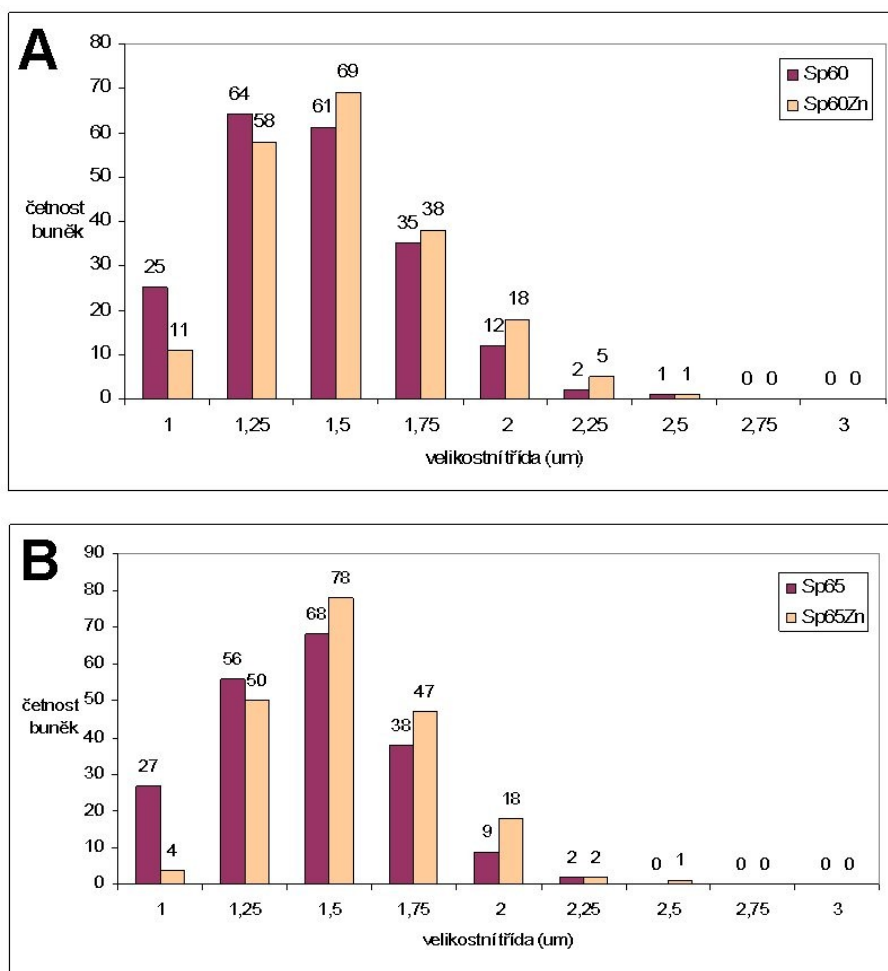
Tab. 4-4: Porovnání velikostí (μm) buněk fixovaných preparátů

Sp1: divoký kmen ; **Sp57:** mutantní kmen (*spr0334::lox72*); **Sp60:** komplementační kmen (*spr0334::lox72*; P_{czcD} -*his-spr0334*) pěstovaný bez a s přidavkem ZnCl_2 ; **Sp65:** komplementační kmen (*spr0334::lox72*; P_{czcD} -*his-spr0334*) pěstovaný bez a s přidavkem ZnCl_2



Obr. 4-30: Srovnání velikostí (μm) buněk fixovaných preparátů

Sp1: divoký kmen; **Sp57:** mutantní kmen (*spr0334::lox72*); **Sp60:** komplementační kmen (*spr0334::lox72*; *P_{czcD}-his-spr0334*) pěstovaný bez a s přidavkem ZnCl_2 ; **Sp65:** komplementační kmen (*spr0334::lox72*; *P_{czcD}-his-spr0334*) pěstovaný bez a s přidavkem ZnCl_2



Obr. 4-31: Histogram – porovnání velikosti buněk fixovaných preparátů

Komplementační kmeny pěstované bez a s přidavkem ZnCl_2 (A) Sp60 (*spr0334::lox72*; *P_{czcD}-his-spr0334*) a (B) Sp65 (*spr0334::lox72*; *P_{czcD}-his-spr0334-T67A+T78A*)

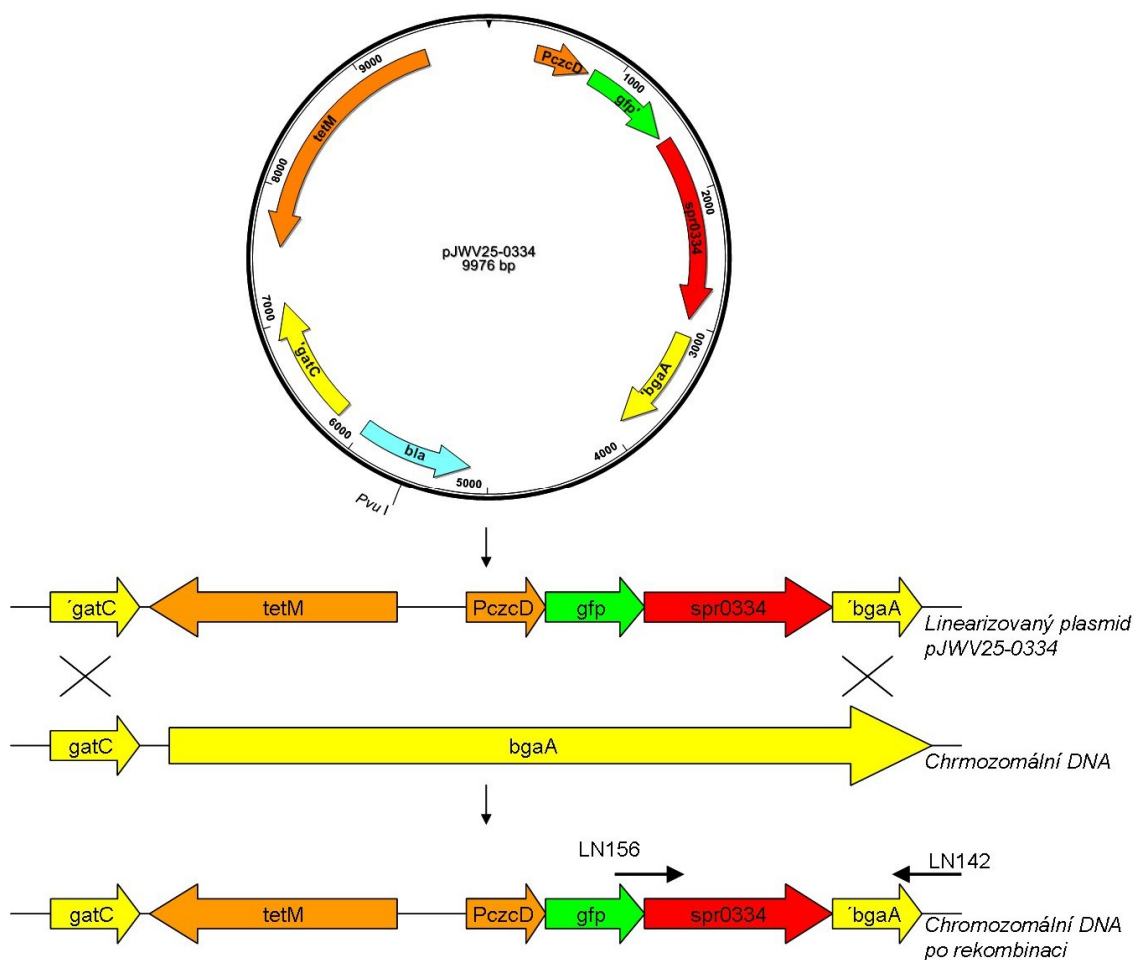
4.5 Lokalizace proteinu *Spr0334* ve *Streptococcus pneumoniae*

Proteinkinasa StkP a její majoritní substrát, protein DivIVA, jsou specificky lokalizovány v dělicím septu, případně na pólech buňky, proto nás zajímalo, jaká je lokalizace proteinu *Spr0334* v buňce. Za tímto účelem jsme vytvořili kmeny *S. pneumoniae* nesoucí na svém chromosomu v *bgaA* lokusu gen pro expresi proteinu *Spr0334* fúzovaného na N-konci s GFP.

4.5.1 Příprava kmenů Sp59 a Sp58

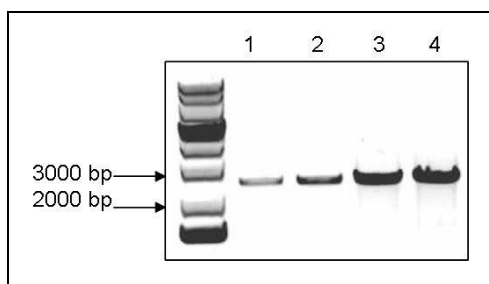
4.5.1.1 Příprava kmene Sp59

Plasmid pJWV25-0334 (L. NOVÁKOVÁ, nepublikované výsledky) nesoucí gen *gfp-spr0334* pod indukibilním P_{czcD} promotorem jsme linearizovali restričním enzymem *PvuI* (obr.4-9). Linearizovaným plasmidem jsme transformovali kmen Sp57 (*spr0334::lox72*), čímž vznikl komplementační kmen *S. pneumoniae* dále označovaný jako Sp59 (*spr0334::lox72; bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*) (obr. 4-32). Integraci konstruktu do chromosomu kmene Sp57 jsme ověřili pomocí PCR u klonů rezistentních k tetracyklinu. V PCR reakci jsme použili oligonukleotid LN142, který je komplementární k sekvenci mimo rekombinační oblast, a druhý LN156, který pokrývá část genu *spr0334*. Získali jsme PCR produkt o očekávané velikosti 2500 bp (obr. 4-32; 4-33). Jako pozitivní kontrolu se stejně velkým amplifikačním produktem jsme zvolili kmen Sp45 (L. NOVÁKOVÁ, nepublikované výsledky), což je divoký kmen, který nese gen *gfp-spr0334* pod indukibilním zinkovým promotorem vložený rovněž v *bgaA* lokusu (obr. 4-33).



Obr. 4-32: Schéma integrace P_{czcD} -gfp-spr0334 do chromosomu *S. pneumoniae* kmene Sp57

P_{czcD} : indukibilní zinkový promotor; *gfp*: gen pro GFP; *spr0334*: gen pro Spr0334; *tetM*: gen pro tetracyklinovou rezistenci; *gatC* a *bgaA*: místa pro homologní rekombinaci; *bla*: gen pro ampicilinovou rezistenci; *PvuI*: restrikční místo; šípky označují použité oligonukleotidy



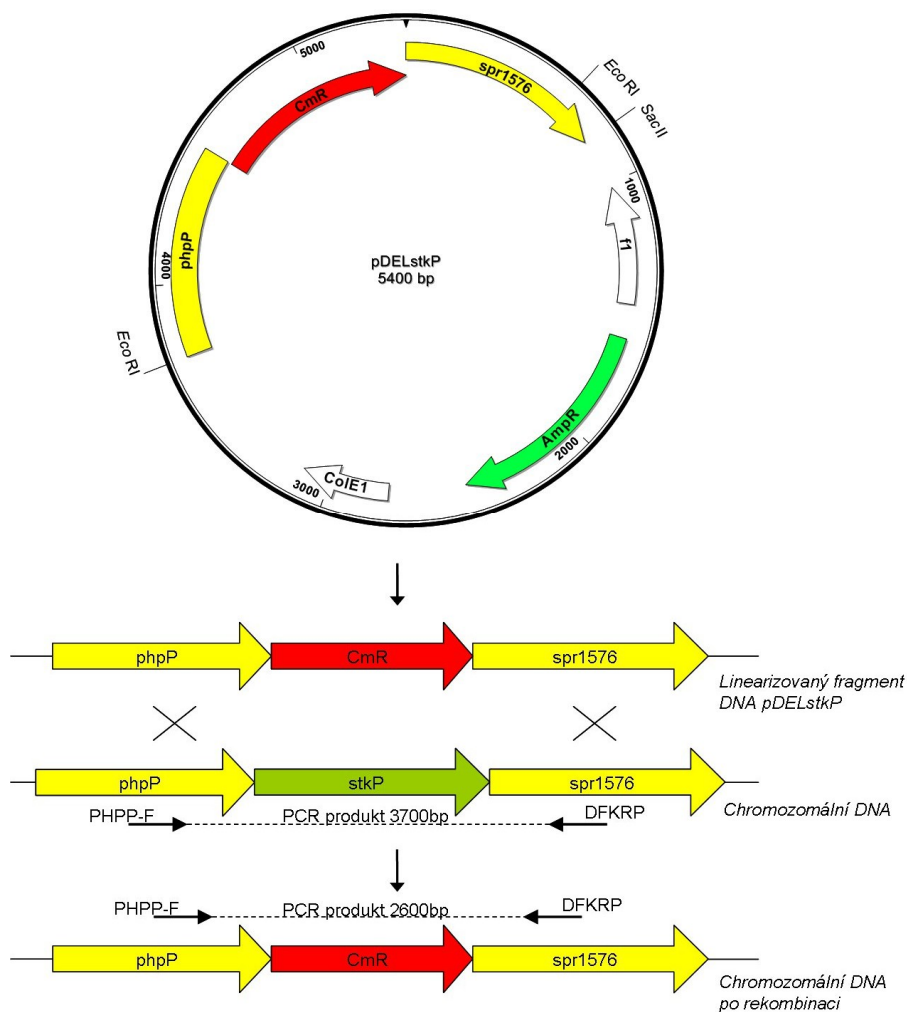
Obr. 4-33: Kontrolní PCR – ověření integrace P_{czcD} -gfp-spr0334 do chromosomu *S. pneumoniae* kmene Sp57

1) Sp45 (*bgaA*:: P_{czcD} -gfp-spr0334) 2)-4) Sp59 (*spr0334*::*lox72*; *bgaA*:: P_{czcD} -gfp-spr0334) klon 1-3; v obou kmenech je P_{czcD} -gfp-spr0334 integrován na chromosom do *bgaA* lokusu (produkt 2500bp)

4.5.1.2 Příprava kmene Sp58

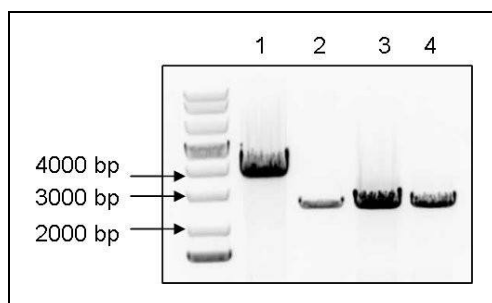
Jak již bylo zmiňováno dříve, protein Spr0334 patří mezi substráty StkP (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010). Abychom mohli sledovat lokalizaci nefosforylovaného proteinu Spr0334 v buňce, připravili jsme kmen Sp58, ve kterém je deletován gen pro proteinkinazu StkP.

Linearizovaný plasmid pDELstkP (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2005) (viz. materiál a metody, kap. 3.1.2) jsme transformovali do kmene *S. pneumoniae* Sp45, čímž vznikl kmen Δ stkP, dále označovaný jako Sp58 (*stkP::cat; bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*) (obr. 4-34). Inzerční inaktivaci genu *stkP* v chromosomu kmene Sp58 jsme ověřili pomocí PCR u klonů rezistentních k tetracyklinu. V PCR reakci jsme použili oligonukleotid PHPP-F, který je komplementární k sekvenci genu *phpP*, a oligonukleotid DFKRP, který je komplementární k sekvenci genu *spr1576*. Získali jsme produkt o očekávané velikosti 2600 bp (obr 4-34; 4-35). Jako kontrolu jsme použili chromosomální DNA divokého kmene (Sp1), kde není gen pro StkP inzerčně deletován, a získali jsme PCR produkt o očekávané velikosti 3700 bp (obr. 4-35).



Obr. 4-34: Schéma integrace lineárního DNA fragmentu pDELstkP do chromosomu *S. pneumoniae* kmene Sp45

phpP: gen pro Ser/Thr protein fosfatase; *stkP*: gen pro Ser/Thr proteinkinasu; *Cm^R*: gen pro chloramfenikolovou rezistenci; *spr1576*: gen pro hypotetický protein Spr1576; *Amp^R*: gen pro ampicilinovou rezistenci; *f1* a *ColE1*: počátečky replikace; *EcoRI* a *SacII*: restrikční místa; šipky označují použité oligonukleotidy



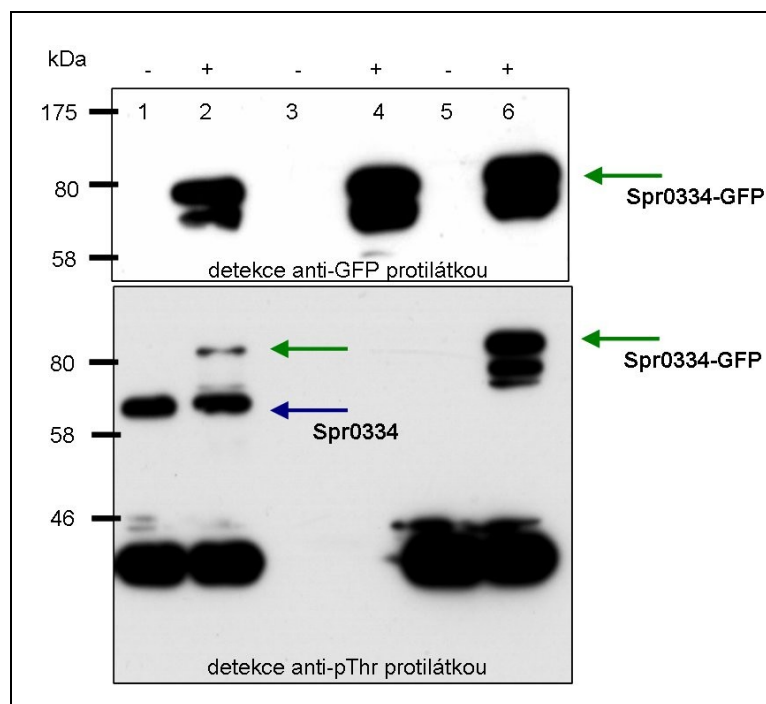
Obr. 4-35: Kontrolní PCR – ověření delece genu *stkP* na chromosomu *S. pneumoniae*

1) Sp1 (WT) – gen *stkP* (produkt 3700 bp); 2)-4) Sp58 (*stkP::cat*; *bgaA::P_{czd}-gfp-spr0334*) klon 1-3 – gen *stkP* zaměněn za *cat* kazetu (produkt 2600 bp)

4.5.1.3 Expres a fosforylace proteinu GFP-Spr0334 ve *S. pneumoniae*

V kmenech *S. pneumoniae* Sp59 (*spr0334::lox72; bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*), Sp58 (*stkP::cat; bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*) a Sp45 (*bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*) jsme testovali expresi a fosforylaci proteinu GFP-Spr0334 pod indukibilním zinkovým promotorem. Kmeny *S. pneumoniae* jsme inokulovali do média M17G s přidavkem induktoru (0,2 mM ZnCl₂). Po dosažení OD₆₀₀ = 0,5 jsme kultivaci ukončili, izolovali jsme proteiny a detekovali je anti-GFP a anti-pThr protilátkou. Jako kontrolu jsme použili buněčné lyzáty jednotlivých kmenů pěstovaných v médiu bez přidavku induktoru.

V lyzátech kmenů Sp45, Sp58 a Sp59 jsme po indukci ZnCl₂ detekovali pomocí anti-GFP protilátky protein GFP-Spr0334. Detekci GFP-Spr0334 jsme ověřili funkčnost konstruktu *P_{czcD}-gfp-spr0334* integrovaného do *bgaA* lokusu na chromosomu *S. pneumoniae*. V lyzátech kmenů Sp45 a Sp59, ve kterých dochází k expresi StkP, jsme pomocí anti-pThr protilátky detekovali fosforylaci proteinu GFP-Spr0334. V lyzátu kmene Sp58, který má gen pro StkP deletován, jsme fosforylaci GFP-Spr0334 nedetekovali, čímž jsme potvrdili, že protein GFP-Spr0334 není v tomto kmeni fosforylován (obr. 4-36).



Obr: 4-36: Detekce exprese a fosforylace fuzního proteinu GFP-Spr0334 pomocí protilátek anti-GFP a anti-pThr

Kultury kmenů byly pěstovány v médiu M17G. Kmen Sp45 (*bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*) **1)** bez přidavku ZnCl₂ a **2)** s přidavkem 0,2 mM ZnCl₂; kmen Sp58 (*stkP::cat; bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*) **3)** bez přidavku ZnCl₂ a **4)** s přidavkem 0,2 mM ZnCl₂; kmen Sp59 (*spr0334::lox72; bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*) **5)** bez přidavku ZnCl₂ a **6)** s přidavkem 0,2 mM ZnCl₂

4.5.1.4 Určení lokalizace proteinu Spr0334 ve *S. pneumoniae*

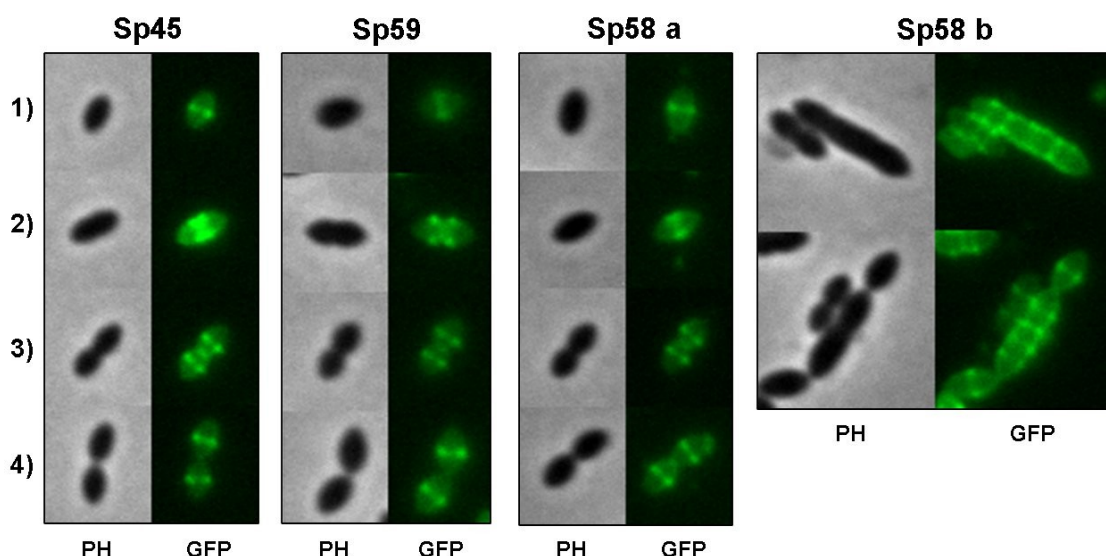
Připravené kmeny exprimující GFP-Spr0334 nám umožnily sledovat, kde v buňce se protein Spr0334 vyskytuje a zda má fosforylace vliv na jeho lokalizaci.

Kmeny Sp45, Sp58 a Sp59 jsme pěstovali v tekutém médiu M17G v přítomnosti induktoru (0,25 mM ZnCl₂) do OD₆₀₀ = 0,3 (exponenciální fáze růstu) a z těchto kultur jsme připravili živé preparáty. Ty jsme pozorovali mikroskopem za použití fluorescenčního filtru pro pozorování GFP signálu. Pro určení lokalizace proteinu GFP-Spr0334 jsme vždy stejný obrázek pořídili pomocí fluorescenčního filtru a filtru fázového kontrastu.

V exponenciální fázi růstu *S. pneumoniae* se vyskytují buňky v různých stádiích růstu. Tato stádia byla rozdělena na 4 kategorie: 1) právě rozdělené buňky s délkou okolo 1 μm, 2) nepatrně prodloužené buňky s délkou okolo 1,2 μm, 3) prodloužené buňky s délkou okolo 1,5 μm a 4) diplokoky s právě uzavřenou buněčnou přepážkou s délkou okolo 2 μm (MORLOT *et al.*, 2003).

V živých preparátech kmenů Sp45, Sp59 jsme pozorovali morfologii buněk typickou pro divoký typ v exponenciální fázi růstu (viz výše). Naše pozorování ukázalo, že protein GFP-Spr0334 je v těchto kmenech lokalizován převážně v buněčné přepážce (obr. 4-37). U kmene Sp58 (*stkP::cat; bgaA::P_{cacD}-gfp-spr0334*), kde nedochází k fosforylaci proteinu GFP-Spr0334 a dalších substrátů, jsme pozorovali dva typy morfologicky odlišných buněk. Prvním typem jsou buňky morfologicky podobné divokému typu *S. pneumoniae* (obr. 4-37; Sp58 a). Druhým typem jsou velmi protáhlé buňky obsahující několik neuzavřených buněčných přepážek, což je typické pro kmen Δ *stkP* *S. pneumoniae* (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010; BEILHARZ *et al.*, 2012;) (obr. 4-37; Sp58 b). I v tomto kmeni je protein GFP-Spr0334 lokalizován převážně v neuzavřených dělicích přepážkách.

Z našeho pozorování vyplývá, že ve všech třech kmenech *S. pneumoniae* Sp45, Sp58 i Sp59 je protein GFP-Spr0334 lokalizován převážně v buněčné přepážce. Lokalizace se významně nemění v závislosti na fosforylovaném či defosforylovaném stavu proteinu a ani v důsledku zvýšeného množství proteinu Spr0334 v buňce (kmen Sp45) nepozorujeme významnou změnu lokalizace.



Obr. 4-37: Lokalizace GFP-Spr0334 ve *S. pneumoniae*

Sp45 (*bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*); **Sp59** (*spr0334::lox72; bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*); **Sp58** (*stkP::cat; bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*); v kmeni **Sp58** se vyskytují dva morfologicky odlišné typy buněk a to **Sp58 a**, který vykazuje stejnou morfologii jakou pozorujeme u kmenů Sp45 (produkce proteinu GFP-Spr0334 na pozadí divokého kmene) a Sp59 (komplementační kmen) a **Sp58 b** tvořící dlouhé buňky s mnohočetnými FtsZ kruhy typické pro kmen Δ *stkP*; **PH** - fázový kontrast; **GFP** - fluorescenční mikroskopie; čísla 1)–4) označují typy buněk v exponenciální fázi, zvětšení 130x

4.6 Charakterizace fenotypu kmenů Sp45 a Sp59

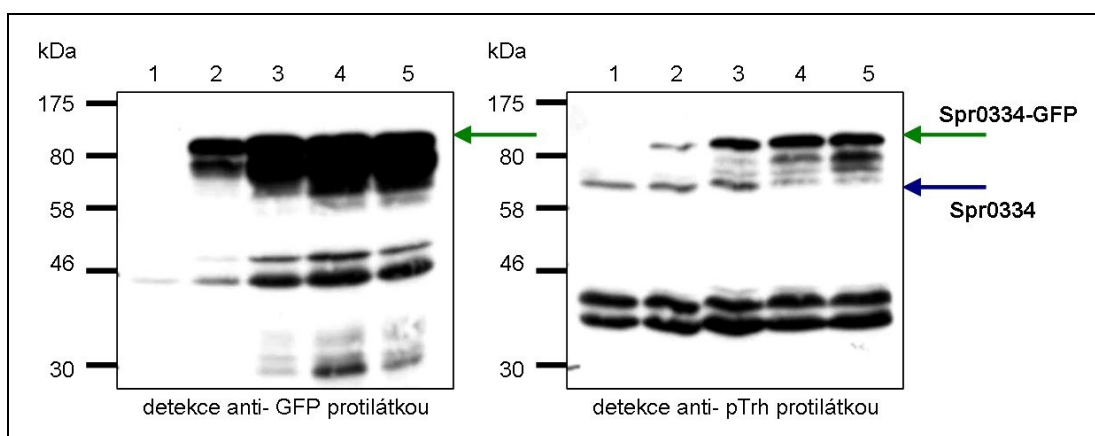
Z našich předchozích pozorování vyplynulo, že ektopicky exprimované alely genu *his-spr0334* jsou schopny komplementovat mutaci Δ *spr0334*. Proto jsme se rozhodli ověřit, zda je plně funkční i fúzní gen *gfp-spr0334* exprimovaný v kmeni Sp45 (*bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*) a komplementačním kmeni Sp59 (*spr0334::lox72; bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*)

4.6.1 Morfologie kmene Sp45

Delece genu *spr0334* měla za následek morfologickou změnu, kdy kmen Δ *spr0334* tvořil menší kulatější buňky s častým výskytem minibuněk. Proto nás zajímalo, jak se morfologicky projeví nadprodukce proteinu Spr0334. Nejprve jsme ověřili expresi a fosforylaci proteinu GFP-Spr0334 v lyzátech kmene Sp45 pěstovaného v tekutém médiu M17G se vzrůstající koncentrací induktoru (0; 0,15; 0,25; 0,35; 0,45 mM ZnCl₂).

Z obrázku 4-38 je patrné, že protein GFP-Spr0334 je v kmeni přepisován pouze v přítomnosti induktoru. Se zvyšující se koncentrací induktoru v médiu M17G se zvyšuje i koncentrace proteinu GFP-Spr0334. Protože byl kmen Sp45 vytvořen k pozorování

lokalizace proteinu GFP-Spr0334 na pozadí divokého typu, dochází samozřejmě i k přepisu nativního proteinu Spr0334. Fosforylace nativního proteinu Spr0334 v přítomnosti 0,35 mM a 0,45 mM ZnCl_2 výrazně klesá, patrně v důsledku zvýšené koncentrace GFP-Spr0334. Z těchto důvodů jsme pro další pokusy používali ZnCl_2 o koncentraci maximálně 0,25 mM. Za použití této koncentrace induktoru pozorujeme nadprodukcii GFP-Spr0334, ale fosforylace nativního Spr0334 zůstává podobná jako v kontrolní kultuře.

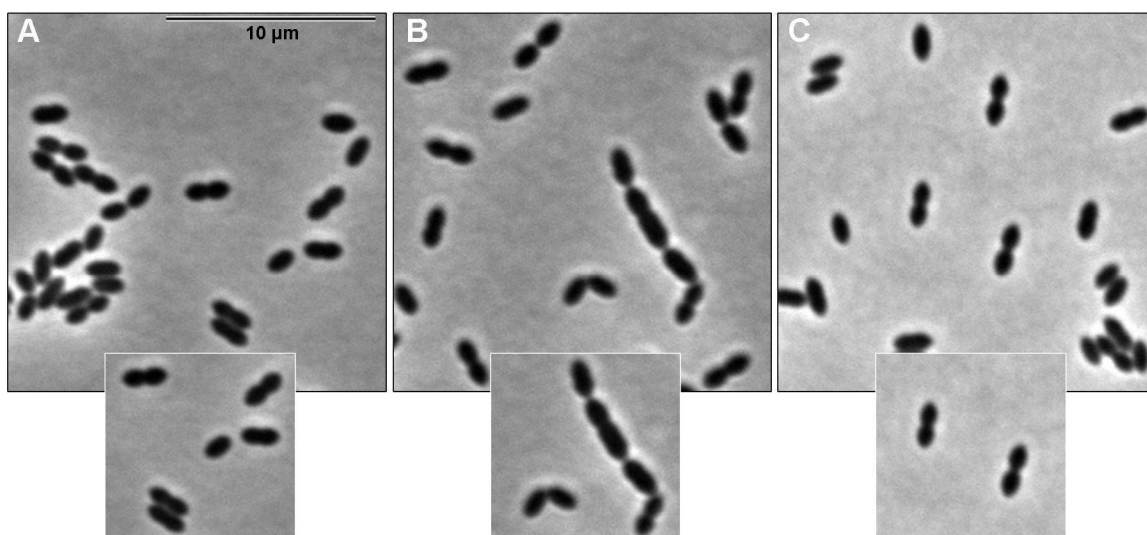


Obr. 4-38: Detekce exprese a fosforylace nativního proteinu Spr0334 a proteinu GFP-Spr0334 pomocí protilátek anti-GFP a anti-pThr

Kmen Sp45 (*bgaA::PczcD-gfp-spr0334*) pěstovaný v médiu M17G v přítomnosti **1)** 0 mM ZnCl_2 ; **2)** 0,15 mM ZnCl_2 ; **3)** 0,25 mM ZnCl_2 ; **4)** 0,35 mM ZnCl_2 ; **5)** 0,45 mM ZnCl_2

Morfologii buněk kmene Sp45 jsme pozorovali v živých preparátech připravených z kultur pěstovaných v tekutém médiu TSB a na krevním agaru bez a s přidavkem induktoru (0,25 mM ZnCl_2) pomocí mikroskopu ve fázovém kontrastu.

Kmen Sp45 pěstovaný v médiu TSB bez přidavku induktoru se projevuje jako divoký kmen *S. pneumoniae* (Sp1) a tvoří diplokoky lancetovitého tvaru (obr. 4-39 A). Na obrázku 4-39 B vidíme, že nadprodukce proteinu Spr0334 v kmeni Sp45 v přítomnosti induktoru v médiu TSB se projevuje tak, že jsme v preparátu pozorovali diplokoky lancetovitého tvaru o poznání větších rozměrů než bez přítomnosti induktoru a navíc se v preparátu vyskytují krátké řetízky o 3 až 4 buňkách. Na krevním agaru s přidavkem induktoru (obr. 4-39 C) nepozorujeme stejnou morfologii buněk jako u kmene Sp45 pěstovaného v médiu TSB s přidavkem induktoru. Naopak morfologie kmene Sp45 na krevním agaru je stejná jako morfologie buněk kmene Sp45 pěstovaného v médiu TSB bez přidavku induktoru (lancetovité diplokoky).



Obr. 4-39: Morfologie kmene Sp45

A: Sp45 (*bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*) 0 mM ZnCl₂; médiu TSB; **B:** Sp45 0,25 mM ZnCl₂; médium TSB; **C:** Sp45 0,25 mM ZnCl₂; krevní agar

Protože se velikost buněk kmene Sp45 pěstovaných v tekutém médiu bez a s přidavkem induktoru lišila, provedli jsme měření velikosti buněk. V programu MicrobeTracker jsme určili velikosti buněk (tab. 4-5). Tyto hodnoty jsme analyzovali ve statistickém programu Prism, porovnali s hodnotami pro divoký kmen (Sp1) a graficky znázornili na obrázku 4-40. Dále jsme výsledky znázornili pomocí histogramu, kde výška sloupce odpovídá zastoupení buněk v určité velikostní třídě (obr. 4-41).

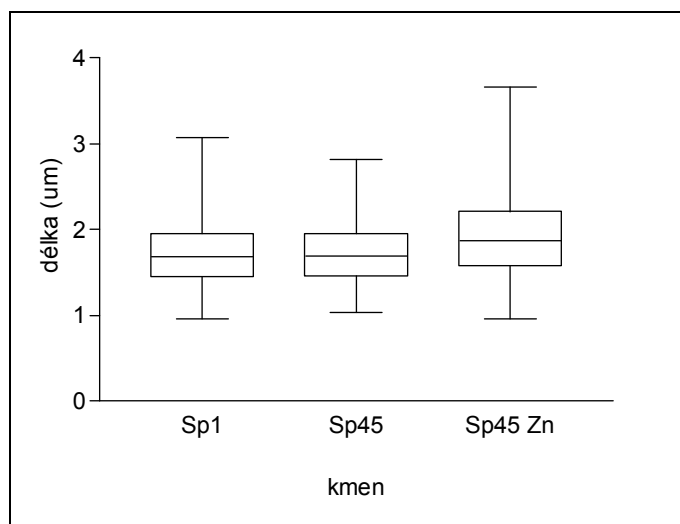
Z histogramů na obrázku 4-41 vidíme, že v kmeni Sp45 dochází v přítomnosti induktoru v médiu ke zvýšení četnosti buněk ve větších velikostních třídách. Data získaná programem MicrobeTracker pro tento kmen pěstovaný bez a s přidavkem induktoru jsme porovnali pomocí nepárového Mann-Whitneyho testu. Dva soubory dat se od sebe statisticky významně lišily ($P = 0,0001$). Z porovnání průměrné délky buněk kmene Sp45 pěstovaného bez přítomnosti induktoru ($1,73 \pm 0,37 \mu\text{m}$) a v přítomnosti induktoru ($1,93 \pm 0,47 \mu\text{m}$) vidíme, že dochází ke zvětšení buněk v jejich délce.

Na závěr tohoto pokusu můžeme říci, že nadprodukce proteinu Spr0334 v tekutém médiu TSB způsobuje celkové zvětšení délky buněk. Na krevním agaru jsme změnu morfologie buněk nepozorovali, což může být způsobeno různou hladinou exprese GFP-Spr0334 při kultivaci na různých mediích.

kmen	min	1. kvartil	medián	3. kvartil	max	průměr	SMODCH	šířka
Sp45	1,04	1,46	1,69	1,95	2,81	1,73	0,37	0,67
Sp45 Zn	0,96	1,58	1,87	2,21	3,66	1,93	0,45	0,70
Sp1	0,97	1,45	1,69	1,95	3,07	1,73	0,37	0,66

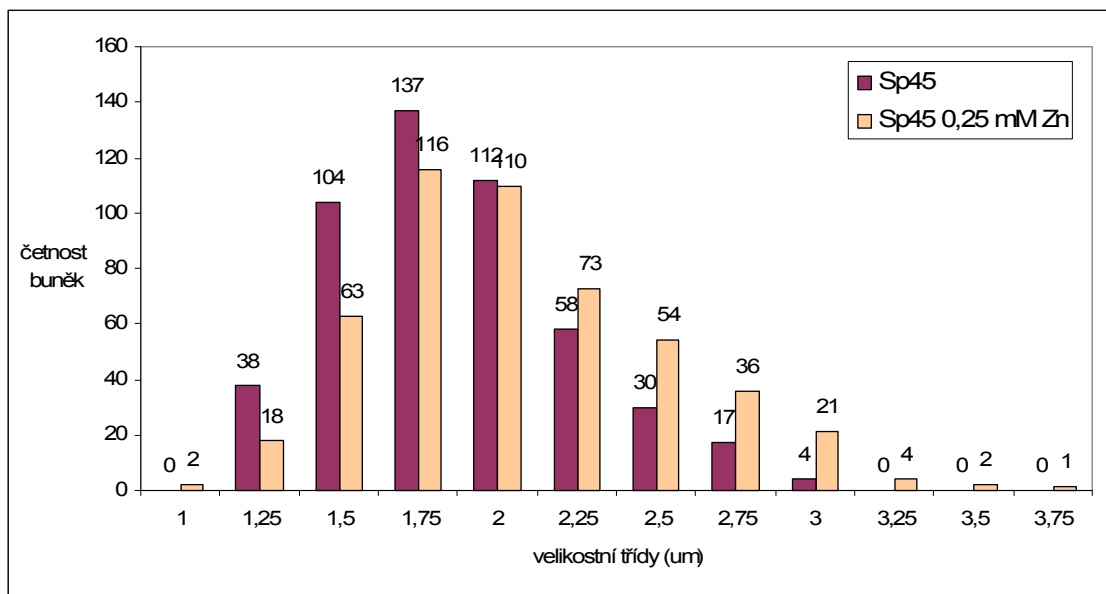
Tab. 4-5: Srovnání velikostí (μm) živých buněk kmene Sp45

Sp45: *bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*; v nepřítomnosti ZnCl₂ se fenotypově projevuje jako divoký kmen *S. pneumoniae*; s přidavkem ZnCl₂ (Sp45 Zn) dochází k expresi nativního Spr0334 i GFP-Spr0334 (nadprodukce); **Sp1:** divoký kmen; všechny velikosti jsou uvedeny v μm



Obr. 4-40: Grafické znázornění porovnání velikostí (μm) živých buněk kmene Sp1 a Sp45

Sp1: divoký kmen; **Sp45:** *bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*; v nepřítomnosti Zn²⁺ se fenotypově projevuje jako divoký kmen (Sp1); s přidavkem Zn²⁺ dochází k expresi nativního Spr0334 i GFP-Spr0334 (nadprodukce)



Obr. 4-41: Histogram – porovnání velikosti živých buněk (μm) kmene Sp45

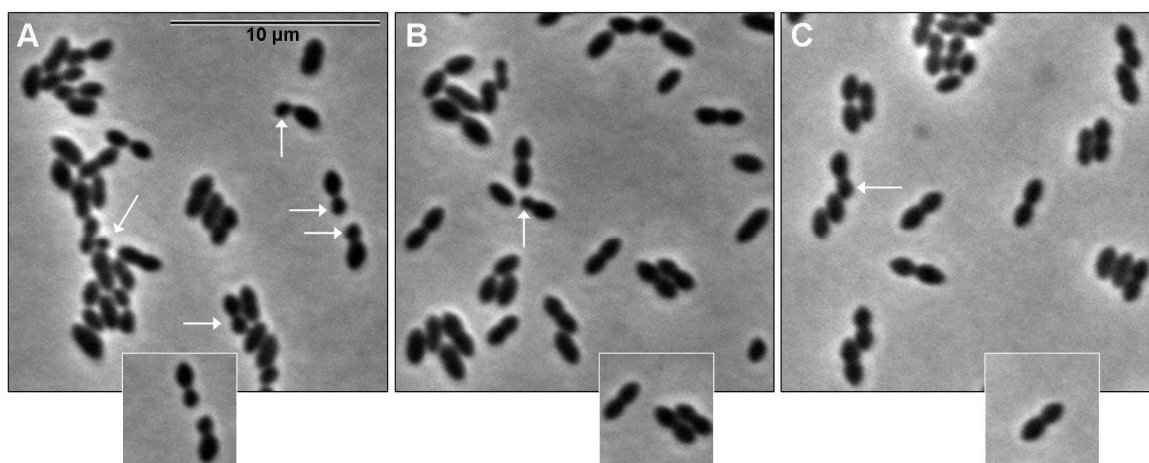
Sp45: *bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*; v nepřítomnosti ZnCl₂ se fenotypově projevuje jako divoký kmen *S. pneumoniae*; s přidavkem ZnCl₂ v médiu dochází k expresi nativního proteinu Spr0334 i GFP-Spr0334 (nadprodukce)

4.6.2 Morfologie kmene Sp59

Dále nás zajímalo, zda v připraveném komplementačním kmeni Sp59 nesoucím pod inducibilním zinkovým promotorem gen *gfp-spr0334* dochází k morfologické změně fenotypu po indukci exprese GFP-Spr0334.

Kmen Sp59 jsme pěstovali v tekutém médiu TSB a na krevním agaru bez a s přidavkem induktoru (0,25 mM ZnCl_2). Živé preparáty jsme pozorovali pomocí mikroskopu ve fázovém kontrastu.

Jak je patrné z obrázku 4-42 A, kmen Sp59 pěstovaný bez přítomnosti induktoru se morfologicky projevuje jako kmen $\Delta\text{spr0334}$. Tvoří drobnější kulatější buňky s častým výskytem minibuněk. V přítomnosti induktoru v médiu a krevním agaru, kdy je přepisován protein GFP-Spr0334, buňky vykazují morfologii divokého kmene (lancetovité diplokoky), avšak v preparátu pozorujeme vzácně i výskyt minibuněk. Z našeho pozorování se zdá, že dochází přinejmenším k částečné komplementaci mutace $\Delta\text{spr0334}$ (obr. 4-42 B, C).



Obr. 4-42: Morfologie komplementačního kmene Sp59

A: Sp59 (*spr0334::lox72; bgaA::P_{cacD}-gfp-spr0334*) 0 mM ZnCl_2 médiu TSB; **B:** Sp59 0,25 mM ZnCl_2 médium TSB; **C:** Sp59 0,25 mM ZnCl_2 krevní agar; **bílé šipky** označují minibuňky

Následně jsme provedli stanovení velikosti buněk kmene Sp59 pěstovaného v tekutém médiu TSB bez a s přidavkem induktoru (0,2 mM ZnCl_2). Ve statistickém programu Prism jsme určili rozdíly ve velikosti buněk (tab. 4-6). Tyto hodnoty jsme porovnali s hodnotami pro divoký kmen (Sp1) a graficky znázornili na obrázku 4-43. Dále jsme výsledky znázornili pomocí histogramu, kde výška sloupce odpovídá zastoupení buněk v určité velikostní třídě (obr. 4-44).

Z histogramů na obrázku 4-44 vidíme, že v kmeni Sp59 dochází v přítomnosti induktoru v médiu ke zvýšení četnosti buněk ve větších velikostních třídách. Data získaná

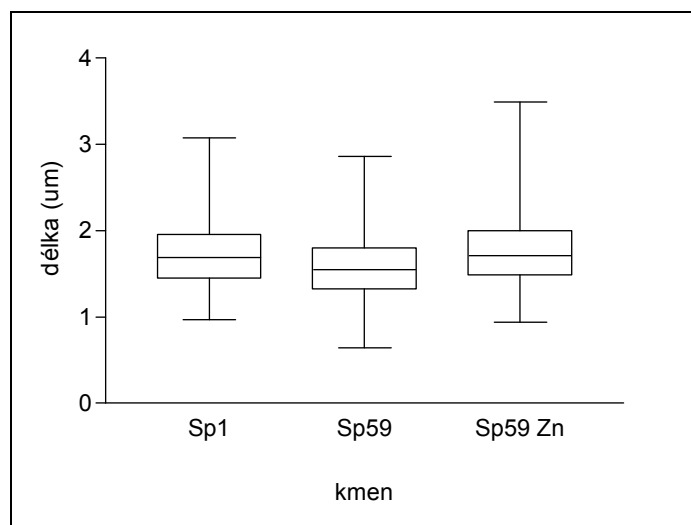
programem MicrobeTracker pro tento kmen pěstovaný bez a s přidavkem induktoru jsme porovnali pomocí nepárového Mann-Whitneyho testu. Dva soubory dat se od sebe statisticky významně lišily ($P = 0,0002$). Z porovnání průměrné délky buněk kmene Sp59, která je $1,59 \pm 0,37 \mu\text{m}$ bez přítomnosti induktoru, a $1,77 \pm 0,41 \mu\text{m}$ v přítomnosti induktoru vyplývá, že dochází ke komplementaci mutace $\Delta\text{spr0334}$.

Na závěr tohoto pokusu můžeme říci, že exprese GFP-Spr0334 po indukci ZnCl_2 vede ke komplementaci mutantního fenotypu $\Delta\text{spr0334}$, tudíž že je protein GFP-Spr0334 funkční.

kmen	min	1. kvartil	medián	3. kvartil	max	průměr	SMODCH	šířka
Sp59	0,64	1,32	1,55	1,80	2,86	1,59	0,37	0,64
Sp59 Zn	0,94	1,49	1,71	2,00	3,49	1,77	0,41	0,72
Sp1	0,97	1,45	1,69	1,95	3,07	1,73	0,37	0,66

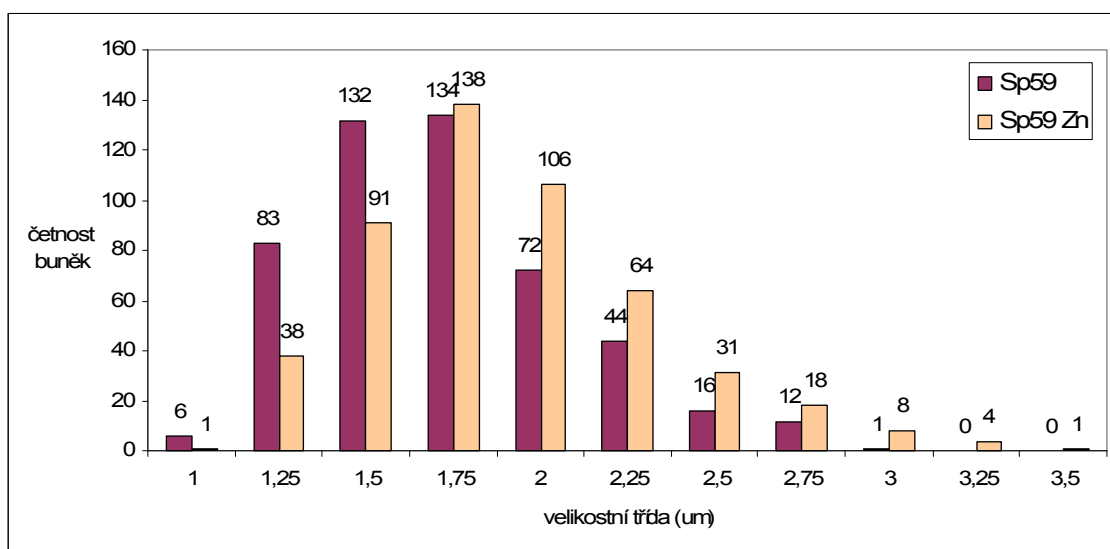
Tab. 4-6: Srovnání velikostí (μm) živých buněk kmene Sp59

Sp59: *spr0334::lox72; bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*; v nepřítomnosti ZnCl_2 se fenotypově projevuje jako kmen $\Delta\text{spr0334}$; v přítomnosti ZnCl_2 (Sp59 Zn) dochází ke komplementaci $\Delta\text{spr0334}$



Obr. 4-43: Grafické znázornění porovnání velikostí (μm) živých buněk kmene Sp1 a Sp59

Sp1: divoký kmen; **Sp59:** *spr0334::lox72; bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*; v nepřítomnosti ZnCl_2 se fenotypově projevuje jako kmen $\Delta\text{spr0334}$; v přítomnosti ZnCl_2 (Sp59 Zn) dochází ke komplementaci $\Delta\text{spr0334}$



Obr. 4-44: Histogram – porovnání velikosti živých buněk (μm) kmene Sp59

Sp59: *spr0334::lox72; bgaA::P_{czcD}-gfp-spr0334*; v nepřítomnosti ZnCl₂ se fenotypově projevuje jako kmen $\Delta spr0334$; v přítomnosti ZnCl₂ (Sp59 Zn) dochází ke komplementaci $\Delta spr0334$

5 Diskuze

5.1 Charakterizace funkce proteinu Spr0334

Streptococcus pneumoniae ve svém genomu kóduje jediný gen pro Ser/Thr proteinkinasu eukaryotního typu nazvanou StkP. Delece *stkP* z chromosomu *S. pneumoniae* ovlivňuje četné buněčné funkce, mezi které patří např. atenuace virulence, změna morfologie buněk, schopnost navození stavu přirozené kompetence a v neposlední řadě snížená odolnost buněk k teplotnímu, osmotickému, oxidativnímu i pH stresu (ECHINIQUE *et al.*, 2004; SASKOVÁ *et al.*, 2007). Do dnešní doby bylo identifikováno sedm substrátů StkP, mezi něž patří protein Spr0334 (NOVÁVKOVÁ *et al.*, 2010).

Spr0334 je membránový protein, který je konzervovaný pouze u streptokoků, *Lactococcus lactis* a *Enterococcus faecalis* (Comprehensive Microbial Ressource, <http://cmr.jevl.org>). Z analýzy sekvence *spr0334* (<http://myhits.isb-sib.ch>) vyplynulo, že je protein Spr0334 složen z N-koncové intracelulární domény, transmembránové domény a C-koncové extracelulární domény, která obsahuje oblast bohatou na serin. V N-koncové doméně proteinu byl hmotnostní spektrometrií identifikován fosforylovaný peptid KEEFVETQSLDDLIQEMR (L. NOVÁKOVÁ, nepublikované výsledky).

Prvním cílem této diplomové práce bylo vytvoření kmene *S. pneumoniae* Δ *spr0334* a následná charakterizace tohoto kmene. Během růstu při 37°C v tekutém médiu má kmen Δ *spr0334* delší lag fázi ve srovnání s divokým kmenem. Jinak mutantní kmen roste srovnatelně se stejnou dobou zdvojení a do stacionární fáze přechází při stejných hodnotách optické denzity jako divoký kmen. Lag fáze je časový úsek, kdy se buňka přizpůsobuje novému prostředí, přestavuje svůj enzymatický aparát, syntetizuje RNA a další molekuly a začíná využívat dostupné živiny. Delece *spr0334* má na tuto fázi zřejmě negativní vliv. Dále jsme studovali vliv různých stresů (pH, osmotický, oxidativní a teplotní) na růst kmene Δ *spr0334* ve srovnání s divokým kmenem. Mutantní kmen je citlivý pouze k teplotnímu stresu, při kterém dorůstá nižší optické denzity než divoký kmen. Podobný fenotyp je pozorován u kmene Δ *stkP*, který na teplotní stres reaguje téměř úplným zastavením růstu a obdobně reaguje i na pH, osmotický a oxidativní stres (SASKOVÁ *et al.*, 2007).

Kmen *S. pneumoniae* Δ *spr0334* vykazuje citlivost k působení antibiotika penicilinu G, které se váže na PBPs, a tím brání syntéze peptidoglykanu. Toto pozorování naznačuje, že kmen Δ *spr0334* není schopen se s vyvolaným stresem buněčné stěny vypořádat tak,

jako divoký kmen *S. pneumoniae*, což může být způsobeno změnou složení buněčné stěny v důsledku delece *spr0334*. Sniženou rezistenci k tomuto antibiotiku má také kmen Δ *stkP* (DIAS *et al.*, 2009).

Morfologicky se delece *spr0334* projevuje tvorbou menších kulatých buněk s častým výskytem minibuněk. Tento fenotyp naznačuje, že by se protein Spr0334 mohl účastnit buněčného dělení. Tvorba minibuněk je pozorována u kmenů tyčinkovitých bakterií s mutací genů pro proteiny MinC a MinD, které se účastní výběru budoucího místa dělení. *S. pneumoniae* tento Min systém nekóduje. V preparátech kmene *S. pneumoniae* Δ *spr0334* barvených DAPI, které se specificky váže k DNA, pozorujeme, že DNA v minibuňce často chybí. Buňky bez DNA byly pozorovány i u kmenů *S. pneumoniae* s deletovaným genem pro pozdní dělicí protein DivIVA (FADDA *et al.*, 2003) či s deletovanými geny pro proteiny účastnící se segregace chromosomů ParB a SMC (MINNEN *et al.*, 2011), ale produkce minibuněk u těchto kmenů pozorována nebyla. Nadprodukce proteinů MinC a MinD způsobuje u tyčinkovitých bakterií filamentaci buněk. Nadprodukce proteinu Spr0334 u *S. pneumoniae* nezapřičinuje filamentaci buněk, ale způsobuje zvětšení buněk a produkci krátkých řetízků třech až čtyřech buněk. Protože nemáme k dispozici specifické protilátky proti proteinu Spr0334, nemůžeme kvantifikovat, do jaké míry je protein Spr0334 nadprodukován. Tudíž pozorovaný fenotyp nadprodukce proteinu může být částečný.

Na základě těchto pozorování se domníváme, že protein Spr0334 hraje úlohu v buněčném dělení *S. pneumoniae* a pravděpodobně se podílí na výběru budoucího místa dělení či segregace chromosomů dosud neznámým mechanismem.

5.2 Analýza předpokládného operonu *spr0331-spr0337*

Pro bakterie a archebakterie je typické, že jsou geny uspořádány do jednotlivých operonů. Geny v jednom operonu jsou přepisovány ve formě polycistronní mRNA. Operon obsahuje od dvou až do více než deseti genů kódujících proteiny, které spolu často funkčně souvisejí, proto jsme se rozhodli analyzovat transkripci genu *spr0334* a genů v jeho okolí pomocí RT-PCR. Podle analýzy okolí genu *spr0334* na chromosomu jsme předpokládali, že by tento gen mohl být součástí operonu, přinejmenším společně s geny *spr0333*, *spr0335* a *spr0336*. Před genem *spr0333* a za genem *spr0336* jsou predikovány terminátory. Jelikož se v případě terminátorů jedná pouze o predikci, testovali jsme expresi i dalších genů v okolí *spr0334*. Gen *spr0331* jsme určili jako pravděpodobný počátek

operonu, protože je prvním genem přepisovaným ve stejném směru jako *spr0334*. Jako poslední gen jsme zvolili gen *spr0337*, protože před tímto genem je predikován terminátor (Comprehensive Microbial Ressource, <http://cmr.jcvi.org>).

Výsledky RT-PCR naznačují, že jsou všechny geny *spr0331-spr0337* přepisovány společně ve formě jedné polycistronní mRNA. Avšak tato metoda není dostatečně citlivá k tomu, abychom vyloučili vliv efektů ovlivňující transkripci, jako např. vnitřní promotory.

Spr0331 je konzervovaný hypotetický protein o neznámé funkci. Homologem Spr0332 je protein SAK_0373 *S. agalactiae*, který je fosforylován proteinkinasou Stk1 (SILVESTRONI *et al.*, 2009). Další homolog proteinu Spr0332 je protein YpsB *B. subtilis*. YpsB je paralogem DivIVA, který se vyskytuje u několika gram-pozitivních bakterií a patří mezi pozdní dělicí proteiny. Není esenciální pro výběr nového dělicího místa ani formování buněčné přepážky. Jeho výskyt v divizomu (proteinový komplex zodpovědný za syntézu buněčné přepážky) je významně zvýšen po zformování Z-kruhu a přispívá k řádnému a účinnému formování buněčné přepážky (TAVARES *et al.*, 2008).

Hypotetický protein Spr0333 obsahuje RNA metyltransferázovou doménu. Ukázalo se, že Spr0333 methyloje G2445 (guanin2445) 23S rRNA a že mutace v metyltransferázové doméně tuto metylaci ruší. Takto mutovaný Spr0333 se vyskytuje u všech kmenů *S. pneumoniae* rezistentních k linezolidu. Zavedení nemutované verze genu *spr0333* do rezistentní bakterie obnovuje metylaci G2445 a způsobuje, že je bakterie citlivější k linezolidu i ostatním antibiotikům (FENG *et al.*, 2009).

Spr0335 neboli 6-fosfoglukonátdehydrogenasa (6PGD) je proteinem pentosofosfátové dráhy, kde přenáší vodíkový proton z glukosa-6-fosfátu na NADP⁺ za vzniku 6-fosfoglukonolaktonu. Ve studii (DANIELY *et al.*, 2006) byl 6PGD identifikován jako protein buněčné stěny lektinové povahy. V této studii autoři hodnotí roli 6PGD v patogenezi *S. pneumoniae* jako adhezinu, který je schopný u myši vyvolat ochranou imunitní odpověď.

Spr0336 je také označován jako RitR. RitR je osiřelý transkripční regulátor, který postrádá kognátní histidinovou kinasu. Bylo ale zjištěno, že tvoří funkční systém s proteinkinasou StkP. RitR obsahuje DNA vazebnou doménu, pomocí níž se váže k promotorovým oblastem a ovlivňuje genovou expresi. Primární funkcí regulátoru RitR je udržování stálé hladiny železa v buňce *S. pneumoniae* přes regulaci transkripce genu *piuB* (podjednotka permeasy pro železo) a *piuA* (železo vázající protein). Dále ovlivňuje expresi genů, které kódují proteiny účastníci se oprav poškozené DNA, rezistence k H₂O₂, dopravy cukrů a biosyntézy pouzdra (ULIJASZ *et al.*, 2004, 2009).

Spr0337 je cholin vázající protein C a předpokládá se, že se účastní degradace mastných kyselin a fosfolipidů (Comprehensive Microbial Ressource, <http://cmr.jcvi.org>).

Metodou RT-PCR jsme zjistili, že jsou geny *spr0331-spr0337* přepisovány společně ve formě jedné polycistronní mRNA. Přesto by bylo vhodné využít dalších metodik, jako např. metodu kvantitativní RT-PCR, ke zjištění, zda exprese některých genů v operonu není dále ovlivňována např. vnitřními promotory. Vzhledem k tomu, že gen *spr0332* kóduje homolog proteinu účastnící se buněčného dělení u *B. subtilis* a je fosforylován u *S. agalactiae* a RitR je regulační protein patřící též mezi substráty StkP, podporují tyto poznatky naši domněnku, že by s nimi gen *spr0334* mohl funkčně souviset.

5.3 Vliv fosforylace na funkci proteinu Spr0334

Fosforylace je reverzibilní kovalentní posttranslační modifikace proteinu katalyzovaná enzymy tzv. proteinkinasami. Tato modifikace může měnit konformaci i aktivitu proteinu.

Pomocí hmotnostní spektrometrie byly určeny dva hlavní fosforylované aminokyselinové zbytky proteinu Spr0334: T67 a T78. Fosforylace obou aminokyselinových zbytků byla potvrzena také *in vitro* (SUN *et al.*, 2010; L. NOVÁKOVÁ, nepublikované výsledky).

Pro potvrzení fosforylace aminokyselinových zbytků proteinu Spr0334 *in vivo* jsme na základě předešlých výsledků vytvořili komplementační kmen *S. pneumoniae* nazvaný Sp65, který ve svém chromosomu nese gen pro fosfoablativní formu proteinu Spr0334-T67A+T78A. Ke komplementaci jsme použili systém, jehož principem je exprese studovaného genu pod indukibilním promotorem, který je vložen do postradatelného lokusu *bgaA* na chromosomu *S. pneumoniae* (EBERHARDT *et al.*, 2009). Komplementační konstrukt byl složen z indukibilního zinkového promotoru P_{czcD} a genu *spr0334* se zaměněným T67 a T78 za neutrální aminokyselinu alanin, která nemůže být fosforylována. Protein Spr0334-T67A+T78A byl na svém N-konci fúzován s histidinovou kotvou, která nám umožnila jeho imunodetekci. V lyzátech kmene Sp65 pěstovaného bez a s přidavkem induktoru jsme imunodetekci s anti-His protilátkou ověřili, že dochází k expresi proteinu His-Spr0334-T67A+T78A pouze v přítomnosti induktoru. Imunodetekci s anti-pThr protilátkou jsme potvrdili, že protein His-Spr0334-T67A+T78A není *in vivo* fosforylován, a tedy že T67 a T78 jsou hlavní fosforylované aminokyselinové zbytky proteinu Spr0334.

Dále nás zajímalo, zda a jaký vliv bude mít fosforylace a defosforylace proteinu na jeho funkci. Pro tato pozorování jsme opět použili komplementační kmen Sp65, který v *bgaA* lokusu na chromosomu nese pod inducibilním zinkovým promotorem fosfoablativní formu genu a komplementační kmen Sp60, který v *bgaA* lokusu na chromosomu nese pod inducibilním zinkovým promotorem divokou alelu genu pro protein Spr0334. Jak bylo uvedeno výše, delece genu *spr0334* způsobuje morfologickou změnu buněk, tvorbu minibuněk a má vliv i na segregaci chromosomů. Abychom potvrdili, že je tento fenotyp způsoben právě delecí *spr0334*, a zjistili zda má defosforylace proteinu Spr0334 vliv na jeho funkci, pozorovali jsme morfologii buněk komplementačního kmene Sp60 a Sp65 pěstovaného v médiu bez a s přidavkem induktoru. Oba kmeny Sp60 a Sp65 připravené pěstováním v médiu bez přidavku induktoru, vykazovaly fenotyp typický pro kmen $\Delta spr0334$: tvořily menší kulaté buňky s častým výskytem minibuněk a po obarvení DNA DAPI jsme pozorovali výskyt minibuněk, které neobsahovaly DNA. Oba kmeny pěstované v médiu s přidavkem induktoru tvořily lancetovité diplokoky bez výskytu minibuněk a DNA byla po obarvení DAPI přítomna ve všech buňkách. Z těchto pozorování jsme usoudili, že obě ektopicky exprimované alely genu pro protein His-Spr0334 jsou schopné komplementovat deleci *spr0334*, a to ve stejném rozsahu nezávisle na stavu fosforylace proteinu Spr0334.

Zjistili jsme, že nefosforylovaný protein Spr0334 je funkční, ale zatím nelze určit přesnou funkci fosforylace, protože nevíme, jaký vliv na aktivitu bude mít fosforylovaný stav proteinu Spr0334. K tomuto účelu by bylo vhodné vytvořit kmen *S. pneumoniae*, který by ve svém chromosomu nesl fosfomimetickou mutaci genu pro protein Spr0334, a tento kmen fenotypicky charakterizovat. Ve fosfomimetické formě proteinu Spr0334 by byly T67 a T78 zaměněny za kyselinu glutamovou nebo asparagovou, které díky své chemické struktuře napodobují fosforylovaný stav threoninu.

5.4 Lokalizace Spr0334 v buňce

Dále nás tedy zajímalo, jak je protein Spr0334 lokalizován v buňce a zda jeho fosforylace ovlivní lokalizaci. Pro určení lokalizace proteinu Spr0334 v buňce jsme vytvořili konstrukt složený z inducibilního zinkového promotoru a genu pro protein Spr0334 fúzovaný s GFP na N-konci, které nám umožnilo sledovat jeho lokalizaci v živých buňkách pomocí fluorescenční mikroskopie. Tento konstrukt jsme transformovali do třech kmenů *S. pneumoniae*: divokého typu, $\Delta spr0334$ a $\Delta stkP$. Tímto jsme vytvořili

následující kmeny: i) kmen Sp45, ve kterém jsme pozorovali lokalizaci proteinu GFP-Spr0334 v přirozeném genetickém pozadí, ii) komplementační kmen Sp59, ve kterém jsme pozorovali lokalizaci GFP-Spr0334 a jeho schopnost komplementovat delecí *spr0334* a iii) kmen Sp58, ve kterém je gen pro StkP deletován, což má za následek, že substráty StkP, mezi které patří i protein Spr0334, nejsou fosforylovány. Každý z těchto kmenů jsme pěstovali v tekutém médiu s přidavkem induktoru a lokalizaci pozorovali pomocí fluorescenčního mikroskopu. Protein Spr0334 je ve všech kmenech nezávisle na svém fosforylovaném stavu lokalizován převážně v buněčné přepážce. Toto pozorování naznačuje, že fosforylace proteinu Spr0334 není důležitá pro jeho lokalizaci.

5.5 Vztah mezi Ser/Thr proteinkinasou StkP a jejím substrátem Spr0334

StkP se účastní buněčného dělení a má vliv na určení buněčného tvaru. Signálem pro lokalizaci StkP v dělicí přepážce jsou fragmenty peptidoglykanu. Zda se jedná o fragmenty nově vznikajícího či degradovaného peptidoglykanu, není známo (MAESTRO *et al.*, 2011; BEILHARZ *et al.*, 2012). Buňky kmene $\Delta stkP$ mají atypický prodloužený tvar s četnými FtsA a DivIVA neuzavřenými kruhy (BEILHARZ *et al.*, 2012). Naopak nadprodukce StkP má za následek tvorbu malých kulatých buněk. Stejný fenotyp je pozorován i u kmene $\Delta phpP$. Obě tyto mutace způsobují hyperfosforylaci substrátů StkP (L. NOVÁKOVÁ, nepublikované výsledky). Tvorbu menších kulatějších buněk pozorujeme též u kmene $\Delta spr0334$, což by mohlo naznačovat, že fosforylace proteinu Spr0334 zapříčiňuje jeho inaktivaci. Tuto teorii podporuje naše pozorování nefosforylovaného proteinu Spr0334, který je funkční. Podobný vliv fosforylace byl pozorován u anorganické pyrofosfatasy PpaC patřící též mezi substráty StkP, u které fosforylace inhibuje její aktivitu *in vitro* (ŠTECHOVÁ, 2010).

StkP reguluje syntézu buněčné stěny a buněčné dělení prostřednictvím fosforylace několika známých substrátů, ačkoli molekulární mechanismus působení fosforylace na aktivitu těchto proteinů není ještě podrobně prozkoumán. Mezi tyto substráty patří mimo jiné fosfoglukosaminmutasa (GlmM) účastníci se biosyntézy buněčných komponent (peptidoglykan, lipopolysacharidy, atd.) (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2005), dále dva široce konzervované proteiny buněčného dělení FtsZ (GIEFING *et al.*, 2010) a FtsA (BEILHARZ *et al.*, 2012) a pozdní dělicí protein DivIVA (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010).

Z našich výsledků vyplývá, že Spr0334 je protein lokalizovaný v dělicí přepážce a je s velkou pravděpodobností součástí divizomu. Jeho inaktivace způsobuje asymetrické

dělení buněk a nerovnoměrné rozdělení DNA, což naznačuje jeho úlohu ve výběru dělicího místa a segregaci chromosomů. Spr0334 je tak dalším v řadě substrátů StkP, které hrají roli v buněčném dělení. K objasnění jeho funkce však bude ještě zapotřebí zjistit např. dynamiku jeho lokalizace během buněčného dělení, jeho pozici při sestavování divizomu a určit jeho interakční partnery mezi ostatními proteiny buněčného dělení.

6 Souhrn

Výsledky této diplomové práce můžeme shrnout do následujících bodů.

- Vytvořili jsme kmen *S. pneumoniae* $\Delta spr0334$ a pomocí RT-PCR jsme ověřili, že delece *spr0334* nezpůsobuje polární efekt či jinak neovlivňuje transkripci genů v okolí této delece.
- Charakterizovali jsme fenotyp kmene $\Delta spr0334$ a zjistili jsme, že tento kmen má oproti divokému kmeni prodlouženou lag fázi, je citlivější k teplotnímu stresu a k působení penicilinu G. Morfologicky se mutantní kmen od divokého kmene liší tvorbou menších kulatých buněk a tvorbou minibuněk, které často postrádají DNA.
- Za účelem ověření fosforylačních míst proteinu Spr0334 *in vivo* jsme vytvořili dva komplementační kmeny *S. pneumoniae*. První komplementační kmen (Sp60) kóduje pod indukibilním zinkovým promotorem divokou alelu genu pro protein Spr0334 fúzovanou na N-konci s histidinovou kotvou. Druhý komplementační kmen (Sp65) kóduje pod indukibilním zinkovým promotorem gen pro fosfoablativní formu proteinu Spr0334 fúzovanou na N-konci s histidinovou kotvou, v němž byly aminokyseliny T67 a T78 zaměněny za neutrální aminokyselinu alanin, která nemůže být fosforylována.
- Pomocí imunodetekce proteinových lyzátů komplementačních kmenů Sp60 a Sp65 protilátkou proti pThr jsme prokázali, že aminokyseliny T67 a T78 jsou místy fosforylace proteinu Spr0334 *in vivo*.
- Za účelem určení vlivu fosforylace na funkci proteinu Spr0334 jsme pozorovali morfologii komplementačních kmenů Sp60 a Sp65 bez a v přítomnosti induktoru. Zjistili jsme, že obě ektopicky exprimované alely genu (divoká a mutovaná) pro protein His-Spr0334 jsou schopny komplementovat deleci *spr0334*, a to ve stejném rozsahu nezávisle na stavu fosforylace proteinu Spr0334.
- Vytvořili jsme kmeny *S. pneumoniae*, které v postradatelném *bgaA* lokusu nesou pod indukibilním zinkovým promotorem gen pro protein Spr0334 fúzovaný na N-konci

s GFP, což nám umožnilo pomocí fluorescenční mikroskopie pozorovat lokalizaci proteinu Spr0334 v buňce. Lokalizaci proteinu Spr0334 jsem pozorovali na genetickém pozadí divokého kmene, v kmeni $\Delta spr0334$, a v kmeni s deletovaným genem pro Ser/Thr proteinkinasu StkP, ve kterém nejsou substráty StkP fosforylovány. Z pozorování mikroskopických preparátů jsme zjistili, že ve všech třech kmenech *S. pneumoniae* je protein GFP-Spr0443 lokalizován převážně v buněčné přepážce. Lokalizace proteinu GFP-Spr0334 se významně nemění v závislosti na stavu jeho fosforylace.

7 Seznam použité literatury

Addinall, S.G., and Lutkenhaus, J. (1996): FtsA is localized to the septum in an FtsZ-dependent manner. *J Bacteriol* **178**: 7167-7172.

Agarwal, S., Agarwal, S., Jin, H., Pancholi, P., and Pancholi, V. (2012a): Serine/Threonine Phosphatase (SP-STP), Secreted from *Streptococcus pyogenes*, Is a Pro-apoptotic Protein. *J Biol Chem* **287**: 9147-9167.

Agarwal, S., Agarwal, S., Pancholi, P., and Pancholi, V. (2012b): Strain-specific regulatory role of eukaryote-like serine/threonine phosphatase in pneumococcal adherence. *Infect Immun* **80**: 1361-1372.

Agarwal, S., Agarwal, S., Pancholi, P., and Pancholi, V. (2011): Role of serine/threonine phosphatase (SP-STP) in *Streptococcus pyogenes* physiology and virulence. *J Biol Chem* **286**: 41368-41380.

Appleby, J.L., Parkinson, J.S., and Bourret, R.B. (1996): Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* **86**: 845-848.

Av-Gay, Y., Jamil, S., and Drews, S.J. (1999): Expression and characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinase PknB. *Infect Immun* **67**: 5676-5682.

Bagnoli, F., Moschioni, M., Donati, C., Dimitrovska, V., Ferlenghi, I., Facciotti, C., Muzzi, A., Giusti, F., Ernolo, C., Sinisi, A., Hilleringmann, M., Pansegrau, W., Censini, S., Rappuoli, R., Covacci, A., Masignani, V., Barocchi, M.A. (2008): A second pilus type in *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells. *J Bacteriol* **190**: 5480-5492.

Balakrishnan, I., Crook, P., Morris, R., and Gillespie, S.H. (2000): Early predictors of mortality in pneumococcal bacteraemia. *J Infect* **40**: 256-261.

Banu, L.D., Conrads, G., Rehrauer, H., Hussain, H., Allan, E., and van der Ploeg, Jr. (2010): The *Streptococcus mutans* serine/threonine kinase, PknB, regulates competence development, bacteriocin production, and cell wall metabolism. *Infect Immun* **78**: 2209-2220.

Barocchi, M.A., Ries, J., Zogaj, X., Hemsley, C., Albiger, B., Kanth, A., Dahlberg, S., Fernebro, J., Moschioni, M., Masignani, V., Hultenby, K., Taddei, A.R., Beiter, K., Warthan, F., von Rulet, A., Covacci, A., Holden, D.W., Normark, S., Rappuoli, R., Henrigues-Normark, B. (2006): A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2857-2862.

Barrett, J.F., and Hoch, J.A. (1998): Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1529-1536.

Beilharz, K., Nováková, L., Fadda, D., Branny, P., Massidda, O., and Veening, J.W. (2012): Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

- Benton, K.A., Paton, J.C., and Briles, D.E. (1997):** Differences in virulence for mice among *Streptococcus pneumoniae* strains of capsular types 2, 3, 4, 5, and 6 are not attributable to differences in pneumolysin production. *Infect Immun* **65**: 1237-1244.
- Bergmann, S., and Hammerschmidt, S. (2006):** Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* **152**: 295-303.
- Bergmann, S., Rohde, M., and Hammerschmidt, S. (2004):** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein. *Infect Immun* **72**: 2416-2419.
- Bergmann, S., Rohde, M., Preissner, K.T., and Hammerschmidt, S. (2005):** The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. *Thromb Haemost* **94**: 304-311.
- Berry, A.M., Lock, R.A., Hansman, D., and Paton, J.C. (1989):** Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **57**: 2324-2330.
- Berry, A.M., and Paton, J.C. (2000):** Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect Immun* **68**: 133-140.
- Bethe, G., Nau, R., Wellmer, A., Hakenbeck, R., Reinert, R.R., Heinz, H.P., and Zysk, G. (2001):** The cell wall-associated serine protease PrtA: a highly conserved virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **205**: 99-104.
- Bi, E.F., and Lutkenhaus, J. (1991):** FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**: 161-164.
- Bigot, S., Corre, J., Louarn, J.M., Cornet, F., and Barre, F.X. (2004):** FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Mol Microbiol* **54**: 876-886.
- Blue, C.E., and Mitchell, T.J. (2003):** Contribution of a response regulator to the virulence of *Streptococcus pneumoniae* is strain dependent. *Infect Immun* **71**: 4405-4413.
- Bogaert, D., Hermans, P.W., Adrian, P.V., Rumke, H.C., and de Groot, R. (2004):** Pneumococcal vaccines: an update on current strategies. *Vaccine* **22**: 2209-2220.
- Bork, P., Sander, C., and Valencia, A. (1992):** An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 7290-7294.
- Brown, J.S., Gilliland, S.M., and Holden, D.W. (2001):** A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Mol Microbiol* **40**: 572-585.
- Burnside, K., Lembo, A., de los Reyes, M., Iliuk, A., Binhtran, N.T., Connelly, J.E., Lin, W.J., Schmidt, B.Z., Richardson, A.R., Fang, F.C., Tao, W.A., Rajagopal, L. (2010):** Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase. *PLoS One* **5**: e11071.

- Burnside, K., Lembo, A., Harrell, M.I., Gurney, M., Xue, L., BinhTran, N.T., Connelly, J.E., Jewell, K.A., Schmidt, B.Z., de los Reyes, M., Tao, W.A., Doran, K.S., Rajagopal, L. (2011):** Serine/threonine phosphatase Stp1 mediates post-transcriptional regulation of hemolysin, autolysis, and virulence of group B *Streptococcus*. *J Biol Chem* **286**: 44197-44210.
- Camara, M., Boulnois, G.J., Andrew, P.W., and Mitchell, T.J. (1994):** A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect Immun* **62**: 3688-3695.
- Campbell, J.R., Hillier, S.L., Krohn, M.A., Ferrieri, P., Zaleznik, D.F., and Baker, C.J. (2000):** Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. *Obstet Gynecol* **96**: 498-503.
- Canova, M.J., Kremer, L., and Molle, V. (2008):** pETPhos: a customized expression vector designed for further characterization of Ser/Thr/Tyr protein kinases and their substrates. *Plasmid* **60**: 149-153.
- Carapetis, J.R., Steer, A.C., Mulholland, E.K., and Weber, M. (2005):** The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis* **5**: 685-694.
- Chandler, M.S., and Morrison, D.A. (1988):** Identification of two proteins encoded by com, a competence control locus of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **170**: 3136-3141.
- Claverys, J.P., and Havarstein, L.S. (2002):** Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Biosci* **7**: d1798-d1814.
- Cron, L.E., Bootsma, H.J., Noske, N., Burghout, P., Hammerschmidt, S., and Hermans, P.W. (2009):** Surface-associated lipoprotein PpmA of *Streptococcus pneumoniae* is involved in colonization in a strain-specific manner. *Microbiology* **155**: 2401-2410.
- Cutts, F.T., Zaman, S.M., Enwere, G., Jaffar, S., Levine, O.S., Okoko, J.B., Oluwalana, C., Vaughan, A., Obaro, S.K., Leach, A., McAdam, K.P., Biney, E., Saaka, M., Onwuchekwa, U., Zaklop, F., Pierce, N.F., Greenwood, B.M., Adegbola, R.A., Gambian Pneumococcal Vaccine Trial Group (2005):** Efficacy of nine-valent pneumococcal conjugate vaccine against pneumonia and invasive pneumococcal disease in The Gambia: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **365**: 1139-1146.
- D'Andrea, L.D., and Regan, L. (2003):** TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* **28**: 655-662.
- Dagkessamanskaia, A., Moscoso, M., Henard, V., Guiral, S., Overweg, K., Reuter, M., Martin, B., Wells, J., Claverys, J.P. (2004):** Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of ciaR mutant cells. *Mol Microbiol* **51**: 1071-1086.
- Daniel, R.A., and Errington, J. (2000):** Intrinsic instability of the essential cell division protein FtsL of *Bacillus subtilis* and a role for DivIB protein in FtsL turnover. *Mol Microbiol* **36**: 278-289.

- Daniely, D., Portnoi, M., Shagan, M., Porgador, A., Givon-Lavi, N., Ling, E., Dagan, R., Mizrahi Nebenzahl, Y. (2006):** Pneumococcal 6-phosphogluconate-dehydrogenase, a putative adhesin, induces protective immune response in mice. *Clin Exp Immunol* **144**: 254-263.
- Dave, S., Brooks-Walter, A., Pangburn, M.K., and McDaniel, L.S. (2001):** PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect Immun* **69**: 3435-3437.
- Dawid, S., Roche, A.M., and Weiser, J.N. (2007):** The blp bacteriocins of *Streptococcus pneumoniae* mediate intraspecies competition both in vitro and in vivo. *Infect Immun* **75**: 443-451.
- De Las Rival, R.B., Garcia, J.L., Lopez, R., and Garcia, P. (2002):** Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo-beta-N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J Bacteriol* **184**: 4988-5000.
- De Saizien, S.A., Gardes, C., Flint, N., Wagner, C., Kamber, M., Mitchell, T.J., Keck, W., Amrein, K.E., Lange, R. (2000):** Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *J Bacteriol* **182**: 4696-4703.
- Debarbouille, M., Dramsi, S., Dussurget, O., Nahori, M.A., Vaganay, E., Jouvion, G., Cozzone, A., Msadek, T., Duclos, B. (2009):** Characterization of a serine/threonine kinase involved in virulence of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **191**: 4070-4081.
- Dias, R., Felix, D., Canica, M., and Trombe, M.C. (2009):** The highly conserved serine threonine kinase StkP of *Streptococcus pneumoniae* contributes to penicillin susceptibility independently from genes encoding penicillin-binding proteins. *BMC Microbiol* **9**: 121.
- Dintilhac, A., Alloing, G., Granadel, C., and Claverys, J.P. (1997):** Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol Microbiol* **25**: 727-739.
- Donat, S., Streker, K., Schirmeister, T., Rakette, S., Stehle, T., Liebeke, M., Lalk, M., Ohzen, K. (2009):** Transcriptome and functional analysis of the eukaryotic-type serine/threonine kinase PknB in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **191**: 4056-4069.
- Eberhardt, A., Wu, L.J., Errington, J., Vollmer, W., and Veening, J.W. (2009):** Cellular localization of choline-utilization proteins in *Streptococcus pneumoniae* using novel fluorescent reporter systems. *Mol Microbiol* **74**: 395-408.
- Eberhard, T., Kronvall, G., and Ullberg, M. (1999):** Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. *Microb Pathog* **26**: 175-181.
- Echenique, J., Kadioglu, A., Romao, S., Andrew, P.W., and Trombe, M.C. (2004):** Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **72**: 2434-2437.

- Echenique, J.R., and Trombe, M.C. (2001):** Competence repression under oxygen limitation through the two-component MicAB signal-transducing system in *Streptococcus pneumoniae* and involvement of the PAS domain of MicB. *J Bacteriol* **183**: 4599-4608.
- Egger, L.A., Park, H., and Inouye, M. (1997):** Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay. *Genes Cells* **2**: 167-184.
- Ehlert, K., and Holtje, J.V. (1996):** Role of precursor translocation in coordination of murein and phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 6766-6771.
- Errington, J., Daniel, R.A., and Scheffers, D.J. (2003):** Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 52-65, table.
- Fabret, C., and Hoch, J.A. (1998):** A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. *J Bacteriol* **180**: 6375-6383.
- Fadda, D., Pischedda, C., Caldara, F., Whalen, M.B., Anderluzzi, D., Domenici, E., and Massidda, O. (2003):** Characterization of divIVA and other genes located in the chromosomal region downstream of the dcw cluster in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **185**: 6209-6214.
- Fadda, D., Santona, A., D'Ulisse, V., Ghelardini, P., Ennas, M.G., Whalen, M.B., and Massidda, O. (2007):** *Streptococcus pneumoniae* DivIVA: localization and interactions in a MinCD-free context. *J Bacteriol* **189**: 1288-1298.
- Feng, J., Lupien, A., Gingras, H., Wasserscheid, J., Dewar, K., Legare, D., and Ouellette, M. (2009):** Genome sequencing of linezolid-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals novel mechanisms of resistance. *Genome Res* **19**: 1214-1223.
- Fleurie, A., Cluzel, C., Guiral, S., Freton, C., Galisson, F., Zanella-Cleon, I., Di Guilmi, A.M., Grangeasses, C. (2012):** Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **83**: 746-758.
- Fridkin, S.K., Hageman, J.C., Morrison, M., Sanza, L.T., Como-Sabetti, K., Jernigan, J.A., Harriman, K., Harrison, L.H., Lynfield, R., Farley, M.M.(2005):** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *N Engl J Med* **352**: 1436-1444.
- Garcia, P., Paz, G.M., Garcia, E., Garcia, J.L., and Lopez, R. (1999):** The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol Microbiol* **33**: 128-138.
- Gerard, P., Vernet, T., and Zapun, A. (2002):** Membrane topology of the *Streptococcus pneumoniae* FtsW division protein. *J Bacteriol* **184**: 1925-1931.
- Ghuysen, J.M. (1991):** Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol* **45**: 37-67.

- Gieffing, C., Jelencsics, K.E., Gelbmann, D., Senn, B.M., and 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**: 1697-1707.
- Gieffing, C., Meinke, A.L., Hanner, M., Henics, T., Bui, M.D., Gelbmann, D., Lundberg, U., Senn, B.M., Schunn, M., Habel, A., Henriques-Normark, B., Ortqvist, A., Kalin, M., von Gabain, A., Nagy, E. (2008):** Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *J Exp Med* **205**: 117-131.
- Gieffing-Kroll, C., Jelencsics, K.E., Reipert, S., and Nagy, E. (2011):** Absence of pneumococcal PcsB is associated with overexpression of LysM domain-containing proteins. *Microbiology* **157**: 1897-1909.
- Gillespie, S.H., and Balakrishnan, I. (2000):** Pathogenesis of pneumococcal infection. *J Med Microbiol* **49**: 1057-1067.
- Goffin, C., and Ghuysen, J.M. (1998):** Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1079-1093.
- Gordon, E., Mouz, N., Duee, E., and 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**: 477-485.
- Gosink, K.K., Mann, E.R., Guglielmo, C., Tuomanen, E.I., and Masure, H.R. (2000):** Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **68**: 5690-5695.
- Guenzi, E., Gasc, A.M., Sicard, M.A., and Hakenbeck, R. (1994):** A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **12**: 505-515.
- Guiral, S., Mitchell, T.J., Martin, B., and Claverys, J.P. (2005):** Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8710-8715.
- Haas, W., Kaushal, D., Sublett, J., Obert, C., and Tuomanen, E.I. (2005):** Vancomycin stress response in a sensitive and a tolerant strain of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **187**: 8205-8210.
- Halfmann, A., Schnorpfeil, A., Muller, M., Marx, P., Gunzler, U., Hakenbeck, R., and Bruckner, R. (2011):** Activity of the two-component regulatory system CiaRH in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Mol Microbiol Biotechnol* **20**: 96-104.
- Hammerschmidt, S., Bethe, G., Remane, P.H., and Chhatwal, G.S. (1999):** Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **67**: 1683-1687.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M., and Hunter, T. (1988):** The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**: 42-52.

Hausdorff, W.P., Bryant, J., Paradiso, P.R., and Siber, G.R. (2000): Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* **30**: 100-121.

Havarstein, L.S., Martin, B., Johnsborg, O., Granadel, C., and Claverys, J.P. (2006): New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol Microbiol* **59**: 1297-1307.

Hendriksen, W.T., Bootsma, H.J., van Diepen, A., Estevao, S., Kuipers, O.P., de Groot, R., and Hermans, P.W. (2009): Strain-specific impact of PsaR of *Streptococcus pneumoniae* on global gene expression and virulence. *Microbiology* **155**: 1569-1579.

Hendriksen, W.T., Silva, N., Bootsma, H.J., Blue, C.E., Paterson, G.K., Kerr, A.R., de Jong, A., Kuipers, O.P., Hermans, P.W., Mitchell, T.J. (2007): Regulation of gene expression in *Streptococcus pneumoniae* by response regulator 09 is strain dependent. *J Bacteriol* **189**: 1382-1389.

Henriques, A.O., Glaser, P., Piggot, P.J., and Moran, C.P., Jr. (1998): Control of cell shape and elongation by the rodA gene in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **28**: 235-247.

Hermans, P.W., Adrian, P.V., Albert, C., Estevao, S., Hoogenboezem, T., Luijendijk, I.H., Kamphausen, T., Hammerschmidt, S. (2006): The streptococcal lipoprotein rotamase A (SlrA) is a functional peptidyl-prolyl isomerase involved in pneumococcal colonization. *J Biol Chem* **281**: 968-976.

Holmes, A.R., McNab, R., Millsap, K.W., Rohde, M., Hammerschmidt, S., Mawdsley, J.L., and Jenkinson, H.F. (2001): The pavA gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol* **41**: 1395-1408.

Hussain, H., Branny, P., and Allan, E. (2006): A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase is required for biofilm formation, genetic competence, and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **188**: 1628-1632.

Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.

Irwin, C.R., Schor, S.L., and Ferguson, M.W. (1994): Effects of cytokines on gingival fibroblasts in vitro are modulated by the extracellular matrix. *J Periodontal Res* **29**: 309-317.

Jacobsen, F.E., Kazmierczak, K.M., Lisher, J.P., Winkler, M.E., and Giedroc, D.P. (2011): Interplay between manganese and zinc homeostasis in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Metallomics* **3**: 38-41.

Jedrzejask, M.J., Mello, L.V., De Groot, B.L., and Li, S. (2002): Mechanism of hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. Structures of complexes with the substrate. *J Biol Chem* **277**: 28287-28297.

Jin, H., and Pancholi, V. (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**: 1351-1372.

- Johnsborg, O., Eldholm, V., and Havarstein, L.S. (2007):** Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol* **158**: 767-778.
- Johnsborg, O., and Havarstein, L.S. (2009):** Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 627-642.
- 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**: 7470-7476.
- Jonsson, S., Musher, D.M., Chapman, A., Goree, A., and Lawrence, E.C. (1985):** Phagocytosis and killing of common bacterial pathogens of the lung by human alveolar macrophages. *J Infect Dis* **152**: 4-13.
- Kadioglu, A., Echenique, J., Manco, S., Trombe, M.C., and Andrew, P.W. (2003):** The MicAB two-component signaling system is involved in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **71**: 6676-6679.
- Kristich, C.J., Little, J.L., Hall, C.L., and Hoff, J.S. (2011):** Reciprocal regulation of cephalosporin resistance in *Enterococcus faecalis*. *MBio* **2**: e00199-11.
- Kristich, C.J., Wells, C.L., and Dunny, G.M. (2007):** A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in *Enterococcus faecalis* mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 3508-3513.
- Lahti, R. (1983):** Microbial inorganic pyrophosphatases. *Microbiol Rev* **47**: 169-178.
- Land, A.D., and Winkler, M.E. (2011):** The requirement for pneumococcal MreC and MreD is relieved by inactivation of the gene encoding PBP1a. *J Bacteriol* **193**: 4166-4179.
- Le Gon llec, G.A., Roux, L., Fadda, D., Massidda, O., Vernet, T., and Zapun, A. (2008):** Roles of pneumococcal DivIB in cell division. *J Bacteriol* **190**: 4501-4511.
- Lembo, A., Gurney, M.A., Burnside, K., Banerjee, A., de los Reyes, M., Connelly, J.E., Lin, W.J., Jewell, K.A., Vo, A., Renken C.W., Doran, K.S., Rajagopal, L. (2010):** Regulation of CovR expression in Group B *Streptococcus* impacts blood-brain barrier penetration. *Mol Microbiol* **77**: 431-443.
- Lin, W.J., Walthers, D., Connelly, J.E., Burnside, K., Jewell, K.A., Kenney, L.J., and Rajagopal, L. (2009):** Threonine phosphorylation prevents promoter DNA binding of the Group B *Streptococcus* response regulator CovR. *Mol Microbiol* **71**: 1477-1495.
- Linder, T.E., Daniels, R.L., Lim, D.J., and DeMaria, T.F. (1994):** Effect of intranasal inoculation of *Streptococcus pneumoniae* on the structure of the surface carbohydrates of the chinchilla eustachian tube and middle ear mucosa. *Microb Pathog* **16**: 435-441.
- Loesche, W.J. (1986):** Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* **50**: 353-380.
- Lowe, J., and Amos, L.A. (1998):** Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* **391**: 203-206.

Luo, P., and Morrison, D.A. (2003): Transient association of an alternative sigma factor, ComX, with RNA polymerase during the period of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **185**: 349-358.

Maestro, B., Nováková, L., Heseck, D., Lee, M., Leyva, E., Mobashery, S., Sanz, J.M., Branny, P. (2011): Recognition of peptidoglycan and beta-lactam antibiotics by the extracellular domain of the Ser/Thr protein kinase StkP from *Streptococcus pneumoniae*. *FEBS Lett* **585**: 357-363.

Maggi, S., Massidda, O., Luzi, G., Fadda, D., Paolozzi, L., and Ghelardini, P. (2008): Division protein interaction web: identification of a phylogenetically conserved common interactome between *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Microbiology* **154**: 3042-3052.

Margolin, W. (2000): Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 531-548.

Marston, A.L., and Errington, J. (1999): Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. *Mol Microbiol* **33**: 84-96.

McCluskey, J., Hinds, J., Husain, S., Witney, A., and Mitchell, T.J. (2004): A two-component system that controls the expression of pneumococcal surface antigen A (PsaA) and regulates virulence and resistance to oxidative stress in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **51**: 1661-1675.

McKessar, S.J., and Hakenbeck, R. (2007): The two-component regulatory system TCS08 is involved in cellobiose metabolism of *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Bacteriol* **189**: 1342-1350.

Mellroth, P., Daniels, R., Eberhardt, A., Ronnlund, D., Blom, H., Widengren, J., Normark, S., Henriques-Normark, B. (2012): LytA, the major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to the nascent peptidoglycan. *J Biol Chem*.

Mengin-Lecreulx, D., and van Heijenoort, J. (1996): Characterization of the essential gene glmM encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**: 32-39.

Miller, M., Donat, S., Rakette, S., Stehle, T., Kouwen, T.R., Diks, S.H., Dreisbach, A., Reilmanm, E., Gronau, K., Becher, D., Peppelenbosch, M.P., van Dijk, J.M., Ohozen., K. (2010): *Staphylococcal* PknB as the first prokaryotic representative of the proline-directed kinases. *PLoS One* **5**: e9057.

Minnen, A., Attaiech, L., Thon, M., Gruber, S., and Veening, J.W. (2011): SMC is recruited to oriC by ParB and promotes chromosome segregation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **81**: 676-688.

Mitchell, A.M., and Mitchell, T.J. (2010): *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect* **16**: 411-418.

Mitchell, T.J., Andrew, P.W., Saunders, F.K., Smith, A.N., and Boulnois, G.J. (1991): Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein. *Mol Microbiol* **5**: 1883-1888.

Morgan, P.J., Hyman, S.C., Rowe, A.J., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., and Saibil, H.R. (1995): Subunit organisation and symmetry of pore-forming, oligomeric pneumolysin. *FEBS Lett* **371**: 77-80.

Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2003): Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol Microbiol* **50**: 845-855.

Morona, J.K., Morona, R., Miller, D.C., and Paton, J.C. (2003): Mutational analysis of the carboxy-terminal (YGX)₄ repeat domain of CpsD, an autophosphorylating tyrosine kinase required for capsule biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **185**: 3009-3019.

Morona, J.K., Paton, J.C., Miller, D.C., and Morona, R. (2000): Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **35**: 1431-1442.

Morrison, D.A., Trombe, M.C., Hayden, M.K., Waszak, G.A., and Chen, J.D. (1984): Isolation of transformation-deficient *Streptococcus pneumoniae* mutants defective in control of competence, using insertion-duplication mutagenesis with the erythromycin resistance determinant of pAM beta 1. *J Bacteriol* **159**: 870-876.

Mullaney, D.M. (2001): Group B streptococcal infections in newborns. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* **30**: 649-658.

Nelson, A.L., Roche, A.M., Gould, J.M., Chim, K., Ratner, A.J., and Weiser, J.N. (2007): Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun* **75**: 83-90.

Novak, R., Charpentier, E., Braun, J.S., and Tuomanen, E. (2000): Signal transduction by a death signal peptide: uncovering the mechanism of bacterial killing by penicillin. *Mol Cell* **5**: 49-57.

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

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**: 1243-1254.

Ogunniyi, A.D., Grabowicz, M., Mahdi, L.K., Cook, J., Gordon, D.L., Sadlon, T.A., and Paton, J.C. (2009): Pneumococcal histidine triad proteins are regulated by the Zn²⁺-dependent repressor AdcR and inhibit complement deposition through the recruitment of complement factor H. *FASEB J* **23**: 731-738.

- Ohlsen, K., and Donat, S. (2010):** The impact of serine/threonine phosphorylation in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* **300**: 137-141.
- Olafsdottir, T.A., Lingnau, K., Nagy, E., and Jonsdottir, I. (2012):** Novel protein-based pneumococcal vaccines administered with the Th1-promoting adjuvant IC31 induce protective immunity against pneumococcal disease in neonatal mice. *Infect Immun* **80**: 461-468.
- Orihuela, C.J., Radin, J.N., Sublett, J.E., Gao, G., Kaushal, D., and Tuomanen, E.I. (2004):** Microarray analysis of pneumococcal gene expression during invasive disease. *Infect Immun* **72**: 5582-5596.
- Pallová, P., Hercik, K., Sasková, L., Nováková, L., and Branny, P. (2007a):** A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP of *Streptococcus pneumoniae* acts as a dimer in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **355**: 526-530.
- Pallová, P., (2007b):** Dimerizace Ser/Thr proteinkinasy eukaryotního typu *Streptococcus pneumoniae* a charakterizace jejího substrátu, fosfoglukosaminmutasy GlmM, PřF UK Praha, Dizertační práce
- Pancholi, V., Boel, G., and Jin, H. (2010):** *Streptococcus pyogenes* Ser/Thr kinase-regulated cell wall hydrolase is a cell division plane-recognizing and chain-forming virulence factor. *J Biol Chem* **285**: 30861-30874.
- Parker, D., Soong, G., Planet, P., Brower, J., Ratner, A.J., and Prince, A. (2009):** The NanA neuraminidase of *Streptococcus pneumoniae* is involved in biofilm formation. *Infect Immun* **77**: 3722-3730.
- Paterson, G.K., Blue, C.E., and Mitchell, T.J. (2006):** Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Med Microbiol* **55**: 355-363.
- Paterson, G.K., and Mitchell, T.J. (2006):** The role of *Streptococcus pneumoniae* sortase A in colonisation and pathogenesis. *Microbes Infect* **8**: 145-153.
- Perez, J., Castaneda-Garcia, A., Jenke-Kodama, H., Muller, R., and Munoz-Dorado, J. (2008):** Eukaryotic-like protein kinases in the prokaryotes and the myxobacterial kinome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15950-15955.
- Pestova, E.V., Havarstein, L.S., and Morrison, D.A. (1996):** Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol* **21**: 853-862.
- Pichoff, S., and Lutkenhaus, J. (2005):** Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol Microbiol* **55**: 1722-1734.
- Pike, A.C., Rellos, P., Niesen, F.H., Turnbull, A., Oliver, A.W., Parker, S.A., Turk, B.E., Pearl, L.H., Knapp, S. (2008):** Activation segment dimerization: a mechanism for kinase autophosphorylation of non-consensus sites. *EMBO J* **27**: 704-714.
- Pinas, G.E., Cortes, P.R., Orio, A.G., and Echenique, J. (2008):** Acidic stress induces autolysis by a CSP-independent ComE pathway in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **154**: 1300-1308.

- Poh, C.H., Oh, H.M., and Tan, A.L. (2006):** Epidemiology and clinical outcome of enterococcal bacteraemia in an acute care hospital. *J Infect* **52**: 383-386.
- Pracht, D., Elm, C., Gerber, J., Bergmann, S., Rohde, M., Seiler, M., Kim, K.S., Jenkinson, H.F., Nau, R., Hammerschmidt, S. (2005):** PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. *Infect Immun* **73**: 2680-2689.
- Quon, K.C., Marczynski, G.T., and Shapiro, L. (1996):** Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* **84**: 83-93.
- Rajagopal, L., Clancy, A., and Rubens, C.E. (2003):** A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphate and affect growth, cell segregation, and virulence. *J Biol Chem* **278**: 14429-14441.
- Rajagopal, L., Vo, A., Silvestroni, A., and Rubens, C.E. (2005):** Regulation of purine biosynthesis by a eukaryotic-type kinase in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol* **56**: 1329-1346.
- Rajagopal, L., Vo, A., Silvestroni, A., and Rubens, C.E. (2006):** Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signalling mechanisms in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol* **62**: 941-957.
- Ren, B., Szalai, A.J., Thomas, O., Hollingshead, S.K., and Briles, D.E. (2003):** Both family 1 and family 2 PspA proteins can inhibit complement deposition and confer virulence to a capsular serotype 3 strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **71**: 75-85.
- Sasková, L., Nováková, L., Basler, M., and 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.
- Shah, I.M., Laaberki, M.H., Popham, D.L., and Dworkin, J. (2008):** A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell* **135**: 486-496.
- Sham, L.T., Barendt, S.M., Kopecky, K.E., and Winkler, M.E. (2011):** Essential PcsB putative peptidoglycan hydrolase interacts with the essential FtsXSpn cell division protein in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: E1061-E1069.
- Shi, Y. (2009):** Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* **139**: 468-484.
- Shimazu, K., Takahashi, Y., Karibe, H., Mitsuhashi, F., and Konishi, K. (2012):** Contribution of phosphoglucosamine mutase to determination of bacterial cell morphology in *Streptococcus gordonii*. *Odontology* **100**: 28-33.
- Silvestroni, A., Jewell, K.A., Lin, W.J., Connelly, J.E., Ivancic, M.M., Tao, W.A., and Rajagopal, L. (2009):** Identification of serine/threonine kinase substrates in the human pathogen group B *Streptococcus*. *J Proteome Res* **8**: 2563-2574.

Sliusarenko, O., Heinritz, J., Emonet, T., and Jacobs-Wagner, C. (2011): High-throughput, subpixel precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics. *Mol Microbiol* **80**: 612-627.

Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E.J. (1999): The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* **24**: 181-185.

Sohn, H.S., Suh, D.C., Jang, E., and Kwon, J.W. (2010): Economic evaluation of childhood 7-valent pneumococcal conjugate vaccination in Korea. *J Manag Care Pharm* **16**: 32-45.

Song, X.M., Connor, W., Hokamp, K., Babiuk, L.A., and Potter, A.A. (2009): The growth phase-dependent regulation of the pilus locus genes by two-component system TCS08 in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* **46**: 28-35.

Standish, A.J., Strocher, U.H., and Paton, J.C. (2005): The two-component signal transduction system RR06/HK06 regulates expression of *cbpA* in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 7701-7706.

Sun, X., Ge, F., Xiao, C.L., Yin, X.F., Ge, R., Zhang, L.H., and He, Q.Y. (2010): Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteome Res* **9**: 275-282.

Sung, C.K., and Morrison, D.A. (2005): Two distinct functions of ComW in stabilization and activation of the alternative sigma factor ComX in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **187**: 3052-3061.

Suntharalingam, P., and Cvitkovitch, D.G. (2005): Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. *Trends Microbiol* **13**: 3-6.

Szwedziak, P., Wang, Q., Freund, S.M., and Lowe, J. (2012): FtsA forms actin-like protofilaments. *EMBO J*.

Štechová, M. (2010): Studie fosforylace anorganické pyrofosfatázy *Streptococcus pneumoniae*, PřF UK Praha, Diplomová práce

Tavares, J.R., de Souza, R.F., Meira, G.L., and Gueiros-Filho, F.J. (2008): Cytological characterization of YpsB, a novel component of the *Bacillus subtilis* divisome. *J Bacteriol* **190**: 7096-7107.

Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R.T., Haft, D.H., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Peterson, J.D., Umayam, L.A., White, O., Salzberg, S.L., Lewis, M.R., Radune, D., Holtzapple, E., Mhourá, H., Wolf, A.M., Utterback, T.R., Hansen, C.L., Macdonald, L.A., Feldblyum, T.V., Angiuoli, S., Dickson, T., Hickey, E.K., Holt, I.E., Lotus B.J., Yang, F., Smith, O.H., Center, J.C., Dougherty, B.A., Morrison, D.A., Hollingshead, S.K., Fraser, C.M. (2001): Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**: 498-506.

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**: 566-576.

Trappetti, C., Kadioglu, A., Carter, M., Hayre, J., Iannelli, F., Pozzi, G., Andrew P.W., Oggioni, M.R. (2009): Sialic acid: a preventable signal for pneumococcal biofilm formation, colonization, and invasion of the host. *J Infect Dis* **199**: 1497-1505.

Truong-Bolduc, Q.C., and Hooper, D.C. (2010): Phosphorylation of MgrA and its effect on expression of the NorA and NorB efflux pumps of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **192**: 2525-2534.

Tseng, H.J., McEwan, A.G., Paton, J.C., and Jennings, M.P. (2002): Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: PsaA mutants are hypersensitive to oxidative stress. *Infect Immun* **70**: 1635-1639.

Ulijasz, A.T., Andes, D.R., Glasner, J.D., and Weisblum, B. (2004): Regulation of iron transport in *Streptococcus pneumoniae* by RitR, an orphan response regulator. *J Bacteriol* **186**: 8123-8136.

Ulijasz, A.T., Falk, S.P., and 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**: 382-390.

van den Ent, E.F., and Lowe, J. (2000): Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *EMBO J* **19**: 5300-5307.

van der Poll, P.T., and Opal, S.M. (2009): Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* **374**: 1543-1556.

Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., and Foster, S. (2008): Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 259-286.

Weng, L., Biswas, I., and Morrison, D.A. (2009): A self-deleting Cre-lox-ermAM cassette, Cheshire, for marker-less gene deletion in *Streptococcus pneumoniae*. *J Microbiol Methods* **79**: 353-357.

Wright, G.D., and Thompson, P.R. (1999): Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Front Biosci* **4**: D9-21.

Yeats, C., Finn, R.D., and Bateman, A. (2002): The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends Biochem Sci* **27**: 438.

Young, T.A., Delagoutte, B., Endrizzi, J.A., Falick, A.M., and Alber, T. (2003): Structure of *Mycobacterium tuberculosis* PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases. *Nat Struct Biol* **10**: 168-174.

Zapun, A., Vernet, T., and Pinho, M.G. (2008): The different shapes of cocci. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 345-360.

Zysk, G., Bongaerts, R.J., ten Thoren, E., Bethe, G., Hakenbeck, R., and Heinz, H.P. (2000): Detection of 23 immunogenic pneumococcal proteins using convalescent-phase serum. *Infect Immun* **68**: 3740-3743.