

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

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Simona Kleinová

Identifikace nových substrátů Ser/Thr proteinkinázy StkP
Identification of new substrates of Ser/Thr protein kinase StkP

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Aleš Ulrych, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení:

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

V Praze dne 28.4.2018

.....

Simona Kleinová

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Aleši Ulrychovi, Ph.D. za jeho ochotu, trpělivost, cenné rady a zkušenosti, které mi předával po celou dobu studia.

Dále bych chtěla poděkovat vedoucímu laboratoře RNDr. Pavlu Brannymu, CSc. za možnost pracovat v Laboratoři buněčné signalizace MBÚ AV ČR. Také děkuji všem mým kolegům Olivě, Vendy, Lindě, Šárce, Karolíně a Sylvii, kteří mi kromě rad a zkušeností vytvořili příjemné pracovní prostředí.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině za podporu během celého mého studia.

Identifikace nových substrátů Ser/Thr proteinkinázy StkP

Streptococcus pneumoniae kóduje ve svém genomu jedinou unikátní serin/threoninovou proteinkinázu StkP a k ní příslušnou proteinfosfatázu PhpP. Tento signalizační pár fosforyluje/defosforyluje mnoho cílových proteinů zúčastněných v celé řadě buněčných procesů. Dosud však bylo charakterizováno pouze několik z nich.

Analýzou globálního fosfoproteomu mutantního kmene na pozadí $\Delta stkP$ kmene byl identifikován fosfoprotein Spr0175 a určen fosforylovaný zbytek Thr7. Cílem této diplomové práce byla charakterizace tohoto nového substrátu.

Byly připraveny $\Delta spr0175$ mutantní kmeny na genetickém pozadí Rx a R6 divokých kmenů, u kterých byl monitorován růst a buněčná morfolgie. Testované mutantní kmeny měly morfologické defekty znamenající pravděpodobnou účast Spr0175 v procesu buněčného dělení. V divokém kmeni D39 byla delece genu *spr0175* neúspěšná, což znamená možnou esencialitu Spr0175 u kmene D39.

Získané výsledky dále potvrzují, že je protein Spr0175 v *in vitro* i *in vivo* podmínkách modifikován na threoninu v pozici 7. V *in vitro* podmínkách byla také prokázána minoritní fosforylace na zbytku T4. V *in vivo* experimentu bylo pomocí koimunoprecipitace zároveň prokázáno, že protein Spr0175 vytváří oligomerní struktury.

Dalším cílem diplomové práce byla buněčná lokalizace Spr0175. Fluorescenční mikroskopii bylo zjištěno, že fúzní protein GFP-Spr0175 má cytoplazmatickou difúzní lokalizaci.

Klíčová slova: *Streptococcus pneumoniae*, proteinkináza StkP, fosforylace, protein Spr0175, buněčné dělení

Identification of new substrates of Ser/Thr protein kinase StkP

Streptococcus pneumoniae encodes single serine/threonine protein kinase StkP and its cognate protein phosphatase PhpP. This signalling couple phosphorylates/dephosphorylates many target proteins involved in various cellular processes. So far, only few of them was characterized in detail.

Global phosphoproteomic analysis in the Δ *stkP* mutant strain background resulted in the identification of protein Spr0175 as phosphorylated on threonine 7. The main aim of this work was to characterize this new substrate.

The Δ *spr0175* mutant strains were prepared in the wild type genetic background Rx and R6 and then monitored for their growth and cell morphology. Mutant strains exhibited morphological defects revealing potential involvement of Spr0175 in the process of cell division. In the wild type D39 the deletion was unsuccessful, which may entail possible essentiality of Spr0175 in D39 strain.

The results obtained also confirmed that the Spr0175 is modified in *in vitro* and *in vivo* conditions at threonine 7. *In vitro* study also confirmed minor phosphorylation at T4 residue. By using co-immunoprecipitation assay we demonstrated that Spr0175 protein can form oligomeric structures.

Another aim of this work was cellular localization of Spr0175. By using fluorescent microscopy we showed that GFP-Spr0175 fusion protein localized in the cytoplasm.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, protein kinase StkP, phosphorylation, protein Spr0175, cell division

Obsah

1	Úvod	8
2	Přehled literatury	9
2.1	Streptococcus pneumoniae	9
2.1.1	Patogeneze, faktory virulence	10
2.1.2	Genetická transformace <i>S. pneumoniae</i>	12
2.1.3	Kompetence navozená mechanismem Quorum sensing	12
2.1.4	Vakcinace	14
2.1.5	Buněčné dělení	15
2.2	Proteinkináza StkP	27
2.2.1	Substráty StkP	29
3	Cíle diplomové práce	34
4	Materiál a metodika	35
4.1	Materiály	35
4.1.1	Bakteriální kmeny	35
4.1.2	Použité vektory a deleční kazety	36
4.1.3	Oligonukleotidy	37
4.1.4	Chemikálie	39
4.1.5	Kultivační půdy a média	42
4.1.6	Použité roztoky a puřry	43
4.1.7	Enzymy	45
4.1.8	Použité laboratorní přístroje	46
4.1.9	Použité laboratorní programy a softwary	47
4.1.10	Použité standardy a komerční soupravy	47
4.1.11	Použité protilátky	48
4.2	Metody	48
4.2.1	Manipulace s DNA	48
4.2.2	Manipulace s proteiny	51
4.2.3	Manipulace s <i>S. pneumoniae</i> a <i>E. coli</i>	56
5	Výsledky	60
5.1	Příprava mutantních kmenů Δ spr0175	61
5.2	Příprava kmenů exprimujících rekombinantní protein Spr0175 a jeho mutantní formy	64
5.3	Příprava merodiploidních kmenů a jejich mutantních forem	72
5.4	Příprava kmenů určených pro stanovení lokalizace proteinu Spr0175 v buňce	76
5.5	Morfologická charakterizace mutantních kmenů s odstraněným genem spr0175	78
5.6	Růstová charakterizace mutantních kmenů s odstraněným genem spr0175	82
5.7	Průkaz fosforylace proteinu Spr0175 a jeho mutantních forem <i>in vitro</i> proteinkinázou StkP	88
5.7.1	Expresce His-Spr0175 v pETPhos plasmidu	88
5.7.2	Expresce Spr0175-His a jeho mutantních forem v expresním plasmidu pET42b	90

5.8	Průkaz fosforylace proteinu Spr0175 a jeho mutantních forem <i>in vivo</i>	94
5.9	Identifikace neznámého substrátu proteinkinázy StkP a interakčního partnera proteinu Spr0175.....	95
5.10	Lokalizace proteinu Spr0175 a sledování jeho exprese.....	97
6	Diskuze.....	99
7	Souhrn:.....	110
8	Citace.....	111

Seznam použitých zkratek

Anti	Protilátka
ATB	Antibiotikum
C ₅₅ -P	Undekaprenyl fosfát, lipidový přenašeč
CSP	Kompetenci stimulující peptid
CWH	Hydrolázy buněčných stěn
eDNA	Extracelulární DNA
FLAG	FLAG-epitop
g	Tíhové zrychlení
GFP	Zelený fluorescenční protein
HK	Histidinová kináza
chDNA	Chromozomální DNA
IPTG	Syntetický analog laktózy inaktivující <i>lac</i> represor
KD	Kinázová doména
kDa	Kilodalton
OD ₆₀₀	Optická denzita při vlnové délce 600 nm
pb	Páry bází
PBP	Penicilin vazebný protein
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PG	Peptidoglykan
pZn	Zinkem indukovatelný promotor
QS	Quorum sensing
RR	Regulátor odpovědi
SJK	Sweet Janus kazeta
STK	Serin/threoninová proteinkináza
STP	Serin/threoninová proteinfosfatáza
T4A	Záměna threoninu ve 4 pozici za alanin
T7A	Záměna threoninu v 7 pozici za alanin
TCS	Dvousložkový systém
WT	Divoký kmen

1 Úvod

Bakteriální buňky žijí v nestálém a rychle se měnícím prostředí. Aby dokázaly přežít, musí neustále monitorovat intracelulární a extracelulární prostředí a přizpůsobit tomu buněčnou strukturu, fyziologii a chování. Vzhledem k velkému selekčnímu tlaku není překvapivé, že si bakterie vyvinuly sofistikované signalizační systémy, které jim zajišťují patřičnou odpověď na tyto změny.

Buněčná signalizace je součástí každého komunikačního procesu, řídí základní činnosti buněk a koordinuje všechny buněčné akce. Základním mechanismem je přenos signálu prostřednictvím fosforylace a defosforylace proteinů. Fosforylaci proteinů zajišťují enzymy kinázy, které katalyzují přenos fosfátové skupiny na fosforylovatelné aminokyselinové zbytky. Jejich defosforylace je pak zajištěna enzymy fosfatázami. Dříve se předpokládalo, že signalizace v bakteriích je zprostředkována především prostřednictvím dvousložkového systému (TCS) mezi histidinovou kinázou a jí příslušným odpovídajícím regulátorem. Nedávno bylo zjištěno, že genomy některých bakterií kódují signalizační pár serin/threoninovou proteinkinázu a k ní příslušnou proteinfosfatázu, nezávislou na signalizační síti TC systému.

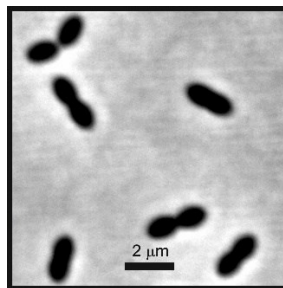
S. pneumoniae a ostatní streptokoci kódují pouze jedinou kopii této serin/threoninové proteinkinázy s názvem StkP a k ní příslušné proteinfosfatázy PhpP, čímž se tento signalizační pár stává praktickým modelem pro studium regulačních funkcí těchto proteinů. Tato proteinkináza se účastní především regulace buněčného dělení a syntézy peptidoglykanu prostřednictvím fosforylace svých substrátů. K dnešnímu dni bylo ovšem identifikováno pouze několik substrátů proteinkinázy StkP. Abychom lépe porozuměli funkci tohoto regulačního proteinu, byl v naší laboratoři ve spolupráci s laboratoří Ústavu molekulární patologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové analyzován globální fosfoproteom v závislosti na StkP. Byla detekována celá řada potenciálních substrátů proteinkinázy StkP, nejvyšší signál fosforylace byl však zaznamenán u proteinu Spr0175 na threoninu v pozici 7.

Protein Spr0175 je hypotetický protein o velikosti 10.3 kDa konzervovaný ve streptokokcích, který neobsahuje žádnou transmembránovou doménu. Předkládaná diplomová práce se zabývá bližší charakterizací tohoto neznámého substrátu. Naším cílem bylo potvrdit fosforylaci proteinu Spr0175 proteinkinázou StkP v podmínkách *in vivo* a *in vitro* a následně tento protein blíže charakterizovat studiem mutantních kmenů *S. pneumoniae*.

2 Přehled literatury

2.1 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae je grampozitivní bakterie patřící do kmene *Firmicutes* produkující ochranné polysacharidové pouzdro jako faktor virulence. Morfologicky lze tuto bakterii zařadit mezi lancetovitě zašpičatělé kokovité bakterie vyskytující se ve dvojicích nebo v řetězcích nebo i jako samostatné bakterie. Z hlediska fyziologie je pneumokok řazen mezi aerotolerantní anaerobní organismy, nepohyblivé a spory netvořící bakterie. Na miskách s krevním agarem se projevuje tvorbou alfa-hemolýzy, nazelenalé zóny v okolí bakterie způsobené přeměnou hemoglobinu na verdoglobín. Na obrázku č.1 je znázorněn divoký kmen (WT) *S. pneumoniae*.



Obrázek č.1: Mikroskopický snímek *Streptococcus pneumoniae*. Mikroskopický snímek divokého kmene *S. pneumoniae* pořízený světelnou mikroskopií s použitím fázového kontrastu. (Vlastní zpracování)

S. pneumoniae byl poprvé izolován ze slin, izolovali jej Pasteur a Sternberg (1881) (Alouf & Horaud, 1997). Následně se ukázalo, že se jedná o hlavního původce invazivní pneumokokové pneumonie. V roce 1918 při pandemii chřipky, byla přiřazena většina úmrtí právě této bakterii (Morens *et al.*, 2008). *S. pneumoniae* představuje i dnes celosvětový zdravotnický problém (Sohail *et al.*, 2018). Úmrtnost na pneumokokovou infekci je stále velmi vysoká, hlavně u vnímavých jedinců dosahuje i přes validní léčbu až 40 % (Geno *et al.*, 2015). Dle světové zdravotnické organizace (WHO) na pneumonii způsobenou *S. pneumoniae* každoročně umírá okolo půl miliónu dětí mladších 5 let (www.cdc.gov/pneumococcal/global.html). Mezi další významné původce pneumónií můžeme zařadit bakterii *Haemophilus influenzae* typu b, syncytiální virus a virus chřipky, avšak *S. pneumoniae* v incidenci onemocnění dominuje (převzato z: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME) GBD Compare Data Visualization. Seattle, WA: IHME, University of Washington; (2017), <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>). *S. pneumoniae* nehraje roli pouze v patogenezi invazivní pneumokokové pneumonie, ale jako extracelulární patogen se uplatňuje i u jiných onemocnění, mezi něž řadíme meningitidy, bakterémie, akutní záněty

středního ucha a sinusitidy (převzato z: Centers for Disease Control and Prevention. Pneumococcal Disease. (2015). <https://www.cdc.gov/pneumococcal/index.html>)

2.1.1 Patogeneze, faktory virulence

K přenosu bakterií dochází nejčastěji skrze sekrety dýchacích cest mezi bacilonosičem a zdravou osobou. Přenos je také možný kontaminovanými předměty v nemocničním prostředí, na kterých se tvoří biofilm chránící bakterie před vyschnutím a umožňující jejich přežití ve vnějším prostředí (Marks *et al.*, 2014). Trpí-li pacient jiným než pneumokokovým onemocněním poškozujícím epitel respiračních cest, je riziko infekce zvýšené. K takovým to ko-infekcím dochází například při infekci virem chřipky, jež umožní lepší uchycení *S. pneumoniae* k povrchu a rozvoj pneumokokového onemocnění (Vu *et al.*, 2011, Bakaletz, 2017).

Průběh onemocnění je závislý na faktorech virulence zahrnující invazi, adhezenci a obranu před imunitním systémem (Kadioglu *et al.*, 2008). *S. pneumoniae* nejčastěji napadá oblast nosohltanu. Nosohltan je u zdravých osob osídlen přirozenou mikroflórou, která je schopna případného patogena odstranit. Dojde-li ke kolonizaci nosohltanu, která se projevuje asymptomaticky, označujeme jej jako nosičství (Bogaert *et al.*, 2004). Nosiči bývají častěji děti (20-50 %) než dospělí (5-20 %) (Chao *et al.*, 2014). Kolonizace je zároveň nezbytným předpokladem pro vznik onemocnění. Dalším rizikovým faktorem rozvoje onemocnění je neregulovaná nebo přehnaná imunitní reakce organismu, vedoucí k poškození přirozených bariér, umožňujících lepší průnik pneumokoka do sterilních tkání (Sohail *et al.*, 2018). Samotný průnik do tkání je tedy klíčový pro rozvoj onemocnění. Mezi rizikové skupiny patří zejména děti do dvou let, osoby starší a osoby imunokompromitované se zhoršenými obrannými mechanismy (Brooks & Mias, 2018).

Faktory virulence *S. pneumoniae* hrají významnou roli v jeho patogenezi umožňující bakterii uniknout před obrannými mechanismy hostitelského organismu a uchytit se na hostitelské tkáni a povrchových receptorech. Tato schopnost se u jednotlivých kmenů *S. pneumoniae* může lišit, což je dáno genetickou variabilitou (Brooks & Mias, 2018). Mezi významné faktory virulence exprimované u *S. pneumoniae* můžeme zařadit polysacharidové pouzdro, povrchové proteiny, enzymy a toxin pneumolyzin (Mitchell & Mitchell, 2010). Nejdůležitější z těchto faktorů je polysacharidové pouzdro, vyznačující se svou antifagocytární aktivitou (Keller *et al.*, 2016). Po navázání Fc fragmentu imunoglobulinu a iC3b složek komplementu na buněčnou stěnu bakterie, zabraňuje jejich interakci s buňkami fagocytárního

systemu (Mitchell & Mitchell, 2010) a tím brání účinné opsonizaci a fagocytóze. Polysacharidové pouzdro zároveň napomáhá kolonizaci, která je nezbytná pro progresi pneumokokového onemocnění. Neopouzdržené kmeny *S. pneumoniae* mají značně sníženou schopnost způsobit invazivní pneumokokové onemocnění, ale hrají významnou roli v patogenezi konjunktivitid a zánětů středního ucha. Naopak vyšší produkce pouzdra je pozorována u systémových onemocnění (Keller *et al.*, 2016). Za další významný a nejčastěji studovaný faktor virulence je považován toxin pneumolyzin. Pneumolyzin je produkován více než 20 druhy grampozitivních bakterií, tento pórtvorný toxin se váže na cholesterol v membráně, kde způsobuje tvorbu velkých pórů oligomerizací asi 50 toxinových monomerů s následnou lýzí buňky. Vedle jeho lytické aktivity je také schopen aktivovat komplement. K uvolnění pneumolyzinu dochází při autolýze buňky, může však být uvolňován i nezávisle na autolýze. Mezi další faktory virulence *S. pneumoniae* patří proteiny ukotvené k povrchu membrány, jako jsou enzymy hyaluronidáza a neuraminidáza (Mitchell & Mitchell, 2010). Hyaluronidáza štěpí hyaluronovou kyselinu, složku pojivové tkáně, a tím narušuje její kompaktnost. Takto narušená tkáň umožňuje bakteriím lepší prostup do hlubších vrstev a dalších tkání (Mitchell, 2000). Prostupu hlouběji do tkání napomáhá také neuraminidáza, enzym ukotvený k povrchu membrány. Tento enzym odštěpuje N-acetylneuraminovou kyselinu z glykolipidů, lipoproteinů a oligosacharidů a tím poškozuje hostitelskou buňku. Uvolnění N-acetylneuraminové kyseliny do prostředí může sloužit jako kontrolní signál pneumokokové infekce (Mitchell & Mitchell, 2010). Lytická amidáza LytA patří do skupiny autolyzinů uplatňujících se v patogenezi. Tento intracelulární enzym navozuje lyzi buňky skrze degradaci buněčné stěny, což způsobí uvolnění degradačních produktů buňky do prostředí a indukci zánětlivé reakce (Mellroth *et al.*, 2012). K aktivaci LytA dochází při zastavení biosyntetických pochodů buňky, příkladem může být léčba penicilinem nebo hladovění. K indukci LytA dochází také u nekompetentních buněk ve fratricidním procesu (Mitchell, 2000, Mellroth *et al.*, 2012). Některé kmeny pneumokoka mají na svém povrchu pili, buněčné struktury zprostředkávající adhezi k buňkám a aktivaci zánětlivé odpovědi produkcí cytokinů. Spektrum faktorů virulence u *S. pneumoniae* je široké, dále lze mezi ně zařadit například některé lipoproteiny, cholin vazebné proteiny a další proteiny přispívající adhezi a virulenci (Mitchell & Mitchell, 2010). Kromě faktorů virulence je významná i produkce biofilmu, jak již bylo uvedeno výše, který sehrává důležitou roli v kolonizaci a perzistenci bakterií v nosohltanu. Bakterie obklopené biofilmem jsou lépe chráněny před účinkem antibiotik a před hostitelskou imunitní odpovědí (Keller *et al.*, 2016).

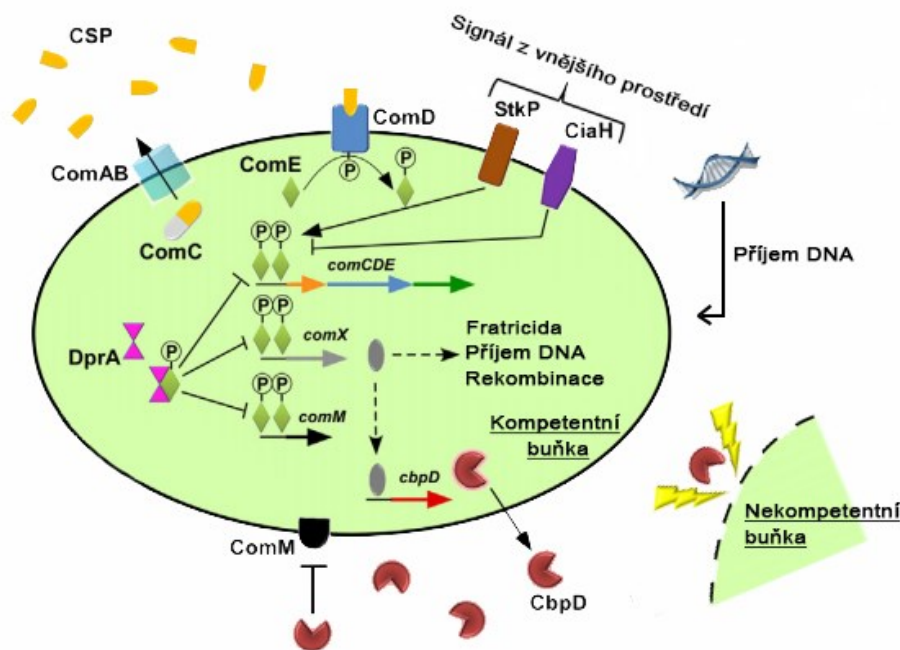
2.1.2 Genetická transformace *S. pneumoniae*

S. pneumoniae je přirozeně kompetentní bakterie schopna přijímat genetickou informaci skrze transformaci v podobě extracelulární DNA (eDNA) a homologní rekombinací ji inkorporovat do genomu (Shanker & Federle, 2017). Takto přijatá eDNA může bakterii *S. pneumoniae* přinést jisté selekční výhody, umožňující lepší přežití v rozdílném hostitelském organismu nebo zlepšit schopnost virulence a rozvoj pneumokokového onemocnění (Brooks & Mias, 2018). Jako příklad lze uvést geny pro rezistenci k antibiotikům (ATB), geny pro produkci nových toxinů nebo geny pro opravu poškozené DNA (Shanker & Federle, 2017). Transformační princip byl poprvé popsán Frederickem Griffithem v roce 1928. V jeho experimentu byly subkutánně myším aplikovány virulentní a nevirulentní kmeny *S. pneumoniae*. Zatímco myši očkované virulentním kmenem *S. pneumoniae* zemřely, nevirulentní kmen myši neusmrtil. Pokud se ale použila směs tepelně usmrcených virulentních kmenů *S. pneumoniae*, která byla aplikovaná ve směsi s živými buňkami nevirulentního kmene, myši zemřely na generalizovanou pneumokokovou infekci. Z usmrceného virulentního kmene došlo k přenosu jisté substance procesem transformace do kmene nevirulentního. Tím byl objeven transformační princip. Na jeho práci navázali Avery, MacLeod a McCarty, kteří se zabývali identifikací této substance. Bylo provedeno několik analytických metod, jejichž závěrem byla jako neznámá substance identifikována právě DNA. Tento fakt stvrzoval i experiment, při němž v přítomnosti enzymů proteináz a ribonukleáz transformace probíhala, naproti tomu v přítomnosti deoxyribonukleázy k transformaci nedocházelo (Downie, 1972).

2.1.3 Kompetence navozená mechanismem Quorum sensing

K navození stavu přirozené kompetence dochází mechanismem zvaným Quorum sensing (QS). QS je v bakteriální říši rozšířený komunikační mechanismus, který v závislosti na hustotě bakteriální populace reguluje genovou expresi a buněčnou diferenciaci. U bakterií může regulovat fyziologické procesy jako například tvorbu biofilmu, sporulaci, indukci faktorů virulence nebo biosyntézu antibiotik (Li *et al.*, 2002). Hlavní signalizační molekulou QS pro kompetenci u *S. pneumoniae* je CSP (competent stimulating peptid). CSP je syntetizován v podobě prekurzorového peptidu ComC, který je následně exportován z buňky skrze ABC transportérový systém ComAB, jež zároveň funguje jako proteáza aktivující CSP sestřihem (Havarstein *et al.*, 1996). Na hladinu extracelulárního CSP odpovídá dvousložkový systém složený z histidinové kinázy ComD a příslušného regulátoru ComE. Navázání CSP na histidinovou kinázu ComD způsobí její autofosfosforylaci s následnou fosforylací regulátoru ComE. Aktivovaný ComE se váže do konzervované promotorové oblasti zvané Ceb (ComE-

binding site) a tím indukuje expresi časných genů kompetence, zahrnujících geny *comAB*, *comCDE*, *comX*, a gen *comM*. Expresí pozdních genů kompetence je regulována alternativním sigma faktorem ComX (σ^X), který v komplexu s RNA polymerázou nasedá na promotorovou oblast genů pro příjem DNA, genů lytické fáze a genů pro homologní rekombinaci (Shanker & Federle, 2017). Buňky *S. pneumoniae*, které nejsou kompetentní, jsou následně zabíjeny ve fratricidním procesu. Tohoto procesu se účastní mureinová hydroláza CbpD kódována pozdními geny kompetence. Tato hydroláza způsobuje lýzi nekompetentních buněk, zatímco kompetentní buňky jsou vůči lytické aktivitě CbpD chráněny pomocí membránového proteinu ComM. Protein ComM je kódován časnými geny kompetence, imunita je tedy navozena dřív, než dojde k expresi proteinu CbpD. V kompetenci sehraává roli také dvousložkový systém CiaRH, jehož aktivace potlačuje rozvoj kompetentního stavu (Straume *et al.*, 2015). Důležitou roli má i Ser/Thr proteinkináza StkP mající v kompetenci pozitivní regulační úlohou skrze aktivaci centrálního kompetenčního operonu *comCDE*. Zároveň proteinkináza StkP zabraňuje autolýze zprostředkované LytA, k jejíž aktivaci dochází během růstu v prostředí s alkalickým pH v přítomnosti nízkých koncentrací ATB působících na stěnu bakteriální buňky. Exponenciální růst v alkalickém pH zároveň vede k navození stavu kompetence (Echenique *et al.*, 2004). Ukončení kompetentního stavu zajišťuje protein DprA inhibující ComE řízenou transkripci časných genů (Straume *et al.*, 2015). Mechanismus regulace kompetence je znázorněn na obrázku č.2.



Obrázek č.2: Mechanismus regulace kompetence u *Streptococcus pneumoniae*. Obrázek znázorňuje dráhu navození kompetentního stavu pomocí signalizační molekuly CSP a její regulaci dvousložkovým systémem CiaRH a Ser/Thr proteinkinázou StkP. Převzato a upraveno (Straume *et al.*, 2015).

2.1.4 Vakcinace

S. pneumoniae se na základě varací jeho pouzdrného polysacharidu vyskytuje ve více než 97 sérotypech (Brooks & Mias, 2018). Protilátky tvořené proti polysacharidovým antigenům jsou specifické pro daný sérotyp. Již od počátku 20. století byla snaha jednotlivé sérotypy identifikovat, v návaznosti na to byla vytvořena celobuněčná vakcína, která snížila množství pneumonií o 25 až 50 %. Později byla tato vakcína nahrazena sérově specifickou polysacharidovou vakcínou. Ta se skládala nejprve z 6 nejběžnějších polysacharidů, později byla uvedena jako 14 valentní vakcína a v roce 1983 jako vakcína 23 valentní. Nízká imunogenicita u dětí mladších dvou let podnítila další výzkum, který vedl k vytvoření pneumokokové konjugované vakcíny, kde jsou polysacharidy navázány na proteinový nosič. Tato vakcína byla vyvinuta až do podoby obsahující 13 nejběžnějších polysacharidových antigenů s účinností i u dětí mladších 2 let (Geno *et al.*, 2015) a její použití významně redukovalo množství invazivních pneumokokových onemocnění (Keller *et al.*, 2016). Současné očkování chrání pouze před několika nejběžnějšími sérotypy, nedokáže ale zabránit kolonizaci a rozvoji onemocnění u ostatních sérotypů *S. pneumoniae*, jejichž incidence po zavedení

očkování vzrostla (Sohail *et al.*, 2018). Zároveň je toto očkování neúčinné vůči neopouzdrěným kmenům pneumokoka (Keller *et al.*, 2016).

2.1.5 Buněčné dělení.

Bakteriální buněčný cyklus je vysoce regulovaný proces sestávající z chromozomální replikace, segregace chromozomů a buněčného dělení. Ve většině bakterií se jednotlivé fáze buněčného cyklu odehrávají současně, avšak v posledním desetiletí bylo poukázáno na jejich časově a prostorově lokalizační vzorec (van Raaphorst *et al.*, 2017). Modelovými organismy pro studium těchto dějů se staly gramnegativní bakterie *Escherichia coli* a grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis*. Studium těchto tyčinkovitých bakterií vedlo k identifikaci většiny proteinů uplatňujících se při buněčném dělení a elongaci. Bohužel toto schéma není konzervované napříč všemi bakteriálními druhy, a tak je studium dalších proteinů a mechanismů, uplatňujících se při dělení, v neustálém zájmu mikrobiologů (Fleurie *et al.*, 2014).

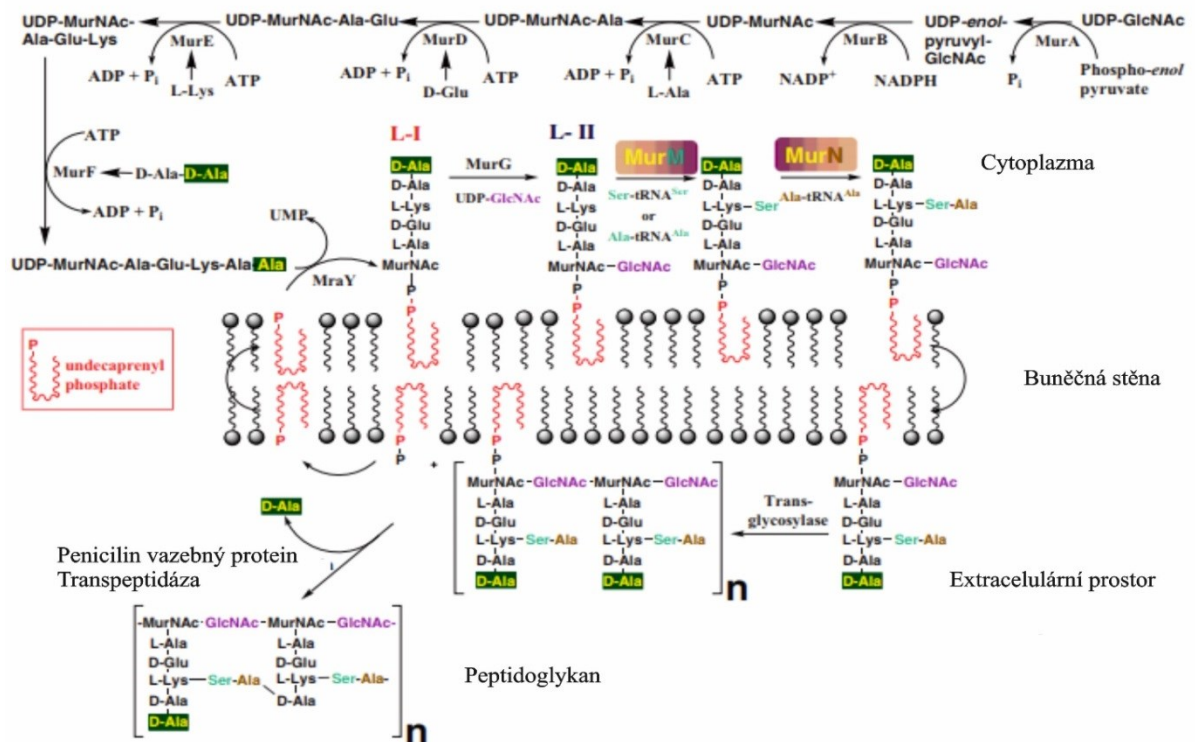
Dříve, než dojde k rozdělení buňky na dvě buňky dceřiné, musí být replikované chromosomy odděleny v procesu segregace. U modelového organismu *B. subtilis* se tohoto děje účastní systém ParABS. Geny *parA*, *parB* i místo *parS* se na chromozomu nachází v operonech v blízkosti OriC místa. *S. pneumoniae* kóduje pouze ParB protein, homologní protein ParA postrádá. ParB po navázání do specifického místa *parS* v blízkosti OriC váže kondenzační protein SMC. Kromě SMC váže ParB protein také protein buněčného dělení DivIVA, předpokládá se tak jeho role v koordinaci segregace chromozomů a buněčného dělení. Delece genu *parB* a *SMC* vede pouze k mírným defektům v segregaci chromozomů, kde část populace tvoří anukleoidní buňky (Minnen *et al.*, 2011). Vazba ParB do *parS* místa zároveň ovlivňuje expresi genů kompetence *comCDE*, které se nachází v jeho blízkosti (Attaiech *et al.*, 2015). Stěžejní roli v segregaci chromozomů u *S. pneumoniae* však sehrává protein Spr0895 pojmenovaný RocS (Regulator of chromosome segregation). RocS je membránový protein vázající ParB a chromozomální úsek DNA. Zatímco delece RocS spolu s ParB nebo SMC je synteticky letální, samotná delece RocS vede ke vzniku buněk s defektními či zcela chybějícími nukleoidy. RocS interaguje také s tyrozinovou autokinázou CpsD hrající roli v syntéze polysacharidového pouzdra. Buňky s defektní autofosforylací CpsD jsou prodloužené a mají aberantní nukleoidy, účast CpsD se tak předpokládá i v procesu chromozomální segregace (Mercy *et al.*, nepublikované výsledky). Protein FtsK (SpoIIIE homologní protein) je další komponentou účastnící se chromozomální segregace, ale jeho konkrétní funkce není doposud zcela známa. (Land *et al.*, 2013). Chromozomální segregace může být také řízena u *S. pneumoniae* procesem replikace nebo transkripce (Attaiech *et al.*, 2015).

Proces buněčného dělení začíná polymerací FtsZ proteinů za vzniku kontraktálního Z-kruhu ve středu buňky (Bi & Lutkenhaus, 1991). Nejrozšířenějším proteinem buněčného dělení konzervovaným téměř u všech bakteriálních druhů je protein FtsZ (Busiek & Margolin, 2015). FtsZ protein je po vazbě GTP polymerován do protofilament, které se váží na membránu a vytváří v místě budoucí přepážky kruhovitý útvar zvaný Z-kruh. Vytvořený Z-kruh tvoří následně kostru pro ostatní proteiny buněčného dělení (de Boer *et al.*, 1992, Erickson *et al.*, 2010). Dalším, mezi bakteriemi rozšířeným proteinem je protein FtsA. Tento protein ukotvuje FtsZ k buněčné membráně a shromažďuje ostatní proteiny potřebné k vytvoření buněčné přepážky (Pichoff & Lutkenhaus, 2005, Pichoff *et al.*, 2012). Pozice Z kruhu je v modelových organismech *E. coli* a *B. subtilis* určena systémem Min (Marston & Errington, 1999) a systémem chromozomální okluze (NO) (Minnen *et al.*, 2011). Tyto systémy mají negativní regulační úlohu zabráňující tvorbě Z prstence v jiných než středových částech buňky (Bramkamp & van Baarle, 2009). *S. pneumoniae* je oválná symetricky se dělicí bakterie postrádající oba tyto systémy Min a NO. K určení místa tvorby Z-kruhu u *S. pneumoniae* je důležitá správná segregace chromosomálního *oriC* místa. Již nově replikovaný počátek *oriC* označuje místo tvorby Z-kruhu u dceřiných buněk, zatímco terminální konec chromosomu zůstává ještě ve středu buňky. Dalším proteinem uplatňujícím se v počátcích tvorby Z-kruhu je MapZ (Fleurie *et al.*, 2014) neboli LocZ protein (Holečková *et al.*, 2014). LocZ/MapZ protein interaguje s FtsZ skrze protein-proteinovou interakci a tím určuje správný úhel dělicí roviny (van Raaphorst *et al.*, 2017). Lokalizace LocZ/MapZ proteinu je závislá na buněčném cyklu. LocZ/MapZ kruh je nejprve umístěn ve středu buňky, kde ko-lokalizuje se Z-prstencem. Elongací buňky dochází k rozdělení LocZ/MapZ kruhu na dva od sebe se vzdalující kruhy (Fleurie *et al.*, 2014, Holečková *et al.*, 2014). Do středu buňky je poté vložen třetí LocZ/MapZ kruh, který zde setrvává až do úplného oddělení buněk (Fleurie *et al.*, 2014). Holečková *et al.* (2014) a van Raaphorst *et al.* (2017) ovšem třetí LocZ/MapZ kruh nepozorovali. Napříč bakteriálními druhy existuje množství dalších alternativních systémů určujících středovou lokalizaci Z-kruhu. Jako příklad lze uvést protein MipZ s negativní regulační úlohou u α -proteobakterie *Caulobacter crescentus* (Thanbichler & Shapiro, 2006) nebo proteiny s pozitivní regulační úlohou PomZ u Δ -proteobakterie *Myxococcus xanthus* (Treuner-Lange *et al.*, 2013) či SsgB protein u aktinobakterie *Streptomyces coelicolor* (Willemse *et al.*, 2011). V procesu buněčného dělení se uplatňují také regulační proteiny FtsE a FtsX. Komplex FtsEX svou strukturou připomíná ABC transportní systém, jeho funkce však spočívá v propojení buněčného dělení s aktivací hydroláz prostřednictvím PcsB, které se obecně podílejí na remodelaci peptidoglykanu (PG), na výsledné morfologii buňky (Bajaj *et al.*, 2016). Dalšími proteiny

buněčného dělení jsou pozitivní regulátory Z-kruhu ZapA a ZapB a negativní regulátor Z-kruhu EzrA (Massidda *et al.*, 2013). Důležitou roli sehrává i protein SepF (YlmF) pozitivně regulující Z-kruh, jehož delece způsobuje v buněčném dělení vážné defekty (Fadda *et al.*, 2003, Massidda *et al.*, 2013). Esenciální protein FtsK (SpoIIIE homologní protein), účastnící se chromozomální segregace, sehrává také roli v buněčném dělení, ale jeho přesná funkce nebyla dosud objasněna (Fadda *et al.*, 2007, Massidda *et al.*, 2013).

Elipsoidní tvar pneumokoků vzniká koordinovanou syntézou septálního a periferního PG. Peptidoglykan je složen z polysacharidových řetězců kyseliny N-acetylmuramové (MurNAc) a N-acetylglukosaminu (GlcNAc), propojených přes β -1,4-glykosidické vazby (Vollmer *et al.*, 2008). Glykanové řetězce jsou poté propojeny skrze krátké pentapeptidové můstky o sekvenci L-alanin, D-glutamová kyselina, L-Lysin, D-alanin a terminální D-alanin. Samotné propojení dvou oligopeptidů vázaných k MurNAc dvěma odlišnými polysacharidovými řetězců je zprostředkováno přímou vazbou mezi D-alaninem na 4. pozici a L-lysinem na 3. pozici. Příčné vazby mohou být u pneumokoka tvořeny také skrze větvené peptidy (Straume *et al.*, 2017).

Syntéza PG, která je znázorněna na obrázku č. 3, je zahájena v cytoplazmě, kde dochází k více než 20 enzymatickým reakcím vedoucím ke vzniku aktivovaných nukleotidových prekurzorů (UDP-N-acetylglukozaminu a UDP-N-acetylmuramyl pentapeptidu), tyto prekurzory jsou v dalším kroku shromažďovány k vnitřní straně cytoplazmatické membrány spolu s undekaprenyl fosfátem (C₅₅-P) za vzniku lipidově ukotvené disacharid-pentapeptidové monomerní podjednotky zvané lipid II a takto navázané prekurzory jsou přenášeny na vnější stranu cytoplazmatické membrány. V posledním kroku jsou disacharid-pentapeptidové monomerní podjednotky lipidu II zabudovány do stávajícího PG pomocí transglykosylačních reakcí a pomocí transpeptidace zajištěna výsledná pevnost celé struktury. (Bouhss *et al.*, 2004, Vollmer *et al.*, 2008, Straume *et al.*, 2017).



Obrázek č.3: Syntéza peptidoglykanu. Na obrázku je zobrazena syntéza PG sestávající ze tří kroků: ze syntézy PG prekurzorů v cytoplasmě, z tvorby lipidu II a jeho translokace skrze membránu a z polymerizačních reakcí vedoucích k tvorbě výsledného PG. Převzato dle (Lloyd *et al.*, 2008).

Syntéza prekurzoru peptidoglykanu UDP-*N*-acetylglukozaminu začíná přeměnou fruktózo-6-fosfátu na glukozamin-6-fosfát pomocí enzymu aminotransferázy GlmS (Badet *et al.*, 1987). Tento krok je následován enzymatickou reakcí, při níž dochází k přeměně glukozamin-6-fosfátu na jeho izomerní sloučeninu glukozamin-1-fosfát pomocí fosfoglukozaminmutázy GlmM (Mengin-Lecreulx & van Heijenoort, 1996). Posledního kroku syntézy prekurzoru UDP-*N*-acetylglukozaminu se účastní bifunkční enzym GlmU. Tento enzym modifikuje vzniklý glukozamin-1-fosfát acetylací a urydylací za vzniku UDP-GlcNAc (Mengin-Lecreulx & van Heijenoort, 1994). UDP-GlcNAc je v následujících krocích pomocí proteinů Mur přeměněn na aktivované nukleotidové prekurzory. Cukerná složka UDP-*N*-acetyl muramát je syntetizována enzymy MurA a MurB. Následné připojení podjednotek pentapeptidu je zprostředkováno aminokyselinovými ligázami MurC, MurD, MurE a MurF (Barreteau *et al.*, 2008). Zároveň dochází v tomto kroku k tvorbě di-peptidového můstku větvených peptidů. Syntéza těchto peptidů je zprostředkována proteiny MurM a MurN (De Pascale *et al.*, 2008, Lloyd *et al.*, 2008). MurM je aminokyselinová ligáza katalyzující připojení L-alaninu nebo L-serinu k L-lysinu pentapeptidového můstku. Aktivita MurM je zároveň nezbytná pro vznik penicilinové rezistence *S. pneumoniae* (Lloyd *et al.*, 2008). Aminokyselinová ligáza MurN se účastní následného kroku tvorby di-peptidového můstku. Katalyzuje připojení druhé

aminokyseliny L-alaninu k aminokyselině L-alaninu nebo L-serinu připojené v předchozím kroku pomocí enzymu MurM (De Pascale *et al.*, 2008). Mezi další enzymy účastníci se intracelulárního procesu tvorby peptidoglykanu můžeme zařadit enzymy MurI, DdlA a Alr (DadX). Glutamátová racemáza MurI je nezbytná pro biosyntézu D-glutamátu, komponenty syntézy peptidoglykanu (Yoshimura *et al.*, 1993). Enzym DdlA je ligáza spojující koncové D-alaniny za vzniku dimeru D-alanin-D-alanin, který je následně připojen k UDP-*N*-acetylmuramyl tripeptidu (Neuhaus, 1962). Dalším enzymem je alaninová racemáza Alr přeměňující L-alanin na D-alanin. V celé řadě bakterií stejně jako v modelovém organismu *E. coli* je přítomna ještě druhá alaninová racemáza DadX (Lobočka *et al.*, 1994), *S. pneumoniae* však kóduje pouze jedinou alaninovou racemázu Alr (Strych *et al.*, 2007).

Dalšího, již membránového kroku, se účastní enzymy MraY a MurG. MraY je translokáza katalyzující přenos phospho-MurNAc-pentapeptidu na C₅₅-P lipidový přenašeč za vzniku lipidu I (C₅₅-PP-MurNAc-pentapeptid) (Bouhss *et al.*, 2004). Tento lipidový přenašeč C₅₅-P je nejprve syntetizován v podobě prekurzoru C₅₅-PP (undekaprenyl pyrofosfát) pomocí membránového enzymu UppS (undekaprenyl pyrofosfát syntáza), který katalyzuje přidání osmi C₅ izopentenylových podjednotek k C₁₅ (farnesyl pyrofosfát) (Ogura & Koyama, 1998, Apfel *et al.*, 1999). Následná aktivace prekurzoru C₅₅-PP je zprostředkována defosforylací C₅₅-PP na C₅₅-P pomocí druhého membránově vázaného enzymu UppP (undekaprenyl pyrofosfát a), dříve nazývaného BacA (El Ghachi *et al.*, 2004). Další enzym glykosyltransferáza MurG katalyzuje přenos GlcNAc z UDP na C₄ hydroxylovou skupinu lipidu I za vzniku lipidu II. β-vázaný GlcNAc-MurNAc disacharid je následně transportován skrze cytoplazmatickou membránu (Ha *et al.*, 2000) pomocí enzymů flipáz. Mezi dosud identifikované lipid II transportující flipázy můžeme zařadit proteiny FtsW, RodA a MurJ, flipázy FtsW a RodA však sehrávají roli i v následné polymeraci peptidoglykanu (Inoue *et al.*, 2008, Mohammadi *et al.*, 2011). Protein MurJ patří do rodiny MOP (Multidrug/oligosacharidyl-lipid/Polysacharid) byl identifikován v *E. coli* (Ruiz, 2008) jako esenciální. Deplece tohoto proteinu vedla ke snížení syntézy PG, k akumulaci PG prekurzorů, tvarovým defektům buňky a případné lýzi (Ishino *et al.*, 1986, Inoue *et al.*, 2008). Protein YtgP, ortholog proteinu MurJ, u grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* však není esenciální, kóduje ale dosud neznámý protein Amj, jenž je schopen funkci MurJ komplementovat. U streptokoků byl identifikován pouze orthologní protein MurJ, zatímco ortholog proteinu Amj nebyl nalezen (Meeske *et al.*, 2015). Zároveň se zjistilo, že protein MurJ (YtgP) *S. pyogenes* komplementuje delecí MurJ v *E. coli* a vzhledem k 56 % sekvenční homologii s MurJ *S. pneumoniae* se role lipid II transportující flipázy

předpokládá i u pneumokoka (Ruiz, 2008, Straume *et al.*, 2017). Protein FtsW byl nejprve popsán u *E. coli*, kde v pozdních fázích tvorby buněčné přepážky lokalizuje do oblasti septa a umožňuje navázání dalšího proteinu septální peptidoglykanové syntézy transpeptidázy FtsI (PBP3) (Mercer & Weiss, 2002). Lokalizace proteinu FtsW do oblasti buněčné přepážky byla zjištěna i u *S. pneumoniae*, zároveň byla u tohoto proteinu popsána jeho interakce s proteinem PBP2x uplatňujícím se v pozdních fázích syntézy peptidoglykanu, korespondujícím s transpeptidázou FtsI (PBP3) popsanou v *E. coli* (Noirclerc-Savoie *et al.*, 2013). Protein RodA byl také nejprve popsán u *E. coli*. RodA je nezbytný pro správnou funkci transpeptidázy PBP2 uplatňující se v elongaci peptidoglykanu, defekt v genu *rodA* vede ke vzniku buněk sférického tvaru, namísto ovoidního (Massidda *et al.*, 2013). Silná interakce mezi proteinem RodA a pro elongasom specifickou transpeptidázou PBP2b byla popsána i u *S. pneumoniae*. Stejně tak deplece proteinu PBP2b vedla ke vzniku podobného fenotypu jako deplece proteinu RodA, buňky byly sférického tvaru, uspořádány v dlouhých řetězcích, měly zvýšený obsah větvených peptidů a vykazovaly hypersenzitivitu k hydroláze CbpD. Na základě těchto dat se předpokládá úzký interakční vztah mezi proteinem PBP2b a RodA. Závěrem lze také usuzovat, že proteiny RodA a FtsW sehrávají roli spíše jako polymerázy peptidoglykanu, a že protein MurJ bude pravděpodobně hlavní lipid II transportující flipázou (Straume *et al.*, 2017).

Poslední krok syntézy PG je zprostředkován třemi typy enzymů. Enzymy SEDS (shape, elongation, division, sporulation), mezi které řadíme zmíněné polymerázy RodA a FtsW, prodlužující glykanové řetězce, CWH (hydrolázy buněčných stěn) schopné remodelovat a degradovat buněčnou stěnu a penicilin vazebné proteiny (PBP) katalyzující polymerizační reakce v pozdních fázích syntézy PG (Gerard *et al.*, 2002, Sauvage *et al.*, 2008, van Heijenoort, 2011). PBPs můžeme rozdělit do tří tříd A až C. Pneumokok má šest těchto penicilin vazebných proteinů. Třída A zahrnuje PBP1a, PBP1b a PBP2a. Penicilin vazebné proteiny třídy A (PBPa) mají dvě enzymatické aktivity. Katalyzují transglykosylaci, polymerizaci polysacharidových řetězců a transpeptidaci, tvorbu příčných vazeb skrze krátké peptidy. PBP2a tvoří komplex s membránově vázaným kofaktorem MacP, který je nezbytný pro jeho syntetázovou aktivitu. MacP je zároveň substrátem StkP proteinkinázy, globálního regulátoru buněčného cyklu a jeho fosforylace vede k modulaci aktivity PBP2a (Fenton *et al.*, 2018). Třída B zahrnuje dva PBP: PBP2x a PBP2b vyznačující se pouze transpeptidázovou aktivitou. Do třídy C patří PBP3 s karboxypeptidázovou aktivitou (Stamsas *et al.*, 2017). PBP3 (DacA) reguluje zesílení PG odštěpováním terminálního D-alaninu z pentapeptidových postranních řetězců (Severin *et al.*,

1992, Morlot *et al.*, 2004, Nemmara *et al.*, 2011). PBP3 protein je také důležitý pro správnou orientaci FtsZ a kruhovitých PBP struktur ve středu buňky (Morlot *et al.*, 2004). V procesu buněčného dělení je významná i přítomnost CWH. Hydrolázy napomáhají výsledné morfologii buňky remodelací peptidoglykanu a podílí se na buněčné separaci a autolýze. *S. pneumoniae* kóduje 12 doposud známých CWH uplatňujících se v dělení a růstu. Syntézy periferního peptidoglykanu se účastní lytická transglykosyláza MltG (viz níže). Kromě již zmíněné D,D-karboxypeptidázy PBP3 (DacA), také L,D-karboxypeptidáza DacB štěpí peptidové řetězce příčných vazeb PG. Jako substrát využívá tetrapeptidový postranní řetězec PG produkovaný enzymem PBP3 a přeměňujeho na tripeptid (Barendt *et al.*, 2011). Lysozym Pmp23 je důležitý pro stabilitu vznikající dělicí mašinerie ve středu buňky a pro lokalizaci MapZ/LocZ (Jacq *et al.*, 2018). PcsB endopeptidáza štěpí peptidové vazby septálního PG, zajišťující rozdělení mateřské buňky na dvě buňky dceřiné (Bajaj *et al.*, 2016, Jacq *et al.*, 2018). Pro její funkci je nezbytná přítomnost regulačního systému FtsEX (Bajaj *et al.*, 2016). A za konečné rozdělení dvou dceřiných buněk je zodpovědná hydroláza LytB. Delece jednotlivých hydroláz vede k defektům v buněčném dělení a k defektům ve výsledném buněčném tvaru (Jacq *et al.*, 2018).

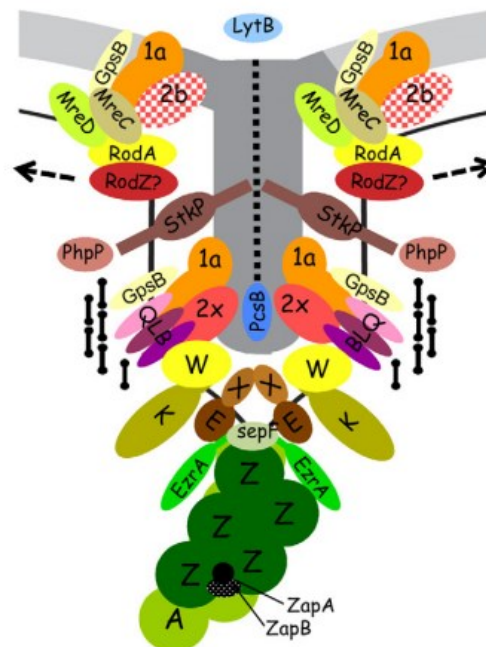
V modelových organismech *E. coli* a *B. subtilis* je syntéza septálního a periferního PG zprostředkována dvěmi odlišnými mašinériemi. Naproti tomu u pneumokoků probíhá veškerá syntéza nového PG ve středu buňky (Fenton *et al.*, 2018), a proto je jak divizom, komplex proteinů uplatňující se při buněčném dělení, tak elongasom, komplex proteinů zprostředkovávajících prodlužování buňky, umístěn rovněž v buněčné přepážce (Philippe *et al.*, 2014). Pro syntézu septálního peptidoglykanu je nezbytná celá řada proteinů. V počátcích se zde uplatňují proteiny FtsZ a FtsA tvořící Z-kruh, sloužící jako kostra k uchycení dalších proteinů. Následně je do buněčné přepážky lokalizován regulační protein buněčného dělení StkP (Beilharz *et al.*, 2012). Do vytvořeného Z-prstence jsou poté lokalizovány další proteiny FtsW, PBP2x, PBP1a, FtsQ/DivIB, FtsB/DivIC, FtsL, EzrA, a GpsB (Maggi *et al.*, 2008, Sham *et al.*, 2012, Fleurie *et al.*, 2014). FtsW je pravděpodobně lipidová flipáza a zároveň PG polymeráza (viz výše) (Mohammadi *et al.*, 2011, Straume *et al.*, 2017). Následné začlenění PG prekurzorů do buněčné stěny zprostředkovávají PBP (Morlot *et al.*, 2004). Dalším proteinem syntézy septálního PG je transpeptidáza PBP2x katalyzující propojení tetrapeptidů v PG. PBP2x je esenciální protein a jeho deplece vede ke vzniku citrónovitých prodloužených buněk (Berg *et al.*, 2013). Na syntéze septálního PG se svou transglykosylázovou a transpeptidázovou aktivitou podílí i PBP1a protein (Morlot *et al.*, 2004). Esenciálními proteiny syntézy septálního

PG jsou proteiny FtsL, DivIC a DivIB, ale jejich přesná role není doposud známa (Noireclerc-Savoye *et al.*, 2005). V pozdních fázích syntézy septálního PG se uplatňuje protein DivIVA, který hraje roli v dokončení septa a v maturaci pólů (Fadda *et al.*, 2003, Fadda *et al.*, 2007).

Se syntézou septálního PG je úzce spojena syntéza PG periferního, uplatňujícího se v elongaci buňky během buněčného dělení a růstu (Fleurie *et al.*, 2014). Elongasom je složen z několika proteinů, mezi které řadíme PBP2b, PBP1a, RodA, MreC, MreD, MltG, DivIVA, GpsB, Jag/EloR/KhpB, RodZ a CozE (Massidda *et al.*, 2013, Fenton *et al.*, 2016, Tsui *et al.*, 2016, Stamsas *et al.*, 2017). Transpeptidáza PBP2b a lipidová flipáza RodA jsou esenciální proteiny, které ve vzájemné spolupráci syntetizují nové složky peptidoglykanu a ty následně inkorporují do boční stěny buňky (Fleurie *et al.*, 2014, Stamsas *et al.*, 2017). Deplece PBP2b vede ke vzniku kulatých buněk uspořádaných v řetězcích (Grangeasse, 2016). Syntéza nového glykanového řetězce periferního PG je zprostředkována také proteinem PBP1a (Tsui *et al.*, 2016). Protein MreCD stejně jako MreB je v modelových organismech *E. coli* a *B. subtilis* důležitý pro udržení buněčného tvaru. U *S. pneumoniae* řídí protein MreCD syntézu periferního PG a kontroluje aktivitu a lokalizaci PBP1a, MreB homologní protein však pneumokok postrádá (Sham *et al.*, 2012). Předpokládá se, že aktivitu Pbp1a kontroluje i protein RodZ, jehož přesná role není doposud známa (Tsui *et al.*, 2016). Dalším proteinem uplatňujícím se v elongaci buňky je již zmíněná endo-lytická transglykosyláza MltG, která uvolňuje enzymatickým štěpením nově syntetizované glykanové řetězce při periferní syntéze PG (Tsui *et al.*, 2016, Jacq *et al.*, 2018). Nedávno popsáným proteinem buněčného dělení je protein CozE, který interaguje s MreCD komplexem a s PBP1a proteinem a je zodpovědný za lokalizaci PBP1a do buněčné přepážky (Fenton *et al.*, 2016). Dále lze také zmínit protein DivIVA, který se podílí na kontrole buněčného cyklu a přispívá k separaci buněk a zrání buněčných pólů (Fadda *et al.*, 2007, Sham *et al.*, 2012). Nedávno bylo zjištěno, že protein DivIVA je nezbytný pro správnou lokalizaci elongasomu v negativně zakřivené oblasti membrány mezi laterální a septální částí buněčné stěny (Straume *et al.*, 2017). Procesu elongace buňky se účastní také protein GpsB, který řídí přechod mezi septální a periferní syntézou peptidoglykanu. GpsB protein se během buněčného cyklu nachází v komplexu s proteinem PBP2a a PBP2b. Zde se uplatňuje jako aktivátor PBP2a, jehož funkce nebyla doposud zcela objasněna, předpokládá se ale jeho role v aktivaci PBP2x s následným uzávěrem septa. Zároveň tvoří GpsB komplex s proteinem buněčného dělení EzrA. EzrA tvoří komplex s dalšími proteiny divizomu mezi něž můžeme zařadit esenciální proteiny FtsA a FtsZ nebo také protein DivIVA. Protein GpsB tak pravděpodobně tvoří signalizační spojku mezi divizomálními

proteiny a proteiny PBP. Role GpsB v buněčném cyklu se předpokládá i v aktivaci Ser/Thr proteinkinázy StkP, která následně interaguje s PBP2x proteinem dokončujícím buněčnou septaci. Interakce proteinu GpsB byla popsána i s proteinem periferní syntézy PG MreC. Delece GpsB vede ke vzniku prodloužených větších buněk s nedokončenými septy. GpsB tak nejspíše sehrává negativní regulační úlohu v periferní syntéze PG a pozitivní regulační úlohu v tvorbě septálního PG a to na různých úrovních buněčného dělení (Rued *et al.*, 2017). Dalším proteinem uplatňujícím se v prodlužování buňky je cytoplazmatický protein KhpB (EloR/Jag), který stimuluje postranní syntézu PG a v součinnosti s KhpA reguluje na post-transkripční úrovni celkové množství FtsA proteinu v buňce. KhpB je zároveň dalším substrátem StkP (Ulrych *et al.*, 2016, Stamsas *et al.*, 2017, Zheng *et al.*, 2017). Proteiny buněčného dělení a proteiny septální a periferní syntézy PG jsou znázorněny na obrázku č.4.

Vzhledem k rostoucímu počtu bakterií rezistentních na dostupné antimikrobiální látky, je potřeba hledat nové terapeutické cíle, proto je studium proteinů buněčného dělení a proteinů syntézy buněčné stěny, jakož to potenciálních cílů antimikrobiální terapie, v centru pozornosti (Massidda *et al.*, 2013).



Obrázek č.4: Proteiny buněčného dělení a syntézy PG Obrázek schematicky znázorňuje mašinerii převážně většiny známých proteinů buněčného dělení a syntézy PG v buněčné přepážce. Fts proteiny jsou zde popsány pouze příslušným písmenem A (FtsA), Z (FtsZ), E (FtsE), X (FtsX), Q (FtsQ/DivIB), B (FtsB/DivIC), L (FtsL), W (FtsW). Proteiny PBP jsou popsány příslušným číslem a písmenem 1a (PBP1a), 2b (PBP2b) a 2x (PBP2x). Převzato z Massidda *et al.*, 2013.

Proteiny buněčného dělení			
Protein	Funkce	Esencialita	Reference
DacB	L,D-karboxypeptidáza, štěpení peptidových řetězců příčných vazeb PG	NE	(Barendt <i>et al.</i> , 2011)
EzrA	Negativní regulační úloha v umístění Z-kruhu	ANO	(Massidda <i>et al.</i> , 2013)
FtsA	Stabilizace a ukotvení Z-kruhu k buněčné membráně, shromáždění ostatních proteinů do buněčného septa	ANO	(Mura <i>et al.</i> , 2017)
FtsE	Regulace propojení buněčného dělení s aktivitou hydroláz (interakce FtsEX s PcsB)	ANO	(Sham <i>et al.</i> , 2012) (Bajaj <i>et al.</i> , 2016)
FtsK (SpoIIIE)	Chromozomální segregace, blíže neurčená role v buněčném dělení	ANO	(Land <i>et al.</i> , 2013)
FtsX	Regulace propojení buněčného dělení s aktivitou hydroláz (interakce FtsEX s PcsB)	ANO	(Sham <i>et al.</i> , 2012) (Bajaj <i>et al.</i> , 2016)
FtsZ	Tvorba kontraktálního Z-kruhu	ANO	(Mura <i>et al.</i> , 2017) (Lara <i>et al.</i> , 2005)
LocZ /MapZ)	Určení správného úhlu dělicí roviny	NE	(van Raaphorst <i>et al.</i> , 2017)
LytB	Hydroláza, konečné rozdělení dvou dceřiných buněk	NE	(De Las Rivas <i>et al.</i> , 2002) (Jacq <i>et al.</i> , 2018)
PBP3 (DacA)	D,D-karboxypeptidáza, štěpení příčných vazeb PG	NE	(Barendt <i>et al.</i> , 2011) (Jacq <i>et al.</i> , 2018)
PcsB	Endopeptidáza, štěpení septa	EV	(Bajaj <i>et al.</i> , 2016) (Jacq <i>et al.</i> , 2018)
Pmp23	Lysozym, stabilita vznikající dělicí mašinerie, správná lokalizace MapZ	NE	(Jacq <i>et al.</i> , 2018)
SepF (YlmF)	Pozitivní regulační úloha v umístění Z-kruhu	NE	(Fadda <i>et al.</i> , 2003)
ZapA	Pozitivní regulační úloha v umístění Z-kruhu	NE	(Fadda a Massidda, nepublikované výsledky)
ZapB	Pozitivní regulační úloha v umístění Z-kruhu	NE	(Fadda a Massidda, nepublikované výsledky)

Proteiny septální syntézy peptidoglykanu			
Protein	Funkce	Esencialita	Reference
DivIVA	Kontrola buněčného cyklu, finální role v separaci buněk, maturace pólů, správná lokalizace elongasomu	NE	(Fadda <i>et al.</i> , 2003) (Fadda <i>et al.</i> , 2007) (Straume <i>et al.</i> , 2017)
FtsB/DivIC	Role dosud neobjasněná	ANO	(Noirclerc-Savoye <i>et al.</i> , 2005)
FtsL	Role dosud neobjasněná	ANO	(Noirclerc-Savoye <i>et al.</i> , 2005)
FtsQ/DivIB	Role dosud neobjasněná	ANO	(Noirclerc-Savoye <i>et al.</i> , 2005)
FtsW	Lipidová flipáza, prodloužení glykanových řetězců	ANO	(Jacq <i>et al.</i> , 2018) (Morlot <i>et al.</i> , 2004)
GpsB	Regulátor syntézy periferního a septálního PG	NE	(Rued <i>et al.</i> , 2017) (Land <i>et al.</i> , 2013)
PBP1a	Transglykosyláza a transpeptidáza, syntéz septálního a periferního PG	NE	(Land <i>et al.</i> , 2013) (Morlot <i>et al.</i> , 2004) (Fenton <i>et al.</i> , 2018)
PBP2x	Transpeptidáza, katalyzující tvorbu septálního PG	ANO	(Straume <i>et al.</i> , 2017)
Proteiny periferní syntézy peptidoglykanu			
Protein	Funkce	Esencialita	Reference
CozE	Pravděpodobně směřování lokalizace PBP1a do buněčné přepážky	N	(Fenton <i>et al.</i> , 2016)
DivIVA	Kontrola buněčného cyklu, finální role v separaci buněk, maturace pólů, správná lokalizace elongasomu	NE	(Fadda <i>et al.</i> , 2003) (Fadda <i>et al.</i> , 2007) (Straume <i>et al.</i> , 2017)
KhpB (EloR, Jag)	Regulace periferní syntézy PG, v komplexu s KhpA regulace genové exprese na transkripční a post-transkripční úrovni	NE	(Ulrych <i>et al.</i> , 2016) (Stamsas <i>et al.</i> , 2017) (Zheng <i>et al.</i> , 2017)
GpsB	Regulátor syntézy periferního a septálního PG	NE	(Land <i>et al.</i> , 2013) (Fleurie <i>et al.</i> , 2014)

MltG	Endo-lytická transglykosyláza, odštěpování nově syntetizovaného glykanového řetězce při periferní syntéze PG	EV	(Tsui <i>et al.</i> , 2016)
MreC	Kontrola syntézy periferního PG a kontrola lokalizace a aktivity PBP1a	EV	(Land & Winkler, 2011)
MreD	Kontrola syntézy periferního PG a kontrola lokalizace a aktivity PBP1a	EV	(Land & Winkler, 2011)
PBP2b	Transpeptidáza, syntéza periferního PG	ANO	(Stamsas <i>et al.</i> , 2017)
PBP1a	Transglykosyláza a transpeptidáza, syntéza septálního a periferního PG	NE	(Morlot <i>et al.</i> , 2004) (Land <i>et al.</i> , 2013) (Fenton <i>et al.</i> , 2018)
RodA	Lipidová flipáza, syntéza periferního PG, prodloužení glykanových řetězců	ANO	(Jacq <i>et al.</i> , 2018) (Stamsas <i>et al.</i> , 2017) (Massidda <i>et al.</i> , 2013)
RodZ	Blíže neurčená funkce v elongaci buňky, pravděpodobně regulace PBP1a a MltG	ANO	(Margolin, 2009) (Tsui <i>et al.</i> , 2016)
Blíže neurčené proteiny buněčného dělení			
Protein	Funkce	Esencialita	Reference
MacP	Membránově vázaný kofaktor proteinu PBP2a	EV	(Fenton <i>et al.</i> , 2018)
PBP1b	Transglykosyláza a transpeptidáza, funkce doposud neobjasněna	EV	(Land <i>et al.</i> , 2013) (Fenton <i>et al.</i> , 2018)
PBP2a	Transglykosyláza a transpeptidáza, funkce doposud neobjasněna	EV	(Land <i>et al.</i> , 2013) (Fenton <i>et al.</i> , 2018)

Tabulka č.1: Soupis proteinů uplatňujících se v buněčném dělení a syntéze peptidoglykanu. Tato tabulka shrnuje známé proteiny buněčného dělení a proteiny septální a periferní syntézy PG u *S. pneumoniae*. Je zde popsáno, o jaký protein se jedná, jaká je jeho funkce a zda je protein esenciální. U esenciality jsou zkratky ANO (je esenciální), NE (není esenciální), EV (esenciální v závislosti na genetickém pozadí) a N (esencialita nebyla stanovena). Upraveno (Massidda *et al.*, 2013).

2.2 Proteinkináza StkP

Monitorování extracelulárního a intracelulárního prostředí a patřičná odpověď na jeho změny je nezbytným jevem umožňujícím přežití bakteriální buňky (Pinas *et al.*, 2018). Jedním ze základních mechanismů přenosu signálu do buňky je proteinkinázami a proteinfosfatázami zprostředkovaná reverzibilní fosforylace (Hardt *et al.*, 2017). Nejrozšířenějším systémem využívající fosforylaci k modulaci buněčných procesů u prokaryot je dvousložkový systém (Jung *et al.*, 2012). *S. pneumoniae* kóduje 13 těchto TCS systémů sestávajících ze dvou komponent (Echenique *et al.*, 2004). Z histidinové kinázy (HK), která je po zaznamenání signálu z prostředí autofosforylována na histidinovém zbytku, a z regulátoru odpovědi (RR), který následně katalyzuje přenos fosfátové skupiny z histidinové kinázy na aspartátový zbytek vlastní regulační domény (Stock *et al.*, 2000). Efektorová doména RR se poté váže na specifickou oblast DNA a tím moduluje genovou expresi (Pinas *et al.*, 2018).

V posledních desetiletích byly u bakterií objeveny další signální systémy založené na fosforylaci tyrozinu, serinu a threoninu. Tyrozinové zbytky jsou fosforylovány bakteriální tyrozinovou proteinkinázou (BTK). U *S. pneumoniae* je přítomná pouze jediná kináza tohoto typu nazvaná CpsD, která sehraává roli v syntéze a transportu polysacharidů pouzdra. Serinové a threoninové zbytky jsou fosforylovány a defosforylovány serin/threoninovou proteinkinázou (STK) a proteinfosfatázou (STP) (Morona *et al.*, 2003, Pérez *et al.*, 2008, Dworkin, 2015). STK byla nejprve nalezena a popsána u eukaryotních organismů v práci Hanks *et al.* (1988), následné genomové sekvenování však odhalilo zastoupení této signální dráhy i u bakterií *Myxococcus xanthus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori* a *Haemophilus influenzae*. Dnes je jejich přítomnost známá napříč celou řadou dalších bakterií, ale i archeí. Do nedávna byla všeobecně přijímána skutečnost, že výskyt těchto proteinkináz v bakteriích byl zapříčiněn horizontálním přenosem z eukaryotních organismů, a proto byly pojmenovány Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu (Pereira *et al.*, 2011). V roce 2018 byla navržena změna jejich označení na Ser/Thr proteinkinázy Hanksova typu, protože podle fylostratigrafické analýzy bylo demonstrováno, že tyto proteinkinázy přítomné u eukaryot, bakterií i u archeí mají tzv. posledního univerzálního společného předchůdce zvaného LUCA (last universal common ancestor) (Stancik *et al.*, 2018).

S. pneumoniae kóduje pouze jedinou Ser/Thr proteinkinázu StkP, která je přepisována spolu s jí příslušnou proteinfosfatázou zvanou PhpP (Nováková *et al.*, 2005). StkP proteinkináza je membránový dimerní protein složený ze tří částí, z N-terminální kinázové

domény, z krátké transmembránové domény a z C-terminální extracelulární domény se čtyřmi PASTA (Penicillin-binding protein And Serine/Threonine kinase Associated domain) doménami (Yeats *et al.*, 2002). PASTA domény odpovídají za vazbu specifických signálů z vnějšího prostředí vedoucí k aktivaci StkP s následnou fosforylací intracelulárních efektorových proteinů (Barthe *et al.*, 2010). Bylo prokázáno, že PASTA domény *S. pneumoniae* jsou schopny vázat podjednotky jak nativního, tak syntetického PG, ale i například β -laktamová antibiotika a zároveň lokalizovat StkP proteinkinázu do míst buněčného dělení, skrze interakci s podjednotkami septálního PG (Maestro *et al.*, 2011, Beilharz *et al.*, 2012). Aktivace proteinkinázy skrze vazbu podjednotek PG extracelulárními PASTA doménami byla následně potvrzena u bakterie *Bacillus subtilis*, kde navázání muropeptidů, fragmentů buněčné stěny, na PASTA domény proteinkinázy PrkC *in vitro* vedlo ke germinaci spór (Shah *et al.*, 2008). U bakterie *Staphylococcus aureus* byl jako signál proteinkinázy PknB popsán prekurzor buněčné stěny membránově ukotvený lipid II (Hardt *et al.*, 2017). Vzhledem k vzájemné homologii PknB a StkP je pravděpodobné, že lipid II sehrává roli i v aktivaci StkP. Samotná autofosforylační aktivita proteinkinázy StkP je zprostředkována tvorbou homodimeru mezi transmembránovými a extracelulárními doménami. Homodimerizace je pravděpodobně také nezbytná pro zacílení substrátů proteinkinázou StkP (Pallová *et al.*, 2007).

StkP proteinkináza hraje důležitou roli v metabolismu biosyntézy buněčné stěny a buněčném dělení, v opravách DNA, syntéze purinů, příjmu železa a oxidativním stresu a hraje také nezbytnou roli v patogenezi, kompetenci a autolýze (Echenique *et al.*, 2004, Rajagopal *et al.*, 2005, Hussain *et al.*, 2006, Sasková *et al.*, 2007, Herbert *et al.*, 2015). Delece StkP vede k mnohostranným defektům v buňce. Pneumokok vykazuje růstové a morfologické poškození, buňky jsou prodloužené s několika nedokončenými septy, dochází u nich ke zvýšené autolýze zprostředkované LytA v prostředí s alkalickým pH a v přítomnosti nízkých koncentrací ATB působících na buněčnou stěnu, buňky mají sníženou toleranci na stresové podmínky a sníženou schopnost adherence k endoteliálním buňkám (Echenique *et al.*, 2004, Nováková *et al.*, 2010, Beilharz *et al.*, 2012, Herbert *et al.*, 2015). V laboratorních podmínkách není delece StkP letální, bylo však prokázáno, že je esenciální pro průnik do plic a do krevního řečiště u myši (Echenique *et al.*, 2004). V procesu buněčného dělení je proteinkináza StkP v rané fázi lokalizována do buněčného septa skrze její interakci s proteinem FtsZ a setrvává zde až do finálního rozdělení buněk (Beilharz *et al.*, 2012). Spolu s proteinkinázou StkP je do místa buněčného dělení lokalizována také proteinfosfatáza PhpP, provádějící opačný proces, defosforylaci StkP a jí příslušných substrátů (Beilharz *et al.*, 2012, Ulrych *et al.*, 2016). StkP

zde reguluje celou řadu procesů, uplatňujících se v syntéze buněčné stěny a ve tvorbě a uzavírání septa (Beilharz *et al.*, 2012).

2.2.1 Substráty StkP

Mezi substráty StkP proteinkinázy fosforylované *in vivo* patří protein DivIVA, MapZ (LocZ), KhpB (EloR/Jag), MacP, anorganická pyrofosfatáza PpaC, fosfoglukozaminmutáza GlmM a regulační proteiny RR06 a ComE (Nováková *et al.*, 2005, Nováková *et al.*, 2010, Agarwal *et al.*, 2012, Ulrych *et al.*, 2016, Fenton *et al.*, 2018, Pinas *et al.*, 2018). Mezi substráty StkP, kde byla fosforylace prokázána pouze *in vitro*, můžeme zařadit protein FtsZ, FtsA, enzym MurC a RitR (Ulijasz *et al.*, 2004, Giefing *et al.*, 2010, Beilharz *et al.*, 2012, Falk & Weisblum, 2013). Veškeré doposud identifikované substráty StkP jsou uvedeny v tabulce č.2.

Substráty Ser/Thr proteinkinázy StkP			
Substrát	Funkce	Průkaz	Reference
ComE	Regulační protein TC systému ComD/ComE, regulace časných genů kompetence	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	(Pinas <i>et al.</i> , 2018)
DivIVA	Kontrola buněčného cyklu, finální role v separaci buněk, maturace pólů, správná lokalizace elongasomu	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	(Nováková <i>et al.</i> , 2010) (Marston & Errington, 1999) (Fadda <i>et al.</i> , 2003) (Straume <i>et al.</i> , 2017)
KhpB (EloR/Jag)	Stimulace syntézy periferního peptidoglykanu, v komplexu s KhpA regulace genové exprese na transkripční a post-transkripční úrovni	<i>in vivo</i>	(Ulrych <i>et al.</i> , 2016) (Stamsas <i>et al.</i> , 2017) (Zheng <i>et al.</i> , 2017)
FtsA	Ukotvení Z-kruhu k buněčné membráně, shromáždění ostatních proteinů buněčného dělení	<i>in vitro</i>	(Beilharz <i>et al.</i> , 2012) (Mura <i>et al.</i> , 2017)
FtsZ	Tvorba Z-kruhu	<i>in vitro</i>	(Giefing <i>et al.</i> , 2010) (Mura <i>et al.</i> , 2017)
GlmM	Fosfoglukozaminmutáza, syntéza prekurzorů buněčné stěny	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	(Nováková <i>et al.</i> , 2005)
LocZ (MapZ)	Určení správného úhlu dělicí roviny skrze interakci s FtsZ, pozitivní regulátor umístění	<i>in vivo</i>	(Fleurie <i>et al.</i> , 2014) (Holečková <i>et al.</i> , 2014)

Z-kruhu			
MacP	Membránově vázaný kofaktor proteinu PBP2a	<i>in vivo</i>	(Fenton <i>et al.</i> , 2018)
MurC	UDP-N-acetylmuramoyl:L-alanine ligáza, katalýza tvorby PG prekurzorů	<i>in vitro</i>	(Falk & Weisblum, 2013)
PpaC	Mangan-dependentní anorganická fosfatáza, hydrolýza anorganického pyropyrofosfátu PP _i	<i>in vivo</i>	(Nováková <i>et al.</i> , 2010)
RitR	Transkripční regulátor TC systému, exprese genů pro příjem železa a genů uplatňujících se v odpovědi na oxidativní stres	<i>in vitro</i>	(Ulijasz <i>et al.</i> , 2004)
RR06	Regulační protein TC systému HK06/RR06, regulace exprese adhezinu CbpA	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	(Agarwal <i>et al.</i> , 2012)

Tabulka č.2: Substráty Ser/Thr proteinkinázy StkP. Tabulka znázorňuje přehled doposud identifikovaných substrátů Ser/Thr proteinkinázy StkP. V tabulce je posána jejich funkce a uveden způsob detekce fosforylovaného substrátu *in vivo*, *in vitro*, nebo obojí. (Vlastní zpracování)

GlmM

V práci Novákové *et al.* (2005) byl srovnáním dvou fosfoproteomů identifikován jako substrát proteinkinázy StkP *in vivo* protein fosfoglukozaminmutáza GlmM. Přímá fosforylace GlmM proteinu byla následně potvrzena *in vitro* kinázovou reakcí (Nováková *et al.*, 2005). GlmM katalyzuje přeměnu glukozamin-6-fosfátu na glukozamin-1-P, čímž hraje nepostradatelnou roli v prvních fázích biosyntézy UDP-N-acetylglukozaminu. Vytvořený UDP-N-acetylglukozamin se následně účastní tvorby peptidoglykanu, lipopolysacharidů a teichoových kyselin (Mengin-Lecreulx & van Heijenoort, 1996).

RitR

Dalším popsaným substrátem proteinkinázy StkP je protein RR486. Protein RR486, který byl později pojmenován RitR (repressor of iron transport), je sirotčí transkripční regulátor, postrádající příslušnou membránově vázanou senzorovou proteinkinázu. RitR reguluje expresi genů pro příjem železa a genů uplatňujících se v odpovědi na oxidativní stres (Ulijasz *et al.*, 2004). Fosforylace proteinkinázou StkP byla u RitR proteinu potvrzena pouze *in vitro* (Ulijasz *et al.*, 2009).

LocZ (MapZ)

V práci Novákové *et al.* (2010) byl jako substrát proteinkinázy StkP popsán v *in vivo* podmínkách hypotetický membránový protein Spr0334. Ten byl později nazván v práci Holečková (2014) jako LocZ (Localizing at midcell of FtsZ) či v práci Fleurie (2014) jako

MapZ (mid-cell-anchored protein Z). Fluorescenční mikroskopie LocZ proteinu fúzovaného s fluorescenční značkou GFP (GFP-LocZ) ukázala, že je LocZ lokalizován do buněčné přepážky (Fleurie *et al.*, 2014, Holečková *et al.*, 2014) a pro jeho lokalizaci do buněčného septa je nezbytná jeho C-koncová extracelulární doména, zatímco pro jeho funkci je nezbytná jak C, tak i N-koncová doména (Fleurie *et al.*, 2014). LocZ určuje v buňce správný úhel dělicí roviny (van Raaphorst *et al.*, 2017). V počátcích buněčného cyklu je LocZ lokalizován do středu buňky, s prodlužováním buňky dochází k rozdělení kruhu LocZ na dva od sebe se vzdalující kruhy (Holečková *et al.*, 2014, van Raaphorst *et al.*, 2017), zatímco třetí kruh, který byl pozorován pouze v práci Fleurie *et al.* (2014) v kmeni R800, zůstává ve středu buňky. Pomocí ko-imunoprecipitace bylo zjištěno, že LocZ/MapZ interaguje skrze C-koncovou doménu s FtsZ (Fleurie *et al.*, 2014). Proteiny homologní k proteinu LocZ *S. pneumoniae* byly nalezeny pouze u streptokoků, enterokoků a laktokoků (Holečková *et al.*, 2014).

PpaC

Dalším identifikovaným substrátem v práci Novákové (2010) je mangan-dependentní anorganická pyrofosfatáza PpaC. PpaC patří do skupiny esenciálních enzymů zvaných pyrofosfatázy, které se uplatňují v celé řadě biosyntetických reakcí, kde katalyzují hydrolýzu anorganického pyrofosfátu PP_i a dále se účastní virulence (Rajagopal *et al.*, 2003). PpaC byla u pneumokoka prokázána jako substrát proteinkinázy StkP pouze *in vivo*, *in vitro* se to prokázat nepodařilo, což může být nejspíš způsobeno nedostatečnou specifitou reakčních podmínek, či chybějícími interakcemi s dalšími partnery (Nováková *et al.*, 2010).

DivIVA

Další proteinem fosforylovaným *in vivo* i *in vitro* popsáným ve stejné práci je protein DivIVA (Nováková *et al.*, 2010). DivIVA, studovaný především u *B. subtilis*, spolu s proteiny MinCD systému určuje střed buňky. Min systém zabraňuje vzniku buněčného septa na pólech buňky a směřuje vytvoření buněčné přepážky do buněčného středu. Celý tento proces je kontrolován DivIVA (Marston & Errington, 1999). Lokalizace proteinu DivIVA u *S. pneumoniae* byla určena pomocí imunofluorescenční mikroskopie. DivIVA lokalizuje v místě buněčné přepážky a na pólech buňky, kde interaguje s celou řadou dalších proteinů uplatňujících se v procesu dělení (Fadda *et al.*, 2007). DivIVA je zároveň nezbytný pro správnou lokalizaci elongasomu v negativně zakřivené oblasti membrány mezi laterální a septální částí buněčné stěny (Straume *et al.*, 2017). Delece DivIVA vede k vytvoření řetízků neoddělených buněk s neúplnými septy často bez nukleoidu (Fadda *et al.*, 2003). Tato

skutečnost naznačuje, že se protein DivIVA účastní kontroly výsledné morfologie buňky a hraje roli v segregaci chromozomů, ve finálním procesu buněčného dělení a následné separaci buněk.

FtsZ

Další protein, který byl identifikován jako fosforylovaný *in vitro*, je protein FtsZ. Cytoskeletální protein FtsZ tvoří kruhovou strukturu uprostřed buňky, tzv. Z-kruh, který slouží zároveň jako kostra pro upevnění dalších proteinů, uplatňujících se ve tvorbě buněčné přepážky (Giefing *et al.*, 2010). Mechanismus kooperativního sestavení Z-kruhu je závislý na aktivitě GTPázy (Salvarelli *et al.*, 2015).

FtsA

O dva roky později byla prokázána *in vitro* fosforylace proteinu FtsA. FtsA je řazen k proteinům rané fáze tvorby buněčného septa, kde lokalizuje spolu s proteinem FtsZ (Beilharz *et al.*, 2012). FtsA protein je esenciální v *Escherichia coli*, kde jeho inaktivace způsobuje filamentární růst. Esencialita FtsA proteinu byla potvrzena i u *S. pneumoniae*, zde se ale projevuje delokalizací Z-kruhu a inhibicí septace s následnou lýzí buňky (Mura *et al.*, 2017). Naproti tomu u bakterie *Bacillus subtilis* je tento protein neesenciální (Beall & Lutkenhaus, 1992).

RR06

Signalizační pár StkP/PhpP může také interagovat s dvousložkovým systémem přímou fosforylací transkripčního regulátoru, kde jako příklad může být uvedena regulace TCS systému HK06/RR06, který hraje roli v regulaci exprese hlavního pneumokokového adhezínu CbpA (Pinas *et al.*, 2018). CbpA protein patří mezi hlavní adhezivní proteiny uplatňující se v patogenezi *S. pneumoniae*. Fosforylace regulačního proteinu RR06 proteinkinázou StkP byla prokázána *in vivo* a *in vitro* v práci Agarwal *et al.* (2012).

MurC

O rok později byl popsán další protein fosforylovaný *in vitro* proteinkinázou StkP zvaný UDP-N-acetylmuramoyl: L-alaninová ligáza MurC, patřící do skupiny Mur ligáz katalyzujících tvorbu prekurzorů PG (Falk & Weisblum, 2013). Protein MurC zde katalyzuje navázání L-alaninu k laktátovému zbytku UDP-N-acetylmuramové kyseliny (Smith, 2006).

KhpB (EloR/Jag)

Dalším substrátem proteinkinázy StkP fosforylovaným *in vivo* je protein buněčného dělení Spr1851, později pojmenovaný KhpB (EloR/Jag), patřící do proteinové rodiny nazývané

Jag (Jag=spoIIIJ asociovaný gen) (Ulrych *et al.*, 2016, Stamsas *et al.*, 2017, Zheng *et al.*, 2017). KhpB protein stimuluje syntézu periferního PG, vedoucí k prodlužování buňky (Stamsas *et al.*, 2017). Kmeny s delecí KhpB ($\Delta khpB$) tvoří v porovnání s WT buňky kratší (Ulrych *et al.*, 2016, Stamsas *et al.*, 2017, Zheng *et al.*, 2017). Zároveň obsahuje tento protein dvě specifické domény homologní k doménám KH a R3H. Tyto domény jsou schopné vázat jednovláknovou DNA nebo RNA, a tím regulovat genovou expresi na transkripční a post-transkripční úrovni. V práci Zheng *et al.* (2017) byla popsána interakce proteinu KhpB s dalším RNA vazebným proteinem KhpA. Heterodimér KhpB/KhpA reguluje na post-transkripční úrovni celkové množství FtsA v buňce. Studium interakčního páru KhpA/KhpB ukázalo, že tyto RNA vazebné proteiny nesehrávají roli pouze v regulaci FtsA, ale i v regulaci jiných proteinů. Pravděpodobně je tedy KhpA/KhpB všeobecným regulátorem buněčného dělení, podobně jako Hfq chaperony u gramnegativních bakterií (Zheng *et al.*, 2017).

MacP

Jedním z nově popsaných substrátů proteinkinázy StkP fosforylovaných *in vivo* je kofaktor proteinu PBP2a protein MacP (membrane-anchored cofactor of PBP2a). MacP je lokalizován do buněčné přepážky, kde s PBP2a vytváří komplex PBP2a-MacP. Zároveň je MacP substrátem StkP. Regulace syntetázové aktivity PBP2a je zprostředkována proteinkinázou StkP skrze fosforylaci aktivátoru MacP. MacP je tak doposud jediným známým substrátem proteinkinázy StkP propojujícím kontrolu buněčné morfogeneze s aktivitou proteinů syntetizujících PG (Fenton *et al.*, 2018).

ComE

Nejnovějším popsaným substrátem proteinkinázy StkP fosforylovaných *in vitro* i *in vivo* je protein ComE. Regulační protein ComE tvoří jednu ze složek dvousložkového systému ComD/ComE. ComD histidinová kináza fosforyluje ComE na aspartátovém zbytku, což vede ke konformační změně ComE s následným navázáním do promotorové oblasti genů kompetence. V acidickém prostředí je ComE regulátor fosforylován na threoninovém zbytku proteinkinázou StkP. Fosforylovaný ComE reguluje expresi 104 genů zahrnutých v různých buněčných procesech, jako je oxidativní stresová odpověď nebo H₂O₂ produkce. StkP/ComE tak tvoří alternativní cestu regulace uplatňující se v odpovědi na acidický stres (Pinas *et al.*, 2018).

3 Cíle diplomové práce

1. Vytvořit mutantní kmen $\Delta spr0175$ na R6, Rx a D39 genetickém pozadí kmenů R6, Rx a D39a charakterizovat jeho morfologické a růstové vlastnosti.
2. Prokázat fosforylaci proteinu Spr0175 proteinkinázou StkP v podmínkách *in vitro* a *in vivo*.
3. Připravit fosfoablativní formy proteinu Spr0175 T4A a T7A a potvrdit místo fosforylace proteinkinázou StkP v podmínkách *in vitro* a *in vivo*.
4. Vytvořit komplementační kmen a porovnat jeho fenotypový projev ve srovnání s divokým kmenem a mutantním kmenem $\Delta spr0175$.
5. Připravit kmen *S. pneumoniae* exprimující fúzní protein GFP-Spr0175 a určit místo lokalizace proteinu v buňce.

4 Materiál a metodika

4.1 Materiály

4.1.1 Bakteriální kmeny

V tabulce č. 3 a 4 jsou uvedeny veškeré použité kmeny *S. pneumoniae* a *E. coli*. Kmeny byly uchovávány v - 80 °C v 15 % glycerolu. OD₆₀₀ skladovaných kmenů byla 0,3-0,4.

Escherichia coli

Kmen	Genotyp	Fenotyp	Použití	Zdroj
<i>E. coli</i> DH5α	fhuA2 Δ(argFlacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1relA1 endA1 thi-1 hsdR17		Kompetentní buňky použité pro konstrukci plasmidů	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F', ompT, hsdS _B , (mB ⁻ , rB ⁻), dcm, gal, λ(DE3)		Expresní buňky použité pro nadprodukcí proteinu, kmen nesoucí profág O s genem pro T7 polymerázu	Novagen®

Tabulka č.3: Seznam bakteriálních kmenů *E. coli*.

Streptococcus pneumoniae

Kmen	Genotyp	Fenotyp	Použití	Zdroj
Sp1	<i>Rx derivate</i> ; <i>str1</i> , <i>hexA</i>	StrR	Výchozí nevirulentní kmen, použit také jako kontrolní	(Morrison <i>et al.</i> , 1984)
Sp208	<i>R6</i>	R6 neopouzdrěný kmen divokého typu, StrS	Výchozí nevirulentní kmen, použit také jako kontrolní	(Ottolenghi & Hotchkiss, 1962), poskytl Dr. M. Oggioni (Univerzita Siena, Itálie)
Sp339	<i>D39 (NCTC) cps2A cps2H rpsL41 rpsL+</i>	Stabilní neopouzdrěný kmen D39 (NCTC)	Výchozí nevirulentní kmen	(Lanie <i>et al.</i> , 2007), poskytl Dr. Malcolm Winkler, PhD (Univerzita Bloomington, Indiana, USA)

Tabulka č.4: Seznam bakteriálních kmenů *S. pneumoniae*

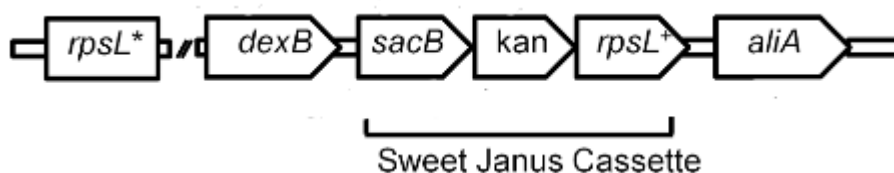
4.1.2 Použité vektory a deleční kazety

pJWV25 je plasmidový vektor o velikosti 8587 pb sloužící k integraci námi zkoumaných genů do postradatelného *bga* lokusu na chromozomu *S. pneumoniae*. K jeho vložení dochází v procesu zvaném homologní rekombinace skrze sekvenci *gatC* a *bgaA*. Vektor pJWV25 obsahuje také gen *tetM*, udělující tetracyklinovou rezistenci k selekci pozitivních klonů *S. pneumoniae* a gen *bla* udělující rezistenci k ampicilinu pro selekci pozitivních klonů *E. coli*. Dále tento vektor obsahuje gen kódující zelený fluorescenční protein GFP (Green Fluorescent protein) sloužící pro N-koncové fúze exprimovaných proteinů. Exprese GFP je kontrolována prostřednictvím zinkem indukovatelného promotoru pZn (Eberhardt *et al.*, 2009). Vektor pJWV25 sloužil v této práci k přípravě kmenů **Sp454** (Rx, Δ *spr0175 bga::pZn-gfp-spr0175*) a **Sp455** (Rx, *bga::pZn-gfp-spr0175*) exprimujících protein Spr0175 fúzovaný s GFP a k přípravě z něj odvozeného vektoru pZn-Spr0175-FLAG.

pETPhos je expresní vektor sloužící k charakterizaci serinových, threoninových a tyrozinových proteinových kináz a jejich substrátů. Tento vektor byl navržen k expresi proteinů fúzovaných na N-konci s histidinovým epitopem. Výhodou tohoto vektoru je nepřítomnost serinových a threoninových zbytků ve fúzní značce, zamezující tak vzniku nespécifického fosforylačního signálu (Canova *et al.*, 2008). V předložené práci byl tento vektor použit pro přípravu expresního kmene Ec387 (*E. coli* Bl21; *pETPhos0175*) vytvořeného za účelem *in vitro* průkazu fosforylace proteinu Spr0175 proteinkinázou StkP.

pET42b je jedním z vektorů systému pET vyvinutých pro klonování a expresi rekombinantních proteinů v bakterii *E. coli*. Vektor pET42b systému pET byl primárně připraven k GST (Glutathion-S-Transferáza) fúzím cílových genů (Smith & Johnson, 1988). Jednou z variant je také klonování těchto genů do vektoru pET42b pomocí restrikčního místa *NdeI*. V sekvenci pET42b se nachází také gen kódující rezistenci ke kanamycinu, T7 laktózový promotor, *lacI* laktózový represor, *lac* operační místo, replikační počátek bakteriofága f1 a histidinová kotva umožňující detekci exprimovaných proteinů. V předkládané diplomové práci byl gen *spr0175* do tohoto vektoru klonován pomocí míst rozeznávaných restrikčními endonukleázami *NdeI/XhoI*. Indukce exprese proteinu Spr0175-His byla navozena přidávkem induktoru IPTG. IPTG je syntetický analog laktózy, tato molekula je schopna alostericky modifikovat laktózový represor *lacI*, čímž způsobí jeho uvolnění z *lac* operačního místa. Uvolnění laktózového represoru z *lac* operačního místa následně vede k přepisu genů *lac* operonu (Dubendorff & Studier, 1991).

Sweet Janus kazeta (SJK), jenž je rozšířením kazety Janus, slouží jako nástroj pro delecí vybraného genu v pneumokokovi skrze pozitivní a negativní selekční marker. Původní Janus kazeta obsahovala gen *kan* udělující rezistenci ke kanamycinu (Km^r) a *rpsL*⁺ marker kódující protein S12 malé ribozomální podjednotky se záměnou lyzinu za threonin v aminokyselinové sekvenci, který uděluje dominantní citlivost ke streptomycinu (Sm^s). Nicméně při použití Janus kazety dochází s frekvencí 10^{-5} až 10^{-3} ke spontánní konverzi *rpsL*⁺ na Sm^r *rpsL* alelu, vedoucí k falešné pozitivitě během negativní selekce. Ke zvýšení účinnosti selekce byl k této kazetě přidán další selekční marker gen *sacB* z bakterie *Bacillus subtilis*, čímž došlo k vytvoření již zmíněné Sweet Janus kazety (Obrázek č.5). Tento gen kóduje enzym levansukrázu, jenž přeměňuje sacharózu na vysoko-molekulární fruktózové polymery. Exprese genu *sacB* vede k usmrcení buňky v přítomnosti sacharózy. Proto gen *sacB* představuje další negativní selekční marker, kde konverze obou markerů SacB a *rpsL*⁺ je pravděpodobná pouze s frekvencí 10^{-9} (Li *et al.*, 2014).



Obrázek č.5: Sweet Janus kazeta. Na obrázku je vyobrazena SJK se dvěma negativními selekčními markery *sacB* a *rpsL*⁺ a s jedním pozitivním selekčním markerem *kan*. SJK byla konstruována v pneumokokovi v *cps* lokusu, který je lemován genem *dexB*, který kóduje glukán 1,6 alfa glukosidázu a genem *aliA*, který kóduje oligopeptid-vázající protein AliA. Gen *rpsL*^{*} představuje kopii mutovaného genu Sm^r *rpsL*. Převzato a upraveno (Li *et al.*, 2014).

4.1.3 Oligonukleotidy

Seznam použitých oligonukleotidů je zobrazen v tabulce č.5. Tyto oligonukleotidy byly navrženy v programu SeqBuilder a vyrobeny firmou Sigma-Aldrich®. Jejich sekvence je v tabulce zobrazena ve směru 5'→3'.

Název	O*	Nukleotidová sekvence (5'→3')	Délka (pb)	Bližší popis
AU139	F	AAAGCCCTTGGAGTGGATAT	20	K přípravě delečního konstruktů 0175::SJK a Δ 0175
AU140	R	AATCAAACGGATCGATCCTTAA TCTAACACCCTCTTTCCTTAG	43	K přípravě delečního konstruktů 0175::SJK, komplementární k DP1
AU141	F	TACTAAACGTCCAAAAGCATAA AAAGGACAAGGAGTCGATCT	42	K přípravě delečního konstruktů 0175::SJK, komplementární k DP2
AU142	R	CAGACTACCTGCGTTTCTAA	20	K přípravě delečního konstruktů 0175::SJK a Δ 0175
AU166	R	AAGATGTTTCATATTTGCCTCC	22	K přípravě konstruktů pZn-Spr0175-FLAG
AU167	F	GGAGGCAAATATGAAACATCTT GGATTACTGAAGAAACAGTAC	44	K přípravě konstruktů pZn-Spr0175-FLAG, komplementární k AU166
AU168	R	ATTAGCGGCCGCTTACTTATCG TCGTCATCCTTGTAATCTAGAT CGACTCCTTGTCCTT	59	Příprava konstruktů pZn-Spr0175-FLAG, sekvence štěpena restričním enzymem <i>NotI</i>
AU180	F	GTCCAATTTAAAACGTACTGCT TCTTCAGTAAATCCAAGATGTT TCATA	49	Cílená mutagenese genu <i>spr0175</i>
AU181	R	TATGAAACATCTTGGATTTACT GAAGAAAGCAGTACGTTTAAAT TGGAC	49	Unikátní k sekvenci genu pZn- <i>spr0175-flag</i> , cílená mutagenese genu <i>spr0175</i>
AU182	F	CGGCCATATGGGATTTACTGAA GAAACAGTA	31	Amplifikace oblasti genu <i>spr0175</i> , sekvence štěpena restričním enzymem <i>NdeI</i>
AU183	R	CGGCGGATCCTTATAGATCGAC TCCTTGTC	31	Amplifikace oblasti genu <i>spr0175</i> , sekvence štěpena restričním enzymem <i>BamHI</i>
AU184	F	CGCGACTAGTGGATTTACTGAA GAAACAGTA	31	Amplifikace oblasti genu <i>spr0175</i> , sekvence štěpena restričním enzymem <i>SpeI</i>
AU185	R	ATTAGCGGCCGCTTATAGATCG ACTCCTTGTC	32	Amplifikace oblasti genu <i>spr0175</i> , sekvence štěpena restričním enzymem <i>NotI</i>
AU200	F	CCGCTCGAGTAGATCGACTCCT TGTCCTT	29	Amplifikace oblasti genu <i>spr0175</i> , sekvence štěpena restričním enzymem <i>XhoI</i>

AU201	R	CGGCCATATGGGATTTACTGAA GAAGCAGTA	31	Amplifikace oblasti genu <i>spr0175</i> , sekvence štěpena restričním enzymem <i>NdeI</i>
AU205	F	AAGGAGATATACATATGGGATT TGCTGAAGAAGCAGTACGTTTT AAA	47	Cílená mutagenese genu <i>spr0175</i>
AU206	R	TTTAAAACGTACTGCTTCTTCA GCAAATCCCATATGTATATCTC CTT	47	Cílená mutagenese genu <i>spr0175</i>
DP1	F	TTAAGGATCGATCCGTTTGATT	22	Amplifikace SJK
DP2	R	TTATGCTTTTGGACGTTTAGTA	22	Amplifikace SJK
LN123	F	TTCGCTACTTGGAGCCACTAT	21	Příprava konstruktů pZn-Spr0175- FLAG
LN142	R	AGGACAAGAGTTTTTCTTTGG	21	K ověření integrace vektorů odvozených od pJWV25 do lokusu <i>bga</i> chromozomu <i>S. pneumoniae</i>
LN143	R	GTTACGTTGATTTTCATCACC	20	K ověření integrace konstruktů do lokusu <i>bga</i> na plasmidu pJWV25
LN164	F	GAATTATTGCGATTACTATCA	21	Sekvence unikátní k promotoru pZn
LN281	F	AGCCAGCATCGTTTCGTC	18	K ověření integrace 0175::SJK do chromozomu <i>S. pneumoniae</i>
LN282	R	CCTTCCCATTCTGGGA	18	K ověření integrace 0175::SJK do chromozomu <i>S. pneumoniae</i>
LN283	R	ATCGACTCCTTGTCCTTTGAGT CTAACACCCTTTTCCTTAG	42	K amplifikaci oblasti nacházející se před genem <i>spr0175</i> , komplementární k sekvenci před genem <i>spr0175</i> ve směru transkripce
LN284	F	ATTCTAAGGAAAGAGGGTGTTA GACTCAAAGGACAAGGAGTCG A	44	K amplifikaci oblasti nacházející se za genem <i>spr0175</i> , komplementární k sekvenci za genem <i>spr0175</i> ve směru transkripce

Tabulka č.5: Seznam použitých oligonukleotidů. Červeně jsou zobrazeny komplementární sekvence. Modře místa rozeznávané restričními enzymy, fialově je zobrazena sekvence FLAG-epitopu, zeleně je zobrazena bodová mutace s výslednou záměnou T7A a žlutě je v sekvenci zobrazena bodová mutace s výslednou záměnou T4A. O* představuje orientaci oligonukleotidu „F“ ve směru transkripce a „R“ proti směru transkripce.

4.1.4 Chemikálie

V tabulce č.6 jsou uvedeny použité chemikálie. Veškeré chemikálie obsahují analytickou čistotu a jsou seřazeny v abecedním pořadí. Sloupec Vzorec/Zkratka uvádí označení chemikálií dále používané v textu.

Název	Firma	Vzorec/Zkratka	Použití
1,4-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich®	dTT	V kinázové reakci <i>in vitro</i>
2'- deoxyadenosin -5'- trifosfát	Promega	dATP	PCR nukleotidy
2'- deoxythymidin -5'- trifosfát	Promega	dTTP	PCR nukleotidy
2'- deoxycytidin -5'- trifosfát	Promega	dCTP	PCR nukleotidy
2'- deoxyguanosin -5'- trifosfát	Promega	dGTP	PCR nukleotidy
Agaróza	Sevac		K přípravě DNA agarózového gelu
Akrylamid	Sigma-Aldrich®		K přípravě gelu na 1D SDS PAGE
ATP solution	Sigma-Aldrich®	ATP	V kinázové reakci <i>in vitro</i>
Amidová čern	Lachema		K přípravě roztoku amidové černě
Ampicilin	Sigma	Amp	K přípravě selekčních médií
Anti-FLAG® M2 Magnetic Beads	Sigma-Aldrich®		K purifikaci proteinů s Flagovou kotvou
Bacto agar	Oxoid		K přípravě pevných půd na kultivaci
Bromfenolová modř	Lachema	BPB	K přípravě vzorkového pufru
Casiton	BD company		K přípravě gelózy
Complete™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche		Inhibitor proteáz na izolaci proteinů
Kompetenci stimulující peptid	Biopharm	CSP	K indukci kompetence během transformací
Deoxycholát sodný	Merck	DCNa	K přípravě DCNa-SDS na izolaci chDNA a k přípravě SEDS
Dihydrogen fosforečnan draselný	Lach-Ner	KH ₂ PO ₄	K přípravě PBS
Dihydrogen fosforečnan sodný	Lach-Ner	NaH ₂ PO ₄	K přípravě roztoků na purifikaci proteinů s Flagovou kotvou
Dodecylsulfát sodný	Serva	SDS	K přípravě roztoků na izolaci DNA a roztoků k přípravě 1D SDS-PAGE
D-glukóza	Lachema		K přípravě médií pro kultivaci
Ethanol	Lachema	EtOH	K izolaci chDNA
Ethylendiamintetraoctová kyselina	Sigma-Aldrich®	EDTA	K přípravě SEDS a pufru TAE, kinázová reakce <i>in vitro</i>

Fenol	Sigma-Aldrich®		K přípravě fenol/chloroformových směsí na izolaci chDNA
Gel Loading Dye Purple 6x	New England Biolabs		K přípravě vzorků na DNA elektroforézu
Gel Red Nucleic Acid Stain	Biotium		K vizualizaci DNA na agarózovém gelu
Glycerol	Lach-Ner		K přípravě konzerv/prekonzerv a vzorkového pufru
Glycin	Serva	Gly	K přípravě pufru na blotování a elektroforézu
Heptahydrát hydrogen fosforečnanu sodného	Lach-Ner	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	K přípravě PBS
Hovězí sérový albumin, frakce V	Carl Roth®	BSA	K přípravě blokovačích roztoků a roztoků protilátek
Chlorid draselný	Serva	KCl	K přípravě PBS
Chlorid sodný	Lach-Ner	NaCl	K přípravě TBS-T, TBS, SEDS, dezintegračního pufru a gelózy, složka kinázové reakce <i>in vitro</i> , příprava pufrů na purifikaci proteinů s Flagovou kotvou
Chlorid manganatý	Sigma-Aldrich®	MnCl ₂	V kinázové reakci <i>in vitro</i>
Chlorid vápenatý	Sigma-Aldrich®	CaCl ₂	K přípravě kompetenčního média TSB
Chloroform	Lach-Ner		K izolaci chDNA a přípravě fenol/chloroformové směsi
Imidazol	Sigma-Aldrich®		K přípravě roztoků na purifikaci proteinů s Flagovou kotvou
Izopropanol	Lach-Ner		K izolaci chDNA
Izopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosidáza	Sigma-Aldrich®	IPTG	K indukci vektrom pETPhos0175
Kanamycin	Sigma-Aldrich®	Kan	K přípravě selekčních médií
Kvasinkový extrakt	Oxoid		K přípravě LB média
Kyselina chlorovodíková	Sigma-Aldrich®	HCl	K přípravě TE pufru a SEDS
Kyselina octová	Lach-Ner		K přípravě amidové černě
β-merkapt ethanol	Sigma-Aldrich®		K přípravě vzorkového pufru

Methanol	BDH Prolabo Chemicals	MetOH	K přípravě pufru na blotování
Ni-NTA agarose	Qiagen		K purifikaci proteinů s Flagovou kotvou
Neopepton	Dufci		K přípravě gelózy
Octan Sodný	Sigma-Aldrich®	CH ₃ COONa	K izolaci chDNA
Peroxosíran amonný	Lachema	APS	K přípravě gelu na 1D SDS- PAGE
Síran zinečnatý	Sigma-Aldrich®	ZnSO ₄	K indukci exprese proteinu Spr0175
Tetracyklin	USB	Tet	K přípravě selekčních médií
Tetramethyldiamid	Serva	TEMED	K přípravě polyakrylamidového gelu
Tris-hydroxymethyl- aminomethan	Sigma-Aldrich®	Tris-base	K přípravě gelózy
Tris-hydroxymethyl- aminomethan hydrochlorid	Sigma-Aldrich®	Tris-HCl	K přípravě SEDS, pufru TE a TBS, složka kinázová reakce <i>in vitro</i>
Tryptone	Oxoid		K přípravě LB média
Tween 20	Sigma-Aldrich®		K přípravě TBS-T, složka reakční směsi na koloniovou PCR

Tabulka č.6: Seznam použitých chemikálií.

4.1.5 Kultivační půdy a média

Kultivace *S. pneumoniae*

S. pneumoniae byl kultivován staticky při 37 °C v tekutém nebo pevném médiu. Následující tabulka č.7 shrnuje jednotlivé přídavky použité na výrobu 1 l média. Celkového objemu bylo dosaženo přidáním destilované vody. Při přípravě pevných půd byl do média přidán 1,5 % agar. Selekční média vznikly přidáním 15 % sacharózy nebo příslušného ATB do média při 45 °C. Koncentrace jednotlivých použitých ATB pro selekci *S. pneumoniae* je uvedena následovně: kanamycin (200 µg/ml) a tetracyklin (2,5 µg/ml). Na závěr bylo médium sterilizováno v autoklávu.

TSB médium (Oxoid)	30 g TSB (Tryptic soy broth)
Kompetenční médium TSB	TSB médium + 10 ml 0,1mM CaCl ₂ , 25 ml 8 % BSA, výsledné pH 8
Krevní agar (LabMediaServis)	Columbia agar s přidavkem 5 % defibrilované beraní krve
Gelóza	Glukóza (1 g), NaCl (5 g), neopepton (5 g), Tris-base (1,25 g), casiton (10 g), agar (10 g)

Tabulka č.7: Seznam použitých kultivačních pūd *S. pneumoniae*.

Kultivace *E. coli*

E. coli byla kultivována v tekutém médiu za aerobních podmínek při 37 °C za stálého třepání. Kultivace probíhala v LB médiu, jehož složení uvádí následující tabulka č.8. Jednotlivé složky média byly doplněny destilovanou vodou na výsledný objem 1 l a takto připravené médium sterilizováno v autoklávu. Příprava selekčního média se uskutečnila přidáním příslušného ATB ze zásobního roztoku na finální koncentraci: kanamycin (25 µg/ml) nebo ampicilin (100 µg/ml).

LB médium	NaCl (10 g), kvasinkový extrakt (5 g), tryptone (10 g), výsledné pH 7,5
-----------	---

Tabulka č.8: Seznam použitých kultivačních pūd *E. coli*.

4.1.6 Použité roztoky a pufry

Agarózový gel k přípravě mikroskopických preparátů

90 mg agarózy bylo povařením rozpuštěno v 9 ml PBS pufru (tabulka č.9) za vzniku 1 % agarózy v PBS.

PBS pufr o objemu 1 l	NaCl (8 g), KCl (0,2 g), Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O (2,68 g), KH ₂ PO ₄ (0,24 g), výsledné pH 7,4
-----------------------	--

Tabulka č.9: Příprava PBS pufru

DNA agarózový gel

Agaróza byla povařením rozpuštěna v TAE pufru (tabulka č.10) dle požadované koncentrace.

TAE pufr	40 mM Tris, 2 mM EDTA, výsledné pH 8,5
----------	--

Tabulka č.10: Příprava TAE pufru

Izolace chDNA u *S. pneumoniae*

DCNa-SDS	0,25 % SDS, 0,5 % deoxycholát sodný
NaCl-EDTA	150 mM NaCl, 30 mM EDTA, výsledné pH 8,0
SEDS NaCl-EDTA	1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, DCNa-SDS (24:1), výsledné pH 8,0
TE pufr	1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, výsledné pH 8,0

Tabulka č.11: Příprava roztoků a pufrů pro izolaci chDNA *S. pneumoniae*.

Purifikace proteinů s Flagovou kotvou pomocí Anti-FLAG značených magnetických kuliček

TBS pufr	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, výsledné pH 7,4
SDS pufr 2x	125 mM Tris-HCl, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0,004 % bromfenolová modř, výsledné pH 6,8

Tabulka č.12: Příprava roztoků a pufrů pro purifikaci proteinů s FLAG kotvou pomocí Anti-FLAG značených magnetických kuliček.

Purifikace proteinů s histidinovou značkou pomocí NI-NTA agarózy

Lyzační pufr	50 mM Na ₂ H ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, výsledné pH 8
Promývací pufr	50 mM Na ₂ H ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, výsledné pH 8
Eluční pufr	50 mM Na ₂ H ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, výsledné pH 8
Dialyzační roztok	25 mM Tris, 100 mM NaCl, výsledné pH 7,5

Tabulka č.13: Příprava roztoků a pufrů pro purifikaci proteinů s histidinovou kotvou pomocí NI-NTA agarózy.

Přenos proteinů na membránu a imunodetekce

Amidová čern	40 % metanol, 10 % kyselina octová, 0,1 % amidová čern
Blokovací pufr	5 % BSA, TBS-T pufr
Blotovací pufr	48 mM Tris, 39 mM glycin, 0,0375 % SDS, 20 % methanol
Dezintegrační pufr	10 mM Tris, 100mM NaCl, výsledné pH 7,5
Roztok TBS-T	0,05 % Tween-20, 137mM NaCl, 20mM Tris, výsledné pH 7,6

Tabulka č.14: Příprava roztoků a pufrů pro přenos proteinů na membránu s následnou imunodetekcí.

SDS-PAGE gel

Dělicí gel o objemu 20 ml	15 %
30 % akrylamid	10 ml
1,5M Tris pH 8,8	5 ml
10 % SDS	200 µl
10 % APS	200 µl
TEMED	20 µl
H ₂ O	4,6 ml
Zaostřovací gel o objemu 6 ml	4 %
30 % akrylamid	800 µl
0,5M Tris pH 6,8	1,5 ml
10 % SDS	60 µl
10 % APS	60 µl
TEMED	7,5 µl
H ₂ O	3,6 ml

Tabulka č.15: Příprava SDS-PAGE gelu.

SDS-PAGE elektroforéza

Elektroforetický pufr	0,025 mM Tris, 0,192 M glycin, 0,1 % SDS, výsledné pH 8,3
SDS pufr 5x	15 % SDS, 20% glycerol, 25 % β -merkptoethanol, bromfenolová modř, 350 mM Tris, výsledné pH 6,8

Tabulka č.16: Příprava roztoků a pufrů pro SDS-PAGE elektroforézu.

4.1.7 Enzymy

V tabulce č.17 a 18 jsou uvedeny použité modifikační a restrikční enzymy. Reakční podmínky u všech enzymů byly nastaveny dle doporučení výrobce.

Modifikační enzymy	
Enzym	Firma
Benzonáza	Merck
Pfu ultra HF DNA polymeráza	Agilent
Phusion polymeráza	New England Biolabs
Proteináza K	Roche
Purple Taq polymeráza	Top Bio
T4 DNA ligáza	Fermentas

Tabulka č.17: Seznam modifikačních enzymů

Restrikční enzymy		
Enzym	Firma	Zásahové místo
<i>Bam</i> HI	New England BioLabs	G/GATCC
<i>Dpn</i> I	New England BioLabs	GA/TC
<i>Eco</i> RI-HF	New England BioLabs	G/AATTC
<i>Nde</i> I	New England BioLabs	CA/TATG
<i>Not</i> I-HF	New England BioLabs	GC/GGCCGC
<i>Pvu</i> I-HF	New England BioLabs	CGAT/CG
<i>Spe</i> I-HF	New England BioLabs	A/CTAGT
<i>Xho</i> I	New England BioLabs	C/TCGAG

Tabulka č.18: Seznam použitých restrikčních enzymů.

4.1.8 Použité laboratorní přístroje

Centrifugy:

- Centrifuge 5417C
- UNIVERSAL 320 R (Hettich®)

Cyklery:

- BIOER (GenePro)
- Mastercycler gradient (Eppendorf)

Elektroforézy:

- ATTO (Atto)
- OWL EASYCAST™ B1A (ThermoScientific)

Spektrofotometry:

- DU-730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer (Beckman Coulter)
- Evolution™ 201/220 UV-Visible Spectrophotometer (Thermo Scientific)
- NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific)
- Prim'Light (Secomam)

Váhy:

- Sartorius-laboratory (Sartorius)
- Sartorius-handy (Sartorius)

Vodní lázně:

- Julabo 7A, 5M, U3 (Julabo)

Ostatní přístroje:

- Dezintegrátor buněk: FastPrep FP120 (ThermoSavant)
- Dokumentace agarózových gelů: G:Box Chemi XRQ instrument (SynGene)
- Dokumentace mikroskopických snímků: Olympus FV2T Digital B/W Fireware Camera (Olympus)
- Mikroskop: Olympus CellR IX 81 microscope (Olympus)
- Magnetická míchačka (ThermoScientific)
- Třepačka: Innova®42 – Incubator Shakers Series (New Brunswick Scientific)
- Kývačka: ProBlot™ Rocker 25 (Labnet)

- Rotátor: Bio RS-24, Mini-rotator (Biosan)
- Suchý termostatovaný blok: ThermoStat Plus (Eppendorf)
- Vortex: VX-200 Lab Vortexer Vortex Mixer (Labnet)
- Zářizní pro Western Blot: GEL BOX, VERTICAL BLOTTER (Labnet)

4.1.9 Použité laboratorní programy a softwary

Program/Software	Použití
CellR Version 2.0 software	Software pro vizualizaci obrazu z kamery FV2T Digital B/W
DNA STAR Lasergene, verze 8.1	Program k sestavování genetických map
GraphPad Prism, verze 3.0.	Program umožňující statistickou analýzu velikosti buněk, přípravu grafů
ImageJ	Program k úpravě obrázků
MicrobeTrackerSuite, verze 0.937	Program k měření velikosti buněk
Quantity One software, verze 4.6.3 (Bio-Rad)	Software pro analýzu signálu imunodetekcí

Tabulka č.19: Seznam použitých laboratorních programů a softwarů.

4.1.10 Použité standardy a komerční soupravy

Komerční soupravy/Standardy	Použití
Amersham™ Protran® Premium 0.45 NC nitrocellulose Western blotting membrane	Membrána sloužící k přenosu proteinů z polyakrylamidového gelu
Min Elute™ Reaction Cleanup Kit (Qiagen)	Kit k přečištění fragmentů DNA po proběhlé PCR reakci
Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)	Stanovení koncentrace proteinů
QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen)	Kit k izolaci DNA z agarózového gelu
QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen)	Kit k izolaci plasmidové DNA
QuikChange® II SiteDirected Mutagenesis Kit (Stratagene)	Místně specifická mutagenese
WesternBright ECL HRP substrate (Advansta)	Substrát k vyvolání chemiluminiscenčního signálu při imunodetekci
WesternBright Sirius HRP substrate (Advansta)	Substrát k vyvolání chemiluminiscenčního signálu při imunodetekci
Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England BioLabs)	Proteinový standard (11-245 kDa)
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)	DNA standard (75-20000 pb)

Tabulka č.20: Seznam použitých standardů a komerčních sad.

4.1.11 Použité protilátky

Protilátka	Firma	Typ protilátky	Ředění	Použití
Anti-FLAG F7425	Sigma-Aldrich®.	Primární	1:10 000	Králičí protilátka proti FLAG-epitopu
Anti-GFP	Santa Cruz Biotechnology		1:10 000	Monoklonální myší protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou proti GFP
Anti-His A7058	Sigma-Aldrich®.		1:25 000	Monoklonální myší protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou proti poly-His
Anti-P-Thr	Cell Signalling Technology	Primární	1:50 000	Polyklonální králičí protilátka proti P-Thr
Anti-Rabbit IgG-PEROXIDASE A0545	Sigma-Aldrich®.	Sekundární	1:5000	Protilátka proti králičímu IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou

Tabulka č.21: Seznam použitých protilátek.

4.2 Metody

4.2.1 Manipulace s DNA

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce sloužila k ověření modifikace genomu připravovaných kmenů a k amplifikaci fragmentů při konstrukci plasmidů. Oligonukleotidy použité v reakci byly navrženy v programu SeqBuilder (Lasergene) a připraveny firmou Sigma-Aldrich®. Seznam těchto oligonukleotidů je uveden v tabulce č. 5, zároveň je u každého z nich uvedena jeho bližší specifikace. Polymerázy použité v této reakci byly dvojího typu. Pro kontrolní PCR reakce sloužící k ověření správnosti připravovaných konstruktů byla použita Purple Taq polymeráza (Top Bio). Tato polymeráza není schopna opravovat chyby vzniklé při amplifikaci DNA, výhodou je však její vysoká enzymatická aktivita a nízká cena. Polymerázy Pfu ultra HF DNA polymeráza (Agilent) a Phusion polymeráza (New England Biolabs) byly použity pro klonovací účely při konstrukcích plasmidů, tyto polymerázy se vyznačují vysokou přesností zamezující tak vzniku chyb v průběhu amplifikace DNA. Složení reakční směsi a podmínky amplifikace PCR reakce byly dodrženy dle pokynů výrobce. Reakční směs vždy obsahovala jednu z uvedených polymeráz a k ní příslušný pufr, dNTP mix o koncentraci 10 mmol/l a patřičné oligonukleotidy „forward a reverse“ o koncentracích 10 μ M. Templátem do reakce byla chDNA nebo DNA plasmidů. Pro ověření vložení či odstranění konstruktů do

chromozomu *S. pneumoniae* byla používána metoda koloniové PCR, templátem do reakce byla v tomto případě sterilní kličkou odebraná část kolonie narostlá na pevném médiu nebo 1 μ l tekuté kultury odebrané ze zásobní konzervy uložené v -80 °C. Do této reakce byl navíc přidán 10 % Tween 20 pro lepší dezintegraci buněk.

Elektroforéza v agarózovém gelu, izolace z gelu

K separaci DNA fragmentů v agarózovém gelu byla použita horizontální agarózová elektroforéza. Agarózový gel o hmotnostní koncentraci 0,8 % byl připraven smícháním 0,32 g agarózy spolu s 40 ml TAE pufru a následně povařen. K rozvařenému agarózovému gelu byl poté přidán Red Gel (Roche), díky němuž dochází ke zviditelnění jednotlivých DNA fragmentů pod UV světlem a nanesen do formy s hřebínkem. Ztuhlý gel spolu s nosnou deskou byl poté přenesen do aparatury pro DNA elektroforézu, kde byl ponořen do TAE pufru. Do jamek vytvořených pomocí hřebínku byl následně nanášen vzorek připravený smícháním s Gel Loading Dye Purple 6x (New England Biolabs). Rozdělení DNA fragmentů v agarózovém gelu probíhalo při napětí 95 V po dobu 1 hodiny. Jako standart k určení velikostí fragmentů byl použit GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo scientific). Separovaná DNA byla následně vizualizována pod UV světlem a v případě potřeby dále izolována z gelu. Izolace z gelu probíhala podle pokynů výrobce dle komerční sady QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Specifický PCR produkt byl případně přečištěn pomocí další komerční soupravy Min Elute™ Reaction Cleanup Kit (Qiagen).

Místně specifická mutageneze

Tato metoda sloužila k zavedení bodové mutace do přesně určeného místa genové sekvence kódující protein Spr0175. K vytvoření konstruktů se zavedenou mutací byla použita komerční souprava QuikChange® II SiteDirected Mutagenesis Kit (Stratagene) a podmínky reakce byly dodrženy dle doporučení výrobce. Mutace byla do genové sekvence vpravena metodou založenou na PCR. Obě vlákna plasmidu byla amplifikována pomocí oligonukleotidů navržených tak, aby byly vzájemně komplementární a nesly požadovanou mutaci. Seznam oligonukleotidů je uveden v tabulce č.5. Po amplifikaci se v reakční směsi nacházela jak nově vytvořená mutovaná DNA, tak původní DNA nemutovaná. K následnému odstranění původního mateřského vlákna byl použit restriční enzym *DpnI* štěpící metylovanou DNA. Nově vytvořené vlákno se zavedenou mutací je vůči degradaci inertní, jelikož neobsahuje metylace. Připravený mutovaný plasmid byl poté transformován do *E. coli* a vytvořená záměna ověřena sekvenací. V mé práci byla tato metoda použita pro místně specifickou záměnu threoninu 4 a 7 za alanin.

Izolace chDNA *S. pneumoniae*

Bakteriální kmen o objemu 200 μ l byl zaočkován do 10 ml TSB média. V exponenciální fázi růstu byla narostlá bakteriální kultura ($OD_{600} = 0,8$) centrifugována (10 min/5000 rpm) a vzniklá peleta vysušena. Pelet byl následně resuspendován přidáním 250 μ l SEDS a inkubován při 37 °C po dobu 20 min, dokud nedošlo k úplné lýzi buněk. Ke vzorku bylo poté přidáno 5 μ l proteiny degradující proteinázy K (2 mg/ml) a vzorek inkubován při 56 °C po dobu 15 min. Dalším krokem bylo přidání 250 μ l pufru TE a 500 μ l fenol/chloroformové směsi (1:1). Vzorek byl promíchán překlápěním v ruce a centrifugován (10 min/13000 rpm). Vrchní vodná část nemísitelných fází byla přenesena do nových zkumavek a doplněna o 500 μ l chloroformu. Celá směs byla opět promíchána a centrifugována (10 min/13000 rpm). Stejně jako v předchozím kroku byla vodná fáze odebrána a po přenesení do nové zkumavky doplněna o 50 μ l 3M NaOAc a 500 μ l izopropanolu, čímž došlo k vysrážení chDNA. Následovalo opětovné promíchání vzorku s následnou centrifugací (10 min/13000 rpm). Peleta na dně zkumavky byla vysušena a promyta 400 μ l 80 % EtOH. Vzorek byl znovu centrifugován (5 min/13000 rpm) a peleta vysušena odstraněním EtOH. Výsledný vzorek obsahující chDNA byl rozpuštěn ve 100 μ l H₂O.

Izolace plasmidové DNA

Plasmidová DNA byla izolována z buněk *E. coli*. Kultura *E. coli* byla nejprve zaočkována do 10 ml LB média a doplněna o antibiotikum, jehož rezistence byla kódována na plasmidu a za stálého třepání při 37 °C inkubována přes noc. Pro následnou izolaci plasmidu byla použita komerční souprava QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) podle pokynů výrobce.

Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Restrikční endonukleázy rozpoznávají specifickou sekvenci na DNA, kterou štěpí v místě vazby deoxyribózy a fosfátového zbytku na obou řetězcích najednou. Reakční podmínky enzymů připravených firmou New England Biolabs byly dodrženy dle pokynů tohoto výrobce. Přehled použitých enzymů je uveden v tabulce č.17. Fragmenty vzniklé tímto štěpením byly definovány velikostně a měly konkrétně definované konce. V případě potřeby pak byla reakční směs rozdělena pomocí DNA agarózové elektroforézy pro kontrolu štěpení nebo byla DNA izolována z gelu pomocí komerčního soupravy QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) či rovnou přečištěna pomocí sady Min Elute™ Reaction Cleanup Kit (Qiagen).

Ligace

Tato metoda byla využita ke spojování fragmentů DNA s klonovacími vektory při konstrukcích plasmidů. Ligace molekul DNA byla prováděna ve 20 μ l za dodržení molárního poměru mezi vektorem a fragmentem 1:2. Reakční směs obsahovala 2 μ l T4 DNA ligázy a 2 μ l odpovídajícího ligačního pufru (10X T4 DNA Ligase buffer (Fermentas)). Reakce probíhala při 22 °C po dobu 1 hodiny.

4.2.2 Manipulace s proteiny

Izolace proteinů – mechanická dezintegrace buněk pro frakcionaci

Pro izolace proteinů z bakterie *S. pneumoniae* byla použita metoda mechanické dezintegrace buněk pomocí přístroje FastPrep FP120 (ThermoSavant). Nejprve bylo 200 μ l bakteriální kultury *S. pneumoniae* zaočkováno do 10 ml TSB média a celá směs kultivována při 37 °C. Narostlá kultura o $OD_{600} = 0,4$ byla centrifugována (5 min /4 °C), supernatant odstraněn a peleta vysušena. Peleta byla následně resuspendována ve 300 μ l dezintegračního pufru a obohacena přidáním 4 μ l inhibitoru proteáz a 0,5 μ l benzonázy. Celý objem byl pak převeden do speciálních mikrozkušavek obsahujících skleněné kuličky a následně vložen do přístroje Fast Prep FP120, kde byly buňky mechanicky dezintegrovány rychlostí 4,5 m/s po dobu 20 sekund. Tento cyklus se opakoval 4x. Mezi jednotlivými cykly homogenizace bylo nutné mikrozkušavky chladit 2 minuty na ledu, aby nedošlo k přehřátí vzorku. Po rozbití buněk následovala centrifugace (5000 rpm, 10 min, 4 °C) a supernatant (bezbuněčný extrakt) byl převeden do nové zkumavky a uchován při -20 °C.

Příprava rychlých proteinových vzorků-chemická dezintegrace buněk

Z exponencionálně rostoucí kultury *S. pneumoniae* bylo odebráno takové množství, jenž odpovídalo poměru 1 ml kultury o $OD_{600} = 0,4$. Toto množství bylo dále centrifugováno (2 minuty, 13000 rpm) a oddělený supernatant odstraněn. Vzniklá peleta byla následně resuspendována ve 20 μ l roztoku SEDS a inkubována ve vodní lázni po dobu 10 minut, dokud nedošlo k lýzi buněk. V dalším kroku byl k suspenzi přidán 2 x koncentrovaný denaturační pufr o objemu 20 μ l a vzorek vařen při 100 °C po dobu 5 minut. Izolované proteiny byly uchovány při teplotě -20 °C nebo dále analyzovány metodou 1D SDS-PAGE.

Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS

SDS-PAGE gelová elektroforéza je metoda, která v této práci sloužila k rozdělení proteinů v elektrickém poli na základě jejich molekulové hmotnosti. Do sestavené aparatury pro elektroforézu byl nejprve nalit elektroforetický pufr, do kterého byl umístěn předem připravený SDS-PAGE gel. Zkoumané vzorky pro SDS-PAGE elektroforézu byly připraveny smícháním s vzorkovým pufrem a vařeny 5 minut při 100 °C. Z gelu byl poté vytažen hřebínek, jenž vytvořil úzké jamky, do kterých byl nanesen vzorek v objemu 15 µl. Aparatura pro elektroforézu byla následně doplněna o elektroforetický pufr, uzavřena víkem a spuštěna při napětí 15 V/cm² do doby, než došlo k dostatečnému rozdělení proteinů na základě viditelného standardu.

Přenos proteinů na membránu („Western Blot“) s následnou imunodetekcí

Po imunodetekci proteinů rozdělených na polyakrylamidovém gelu, bylo třeba tyto proteiny převést na membránu. Do elektroblovací aparatury GEL BOX, VERTICAL BLOTTER (Labnet) byl nejprve nalit blotovací pufr, do kterého byl poté umístěn dle pokynů výrobce sendvič složený mimojiné z polyakrylamidového gelu a nitrocelulóзовé membrány Amersham™ Protran® Premium 0.45 NC, na kterou měly být proteiny převedeny. Samotný přenos proteinů probíhal po dobu 45 minut při 360 mA metodou mokrého elektroblotu. Imunodetekce proteinů převedených na membránu probíhala v závislosti na použité protilátce. Detekce chemiluminiscenčního signálu byla provedena pomocí přístroje G:Box Chemi XRQ instrument (SynGene). V následujících tabulkách jsou uvedeny konkrétní postupy pro jednotlivé použité protilátky.

Detekce Anti-P-Thr	
Blokace membrány	5 % BSA v TBS-T, 30 minut
Primární protilátka	Ant-P-Thr (Cell Signalling Technology), 1:70000 v 1 % BSA v TBS-T
Promytí	3 x 10 minut v TBS-T
Sekundární protilátka	Anti-Rabbit IgG-PEROXIDASE A0545 (Sigma), 1:5000 v TBS-T, 1 hodinu
Promytí	3 x 10 minut v TBS-T
ECL substrát	WesternBright ECL HRP substrate (Advansta) / WesternBright Sirius HRP substrate (Advansta)

Tabulka č.22: Detekce Anti-P-Thr protilátkou

Detekce Anti-Flag	
Blokace membrány	5 % BSA v TBS-T, přes noc
Primární protilátka	Anti-FLAG F7425 (Sigma), 1:10000 v 1 % TBS-T, 2 hodiny
Promytí	3 x 10 minut v TBS-T
Sekundární protilátka	Anti-Rabbit IgG-PEROXIDASE A0545 (Sigma), 1:10000 v TBS-T, 1 hodinu
Promytí	3 x 10 minut v TBS-T
ECL substrát	WesternBright ECL HRP substrate (Advansta)

Tabulka č.23: Detekce Anti-FLAG protilátkou

Detekce Anti-His	
Blokace membrány	5 % BSA v TBS-T, přes noc
Protilátka	Anti-His A7058 (Sigma), 1:25000 v 1 % BSA v TBS-T, 1 hodinu
Promytí	3 x 10 minut v TBS-T
ECL substrát	WesternBright ECL HRP substrate (Advansta)

Tabulka č.24: Detekce Anti-P-His protilátkou

Detekce Anti-GFP	
Blokace membrány	5 % BSA v TBS-T, 1 hodinu
Protilátka	Anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology) 1:10000 v 1 % BSA v TBS-T, přes noc
Promytí	3 x 10 minut v TBS-T
ECL substrát	WesternBright ECL HRP substrate (Advansta)

Tabulka č.25: Detekce Anti-GFP protilátkou

Expres proteinů řízená IPTG inducibilním promotorem

Expres rekombinantních proteinů příslušných kmenů *E. coli* byla navozena přidávkem induktoru exprese IPTG. Jednotlivé kmeny *E. coli* byly nejprve kultivovány za stálého třepání (200 rpm, 37 °C) v 10 ml LB média s přidávkem ATB. Druhý den bylo z přes noc narostlé kultury odebráno množství odpovídající 2,5 ml a toto množství přeočkováno do 50 ml LB média s příslušným ATB. Kultura byla následně třepána (200 rpm) při 37 °C až do $OD_{600} = 0,5 - 0,7$. Z takto narostlé kultury byl odebrán kontrolní vzorek o objemu 1 ml, který reprezentoval stav před indukcí exprese rekombinantního proteinu. V dalším kroku byl ke kultuře přidán 0,5mM IPTG, čímž došlo k navození indukce exprese proteinu Spr0175 kódovaného na plasmidu pod IPTG inducibilním promotorem. Poté byla kultura třepána (200 rpm) za snížené teploty 30 °C. Vzorky pro kontrolní detekci o objemu 1 ml byly odebírány po 2, 3 a 4 hodinách po přidání IPTG. Celá kultivace byla ukončena centrifugací (4000 g, 20 minut, 4 °C) a vzniklá peleta důkladně vysušena. Jednotlivé kontrolní vzorky byly centrifugovány (13000 g, 2 minuty) a vzniklé pelety resuspendovány v 50 μ l 1 x SDS vzorkovém pufru a povařeny 5 minut při

100 °C. Takto připravené vzorky byly zkontrolovány na 1D SDS-PAGE gelu Coomassie Blue barvením a imunodetekcí pomocí Anti-His protilátky.

Izolace proteinů pomocí přístroje „French Press“ a metodou sonikace

Pelet bakteriálních buněk připravený v předchozím odstavci byl zpracován pomocí přístroje „French Press“ nebo metodou sonikace. Nejprve byly buňky v peletě resuspendovány v 5 ml lyzačního pufru a suspenze doplněna o přídavek 50 µl inhibitoru proteáz (ředění 100 x) a 1 µl benzonázy. Povrchové bakteriální struktury byly v následném kroku rozrušeny 2 způsoby: pomocí tlaku přístroje „French press“ nebo sonikací, kde došlo k rozrušení buněčné stěny pomocí pulzů ultrazvukových vln. Dezintegrované bakteriální buňky byly centrifugovány při 10000 g po dobu 20 min při 4 °C a rozpustná frakce značená jako „R“ oddělená od nerozpustné frakce značené „N“. Frakce N obsahovala nečistoty s inkluzními tělísky, zatímco frakce R bílkoviny v nativním stavu. Z obou frakcí byl odebrán kontrolní vzorek o objemu 5 µl, resuspendován s 5 µl 2 x SDS vzorkového pufru, povařen 5 minut při 100 °C a zkontrolován na 1D SDS-PAGE gelu Coomassie Blue barvením a imunodetekcí pomocí Anti-His protilátky.

Purifikace proteinů pomocí Anti-FLAG protilátky imobilizované na magnetických kuličkách

Proteiny označené FLAG-epitopem byly z proteinového lyzátu purifikovány pomocí Anti-FLAG protilátky imobilizované na magnetických kuličkách (Anti-FLAG M2 Magnetic Beads (Sigma-Aldrich®)) dle následujícího postupu. Do 1,5 ml zkumavky bylo přeneseno 40 µl Anti-FLAG protilátkou značených magnetických kuliček a toto množství ekvilibrováno promytím v TBS pufru. Po odstranění TBS pufru byl k magnetickým kuličkám přidán proteinový lyzát a celá směs byla přes noc míchána na automatickém rotátoru při 4 °C. Proteiny značené epitopem FLAG vytvořily komplex s protilátkou Anti-FLAG imobilizovanou na magnetických kuličkách, zatímco neznačené proteiny zůstaly volně ve směsi. Následující den byl vzorek vložen do magnetického separátoru, kde došlo k zadržení magnetických kuliček na stěně zkumavky a supernatant s nenačkanými proteiny byl odebrán a označen jako frakce „fluát“. Vzorek byl následně 3 x promyt pomocí TBS pufru. Jednotlivé odebrané frakce byly nazvány „wash“. Eluce proteinů byla navozena povařením vzorku v 2 x SDS vzorkovém pufru 3 minuty při 100 °C. Vzorek byl poté opět vložen do magnetického separátoru a vzniklá frakce odebrána jako frakce „eluát“. Tato frakce obsahovala proteiny značené FLAG-epitopem. Pro kontrolu frakce „fluát“ a „wash“ bylo odebráno 20 µl vzorku a toto množství smícháno s 4 µl 5 x SDS vzorkového pufru. Vzorky byly poté povařeny (5 min 100 °C) a purifikované proteiny separovány pomocí 1D SDS-PAGE.

Purifikace proteinů pomocí Ni-NTA agarózy

Proteiny označené histidinovou značkou byly purifikovány skrze Ni-NTA agarózu (Qiagen) dle následujícího postupu. Proteinový lyzát o objemu 5 ml byl aplikován do uzavřené kolonky naplněné Ni-NTA agarózou a otáčen pomocí automatického rotátoru po dobu 1 hodiny při 4 °C. Po uplynutí stanovené doby byla spodní část kolonky uvolněna a lyzát působením gravitace protekl. Histidinové zbytky v proteinové sekvenci nacházející se v řadě za sebou interagují s iontem kovu navázaném na sorbentu imobilizovaném na agarozovém nosiči, kde tvoří komplex a zůstávají tak zadrženy v kolonce. Proteiny neobsahující histidinovou sekvenci protekly skrze kolonku a byly jímány jako frakce „**fluát**“. Komplex s navázanými proteiny byl následně propláchnut promývacím pufrem (50 mM Na₂H₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8) (3 x 2,5 ml) a jímané frakce uchovány na detekci obsahu zbytkových nenavázaných bílkovin jako frakce „**wash**“. Uvolnění navázaných bílkovin z komplexu bylo provedeno pomocí elučního pufru (50 mM Na₂H₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8), který byl přidán v objemu 1 ml a to opakovaně 4 x. Veškeré frakce nazvané „**eluát**“ obsahující proteiny značené histidinovou značkou byly opět uchovávány. Z každé frakce bylo následně odebráno 20 µl vzorku a toto množství smícháno s 4 µl 5 x SDS vzorkového pufru. Vzorky byly poté povařeny (5 min 100 °C) a exprese příslušných rekombinantních proteinů byla zkontrolována pomocí 1D SDS-PAGE.

Dialýza purifikovaných bílkovin

Dialýza sloužila k oddělení anorganických solí a jiných nízkomolekulárních látek od purifikovaných bílkovin. Do dialyzační kazety (Thermo scientific, kat. č.: 1060) o objemu 0,5 až 3 ml byl proteinový vzorek vpraven injekční stříkačkou. Samotná dialýza probíhala ve vychlazeném dialyzačním pufru (25 mM Tris, 100 mM NaCl, výsledné pH 7,5) o objemu 1 litr za stálého otáčení kazety po dobu 1 hodiny, poté byl celý objem dialyzačního roztoku vyměněn za čistý pufr a vzorek dialyzován přes noc při 4 °C. Ráno byl dialyzační pufr opět vyměněn a vzorek dialyzován po dobu ještě jedné hodiny. Z dialyzační kazety byl vzorek vytažen pomocí injekční stříkačky a doplněn glycerolem do výsledné koncentrace 5 %. Purifikované bílkoviny byly rozděleny po malých objemech do 1,5 ml zkumavek a uchovány v -80 °C.

Stanovení koncentrace proteinů

Pro stanovení koncentrace proteinů byla použita komerční souprava PierceTM BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) a provedení této metody dodrženo dle pokynů výrobce. Principem této metody je uvolnění iontů mědi Cu²⁺ po reakci s peptidovou vazbou stanovovaných proteinů. Takto uvolněné ionty mědi tvoří komplex s kyselinou

bicinchoninovou (BCA) za vzniku zbarvení, jenž je měřeno spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm. Výsledná koncentrace proteinu byla získána proložením kalibrační křivky (sestavěné na základě známých koncentrací BSA dle pokynů výrobce) přímkou, díky níž byla získána rovnice regrese, ze které byla dopočtena koncentrace měřených proteinů ve vzorcích.

***In vitro* kinázová reakce**

Pro *in vitro* průkaz fosforylace proteinu Spr0175 proteinkinázou StkP byly vypurifikované rekombinantní fúzní proteiny His-Spr0175 a Spr0175-His testovány v *in vitro* kinázové reakci. Reakční směs byla připravena smícháním: 250 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 50 mM MnCl₂, 20 mM DTT, 2 mM EDTA, 0,25 µg kinázové domény StkP (KD) a vzorku, který obsahoval 1 µg testovaných proteinů. Reakce byla provedena také s dvojnásobným množstvím KD a purifikovaných testovaných proteinů: 0,5 µg KD a 2 µg proteinu. Přidáním 100 µM neznačeného ATP nebo radioaktivně značeného [γ -³²P] ATP k reakční směsi došlo k nastartování kinázové reakce. Reakce probíhala ve 37 °C a po 15 minutách byla ukončena přidáním 5 x SDS vzorkového pufru. Vzorky byly následně povařeny 5 minut při 100 °C a elektroforeticky rozděleny. Vizualizace fosforylace byla na základě použitého ATP provedena buď: pomocí imunodetekce protilátkou proti fosfothreoninu (Anti-P-Thr), a nebo pomocí záchytu radioaktivního záření na citlivou folii a následně vyhodnocena na přístroji Molecular Imager FX (Bio-Rad) a analyzována v programu Quantity One 4.6.6.

4.2.3 Manipulace s *S. pneumoniae* a *E. coli*

Kultivace buněk *S. pneumoniae*

Kultivace buněk *S. pneumoniae* probíhala v tekutém TSB médiu, kde bylo do 10 ml TSB média zaočkováno 200 µl z konzervy požadovaného kmene o OD₆₀₀ = 0,4. Druhým způsobem byla kultivace na pevném médiu na miskách s krevním agarem. Kultivace kmenů rostoucích v tekutém médiu probíhala staticky ve vodní lázni vytemperované na 37 °C. Kmeny rostoucí na miskách s krevním agarem byly kultivovány přes noc v termostatu při 37 °C. Pro indukci exprese proteinu Spr0175 ze zinkem indukovaného promotoru byl do média přidán v různých koncentracích ZnSO₄.

Příprava glycerolových konzerv

Glycerolové konzervy byly vytvořeny smícháním 250 µl 60 % glycerolu se 750 µl bakteriální kultury narostlé do OD₆₀₀ = 0,3 - 0,4, přičemž jednotlivé bakteriální kultury byly připraveny zaočkováním 200 µl zásobních buněk (OD₆₀₀ = 0,4) v 10 ml TSB média. Vytvořené glycerolové konzervy jsou uchovávány při teplotě -80 °C.

Měření růstových křivek

Samotnému měření předcházelo rozmrazení konzerv testovaných kmenů uchovávaných v -80 °C při 4 °C. Poté bylo do 10 ml vytemperovaného TSB média zaočkováno 200 µl kultury z konzervy o $OD_{600} = 0,4$. Promíchaná suspenze byla následně rozočkována v objemu 3,5 ml do měrných kyvet. Měření optické hustoty kultury probíhalo automaticky každých 10 minut při vlnové délce 600 nm (OD_{600}) pomocí spektrofotometru Evolution™ 201/220 UV-Visible (Thermo Scientific). Uvedené data z růstových křivek byly získány z celkového měření trvajících 600 minut, kde jednotlivé vzorky byly měřeny v duplikátech.

Transformace DNA do buněk *S. pneumoniae*

Pro transformaci buněk *S. pneumoniae* bylo nejprve připraveno kompetenční médium obsahující 10 ml TSB média s přísadkou 100 µl 0,1 M $CaCl_2$, 67 µl NaOH a 250 µl 8 % BSA. K 950 µl kompetenčního média byl následně přidán vybraný kmen *S. pneumoniae* o objemu 50 µl, 1 µl CSP (250 ng/ml) a 1 µg chDNA či 20-100 ng plasmidové DNA nebo PCR produktu. Transformační směs byla následně inkubována při 37 °C po dobu 2,5 hodiny. V dalším kroku byla transformační směs naředěna dle ředící řady $0-10^{-5}$ a z každého ředění odebráno 100 µl směsi, jenž bylo nanášeno na Petriho misky a přelito gelózou vytemperovanou na 50 °C. Ředění $0-10^{-3}$ obsahovalo navíc antibiotikum kanamycin (200 µg/ml), nebo tetracyklin (2,5 µg/ml), nebo sacharóza (15 %), čímž byly transformanty na základě vykazované rezistence selektovány. Ředění $10^{-4}-10^{-5}$ neobsahovalo selekční složky a sloužilo pouze ke kontrole životaschopnosti buněk. Misky s vysetou transformační směsí byly následně inkubovány přes noc při 37 °C. Druhý den byly klony narostlé na gelóze s ATB přeočkovány na misky s krevním agarem, jenž byly obohaceny o příslušný selekční marker, ke kterému nesly transformanty rezistenci. Následná kultivace probíhala přes noc při 37 °C. Jednotlivé pozitivní klony byly následující den kultivovány ve 2 ml TSB média do hustého zákalu a uskladněny v podobě prekonzerv (250 µl 60 % glycerolu a 750 µl narostlé kultury) v -80 °C.

Kultivace buněk *E. coli*

Kmeny *E. coli* byly kultivovány přes noc při 37 °C dvěma způsoby: po zaočkování buněk do tekutého LB média probíhala kultivace za stálého třepání, buňky vyseté na pevné LB médium byly inkubovány při 37 °C staticky. Selektace kmenů *E. coli* probíhala na miskách LB agaru doplněném o příslušné ATB kanamycin (25 µg/ml) nebo ampicilin (100 µg/ml).

Transformace DNA do buněk *E. coli*

K transformaci ligační směsi bylo použito 100 μ l kompetentních buněk *E. coli* DH5 α , zatímco k transformaci již připravených vektorů byly použity expresní buňky *E. coli* BL21. Buněčné kultury byly uchovávány v laboratorním archivu při -80 °C a pro transformaci DNA rozmrazeny při 4 °C. K buněčné kultuře byla následně přidána ligační směs či směs z PCR reakce v závislosti na požadované transformaci o objemu 10 μ l a vše bylo inkubováno 30 minut při 4 °C. Příjem plasmidové DNA byl poté usnadněn teplotním šokem, jenž byl navozen vložním vzorku na 2 minuty do termobločku vyhřátého na 42 °C s následnou inkubací na ledu po dobu 1,5 minuty. V dalším kroku byla suspenze buněk doplněna 900 μ l LB média vytemperovaného na 37 °C a inkubována ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Směs obsahující transformované buňky *E. coli* byla vyseta na Petriho misky s LB médiem obsahujícím příslušné ATB a inkubována v termostatu při 37 °C do druhého dne.

Mikroskopie

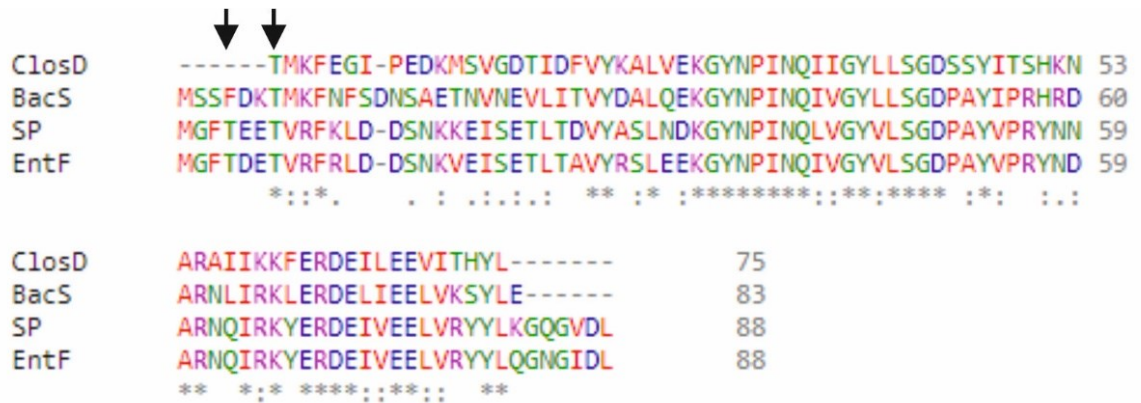
Samotné mikroskopii předcházelo napěstování buněčné kultury v TSB médiu do optické hustoty 0,4. Mikroskopické preparáty byly připraveny nanesením 2 μ l vzorku z takto narostlé kultury na krycí sklíčko a toto množství poté překryto pomocí agarózového bločku. Vzorek s živými buňkami byl následně pozorován pomocí mikroskopu Olympus CellR IX 81 microscope (Olympus) s imerzním objektivem O2PH-UPLFLN/1.3 N.A. při zvětšení 100x. Do podoby obrázků byly buňky zaznamenány s použitím kamery Olympus FV2T Digital B/W Fireware (Olympus). Pro analýzu velikostí buněk byly mikroskopické snímky pořízeny v režimu fázového kontrastu. Snímky byly poté nahrány do programu MicrobeTrackerSuite, jenž dovede dle nastavených parametrů automaticky rozpoznat a zaznamenat velikosti buněk. Vyhodnocení takto naměřených buněčných délek probíhalo v programu GraphPad Prism. Tento program statisticky zhodnotil významnost v rozdílu délek u jednotlivých měřených kmenů. Srovnání bylo vyneseno v grafické podobě ve formě krabicových grafů a významnost rozdílu buněčných délek určena použitím neparametrického Mann Whitneyho testu na hladině významnosti $p < 0,05$. Pro studium lokalizace proteinu Spr0175 byly mikroskopické snímky pořízeny s použitím filtru pro GFP a výsledné obrázky vytvořeny překryvem fotografií pořízených s použitím filtru pro GFP a fotografií pořízených pomocí fázového kontrastu. Pro analýzu procentuálního zastoupení řetízku v populaci *S. pneumoniae* bylo spočteno vždy 400 buněk. Řetízek byl charakterizován 4 a více buňkami a jednotlivé buňky v takto stanoveném řetízku spočteny. Stejně tak bylo sečteno zastoupení buněk vyskytujících se samostatně, kde

byly zařazeny i diplokoky (počítáno jako dvě buňky) a řetízky o třech buňkách (počítáno jako tři buňky). Následně bylo stanoveno jejich procentuální zastoupení.

5 Výsledky

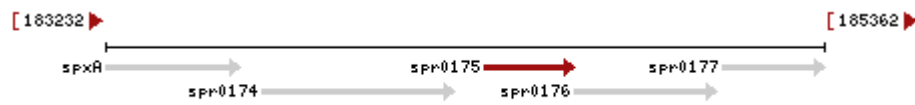
Pneumokoková Ser/Thr proteinkináza StkP se především účastní regulace buněčného dělení a syntézy peptidoglykanu prostřednictvím fosforylace svých substrátů. K dnešnímu dni bylo ovšem identifikováno pouze několik substrátů proteinkinázy StkP. Abychom pochopili funkci tohoto významného regulačního proteinu v buněčné fyziologii, provedli jsme v nedávné době analýzu globálního fosfoproteomu pomocí hmotnostní spektrometrie ve spolupráci s laboratoří Ústavu molekulární patologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové a identifikovali celou řadu substrátů StkP. Ze získaného globálního fosfoproteomu divokého kmene v porovnání s kmenem s odstraněnou proteinkinázou *stkP* (Δ *stkP*) jsme identifikovali protein Spr0175 jako substrát proteinkinázy StkP, která jej fosforyluje na threoninu v pozici 7. U proteinu Spr0175 byla zaznamenána nejvyšší intenzita fosforylace ze všech nově identifikovaných substrátů (Fabrik a Ulrych, nepublikované výsledky).

Protein Spr0175 je hypotetický protein o velikost 10,3 kDa, složený z 88 aminokyselin, konzervovaný ve streptokokích, který neobsahuje žádnou transmembránovou doménu. Gen *spr0175* dlouhý 267 pb (KEGG databáze; https://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?spr:spr0175) se podle databáze prokaryotických operonů DOOR nachází v predikovaném operonu *spr0175-spr0177*. Funkce proteinů Spr0175 a Spr0177 není doposud známá, nebyla objasněna ani u proteinu Spr0176 z enzymatické nadčeledi „holiday junction resolvase-like protein“. U proteinu Spr0176 je na základě provedené NMR (nukleární magnetická rezonance) spektroskopie pouze předpokládána monomerní struktura (<http://csbl.bmb.uga.edu/DOOR/operon.php?id=41964>). Dle databáze orthologních skupin EggNOG se orthology proteinu Spr0175 v bakteriální říši nachází výhradně u kmene *Firmicutes*, a to především u streptokoků (13,3 %), laktobacilů (7,77 %), rodu *Bacillus* (5,76 %) a rodu *Clostridium* (8,52 %). (http://eggnogdb.embl.de/#/app/results#ENOG4105VPH_datamenu). Threonin na 7. pozici je u těchto orthologních proteinů vždy konzervovaný. U zástupců *E. faecalis* a *S. pneumoniae* je konzervovaný i threonin v pozici 4, kterému se rovněž tato diplomová práce věnuje. Srovnání proteinových sekvencí je uvedeno na obrázku č.6.



Obrázek č.6: Sekvence proteinu Spr0175 u vybraných druhů z kmene *Firmicutes*. Na obrázku je uvedena sekvence 4 orthologních proteinů u vybraných druhů z kmene *Firmicutes*. Popis zkratk: **ClosD**–*Clostridium difficile*, **BacS**–*Bacillus subtilis*, **SP**–*Streptococcus pneumoniae*, **EntF**–*Enterococcus faecalis*. Šipkou je označen konzervovaný threonin na pozici 4 a 7.

V literatuře byl v práci Thanassi *et al.* (2002), která byla zaměřená na studium esenciality genů *S. pneumoniae* postupnou inzerční inaktivací, protein Spr0175 popsán jako esenciální (Thanassi *et al.*, 2002). Obrázek č.7 zobrazuje schéma predikovaného operonu *spr0175-spr0177*.



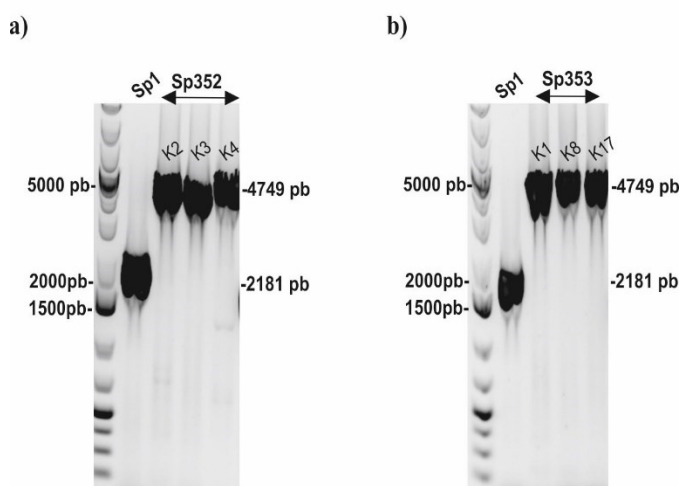
Obrázek č.7: Operon spr0175-spr0177. Obrázek znázorňuje schéma predikovaného operonu *spr0175-spr0177*. Převzato (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Spr0176>).

5.1 Příprava mutantních kmenů Δ spr0175

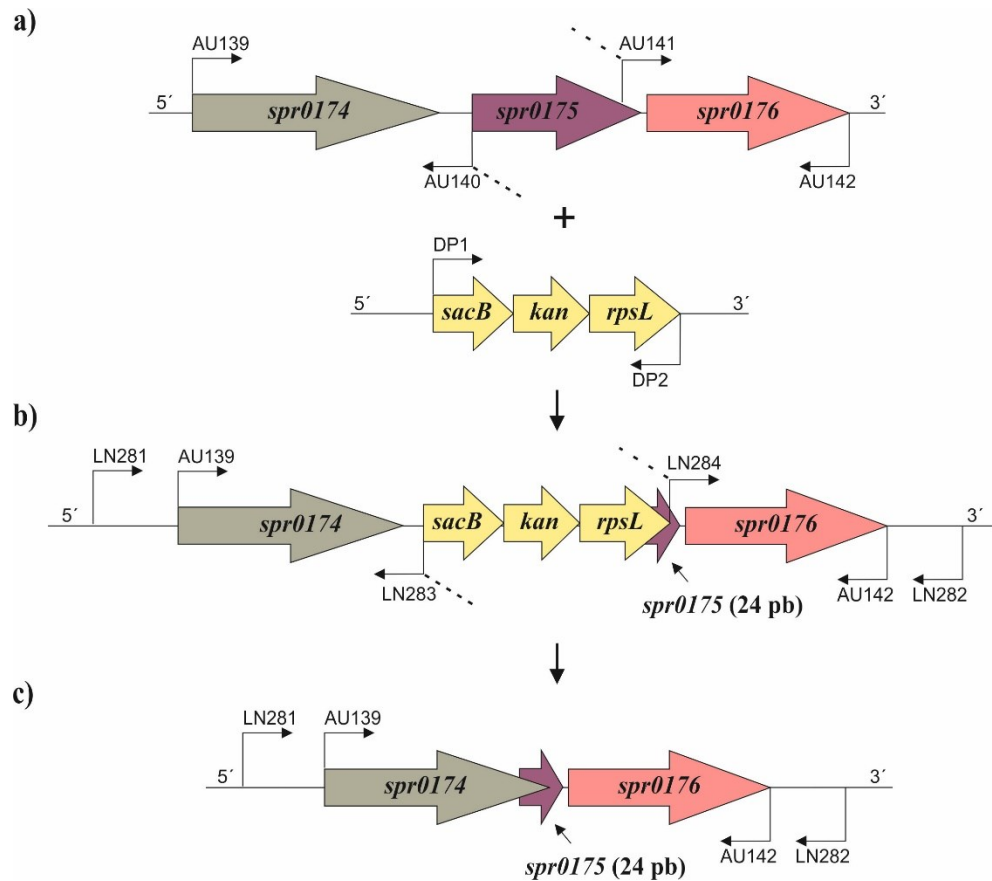
Pro růstovou a morfológickou charakterizaci *S. pneumoniae* byly na pozadí divokých kmenů R6 a Rx připraveny mutantní kmeny Δ spr0175. Jako nástroj pro delecí genu *spr0175* byla použita Sweet Janus kazeta (SJK) nesoucí geny *rpsL*, *kan* a *sacB* (Li *et al.*, 2014). Samotný delecí konstrukce vznikl v několika krocích. Nejprve byla amplifikována sekvence AU139/AU140 (950 pb) nacházející se ve směru transkripce před genem *spr0175*. Zároveň byla amplifikována oblast AU141/AU142 (998 pb) nacházející se ve směru transkripce za genem. Třetím amplifikačním produktem byla SJK, jež byla amplifikována s použitím oligonukleotidů DP1 a DP2 (2807 pb). Část oligonukleotidu AU140 zavedla do sekvence komplementární oblast k oligonukleotidu DP1, stejně tak oligonukleotid AU141 zavedl do sekvence komplementární úsek k oligonukleotidu DP2. Jako templát pro amplifikaci oblasti před genem a za genem byla použita chromozomální DNA divokého kmene Sp1 (Rx). V dalším kroku byla pomocí fúzní PCR amplifikována sekvence ohraničená oligonukleotidy

AU139/AU142 při níž došlo k propojení všech tří vytvořených PCR fragmentů na základě jejich komplementárních koncových sekvencí o výsledné velikosti produktu 4711 pb. Získaný lineární deleční konstrukt byl nazván 0175::SJK.

Konstrukt 0175::SJK byl následně transformována do divokého kmene Sp1 (Rx), Sp208 (R6), a Sp339 (D39). K inzerci 0175::SJK do chromozomu došlo mechanismem zvaným homologní rekombinace. Selektce na přítomnost SJK probíhala ve dvou krocích, v prvním kroku byly klony selektovány na miskách s ATB kanamycinem (200 $\mu\text{g/ml}$). Pozitivní klony byly další den paralelně přeočkovány na misky s kanamycinem (200 $\mu\text{g/ml}$) a 15 % sacharózou. Klony pozitivní na miskách s kanamycinem, které zároveň nerostly v přítomnosti 15 % sacharózy, byly ověřeny na přítomnost SJK koloniovou PCR s použitím oligonukleotidů LN281 a AU142 za vzniku PCR fragmentu o velikosti 4749 pb (obrázek č.8). V kmeni Sp1 byla transformace úspěšná u více než 50 klonů, v kmeni Sp208 pouze u 7 klonů, zatímco v D39 se transformace opakovaně nezdařila vůbec. Pozitivní klony na genetickém pozadí kmene R6 byly pojmenovány na kmen **Sp352** (R6, $\Delta\text{spr}0175::\text{SweetJanus}$), pozitivní klony na pozadí kmene Rx na **Sp353** (Rx, $\Delta\text{spr}0175::\text{SweetJanus}$). Vzhledem k tomu, že bylo u obou kmenů testováno více klonů, je příslušný kmen označen také číslem klonu. Celé schéma delece genu *spr0175* popisuje obrázek č.9 část a) a b).



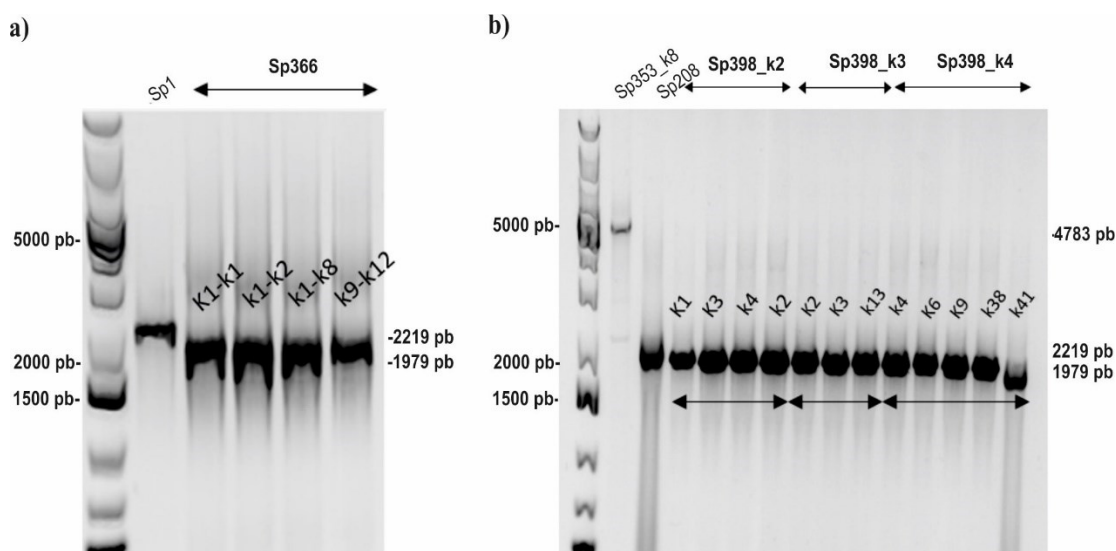
Obrázek č.10: Ověření vložení delečního konstrukt 0175::SJK do kmenů R6 a Rx metodou koloniové PCR. V části a) je zobrazena kontrolní PCR pro $\Delta\text{spr}0175::\text{SweetJanus}$ kmen na pozadí R6. V části b) je zobrazená kontrolní PCR pro $\Delta\text{spr}0175::\text{SweetJanus}$ kmen na pozadí Rx. Výsledná velikost amplifikačních produktů je pro kmen $\Delta\text{spr}0175::\text{SweetJanus}$ (Sp352, Sp353) 4749 pb a pro kontrolní WT kmen (Sp1) 2181 pb.



Obrázek č.11: Delece genu *spr0175* z nativního lokusu prostřednictvím SJK. Barevné šipky znázorňují organizaci jednotlivých genů v kazetě či na chromozomu, malé šipky použité oligonukleotidy. V části a) jsou zobrazeny jednotlivé amplifikované fragmenty použité k deleci genu *spr0175*, v části b) je zobrazeno schéma vzniklého produktu PCR 0175::SJK inzertovaného do chromozomu *S. pneumoniae* a část c) představuje výsledné schéma kmenů s inzertovaným delecím konstruktem $\Delta 0175$.

Pro odstranění SJK z kmene Sp352 (R6; $\Delta spr0175::SweetJanus$) a Sp353 (Rx; $\Delta spr0175::SweetJanus$) byl připraven delecí konstrukce $\Delta 0175$ (obrázek č.11 část c)). V prvním kroku přípravy tohoto konstruktu byla amplifikována oblast AU139/LN283 (949 pb) nacházející se před genem *spr0175* ve směru transkripce. V druhém kroku byla amplifikována oblast nacházející se za genem *spr0175* pomocí oligonukleotidů LN284 a AU142 (1041 pb). Oligonukleotid LN283 použitý k amplifikaci je komplementární k sekvenci nacházející se za genem *spr0175*, konkrétně k sekvenci oligonuklotidu LN284, čehož je využito ve fúzní PCR při spojování obou sekvencí. Templátem pro obě reakce byla chDNA kmene Sp1 (Rx). Výsledný fragment vznikl propojením obou vzniklých PCR fragmentů pomocí fúzní PCR s použitím oligonukleotidů AU139/AU142 (1908 pb). Konstrukce byl pojmenován $\Delta 0175$ a transformován do klonů k3, k4, k5 kmene Sp352 (R6; $\Delta spr0175::SweetJanus$) a klonů k1, k9 kmene Sp353 (Rx; $\Delta spr0175::SweetJanus$). Selektce probíhala dvoukrokově pomocí ATB kanamycinu (200 $\mu\text{g/ml}$) a 15 % sacharózy. Klony rostoucí v přítomnosti 15 % sacharózy a zároveň neschopny růst v přítomnosti antibiotika kanamycinu (200 $\mu\text{g/ml}$) byly ověřeny na

deleci genu *spr0175* pomocí koloniové PCR. Pozitivní klony na pozadí Rx byly označeny **Sp366** (Rx; Δ *spr0175*) kmeny na pozadí R6 byly označeny **Sp398** (R6; Δ *spr0175*). Na obrázku č.12 je zobrazen výsledek PCR pro kmeny Sp366 a Sp398. Použité oligonukleotidy pro kontrolní reakci byly LN281 a LN282 (1979 pb). Pro kontrolu byla použita amplifikace WT (Sp1, Sp208) a kmene obsahujícího SJK (Sp353 klon k8). U produktu PCR Sp1 oproti všem testovaným klonům Sp366 byla na gelu zaznamenána diference ve velikosti, což je v souladu s předpokládanými velikostmi produktů PCR (2219 pb u Sp1 vs. 1979 pb u Sp366). Ovšem produkt PCR u kmene Sp208 putoval na gelu v podobě proužku o stejné molekulové hmotnosti jako produkty PCR klonů k1-k38 kmene Sp398, což může být způsobeno odlišností použitého teplátu v reakci PCR. Zatímco u kmenů Sp208 a Sp398 byla jako templát použita chDNA, u kmenů Sp1 a Sp366 byla použita přímo biomasa jednotlivých kolonií. Správnost přípravy všech delečních kmenů byla potvrzena sekvenací.



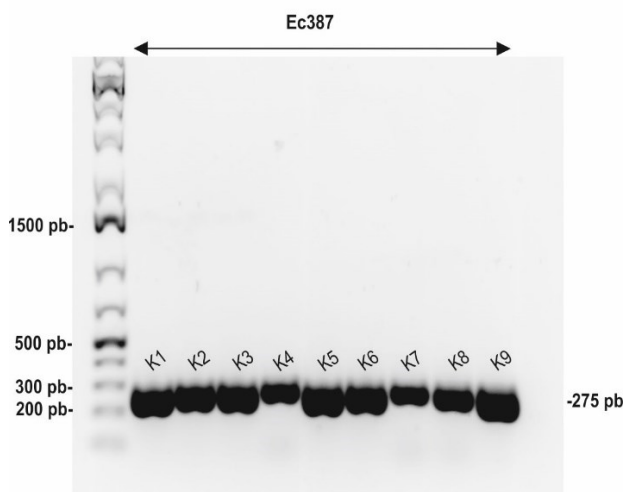
Obrázek č.12: Ověření delece *spr0175* na R6 a Rx genetickém pozadí metodou PCR. V části a) je zobrazena kontrolní koloniová PCR pro Δ *spr0175* kmen na pozadí Rx. V části b) je zobrazená kontrolní PCR pro Δ *spr0175* kmen na pozadí R6. Výsledná velikost amplifikačních produktů je pro kmen Δ *spr0175* (Sp366, Sp398) 1979 pb, pro kontrolní WT kmen (Sp1, Sp208) 2219 pb a pro kmen Δ *Spr0175::SweetJanus* (Sp353_k8) 4783 pb.

5.2 Příprava kmenů exprimujících rekombinantní protein Spr0175 a jeho mutantní formy

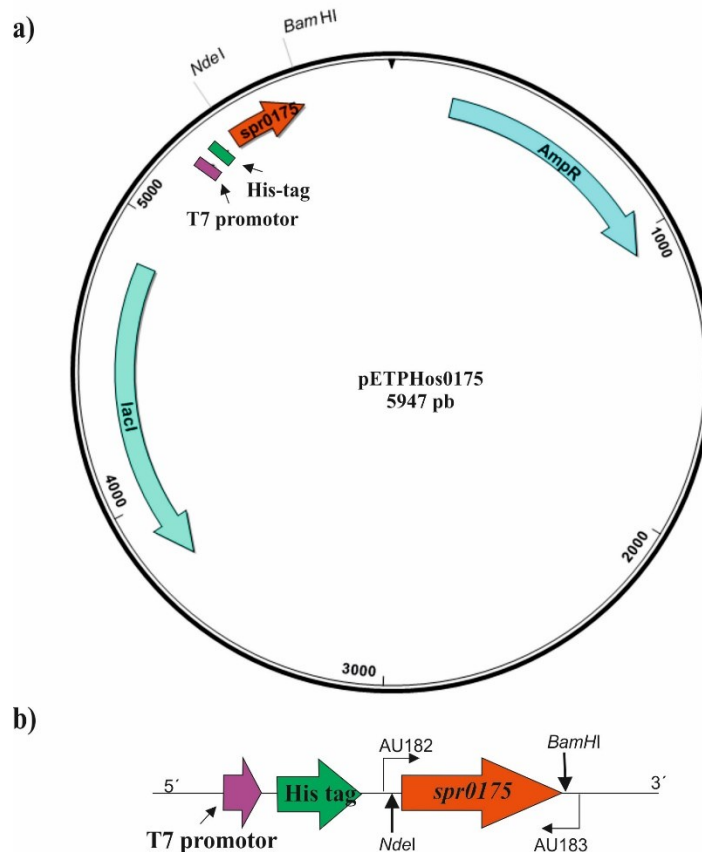
Za účelem průkazu *in vitro* fosforylace proteinu Spr0175 bylo připraveno několik kmenů *E. coli* exprimujících divokou i mutantní formy fúzního proteinu Spr0175 s histidinovou značkou na N- i C-konci.

Příprava kmene s expresním plasmidem pETPhos0175

Pro přípravu konstruktů pETPhos0175 fúzaného s histidinovou značkou na N-konci proteinu Spr0175 byla nejprve s použitím oligonukleotidů AU182/AU183 amplifikována oblast genu *spr0175* (275 pb), kde byla jako templát do reakce použita chromozomální DNA kmene Sp1 (Rx). Oligonukleotidy AU182/AU183 byly navrženy tak, aby obsahovaly restrikční místa *NdeI* a *BamHI* a byly komplementární k úseku genu *spr0175*. V dalším kroku byl z *E. coli* (kmen Ec69) izolován vektor pETPhos, který byl následně štěpen restrikčními enzymy *NdeI* a *BamHI* (5679 pb). Stejnými enzymy byl štěpen také fragment AU182/AU183 a procesem ligace klonován do linearizovaného vektoru pETPhos *NdeI/BamHI*. Takto připravený konstrukt pETPhos0175 byl transformován do kompetentních buněk *E. coli* DH5 α za vzniku kmene **Ec479** (*E. coli* DH5 α ; *pETPhos0175*). Vektor byl poté izolován, verifikován a následně transformován do expresních buněk *E. coli* BL21 za vzniku expresního kmene **Ec387** (*E. coli* BL21; *pETPhos0175*). Selekcce transformantů probíhala na miskách LB agarů s antibiotikem ampicilinem (100 μ g/ml). Kontrola správnosti konstruktů byla provedena pomocí koloniové PCR s použitím oligonukleotidů AU182 a AU183 o výsledné velikosti PCR produktu 275 pb (Obrázek č.13). Správnost konstruktů byla zároveň potvrzena sekvenací. Schéma připraveného vektoru pETPhos0175 je zobrazeno na obrázku č.14.



Obrázek č.13: Ověření správnosti vložení konstruktů pETPhos0175. Na obrázku je zobrazena kontrolní PCR pro kmen **Ec387** (*E. coli* BL21; *pETPhos0175*). Výsledná velikost amplifikačních produktů s použitím oligonukleotidů AU182/AU183 je 275 pb.

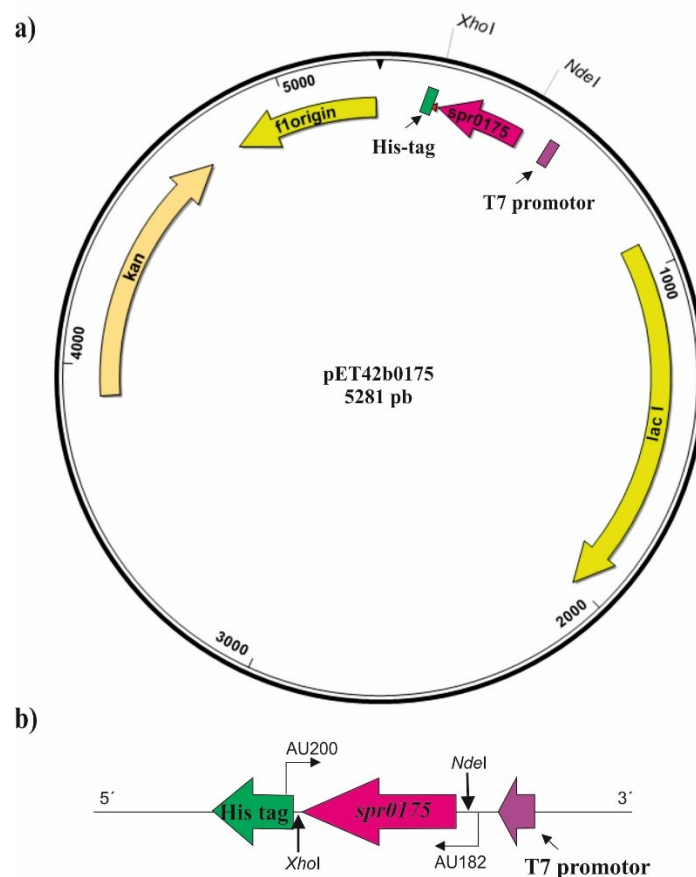


Obrázek č.14: Schéma vektoru pETPhos0175. Na obrázku v části a) je zobrazen konstrukt pETPhos0175 a jsou zde zobrazeny místa štěpené restrikčními enzymy *NdeI/BamHI*. V části b) jsou pomocí šipek zakresleny použité oligonukleotidy. Jednotlivé zkratky jsou popsány zde: **T7 promotor**-promotor pro polymerázu bakteriofága T7, **His-tag** – histidinová značka (6x-His-tag), **spr0175**-gen kódující protein Spr0175, **lacI**–laktózoový represor, **AmpR**-gen udělující rezistenci k ampicilinu, **NdeI** a **BamHI**-restrikční enzymy použité pro přípravu vektoru pETPhos0175.

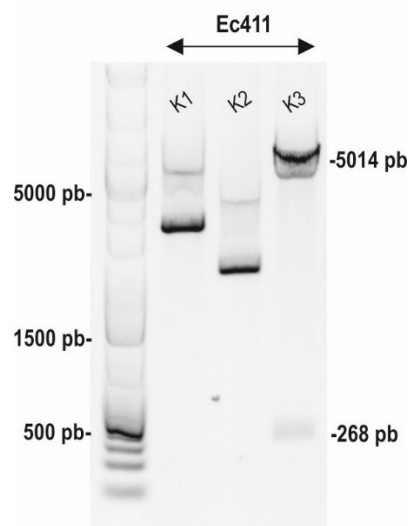
Příprava kmene s expresním plasmidem pET42b0175

Příprava konstruktů pET42b0175 fúzaného s histidinovou značkou na C-konci proteinu Spr0175 probíhala v několika krocích. Nejprve byla s použitím oligonukleotidů AU200 a AU182 amplifikována oblast genu *spr0175* (274 pb). Oligonukleotidy AU200 a AU182 byly navrženy tak, aby obsahovaly komplementární oblast k sekvenci genu *spr0175* a restrikční místa *XhoI* a *NdeI*, díky kterým byl tento fragment AU200/AU182 následně s použitím enzymů *XhoI* a *NdeI* restrikčně štěpen. Jako templát do této reakce byla použita chromozómalní DNA divokého kmene Sp1. Enzymy *XhoI/NdeI* byly použity i pro štěpení vektoru pET42b o výsledné velikosti produktu 5014 pb. Inzert AU200/AU182 byl poté ligován do plasmidu pET42b za vzniku expresního plasmidu pET42b0175 (obrázek č.15). Tento vektor byl následně transformován do kompetentních buněk *E. coli* DH5 α za vzniku kmene **Ec410** (*E. coli* DH5 α ; pET42b0175) a izolován v podobě čistého miniprepu. Izolovaný vektor pET42b0175 byl následně transformován do expresních buněk *E. coli* BL21 a pojmenován

Ec411 (*E. coli* BL21; pET42b0175). Transformanty byly selektovány na miskách LB agaru obsahujícím ATB kanamycin (25 µg/ml). Na závěr byl vektor ověřen restričním štěpením enzymy *XhoI/NdeI* za vzniku výsledných produktů o velikosti 5014 pb a 268 pb. Podle obrázku č.16 se zdá, že jsme získali jeden pozitivní klon Sp411 k3. Přestože velikosti restričních fragmentů úplně neodpovídaly předpokládaným velikostem, podrobili jsme klon k3 sekvenaci z T7 univerzálního oligonukleotidu, která nám potvrdila správnost připraveného kmene.



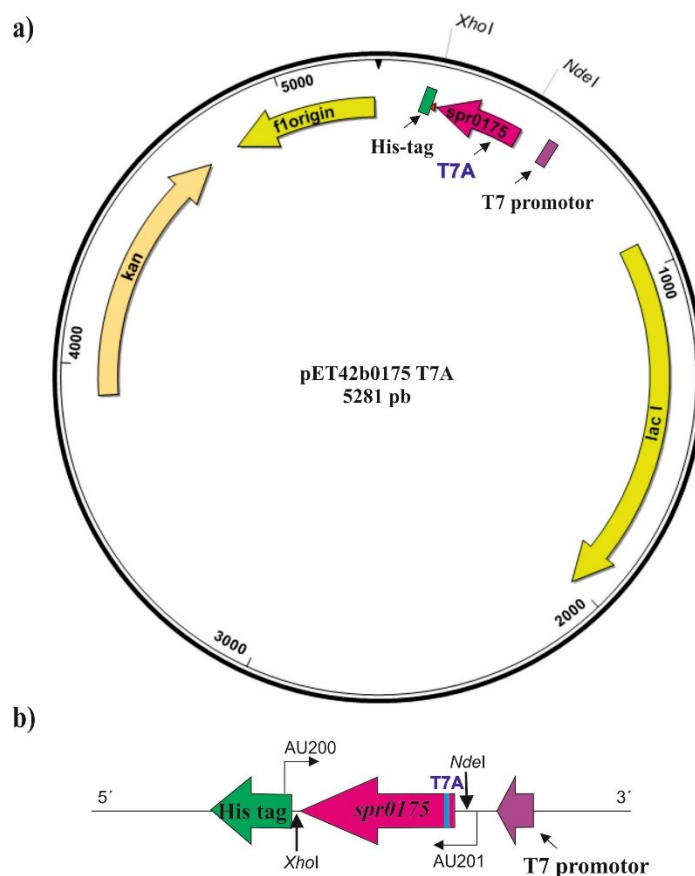
Obrázek č.15: Schéma vektoru pET42b0175. Na obrázku v části a) je zobrazen konstrukt pET42b0175 a jsou zde zobrazeny místa štěpené restričními enzymy *XhoI/NdeI*. V části b) jsou pomocí šipek zakresleny použité oligonukleotidy. Jednotlivé zkratky jsou popsány zde: **T7 promotor** – promotor pro polymerázu bakteriofága T7, **His-tag** – histidinová značka (6 x -His-tag), **spr0175** - gen kódující protein Spr0175, **lacI** – laktózoový represor, **f1 origin** – replikační počátek bakteriofága f1, **kan** - gen udělující rezistenci ke kanamycinu, **XhoI a NdeI** - restriční enzymy použité pro přípravu vektoru pET42b0175



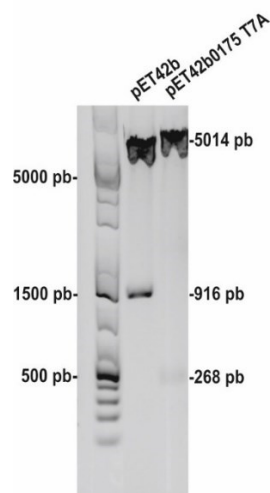
Obrázek č.16: Ověření správnosti konstruktů pET42b0175 restrikčním štěpením s použitím enzymů *XhoI/NdeI*. Na obrázku je zobrazeno ověření správnosti vektoru restrikčním štěpením s použitím restrikčních enzymů *XhoI/NdeI*. Velikost fragmentů je pro expresní plasmid pET42b0175 z kmene Ec411 (*E. coli* BL21; pET42b0175) 5014 pb a 268 pb.

Příprava kmene s expresním plasmidem pET42b0175 T7A

Pro potvrzení fosforylace threoninu na pozici 7 byl vytvořen kmen obsahující expresní plasmid pET42b0175 se záměnou threoninu na sedmé pozici za alanin (pET42b0175 T7A) (obrázek č.17). V první fázi přípravy tohoto kmene byl použitím oligonukleotidů AU200 a AU201 amplifikován celý gen *spr0175* podle templátu pZn-Spr0175-flag T7A (Sp406) (viz kapitola 5.3) o výsledné velikosti produktu 274 pb. Amplifikovaná oblast byla restrikčně štěpena s použitím enzymů *XhoI/NdeI* a procesem ligace vložena do vektoru pET42b (5014 pb) štěpeného stejnými restrikčními enzymy *XhoI* a *NdeI*. Tento vektor byl následně transformován do kompetentních buněk *E. coli* DH5 α , izolován a posléze transformován do expresních buněk *E. coli* BL21. Selektce transformantů probíhala na miskách LB agarů s antibiotikem kanamycinem (25 μ g/ml). Ověření správnosti vektoru bylo provedeno restrikčním štěpením za použití enzymů *XhoI/NdeI* a vzniku výsledných produktů 268 pb a 5014 pb (obrázek č.18). Vzhledem k tomu, že veškeré vzniklé fragmenty putují na gelu dle standardu výše v porovnání s předpokládanou velikostí a intenzita restrikčního fragmentu o velikosti 268 pb je na hranici detekovatelnosti, byla správnost vektoru potvrzena také sekvenací s použitím univerzálního oligonukleotidu T7. Posun je pravděpodobně způsoben nestabilitou standardu velikosti, která byla v dané době v laboratoři zaznamenána. Připravený kmen *E. coli* DH5 α obsahující expresní plasmid pET42b0175 T7A byl pojmenován **Ec412** (*E. coli* DH5 α ; pET42b0175 T7A). Kmen vzniklý vložením expresního plasmidu do *E. coli* BL21 byl nazván **Ec413** (*E. coli* BL21; pET42b0175 T7A).



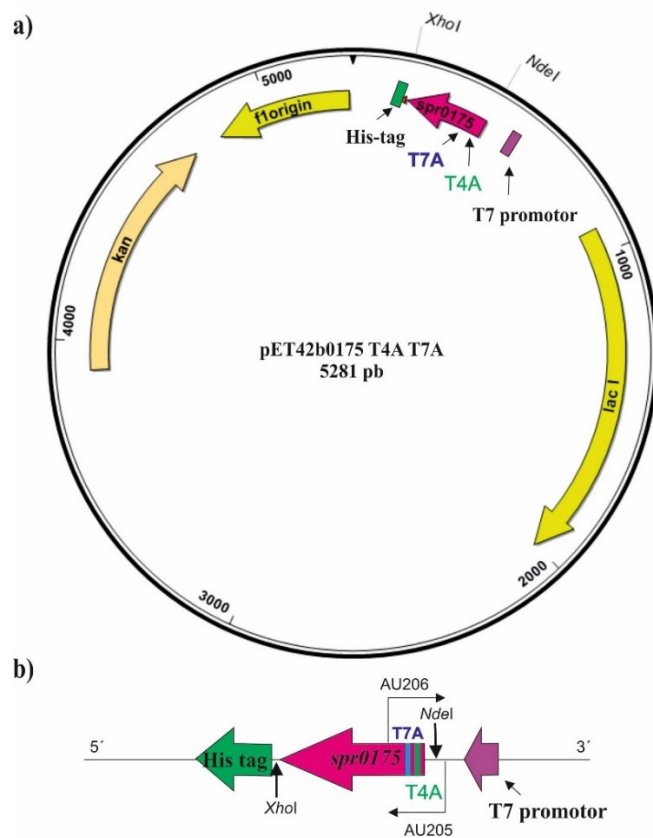
Obrázek č.17: Schéma vektoru pET42b0175 T7A. Na obrázku v části a) je zobrazen konstrukt pET42b0175 T7A a jsou zde zobrazeny místa štěpené restrikčními enzymy *XhoI/NdeI*. V části b) jsou pomocí šipek zakresleny použité oligonukleotidy. Jednotlivé zkratky jsou popsány zde: **T7 promotor**–promotor pro polymerázu bakteriofága T7, **His-tag**–histidinová značka (6x-His-tag), **spr0175 T7A**-gen kódující protein Spr0175 s vloženou záměnou threoninu 7 za alanin, **lacI**–laktóзовý represor, **fl origin**–replikační počátek bakteriofága fl, **kan**-gen udělující rezistenci ke kanamycinu, **XhoI a NdeI**-restrikční enzymy použité pro přípravu vektoru pET42b0175 T7A.



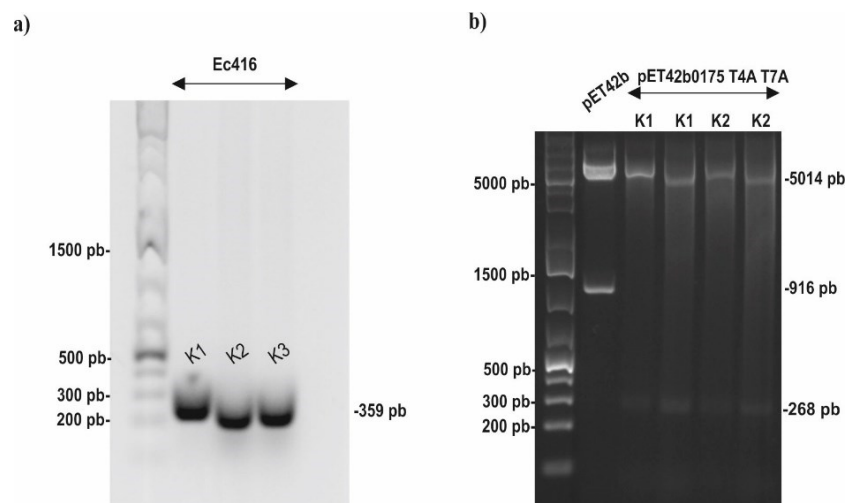
Obrázek č.18: Ověření správnosti konstrukt pET42b0175 T7A restrikčním štěpením s použitím enzymů *XhoI/NdeI*. Na obrázku je zobrazeno ověření správnosti vektoru restrikčním štěpením s použitím restrikčních enzymů *XhoI/NdeI*. Velikost fragmentů pro prázdný vektor pET42b je 5014 pb a 916 pb. Velikost fragmentů pro expresní plasmid pET42b0175 T7A je 5014 pb a 268 pb.

Příprava kmene s expresním plasmidem pET42b0175 T4A T7A

K určení minoritního místa fosforylace proteinu Spr0175 byla cílenou mutagenezí vytvořena ve vektoru pET42b0175 T7A záměna threoninu v pozici 4 za alanin (obrázek č.19). Pro vytvoření této záměny byly navrženy oligonukleotidy AU205 a AU206 obsahující námi požadovanou bodovou mutaci. Následně byla mutace T4A s použitím komerční soupravy QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) zavedena do vektoru pET42b0175 T7A. Endonukleáza *DpnI* štěpící metylovanou a hemimetylovanou DNA byla poté použita k odstranění původního templátového vlákna. Nově syntetizované vlákno je vůči restrikci endonukleázou *DpnI* inertní, jelikož neobsahuje metylace. Takto připravený vektor byl transformován do kmene *E. coli* DH5 α a pojmenován **Ec415** (*E. coli* DH5 α ; pET42b0175 T4A T7A). Izolovaný vektor z kmene Ec415 byl následně transformován do expresního kmene *E. coli* BL21 a nazván **Ec416** (*E. coli* BL21; pET42b0175 T4A T7A). Transformanty byly selektovány na miskách LB agaru v přítomnosti ATB kanamycinu (25 μ g/ml). Přítomnost vektoru byla zkontrolována pomocí koloniové PCR s použitím oligonukleotidů AU200 a AU202 a vzniku výsledného produktu o velikosti 359 pb (obrázek č.20). Přítomnost vektoru byla ověřena zároveň restrikcí, kde restrikčním štěpením enzymy *XhoI/NdeI* vznikly dva restrikční fragmenty o velikosti 5014 pb a 268 pb. Samotná záměna byla následně potvrzena sekvenací z T7 oligonukleotidu.



Obrázek č.19: Schéma vektoru pET42b0175 T4A T7A. Na obrázku v části a) je zobrazen konstrukt pET42b0175 T4A T7A a jsou zde zobrazeny místa štěpené restričními enzymy *XhoI/NdeI*. V části b) jsou pomocí šipek zakresleny použité oligonukleotidy. Jednotlivé zkratky jsou popsány zde: **T7 promotor**-promotor pro polymerázu bakteriofága T7, **His-tag**-histidinová značka (6 x -His-tag), **spr0175 T4A T7A**-gen kódující protein Spr0175 T7A s vloženou záměnou T4 za alanin, **lacI**-laktózoový represor, **f1 origin**-replikační počátek bakteriofága f1, **kan**-gen udělující rezistenci ke kanamycinu, **XhoI a NdeI**-restriční enzymy použité pro přípravu vektoru pET42b0175



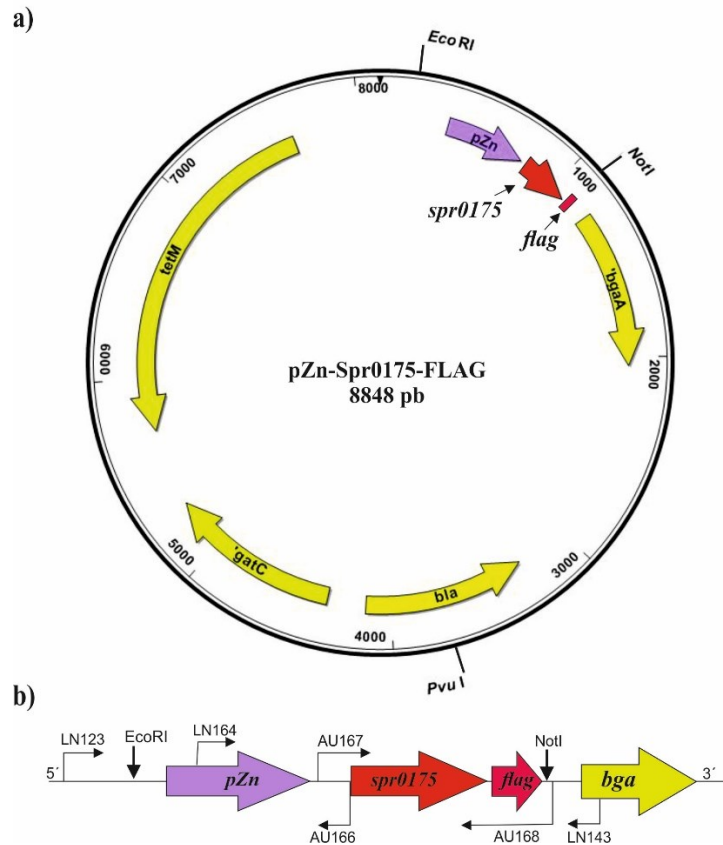
Obrázek č.20: Ověření správnosti konstrukt pET42b0175 T4A T7A. V části a) je zobrazena kontrolní PCR pro kmen **Ec416** (*E. coli BL21*; pET42b0175 T4A T7A). Výsledná velikost amplifikačních produktů s použitím oligonukleotidů AU200/AU202 je 359 pb. V části b) je zobrazeno ověření správnosti vektoru restričním štěpením s použitím restričních enzymů *XhoI/NdeI*. Velikost fragmentů pro prázdný vektor pET42b je 5014 pb a 916 pb. Velikost fragmentů pro expresní plasmid pET42b0175 T7A je 5014 pb a 268 pb.

5.3 Příprava merodiploidních kmenů a jejich mutantních forem

Za účelem průkazu fosforylace proteinu Spr0175 *in vivo* proteinkinázou StkP bylo připraveno několik mutantních kmenů *S. pneumoniae*.

Příprava kmenů exprimujících protein Spr0175-FLAG ze zinkem indukovaného promotoru pZn

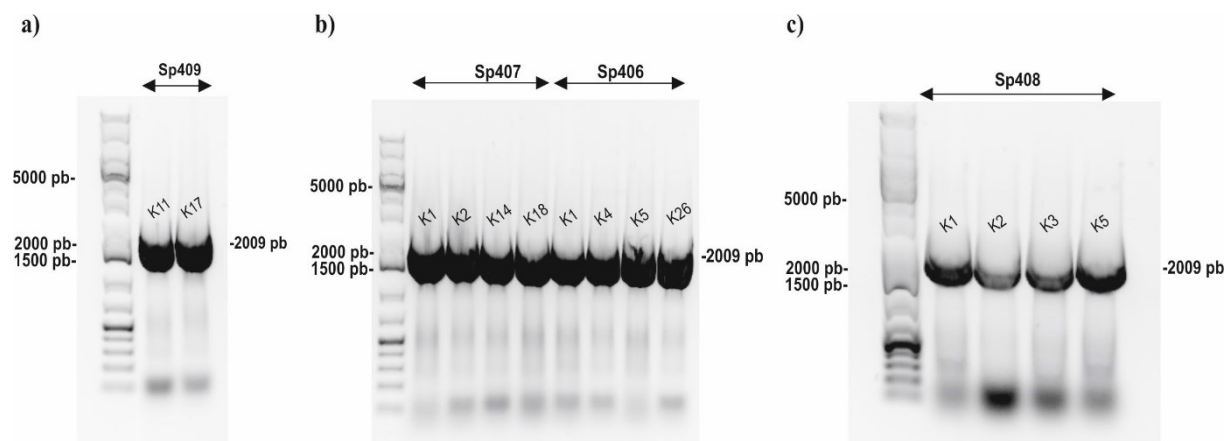
Abychom mohli purifikovat protein Spr0175 a detekovat jeho expresi za účelem potvrzení proteinu Spr0175 jako substrátu proteinkinázy StkP v podmínkách *in vivo*, připravili jsme kmeny exprimující pod zinkem indukovaným promotorem protein Spr0175 značený FLAG-epitopem, a to na různém genetickém pozadí: Sp406 (R6; *bga::pZn-spr0175-flag*), Sp407 (Rx; Δ *stkP bga::pZn-spr0175-flag*), Sp408 (Rx; *bga::pZn-spr0175-flag*) a Sp409 (D39; *bga::pZn-spr0175-flag*). Pro přípravu těchto kmenů byl nejprve vytvořen konstrukt vzniklý fúzí dvou fragmentů LN123/AU166 a AU167/AU168. První fragment LN123/AU166 o velikosti 726 pb byl amplifikován dle vektoru pJWV25 izolovaného z kmene Ec85 uchovávaného v laboratorním archivu. Tento fragment kóduje zinkem indukovatelný promotor pZn. Druhý fragment AU167/AU168 (318 pb) nesoucí sekvenci genu *spr0175* byl amplifikován podle templátu chDNA divokého kmene Sp1 (Rx). Oligonukleotid AU168 zavedl do tohoto fragmentu sekvenci FLAG-epitopu. Zároveň byly pomocí oligonukleotidů AU166 a AU167 do obou fragmentů zavedeny vzájemně přesahující komplementární konce, prostřednictvím nichž se oba fragmenty v další PCR reakci spojily. Pro vznik fúzního konstruktů byly použity oligonukleotidy LN123/AU168. Vzniklý konstrukt byl následně klonován do plasmidu pJWV25 pomocí restričních míst rozeznávaných restričními endonukleázami *EcoRI* a *NotI* za vzniku plasmidového vektoru o velikosti 8116 pb a nazvaného pZn-Spr0175-FLAG. Schéma konstruktů je znázorněno na obrázku č.21.



Obrázek č.21: Schéma vektoru pZn-Spr0175-FLAG. Na obrázku v části a) je zobrazen konstrukt pZn-Spr0175-FLAG a jsou zde zobrazeny místa štěpené restričními enzymy *EcoRI/NotI* a *PvuI*. V části b) jsou pomocí šipek zakresleny použité oligonukleotidy. Jednotlivé zkratky jsou popsány zde: **pZn** - zinkem indukovatelný promotor, **flag** - Flag-epitop, **spr0175** - gen kódující protein Spr0175, **bgaA** a **gatC** - oblasti zprostředkovávající homologní rekombinaci vektoru do chromozomu *S. pneumoniae*, **bla** - gen udělující rezistenci k ampicilinu, **tetM** - gen udělující rezistenci k tetracyklinu, **EcoRI** a **NotI** - restriční enzymy použité pro přípravu vektoru pZn-Spr0175-FLAG, **PvuI** - restriční enzym použit k linearizaci vektoru pJWV25

Takto připravený plasmid pZn-Spr0175-FLAG byl následně transformován do kmene *E. coli* DH5 α . Transformanty byly selektovány na pevném LB médiu s ATB ampicilinem (100 μ g/ml) a ověřeny koloniovou PCR za použití oligonukleotidů LN164 komplementárního k promotoru pZn a LN143 komplementárního k sekvenci na plasmidu pJWV25 za vzniku fragmentu o předpokládané velikosti 551 pb. Vzniklý kmen *E. coli* byl pojmenován **Ec347** (*E. coli* DH5 α ; pZn-spr0175-flag). Správnost izolovaného vektoru pZn-Spr0175-FLAG byla následně ověřena sekvenací za použití oligonukleotidu LN143. Ověřený plasmid byl poté pro zvýšení transformační účinnosti linearizován restričním enzymem *PvuI* a transformován do postradatelného lokusu *bga* *S. pneumoniae*. Selektce transformantů probíhala v přítomnosti antibiotika tetracyklinu v gelóze a na miskách s krevním agarem. K ověření správnosti vložení vektoru pZn-Spr0175-FLAG do *bga* lokusu *S. pneumoniae* byla provedena koloniová PCR s použitím oligonukleotidů LN142 a LN123 a vzniku výsledného fragmentu o velikosti 2009 pb (obrázek č.22). Transformace pZn-Spr0175-FLAG byla provedena na pozadí divokých

kmenů R6 (Sp208), Rx (Sp1) a D39 (Sp339) za vzniku kmenů **Sp406** (R6; *bga::pZn-spr0175-flag*), **Sp408** (Rx; *bga::pZn-spr0175-flag*) a **Sp409** (D39; *bga::pZn-spr0175-flag*). Transformace byla také provedena na pozadí divokého kmene Rx s odstraněným genem kódujícím *stkP* (Sp10) za vzniku kmene **Sp407** (Rx; Δ *stkP bga::pZn-spr0175-flag).*

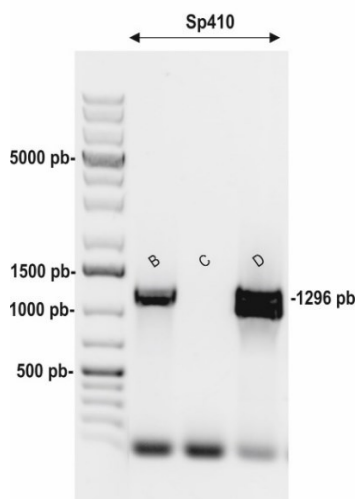


Obrázek č.22: Ověření správnosti transformace pZn-Spr0175-FLAG do kmenů *S. pneumoniae* na pozadí R6 (Sp208), Rx (Sp1), D39 (Sp339) a Rx divokého kmene s odstraněným genem kódujícím *stkP* (Sp10). Na obrázku je zobrazena kontrolní PCR v části **a)** pro kmen **Sp409** D39; *bga::pZn-spr0175-flag*), v části **b)** pro kmene Sp407 (Rx; Δ *stkP bga::pZn-spr0175-flag), **Sp406** (R6; *bga::pZn-spr0175-flag*) a v části **c)** pro kmen **Sp408** (Rx; *bga::pZn-spr0175-flag*). Výsledná velikost amplifikačních produktů s použitím oligonukleotidů LN123/LN142 je pro všechny kmene 2009 pb.*

Příprava kmene exprimujícího protein Spr0175-FLAG se záměnou T7A ze zinkem indukovaného promotoru pZn

Pro potvrzení fosforylace Spr0175 na T7 proteinkinázou StkP *in vivo* byl vytvořen kmen Sp410 (Rx, *bga::pZn-spr0175-flag T7A*). Záměna threoninu v pozici 7 za alanin byla vytvořena metodou cílené mutagenese – komerční soupravou QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Do vektoru pZn-Spr0175-FLAG byla záměna vnesena pomocí oligonukleotidů AU181/AU180. Plasmid pZn-Spr0175-FLAG izolovaný z kmene Ec347 (DH5 α ; *pZn-spr0175-flag*) sloužil jako templát do reakce. Plasmid pZn-Spr0175-FLAG s vnesenou fosfoablativní záměnou T7A byl následně transformován do kmene *E. coli* DH5 α za vzniku nového kmene **Ec350** (DH5 α ; *pZn-spr0175-flag T7A*) a transformanty selektovány na pevném LB médiu s ATB ampicilinem (100 μ g/ml). Vektor byl následně izolován a ověřen sekvenací s použitím oligonukleotidu LN164. Transformace do kmene *S. pneumoniae* probíhala obdobně jako v případě plasmidu pZn-Spr0175-FLAG. Po linearizaci vektoru enzymem *Pvu*I byl tento vektor transformován do divokého kmene Sp1 a integrován do postradatelného lokusu *bga* v procesu homologní rekombinace. Transformanty byly selektovány v přítomnosti ATB tetracyklinu v gelóze a na miskách s krevním agarem a ověřeny

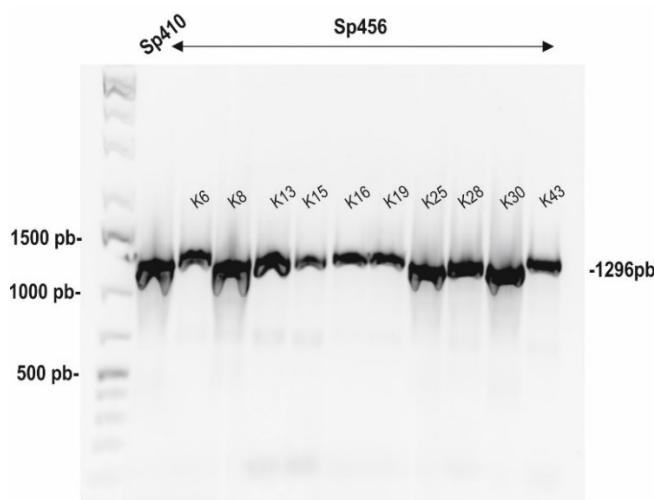
na přítomnost inserce plasmidu pZn-Spr0175-FLAG T7A do lokusu *bga* koloniovou PCR s použitím oligonukleotidů AU181 a LN142 (1296 pb) (obrázek č.23). Ze tří testovaných klonů byly pozitivní pouze klony B a D. Nově vzniklý kmen byl pojmenován **Sp410** (Rx, *bga::pZn-spr0175-flag T7A*).



Obrázek č.23: Ověření správnosti vložení konstruktů pZn-Spr0175-FLAG T7A v kmeni *S. pneumoniae* na pozadí Rx (Sp1). Na obrázku je zobrazena kontrolní PCR pro kmen **Sp410** (Rx; *bga::pZn-spr0175-flag T7A*). Výsledná velikost amplifikačních produktů s použitím oligonukleotidů AU181/LN142 je 1296 pb.

Příprava kmene s exprimujícím protein Spr0175-FLAG pod zinkem indukovaným promotorem na pozadí kmene $\Delta spr0175$

Pro komplementaci delece genu *spr0175* v kmeni Sp366 (Rx; $\Delta spr0175$) byl vytvořen kmen exprimující protein Spr0175-FLAG pod zinkem indukovaným promotorem. V první fázi byl izolovaný vektor pZn-Spr0175-FLAG z kmene Ec347 (DH5 α ; *pZn-spr0175-flag*) a posléze transformován do kmene Sp366 (Rx; $\Delta spr0175$), kde byl v procesu homologní rekombinace integrován do postradatelného lokusu *bga*. Selektce transformantů probíhala v přítomnosti ATB tetracyklinu v gelóze a na miskách s krevním agarem. K ověření integrace vektoru pZn-Spr0175-FLAG do lokusu *bga* byla provedena koloniová PCR (obrázek č.24). Amplifikace proběhla pomocí oligonukleotidů LN142 a AU181 a vzniku produktu o předpokládané velikosti 1296 pb. Oligonukleotid LN142 použitý v reakci je komplementární k úseku chromozomu *S. pneumoniae*, zatímco oligonukleotid AU181 je unikátní k sekvenci genu *pZn-spr0175-flag*. Jako pozitivní kontrola zde sloužil kmen Sp410, kde se s použitím stejných oligonukleotidů předpokládal vznik produktu o identické velikosti. Vzniklý kmen byl pojmenován **Sp456** (Rx; $\Delta spr0175$ *bga::pZn-spr0175-flag*). Tento kmen byl připraven za účelem komplementace delece genu *spr0175*. Z časových důvodů však pro tuto analýzu nebyl použit. Kmen Sp456 jsme použili při testování koimunoprecipitace proteinu Spr0175.



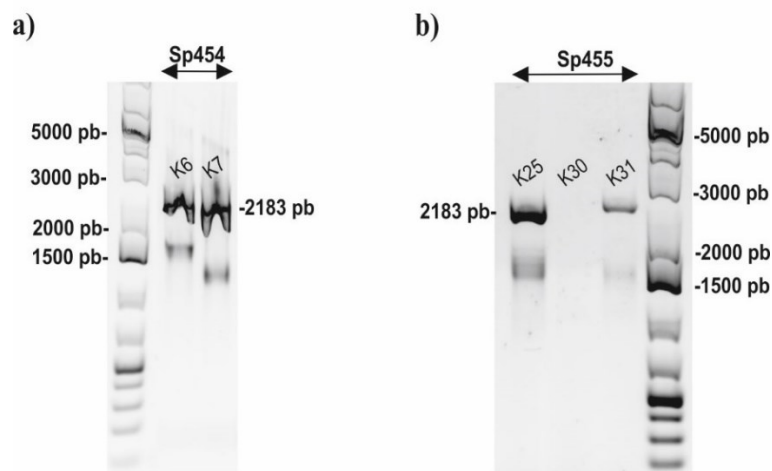
Obrázek č.24: Ověření správnosti vložení konstruktů pZn-Spr0175-FLAG v kmeni Sp366 (Rx; $\Delta spr0175$). Na obrázku je zobrazena kontrolní PCR pro kmen **Sp456** (Rx; $\Delta spr0175$ *bga::pZn-spr0175-flag*). Výsledná velikost amplifikačních produktů s použitím oligonukleotidů AU181/LN142 je jak pro kontrolní kmen **Sp410** (Rx, *bga::pZn-spr0175-flag T7A*), tak pro kmen **Sp456** (Rx; $\Delta spr0175$ *bga::pZn-spr0175-flag*) 1296 pb.

5.4 Příprava kmenů určených pro stanovení lokalizace proteinu Spr0175 v buňce

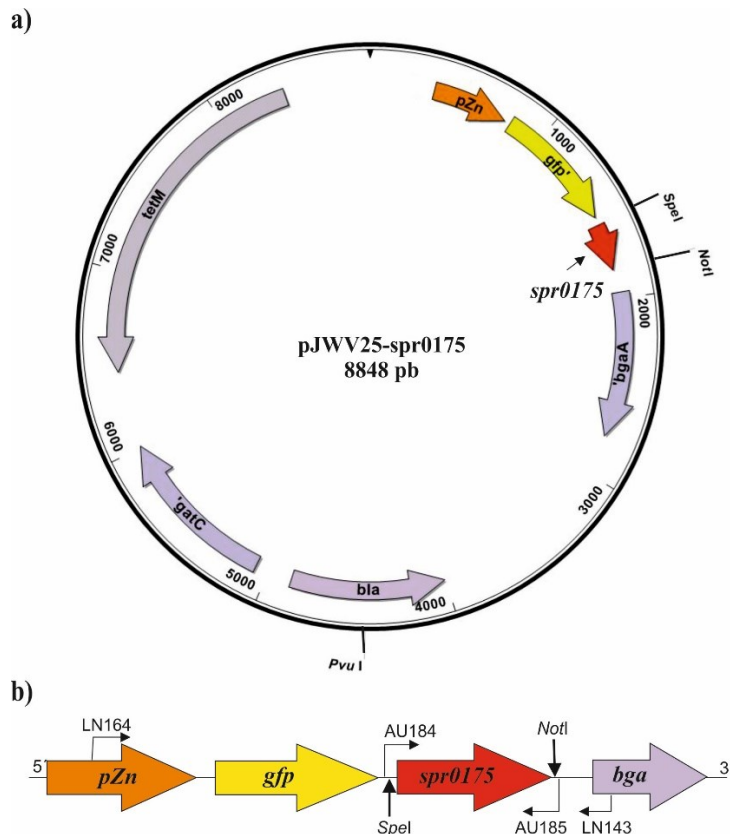
Příprava kmene exprimujícího protein Spr0175 fúzaný s GFP z promotoru indukovaného zinkem

Za účelem studia lokalizace proteinu Spr0175 byl připraven konstrukt pJWV25-spr0175 exprimující fúzi proteinu Spr0175 s GFP na N-konci z indukibilního zinkového promotoru. V prvním kroku přípravy tohoto vektoru byl dle templátu chDNA kmene Sp1 amplifikován s použitím oligonukleotidů AU184/AU185 úsek obsahující sekvenci genu *spr0175*. Použité oligonukleotidy zavedly do vzniklého fragmentu restrikční místa *SpeI* a *NotI*, jenž byly následně rozeznávány stejnojmennými enzymy *SpeI* a *NotI*. Enzymy *SpeI* a *NotI* byl štěpen také vektor pJWV25 izolovaný z kmene Ec85 (DH5 α ; pJWV25). Následně byl prostřednictvím restrikčních míst fragment AU184/AU185 *SpeI/NotI* klonován do vektoru pJWV25 a výsledný konstrukt pJWV25-spr0175 transformován do *E. coli* za vzniku **Ec478** (DH5 α ; pJWV25-spr0175). Selekcce transformantů probíhala na miskách LB agaru s přidavkem antibiotika ampicilinu (100 μ g/ml). Pro ověření správnosti vytvořeného konstruktů byla provedena koloniová PCR s použitím oligonukleotidu LN143 komplementárního k sekvenci pJWV25 a oligonukleotidu LN164 komplementárního k promotoru pZn o předpokládané velikosti fragmentu 1283 pb. Vektor pJWV25-spr0175 byl následně izolován a linearizován restrikčním enzymem *PvuI*. Linearizovaný vektor byl poté transformován do mutantního kmene Sp366 (Rx; $\Delta spr0175$) a do divokého kmene Sp1, kde byl integrován do postradatelného lokusu *bga*

v procesu homologní rekombinace. Selekcce transformantů byla provedena na miskách s krevním agarem v přítomnosti antibiotika tetracyklinu (2,5 µg/ml) a inzerce plasmidu pJWV25-spr0175 do chromozomu byla ověřena koloniovou PCR s použitím oligonukleotidů LN164 a LN142 (2183 pb), kde LN164 je komplementární k promotoru pZn a LN142 je komplementární k úseku chromozomu *S. pneumoniae* (obrázek č.25). Výsledné kmeny byly pojmenovány **Sp454** (Rx, $\Delta spr0175$ *bga::pZn-gfp--spr0175*) a **Sp455** (Rx, *bga::pZn-gfp-spr0175*). Pro kmen Sp454 byly nalezeny pozitivní klony k6 a k7 a pro kmen Sp455 klony k25 a k31. Schéma přípravy vektoru pJWV25-spr0175 je zobrazeno na obrázku č.26.



Obrázek č.25: Ověření správnosti vložení konstruktu pJWV25-spr0175 do kmene Sp366 (Rx; $\Delta spr0175$) a WT kmene Sp1. Na obrázku je zobrazena kontrolní PCR v části a) pro kmen Sp454 (Rx, $\Delta spr0175$ *bga::pZn-gfp-spr0175*) a v části b) pro kmen Sp455 (Rx, *bga::pZn-gfp-spr0175*). Výsledná velikost amplifikačních produktů s použitím oligonukleotidů LN164/LN142 je 2183 pb.



Obrázek č.26: Schéma vektoru pJWV25-spr0175. Na obrázku v části **a)** je zobrazen vektor pJWV25-spr0175. Ve středu schématu je popsána jeho velikost odpovídající 8848 pb. V části **b)** je zobrazena část sekvence tohoto vektoru s oligonukleotidy, jež byly pro přípravu tohoto vektoru použity. Význam zkratk je uveden následovně: *pZn*-zinkem indukovatelný promotor, *gfp*-značka/fluorescenční protein, *spr0175*-gen kódující protein Spr0175, *bgaA* a *gatC*-oblasti zprostředkovávající homologní rekombinaci vektoru do chromozomu *S. pneumoniae*, *bla*-gen udělující rezistenci k ampicilinu, *tetM*-gen udělující rezistenci k tetracyklinu, *SpeI* a *NotI*-restrikční enzymy použité pro přípravu vektoru pJWV25-spr0175, *PvuI*-restrikční enzym použit k linearizaci vektoru pJWV25.

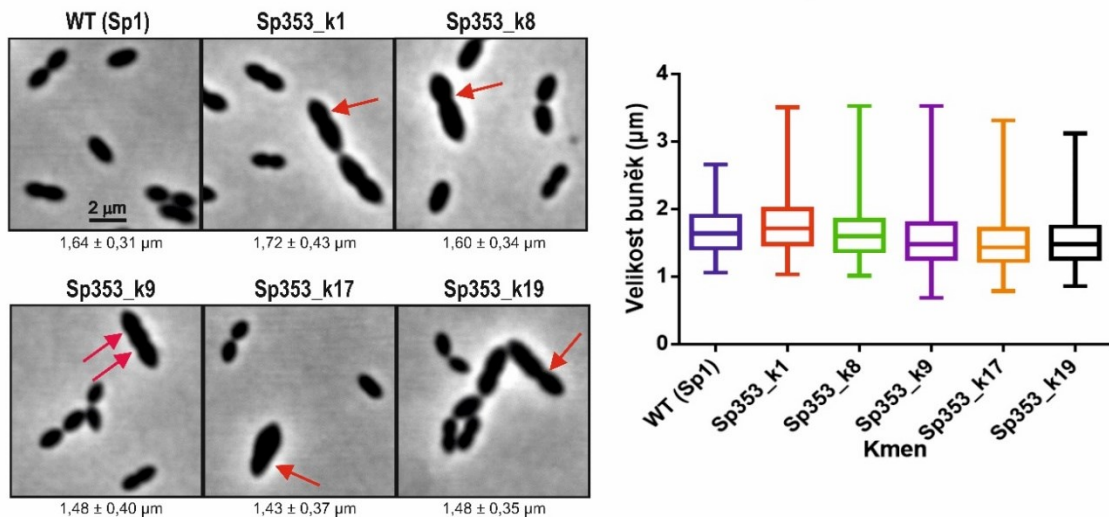
5.5 Morfologická charakterizace mutantních kmenů s odstraněným genem *spr0175*

Pro morfologickou charakterizaci $\Delta spr0175$ mutantních kmenů připravených na odlišném genetickém pozadí *S. pneumoniae* Rx a R6, byly mutantní kmeny kultivovány v TSB médiu. Vzorky pro mikroskopickou analýzu byly odebrány v exponenciální fázi růstu, kdy kultury dosahovaly optické hustoty $OD_{600} = 0,4$. Vzorek o objemu 2 μ l byl následně nanesen na mikroskopické sklíčko, překryt agarózovým bločkem a mikroskopován. Již na první pohled byl fenotyp WT a mutantních buněk odlišný, proto byly získané snímky analyzovány v programu MicrobeJ. Změřená data buněčných délek byla zpracována v programu GraphPadPrism a statisticky vyhodnocena použitím neparametrického Mann-Whitneyho testu při hladině významnosti $p < 0,05$. Pro statistickou analýzu bylo změřeno vždy 500 buněk. Vzhledem k tomu, že *S. pneumoniae* je geneticky velice plastický organismus, který je schopen

hromadit supresorové mutace, bylo pro odhalení stálosti fenotypu $\Delta spr0175$ testováno větší množství klonů. Grafické znázornění velikostí jednotlivých mutantních kmenů $\Delta spr0175$ v porovnání s WT je zobrazeno na obrázku číslo 27, 28 a 29.

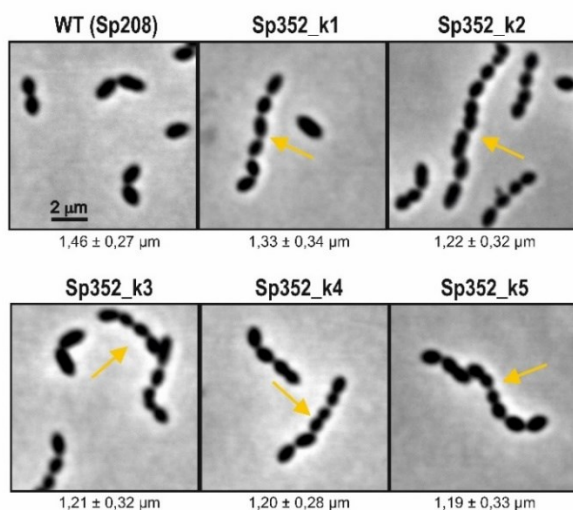
a) Morfologie Sp353

b) Grafické znázornění velikosti buněk kmene Sp353

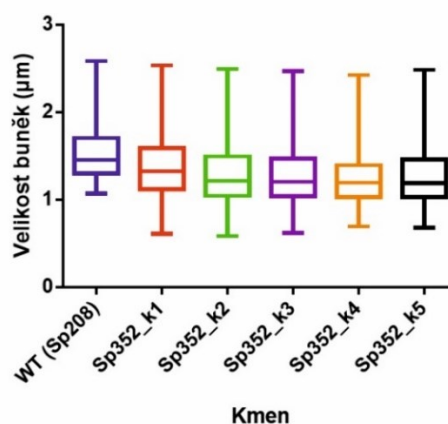


Obrázek č.27: Velikost buněk $\Delta spr0175::SweetJanus$ (Sp353) na pozadí divokého Rx (Sp1) kmene. Obrázek představuje grafické znázornění pěti vybraných klonů k1, k8, k9, k17 a k19 kmene $\Delta spr0175::SweetJanus$ (Sp353) na genetickém pozadí Rx kmene v porovnání s WT (Sp1). V části a) jsou zobrazeny mikroskopické snímky s číselnou hodnotou udávající medián velikosti buněk s příslušnou směrodatnou odchylkou. V části b) je uveden krabicový graf, kde vodorovné úsečky zobrazené u jednotlivých klonů představují maximum, horní kvartil, medián, dolní kvartil, a minimum velikostí buněk. Červené šipky poukazují na příklady buněk s přepázkou lokalizovanou mimo střed.

a) Morfologie Sp352

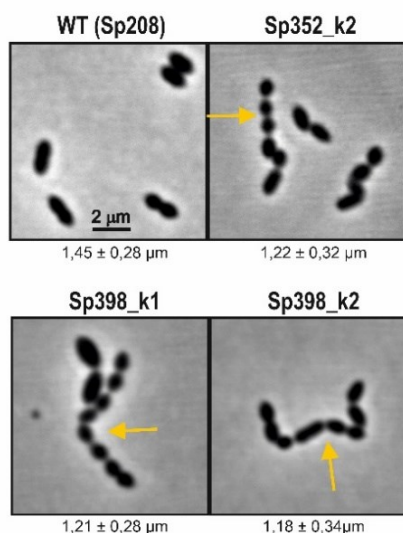


b) Grafické znázornění velikosti buněk kmene Sp352

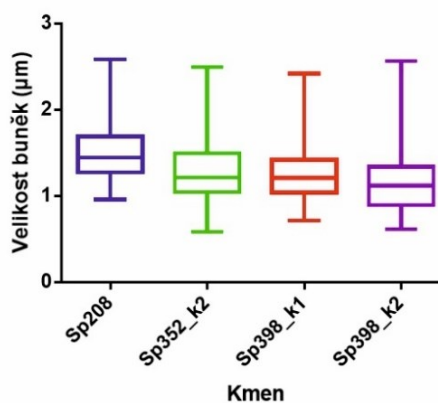


Obrázek č.28: Velikost buněk $\Delta spr0175::SweetJanus$ (Sp352) na pozadí divokého R6 (Sp208) kmene. Obrázek představuje grafické znázornění pěti vybraných klonů k1-5 kmene $\Delta spr0175::SweetJanus$ (Sp352) na pozadí R6 kmene v porovnání s WT (Sp208). Část **a)** představuje jejich mikroskopické zobrazení s číselnou hodnotou udávající medián velikosti buněk s příslušnou směrodatnou odchylku. Část **b)** zobrazuje vynesení jednotlivých kmenů do krabicového grafu. V grafu lze v podobě vodorovných úseček vidět jejich minimum, dolní kvartil, medián, horní kvartil a maximum velikosti buněk. Žluté šipky poukazují na buňky neschopny se rozdělit, čímž dochází k tvorbě řetízků.

a) Morfologie Sp398



b) Grafické znázornění velikosti buněk kmene Sp398



Obrázek č.29: Velikost buněk $\Delta spr0175$ (Sp398) na pozadí divokého R6 (Sp208) kmene. Obrázek představuje grafické znázornění dvou klonů k1 a k3 kmene $\Delta spr0175$ (Sp398) v porovnání s WT (Sp208) a s výchozím rodičovským klonem k2 $\Delta spr0175::SweetJanus$ (Sp352_k2). Část **a)** představuje jejich mikroskopické snímky doplněné o medián velikosti buněk a příslušnou směrodatnou odchylku. Část **b)** představuje krabicový graf zobrazující minimum, dolní kvartil, medián, horní kvartil a maximum velikosti buněk. Žluté šipky poukazují na buňky neschopny se rozdělit, čímž dochází k tvorbě řetízků.

Z části a) i b) uvedených na obrázku č.27 lze usuzovat, že deleční kmen Sp353 s vloženou Sweet Janus kazetou (Rx; $\Delta spr0175::SweetJanus$) na pozadí kmene Rx vede ke vzniku heterogenní populace. Buňky s delečním konstruktem Spr0175::SweetJanus dosahují v porovnání s divokým kmenem podstatně větších, ale i menších rozměrů. Statisticky významný rozdíl v porovnání s WT kmenem ($1,64 \pm 0,31 \mu\text{m}$) tvoří klon Sp353_k1 ($1,72 \pm 0,43 \mu\text{m}$). Buňky jsou statisticky významně větší. V případě klonu Sp353_k8 ($1,60 \pm 0,34 \mu\text{m}$) je statistický rozdíl podle mediánu velikosti buněk nevýznamný, ovšem i zde je zvýšená heterogenita populace oproti WT. Naproti tomu klony Sp353_k9 ($1,48 \pm 0,40 \mu\text{m}$), Sp353_k17 ($1,43 \pm 0,37 \mu\text{m}$) a Sp353_k19 ($1,48 \pm 0,35 \mu\text{m}$) jsou statisticky významně menší. V populaci buněk $\Delta spr0175::SweetJanus$ na pozadí Rx kmene se zároveň nachází takové, které mají buněčnou přepážku lokalizovanou mimo střed (červené šipky na obrázku č.27).

Obrázek č.28 zobrazuje populaci buněk $\Delta spr0175::SweetJanus$ na pozadí kmene R6. Testované buňky všech klonů mutantního kmene Sp352 (R6; $\Delta spr0175::SweetJanus$) jsou statisticky významně menší (přibližně v rozmezí $1,19$ až $1,33 \mu\text{m}$) než buňky divokého kmene ($1,46 \pm 0,27 \mu\text{m}$). Zároveň je u těchto buněk patrný problém s jejich rozdělením (žluté šipky na obrázku č.28), kdy buňky tvoří krátké řetízky, které v populaci převládají. Procentuální zastoupení buněk v řetízcích u WT kmene Sp208 v porovnání s kmenem Sp352 (R6; $\Delta spr0175::SweetJanus$) je uvedeno v tabulce č.26.

Kmen	Počet buněk v řetízcích	Počet buněk samostatně	Procentuální zastoupení buněk v řetízcích
Sp208	16	384	4 %
Sp352 klon k1	44	356	11 %
Sp352 klon k2	216	184	54 %
Sp352 klon k3	148	252	37 %
Sp352 klon k4	220	180	55 %
Sp352 klon k5	252	148	63 %

Tabulka č.26: Procentuální zastoupení buněk $\Delta spr0175::SweetJanus$ (Sp352) v řetízcích na pozadí divokého R6 (Sp208) kmene. Pro každý kmen bylo analyzováno celkem 400 buněk.

Populace buněk je statisticky významně menší i v případě mutantních kmenů $\Delta spr0175$ po odstranění Sweet Janus kazety na pozadí R6 (obrázek č.29). K přípravě kmene Sp398 (R6; $\Delta spr0175$) byl použit klon k2 kmene Sp352 a u výsledného delečního kmene Sp398 byly testovány dva klony: k1 a k2. Medián velikosti buněk u klonu Sp398_k1 je $1,21 \pm 0,28 \mu\text{m}$ a medián buněk u klonu Sp398_k2 je $1,18 \pm 0,34 \mu\text{m}$, v porovnání s divokým kmenem Sp208 o velikosti buněk $1,45 \pm 0,28 \mu\text{m}$. Vzhledem k tomu, že jak rodičovský kmen Sp352, tak dceřiný kmen Sp398 vykazují stejný morfologický defekt, lze usoudit, že přítomnost Sweet Janus

kazety u rodičovského kmene Sp352 klon k2 nemá významný vliv na morfologii R6 kmene. V populaci buněk klonu Sp398_k1 je z pořízených snímků také patrná převládající tvorba krátkých řetízků. Větší množství řetízků ve srovnání s divokým kmenem Sp208 je viditelné i u klonu Sp398_k2. Procentuální zastoupení buněk v řetízcích u kmene Sp398 je uvedeno v tabulce č.27, pro srovnání je zde uvedeno i procentuální zastoupení buněk u WT kmene Sp208 a $\Delta spr0175::SweetJanus$ kmene (Sp352_k2).

Kmen	Počet buněk v řetízcích	Počet buněk samostatně	Procentuální zastoupení buněk v řetízcích
Sp208	16	384	4 %
Sp352 klon k2	216	184	54 %
Sp398 klon k1	216	184	54 %
Sp398 klon k2	128	272	32 %

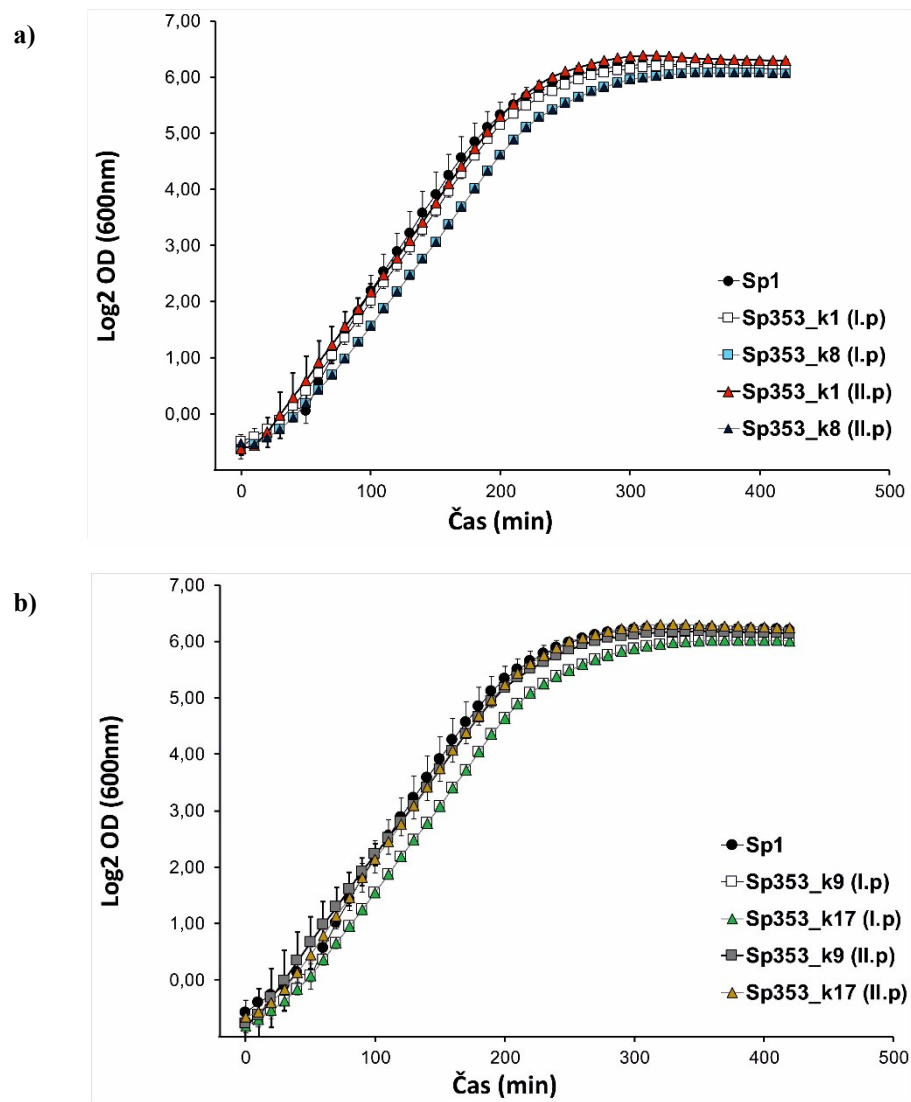
Tabulka č.27: Procentuální zastoupení buněk v řetízcích u kmene $\Delta spr0175$ (Sp398) v porovnání s WT kmenem (Sp208) a rodičovským kmenem $\Delta spr0175::SweetJanus$ (Sp352_k2). Pro každý kmen bylo analyzováno 400 buněk.

5.6 Růstová charakterizace mutantních kmenů s odstraněným genem spr0175

Pro charakterizaci růstových vlastností u kmenů s delecí genu *spr0175* byly pomocí přístroje EvolutionTM 201 UV-Visible Spectrophotometer (Thermo scientific) změřeny jejich růstové křivky. Vzorčky pro analýzu byly měřeny v duplikátech, kdy byla v intervalu každých 10 minut změřena jejich optická denzita OD₆₀₀, a to vždy 5 krát během jedné sekundy. Průměr naměřených hodnot ze dvou nezávislých měření byl vynesena v podobě semilogaritmického grafu a zjištěná doba zdvojení jednotlivých kmenů uvedena v tabulce. U všech růstových křivek jsou zároveň zobrazeny chybové úsečky. Během měření růstových křivek u kmenů s delecí genu *spr0175* byl pozorován fenomén zlepšení růstových vlastností v průběhu pasážování, což podnítilo testování těchto kmenů v dalších generacích.

Nejprve byly růstové křivky měřeny u kmenů Sp353 (Rx; $\Delta spr0175::SweetJanus$) na pozadí Rx divokého kmene (Graf č.1). Testované klony Sp353_k1, Sp353_k8, Sp353_k9 a Sp353_k17 rostly s rozdílem několika minut obdobně jako divoký kmen Sp1 (doba zdvojení 29 minut). Doba zdvojení u kmene Sp353_k1 (31 minut) a Sp353_k8 (33 minut) byla i po proběhlém pasážování buněk shodná. U kmenů Sp353_k9 a Sp353_k17 bylo pozorováno nepatrné zrychlení jejich růstu následkem pasážování. U kmene Sp353_k9 byla doba zdvojení snížena o pouhou 1 minutu z 33 na 32 minut. Doba zdvojení u kmene Sp353_k17 byla vlivem pasážování snížena o 2 minuty z 33 na 31 min. Jednotlivé doby zdvojení jsou uvedeny v tabulce

č.28. Posun růstové křivky vlivem pasážování však není dán jejich nepatrně rychlejším růstem, ale spíše zkrácením lag fáze, ta je z grafu č.1b patrná pouze u kmenů testovaných v první generaci.

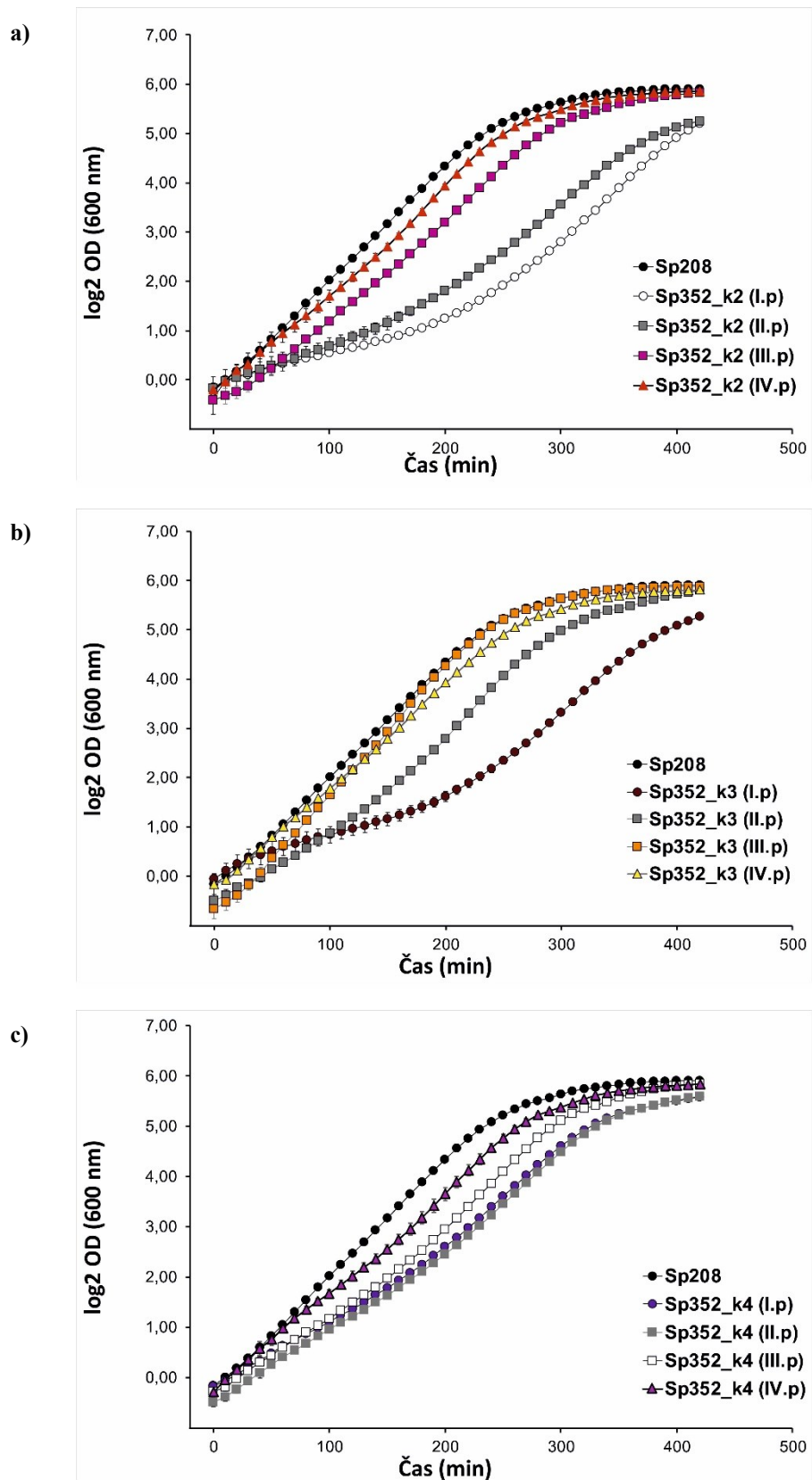


Graf č.1: Růstové křivky kmene Sp353 (Rx; $\Delta spr0175::SweetJanus$) na genetickém pozadí Rx (Sp1) divokého kmene *S. pneumoniae*. Grafy zobrazují semilogaritmické vynesení růstových křivek klonů k1, k8 (a) a k9, k17 (b) u kmene Sp353 (Rx; $\Delta spr0175::SweetJanus$) na pozadí Rx (Sp1). Růstová křivka jednotlivých klonů byla monitorována během I. a II. pasáže (I.p a II.p).

	Kmen	Doba zdvojení
a)	Sp1	29 min
	Sp353_k1 (I.p)	31 min
	Sp353_k8 (I.p)	33 min
	Sp353_k1 (II.p)	31 min
	Sp353_k8 (II.p)	33 min
b)	Sp1	29 min
	Sp353_k9 (I.p)	33 min
	Sp353_k17 (I.p)	33 min
	Sp353_k9 (II.p)	32 min
	Sp353_k17 (II.p)	31 min

Tabulka č.28: Jednotlivé doby zdvojení u kmene Sp353 (Rx; $\Delta spr0175::SweetJanus$) na pozadí Rx (Sp1) divokého kmene *S. pneumoniae*. Tabulka zobrazuje dobu zdvojení buněk u klonů k1, k8 (a) a k9, k17 (b) u kmene $\Delta spr0175::SweetJanus$ na pozadí Rx (Sp1) kmene vypočtených z grafu č.1. Zkratky I.p a II.p označují první a druhou pasáž.

Posléze byly růstové křivky měřeny u kmenů Sp352 (R6; $\Delta spr0175::SweetJanus$) na pozadí R6 divokého kmene. Z výsledků je patrné, že vlivem pasážování dochází k významnému zkracování lag fáze a k celkovému zrychlení růstu jednotlivých pasážovaných mutantních kmenů. Po prvním pasážování rostou jednotlivé klony Sp352_k2 (doba zdvojení 65 minut), Sp352_k3 (54 minut) a Sp352_k4 (61 minut) podstatně pomaleji oproti divokému kmeni Sp 208 (doba zdvojení 42 minut) a je u nich patrná lag fáze. S každým dalším pasážováním je doba zdvojení buněk více podobná divokému kmeni. Po IV. pasážování je u všech těchto kmenů patrné zrychlení růstu, kde klony Sp352_k2 a Sp352_k3 rostou jen o 2 minuty pomaleji (doba zdvojení 44 minut) a klon Sp352_k4 o 5 minut pomaleji (doba zdvojení 47 minut) než divoký kmen Sp208 (doba zdvojení 42 minut). Zrychlení v růstu u jednotlivých kmenů během pasážování je patrné z grafu č.2. V tabulce č.29 jsou pro testované kmeny uvedeny jejich doby zdvojení.

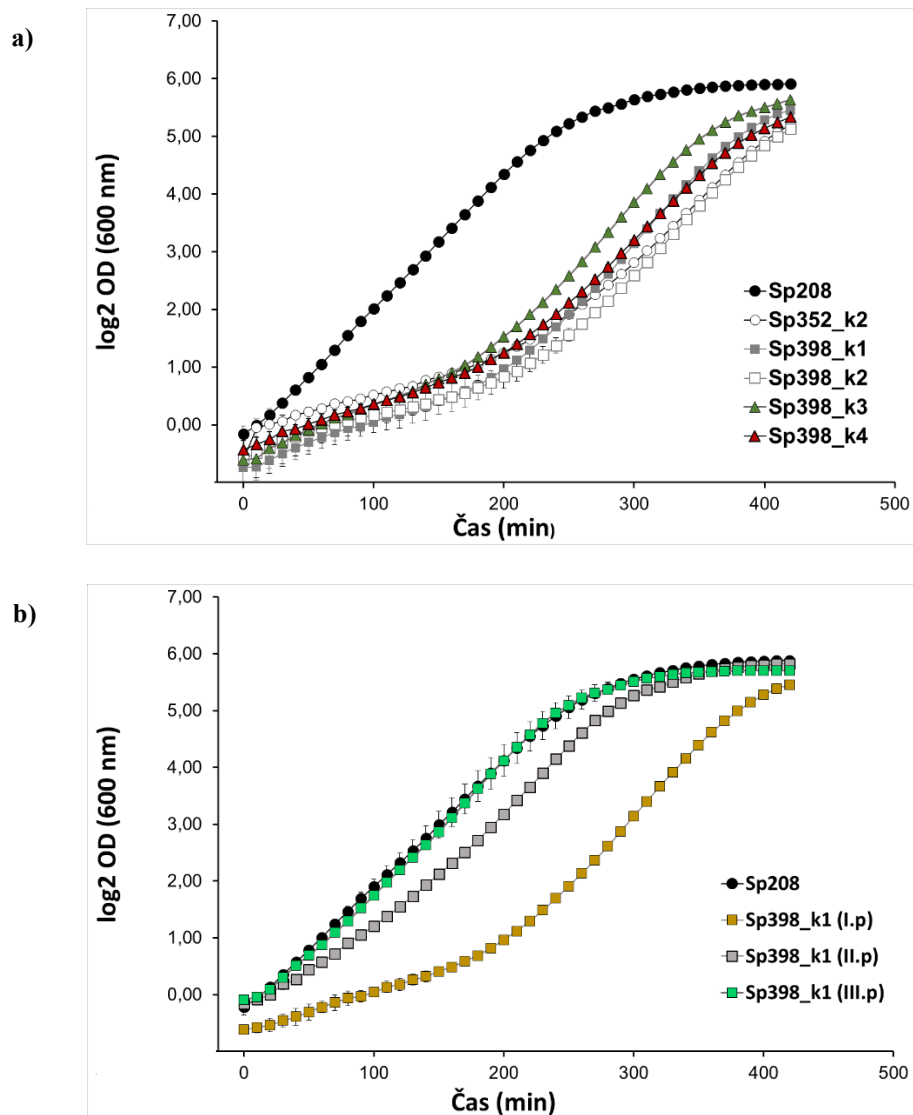


Graf č.2: Růstové křivky kmene Sp352 (R6; $\Delta spr0175::SweetJanus$) na genetickém pozadí R6 (Sp208) divokého kmene *S. pneumoniae*. Grafy zobrazují semilogaritmické vynesení růstových křivek klonů k2 (a), k3 (b) a k4 (c) u kmene Sp352 (R6; $\Delta spr0175::SweetJanus$) na pozadí R6 (Sp208). Růstová křivka jednotlivých klonů byla monitorována během I. - IV. pasáže (I.p, II.p, II.p a IV.p)

	Kmen	Doba zdvojení
a)	Sp208	42 min
	Sp352_k2 (I.p)	65 min
	Sp352_k2 (II.p)	58 min
	Sp352_k2 (III.p)	50 min
	Sp352_k2 (IV.p)	44 min
b)	Sp208	42 min
	Sp352_k3 (I.p)	54 min
	Sp352_k3 (II.p)	48 min
	Sp352_k3 (III.p)	40 min
	Sp352_k3 (IV.p)	44 min
c)	Sp208	42 min
	Sp352_k4 (I.p)	61 min
	Sp352_k4 (II.p)	59 min
	Sp352_k4 (III.p)	56 min
	Sp352_k4 (IV.p)	47 min

Tabulka č.29: Jednotlivé doby zdvojení u kmene Sp352 (R6; $\Delta spr0175::SweetJanus$) na pozadí R6 (Sp208) divokého kmene *S. pneumoniae*. Tabulka zobrazuje dobu zdvojení buněk u klonů k2 (a), k3 (b) a k4 (c) u kmene $\Delta spr0175::SweetJanus$ na pozadí R6 (Sp208) kmene vypočtených z grafu č.2. Zkratky I.p, II.p, III.p a IV.p označují jednotlivé pasáže.

Růstové vlastnosti byly testovány i u kmene Sp398 (R6; $\Delta spr0175$), jenž vznikl po delecii Sweet Janus kazety z klonu k2 kmene Sp352 (R6; $\Delta spr0175::SweetJanus$) (Graf č.3). Obdobně jako u kmene Sp352 je u jednotlivých klonů k1-k4 tohoto nově vzniklého kmene Sp398 přítomná lag fáze a jednotlivé klony mají v porovnání s divokým kmenem Sp208 (doba zdvojení 42 minut) delší dobu zdvojení, kde klon Sp398_k1 (doba zdvojení 46 min) roste o 4 minuty pomaleji, klon Sp398_k2 (doba zdvojení 51 minut) o 9 minut pomaleji, klon Sp398_k3 (doba zdvojení 44 minut) o 2 minuty pomaleji a klon Sp398_k4 (doba zdvojení 50 minut) o 8 minut pomaleji než divoký kmen. U klonu Sp398_k1 (R6, $\Delta Spr0175$) byly následně změřeny růstové křivky i v průběhu třech postupných pasážování. Z výsledků je patrné, že lag fáze u II. pasážování je oproti I. pasážování již výrazně zkrácena a doba zdvojení je 50 min. U III. pasážování je lag fáze téměř na hranici detekovatelnosti a doba zdvojení je jen o 1 minutu delší oproti divokému kmeni (doba zdvojení Sp398_k1 je 43 minut, doba zdvojení divokého kmene Sp208 je 42 minut). Doba zdvojení pro jednotlivé kmeny je uvedena v tabulce č.30.



Graf č.3: Růstové křivky kmene Sp398 (R6; $\Delta spr0175$) na genetickém pozadí R6 (Sp208) divokého kmene *S. pneumoniae*. Grafy zobrazují semilogaritmické vynesení růstových křivek u kmene Sp398 (R6; $\Delta spr0175$) na pozadí R6 (Sp208). V části a) jsou zobrazeny růstové křivky klonů k1-k4 kmene Sp398 a porovnány s rodičovským kmenem klonem Sp352_k2 (R6; $\Delta spr0175::SweetJanus$) a divokým kmenem R6 (Sp208). V části b) je zobrazeno I.-III. pasážování pro klon Sp398_k1 a porovnáno s růstovou křivkou divokého kmene R6 (Sp208)

	Kmen	Doba zdvojení
a)	Sp208	42 min
	Sp352_k2 (I.p)	65 min
	Sp398_k1 (I.p)	46 min
	Sp398_k2 (I.p)	51 min
	Sp398_k3 (I.p)	44 min
	Sp398_k4 (I.p)	50 min
b)	Sp208	42 min
	Sp398_k1 (I.p)	47 min
	Sp398_k1 (II.p)	50 min
	Sp398_k1 (III.p)	43 min

Tabulka č.30: Jednotlivé doby zdvojení u kmene Sp398 (R6; $\Delta spr0175$) na pozadí R6 (Sp208) divokého kmene *S. pneumoniae*. Tabulka udává dobu zdvojení buněk vypočtených z grafu č.3. V části a) jsou zaznamenány doby zdvojení klonů k1-k4 kmene Sp398 a porovnány s rodičovským klonem Sp352_k2 (R6; $\Delta spr0175::SweetJanus$) a divokým kmenem R6 (Sp208). V části b) je zaznamenáno I.-III. pasážování pro klon Sp398_k1 a porovnáno s dobou zdvojení divokého kmene R6 (Sp208). Zkratky I.p, II.p a III.p označují jednotlivé pasáže.

5.7 Průkaz fosforylace proteinu Spr0175 a jeho mutantních forem *in vitro* proteinkinázou StkP

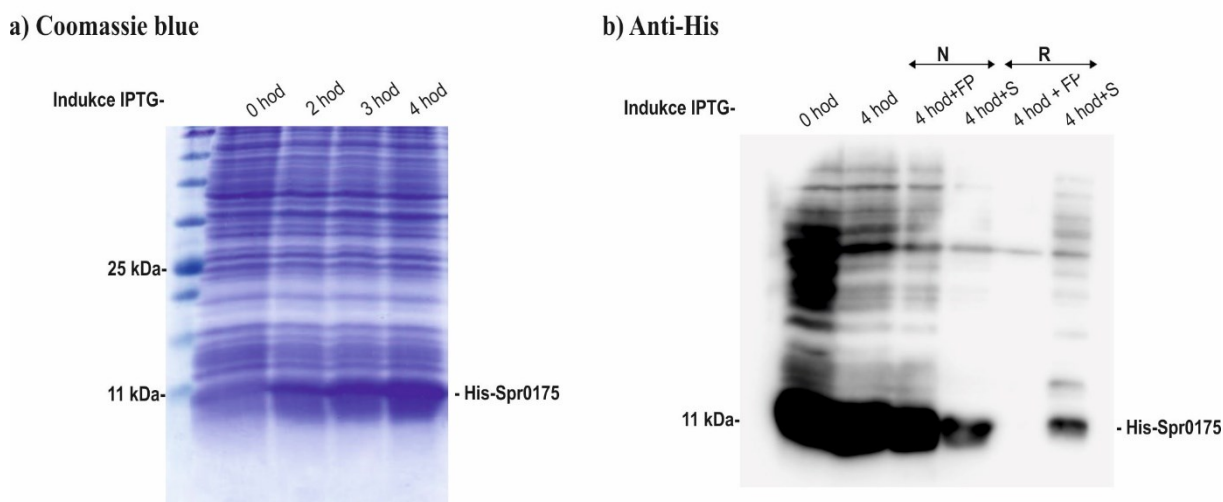
Abychom prokázali fosforylaci proteinu Spr0175 proteinkinázou StkP *in vitro*, připravili jsme rekombinantní fúzní proteiny s histidinovou kotvou His-Spr0175 s Spr0175-His. Tyto purifikované proteiny byly podrobeny fosforylační reakci kinázovou doménou StkP (KD) v přítomnosti neznačeného ATP a také radioaktivně značeného [γ - 32 P] ATP. Vizualizace fosforylace byla provedena pomocí imunodetekce protilátkou proti fosfothreoninu (Anti-P-Thr), a nebo pomocí záchytu radioaktivního záření na citlivou folii, jejím vyhodnocením na přístroji Molecular Imager FX (Bio-Rad) a následnou analýzou v programu Quantity One 4.6.6.

5.7.1 Exprese His-Spr0175 v pETPhos plasmidu

Pro průkaz fosforylace proteinu Spr0175 *in vitro* byl připraven kmen Ec387 (*E. coli* Bl21; pETPhos0175) s expresním plasmidem pETPhos0175. Indukce exprese proteinu His-Spr0175 byla navozena přidáním 0,5 mM IPTG a vzorky pro imunodetekci byly odebrány před přidáním IPTG a po 2, 3 a 4 hodinách indukce. Buňky byly dezintegrovány dvěma odlišnými metodami: sonikací a French-pressem. Po rozdělení proteinů pomocí polyakrylamidové elektroforézy byla exprese proteinu vizualizována Coomassie Blue barvením a imunodetekcí pomocí protilátky Anti-His.

Na obrázku č.30 je zobrazena detekce proteinu His-Spr0175 pomocí Coomassie Blue barvení a imunodetekce Anti-His protilátkou. S prodloužením doby indukce IPTG dochází ke

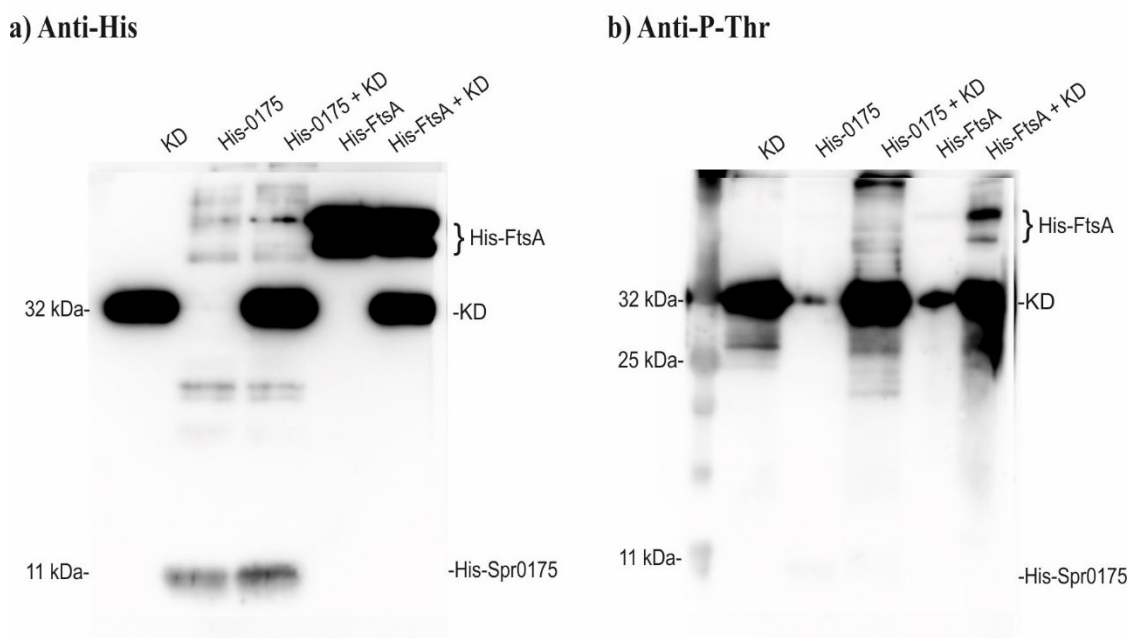
zvýšení exprese proteinu His-Spr0175 (Obrázek č.30a). Kultura byla po čtyřhodinové kultivaci v přítomnosti IPTG podrobena centrifugaci a buňky byly dezintegrovány pomocí sonikace a French-pressu. Po rozbití buněk metodou French-press byl protein přítomen pouze v nerozpustné frakci, zatímco po rozbití buněk sonikací se tento protein nacházel i v rozpustné frakci, což bylo pro následnou zdárnou purifikaci proteinu žádoucí (Obrázek č.30b).



Obrázek č.30: Detekce exprese proteinu His-Spr0175 po přidání induktoru IPTG. Na obrázku je zobrazena detekce exprese proteinu Spr0175 v části **a)** po barvení Coomassie blue G-250 a v části **b)** protilátkou Anti-His. Velikost proteinu His-Spr0175 je 11,05 kDa. U jednotlivých sloupců je uvedeno, jak dlouho probíhala indukce pomocí IPTG. Buňky, jež byly rozbíjeny pomocí French-pressu, jsou označeny zkratkou FP, buňky rozbíjené pomocí sonikace zkratkou S. Detekce proteinu His-Spr0175 po rozbití buněk z rozpustné frakce (označeno zkratkou R) a z nerozpustné frakce (označeno zkratkou N).

Proteiny nacházející se v rozpustné frakci byly následně purifikovány pomocí afinitní chromatografie Ni-NTA agarózou a dialyzovány. K průkazu fosforylace proteinu Spr0175 proteinkinázou StkP byla na purifikovaných proteinech provedena kinázová reakce s následnou imunodetekcí pomocí protilátek Anti-His a Anti-P-Thr s využitím substrátu WesternBright ECL (Advansta) (Obrázek č.31). Protein FtsA, známý substrát proteinkinázy StkP (Kubincová, 2017), byl u obou detekcí použit jako kontrola funkčnosti systému. Na obrázku č.31 byla v části a) protilátkou Anti-His detekována jak rovnoměrná kvantita nanášky proteinu His-Spr0175, tak i kinázové domény KD. Detekce fosforylace proteinu Anti-P-Thr protilátkou v části b) však byla viditelná pouze u samotné kinázové domény a také u kontrolního proteinu FtsA, který putuje na gelu v podobě dvojitého proužku (Obrázek č.31b). Slabý fosforylační signál detekovaný u obou testovaných substrátů bez přídavku proteinkinázy StkP (3 a 5 dráha imunodetekce Obr. 30b) je pravděpodobně způsoben kontaminací okolními vzorky obsahujícími StkP v kombinaci s vysokou citlivostí Anti-P-Thr protilátky. Průkaz fosforylace proteinu His-Spr0175 byl však neúspěšný. Neúspěch detekce Anti-P-Thr mohl být způsoben

přítomností histidinové značky na N-konci proteinu Spr0175 nacházející se tak v těsné blízkosti fosforylačních míst T4 a T7. Takto připravený rekombinantní protein může být nefunkční, proto jsme současně připravili expresní konstrukt, který exprimuje fúzní protein Spr0175 s histidinovou značkou na C-konci proteinu (viz následující kapitola).



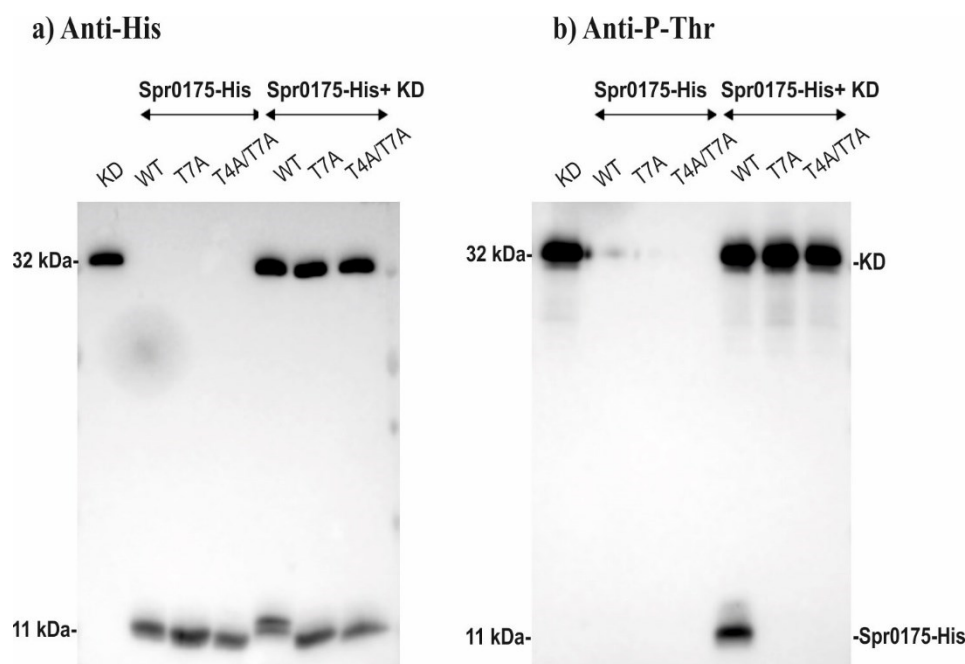
Obrázek č.31: *In vitro* fosforylace proteinu His-Spr0175. Zleva: standard molekulových hmotností, samotná autofosforylace kinázové domény StkP, His-Spr0175 bez a s přidanou kinázovou doménou StkP, His-FtsA bez a s přidanou kinázovou doménou StkP. Jako kontrola stejné nanášky všech vzorků byla použita imunodetekce provedená pomocí Anti-His protilátky (a). Fosforylované proteiny jsou vizualizovány pomocí imunodetekce protilátkou Anti-P-Thr (b). Jako kontrolní protein fosforylovaný kinázovou doménou StkP-KD byl použit His-FtsA, který má velikost 49,89 kDa a putuje jako dvojproužek. Zkratka KD znamená kinázovou doménu.

5.7.2 Exprese Spr0175-His a jeho mutantních forem v expresním plasmidu pET42b

Vzhledem k neúspěšné detekci fosforylace proteinu His-Spr0175 *in vitro* izolovaného z kmene Ec387 byl připraven další kmen Ec411 (*E. coli* BL21; pET42b0175) obsahující expresní plasmid pET42b0175 fúzovaný s histidinovou značkou na C-konci proteinu Spr0175. Tento expresní plasmid byl připraven také s fosfoablativními záměnami v pozici T7 (Ec413: *E. coli* BL21; pET42b0175 T7A) a T4, T7 (Ec416: *E. coli* BL21; pET42b0175 T4A T7A) proteinu Spr0175. Indukce exprese proteinu Spr0175 byla navozena přidáním 0,5 mM IPTG a vzorky pro kontrolní imunodetekci odebrány před a po 2, 3 a 4 hodinách po přidavku induktoru (data neuvedena). Protein byl následně purifikován afinitní chromatografií pomocí Ni-NTA agarózy, dialyzován a na takto purifikovaných proteinech byla provedena kinázová reakce *in vitro*. K detekci proteinu Spr0175-His a k detekci jeho fosforylace byly následně použity protilátky Anti-His a Anti-P-Thr a detekce a vizualizace byla provedena s použitím substrátu

WesternBright ECL (Advansta). Množství purifikované kinázové domény StkP použité v kinázové reakci *in vitro* bylo 0,25 μ g a množství proteinu Spr0175-His 1 μ g.

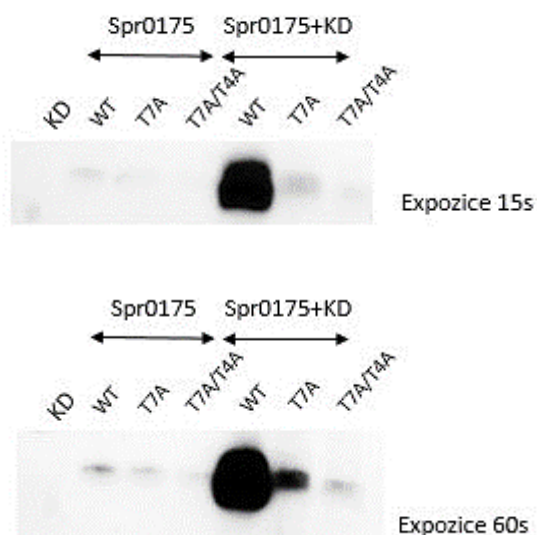
Detekce Anti-His a Anti-P-Thr je zobrazena na obrázku č.32. Část a) zobrazuje detekci naneseného množství proteinu Spr0175-His a jeho mutantních forem protilátkou Anti-His. Z obrázku je patrné, že nanáška proteinu Spr0175 je u všech šesti vzorků přibližně stejná. Zároveň lze říci, že divoká forma proteinu Spr0175-His na rozdíl od fosfoablativních forem putuje na gelu jako dvojproužek, což značí existenci dvou izoform. Část b) představuje detekci protilátkou Anti-P-Thr. Fosforylace divoké formy proteinu Spr0175-His kinázovou doménou StkP vede k silnému nárůstu fosforylačního signálu. Protože Spr0175-His není za nepřítomnosti KD fosforylován, lze tedy konstatovat, že protein Spr0175 je skutečným substrátem proteinkinázy StkP *in vitro*. K potvrzení threoninového zbytku 7 jako hlavního fosforylačního místa proteinu Spr0175 byla testována fosfoablativní forma proteinu Spr0175-His T7A exprimována v kmeni Ec413 (*E. coli BL21; pET42b0175 T7A*). U proteinu Spr0175-His T7A inkubovaného s KD k fosforylaci vůbec nedochází. T7 je tedy hlavním fosforylačním místem proteinkinázy StkP. Možné minoritní místo fosforylace v pozici T4 proteinu Spr0175 proteinkinázou StkP se nám v takto navrženém experimentu nepodařilo prokázat.



Obrázek č.32: *In vitro* fosforylace proteinu Spr0175-His pomocí WesternBright ECL substrátu (Advansta). Zleva: samotná autofosforylace kinázové domény StkP, Spr0175-His (WT) a jeho fosfoablativní formy (Spr0175-His T7A, Spr0175-His T4A/T7A) bez a s přidáním kinázové domény StkP. Jako kontrola stejné nanášky všech vzorků byla použita imunodetekce provedená pomocí Anti-His protilátky (a). Fosforylované proteiny jsou vizualizovány pomocí imunodetekce protilátkou Anti-P-Thr (b). Zkratka KD znamená kinázová doména.

Kinázová reakce *in vitro* byla následně zopakována s použitím většího množství proteinu Spr0175-His (2 µg), stejně tak i s větším množstvím kinázové domény StkP (0,5 µg) a imunodetekce P-Thr byla provedena s použitím citlivějšího chemiluminiscenčního substrátu Sirius (Advansta). Výsledky této detekce jsou zobrazeny na obrázku č.33, kde je u WT formy proteinu Spr0175-His po přidání KD přítomen silný fosforylační signál. Záměnou hlavního fosforylačního místa threoninu v pozici 7 za alanin dochází k významnému úbytku tohoto signálu. Slabý signál je zde ovšem stále přítomen, což znamená, existenci ještě dalšího minoritního fosforylačního místa. Pro potvrzení T4 jako minoritního fosforylačního místa byl připraven kmen Ec416 (*E. coli* BL21; *pET42b0175 T4A T7A*) exprimující protein Spr0175-His se dvěma záměnami v pozici T4A a T7A. U proteinu Spr0175-His T4A/T7A byla zaznamenána další redukce fosforylačního signálu v porovnání s proteinem Spr0175-His T7A.

Z výsledků tedy vyplývá, že zbytek T7 je hlavním a zbytek T4 minoritním fosforylačním místem proteinu Spr0175 v podmínkách *in vitro*.

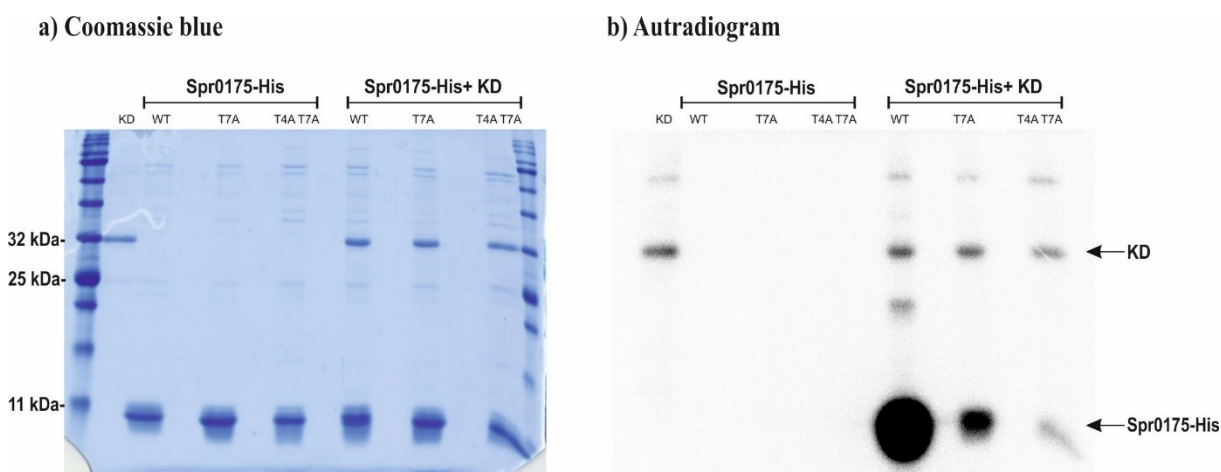


Obrázek č.33: *In vitro* fosforylace proteinu Spr0175-His pomocí citlivějšího ECL substrátu Sirius (Advansta). Zleva: samotná autofosforylace kinázové domény StkP, Spr0175-His (WT) a jeho fosfoablativní formy (Spr0175-His T7A, Spr0175-His T4A/T7A) bez a s přidáním kinázové domény StkP. Fosforylované formy proteinu Spr0175-His jsou vizualizovány pomocí imunodetekce protilátkou Anti-P-Thr s využitím citlivějšího chemiluminiscenčního substrátu Sirius (Advansta) ve dvou expozičních časech: 15 s a 60 s. Zkratka KD znamená kinázová doména.

U proteinu s dvojitou záměnou Spr0175-His T4A/T7A je tak stále detekován velice slabý fosforylační signál (Obrázek č.33). Jelikož podobná bazální intenzita signálu byla detekována rovněž u všech forem proteinu Spr0175-His bez přidání KD (Obrázek č.33), může se jednat buď o nespecifický signál nebo o slabou autofosforylační aktivitu proteinu Spr0175. Abychom zjistili, zdali zbytková fosforylace proteinu Spr0175-His T4A/T7A je závislá na

kinázové doméně StkP či nikoliv, provedli jsme citlivější fosforylační test *in vitro* založený na radioaktivním značení pomocí γ - ^{32}P -ATP.

Kinázová reakce *in vitro* byla provedena standardním způsobem, pouze jako zdroj fosfátové skupiny byl místo neznačeného ATP použit radioaktivně značený γ - ^{32}P -ATP. Proteiny byly následně rozděleny na 1D SDS-PAGE, gel obarven pomocí Coomassie Blue G-250 a založen spolu s citlivou folií pro záchyt radioaktivního signálu. Expozice trvala po dobu dvou dnů. Výsledek této detekce je zobrazen na obrázku č.34. V části a) je detekována hladina proteinu Spr0175-His a jeho mutantních forem barvením Coomassie Blue G-250. Z vizuálního porovnání intenzit lze říci, že nanáška všech proteinů je rovnoměrná. V části b) je znázorněna detekce radioaktivního γ - ^{32}P -ATP. Nejsilnější signál je detekován u divoké formy proteinu Spr0175 izolovaného z kmene Ec411 (*E. coli* BL21; *pET42b0175*) potvrzující, že protein Spr0175-His je substrátem kinázy StkP *in vitro*. Výrazný úbytek fosforylačního signálu v přítomnosti KD je detekován v případě záměny hlavního místa fosforylace T7A proteinu Spr0175. Záměna obou threoninových zbytků za alanin (T4 i T7 proteinu Spr0175-His) vede k téměř úplnému vymizení fosforylačního signálu způsobeného kinázovou doménou KD. Threonin v pozici 4 je tedy druhým místem fosforylace v podmínkách *in vitro*. Nepatrný signál po dvojité záměně T4A a T7A v proteinu Spr0175-His je specifický a nachází se pouze u vzorku s přidanou KD, což znamená, že protein Spr0175 je fosforylován kinázou StkP na dalším dosud neznámém třetím místě.



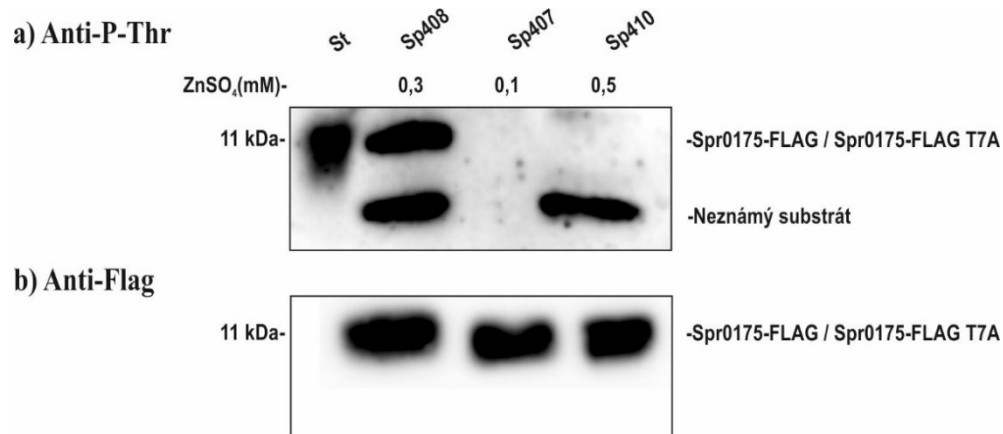
Obrázek č.34: *In vitro* fosforylace proteinu Spr0175-His pomocí radioaktivně značeného γ - ^{32}P -ATP. Zleva: samotná autofosforylace kinázové domény StkP, Spr0175-His (WT) a jeho fosfoablativní formy (Spr0175-His T7A, Spr0175-His T4A/T7A) bez a s přidanou kinázovou doménou StkP. Jako kontrola stejné nanášky všech vzorků byl použit gel barvený pomocí Coomassie Blue G-250 (a). Fosforylované formy proteinu Spr0175-His jsou vizualizovány na autoradiogramu (b). Zkratka KD znamená kinázová doména.

5.8 Průkaz fosforylace proteinu Spr0175 a jeho mutantních forem *in vivo*

Pro průkaz fosforylace proteinu Spr0175 *in vivo* bylo připraveno několik kmenů *S. pneumoniae*: Sp407 (Rx; Δ stkP bga::pZn-spr0175-flag), Sp408 (Rx; bga::pZn-spr0175-flag) a Sp410 (Rx, bga::pZn-spr0175-flag T7A). Tyto kmeny byly nejprve kultivovány v TSB médiu s přidavkem a bez přidavku induktoru exprese ZnSO₄. V celkových lyzátech byla pomocí imunodetekce protilátkou Anti-Flag stanovena koncentrace ZnSO₄, při které docházelo ve všech vzorcích k přibližně stejné expresi proteinu Spr0175-FLAG – 0,3 mM ZnSO₄ u Sp408, 0,1 mM u Sp407 a 0,5 mM u Sp410 (data nejsou uvedena). Protein Spr0175-FLAG byl následně purifikován pomocí Anti-Flag protilátky imobilizované na magnetických kuličkách. Fosforylace těchto purifikovaných proteinů byla detekována protilátkou Anti-P-Thr, zatímco úroveň jejich exprese Anti-Flag protilátkou. K detekci exprese proteinu Spr0175-FLAG protilátkou Anti-Flag byl použit chemiluminiscenční substrát WesternBright ECL (Advansta), zatímco k detekci fosforylace tohoto proteinu byl použit citlivější substrát Sirius (Advansta).

Na obrázku č.35 je zobrazena imunodetekce protilátkami Anti-Flag a Anti-P-Thr. Z výsledků vyplývá, že exprese proteinů Spr0175-FLAG/Spr0175-FLAG T7A je u všech testovaných kmenů stejná (Obrázek č.35b). Hladina fosforylace proteinu Spr0175-FLAG proteinkinázou StkP v části a) se u jednotlivých kmenů liší. Fosforylace proteinu Spr0175-FLAG byla detekována u kmene *spr0175-flag* (Sp408). V kmeni Sp407 (Rx; Δ stkP bga::pZn-spr0175-flag) s delecí proteinkinázy StkP k fosforylaci nedocházelo. Fosforylace nebyla detekována ani po záměně hlavního fosforylačního místa, threoninu v pozici 7 za alanin u kmene Sp410 (Rx; bga::pZn-spr0175-flag T7A). Lze tedy konstatovat, že protein Spr0175 je skutečným substrátem proteinkinázy StkP *in vivo* a jeho hlavním a zároveň jediným fosforylačním místem je threonin v pozici 7.

Dále byl protilátkou Anti-P-Thr detekován neznámý proteinový proužek, jenž je také substrátem kinázy StkP, jelikož v kmeni Sp407 s odstraněnou StkP proteinkinázou není fosforylován (Obrázek č.34a). Pro identifikaci tohoto neznámého substrátu byl proveden další experiment popsáný v kapitole 5.9.



Obrázek č.35: Detekce fosforylace substrátu Spr0175 kinázou StkP *in vivo*. Fosforylované proteiny byly detekovány pomocí protilátky Anti-P-Thr (a). Jako kontrola stejné nanášky všech vzorků byla použita imunodetekce pomocí protilátky Anti-Flag (b). Zkratka St označuje standard molekulových hmotností; velikost proteinu Spr0175 je 10,3 kDa. Detekce byla provedena u kmenů Sp408 (Rx; *bga::pZn-spr0175-flag*), Sp407 (Rx; Δ *stkP bga::pZn-spr0175-flag*) a Sp410 (Rx; *bga::pZn-spr0175-flag T7A*).

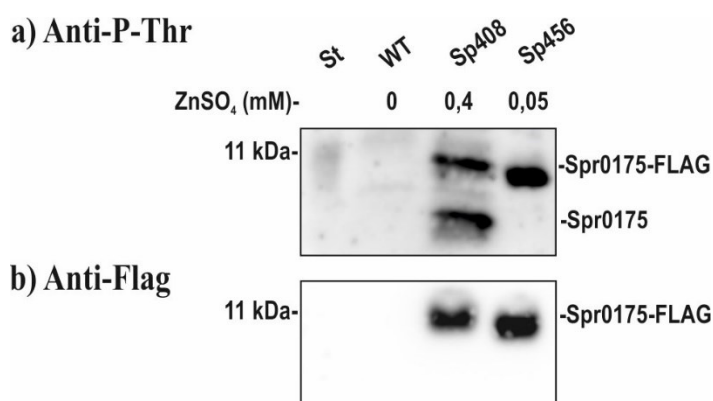
5.9 Identifikace neznámého substrátu proteinkinázy StkP a interakčního partnera proteinu Spr0175

V předešlé kapitole byla zmíněna detekce protilátkou Anti-P-Thr neznámého proteinu. Vzhledem k tomu, že fosforylační signál nebyl detekován v kmeni Sp407 s odstraněnou StkP proteinkinázou (Rx; Δ *stkP bga::pZn-spr0175-flag*), jevílo se jako pravděpodobné, že neznámý protein je substrátem kinázy StkP. Pro vysvětlení existence tohoto substrátu jsme navrhli dvě hypotézy: mohlo by se jednat o nový substrát kinázy StkP, který zároveň interaguje s proteinem Spr0175 anebo by druhý pozitivní proteinový proužek mohl představovat nativní formu proteinu Spr0175. Při purifikaci proteinu Spr0175-FLAG mohlo dojít k jeho současné kopurifikaci s proteinem Spr0175 z nativního lokusu, který nemá Flagovou kotvu a bude tedy na gelu migrovat rychleji než protein fúzovaný s Flagovou kotvou.

Abychom určili, zda se jedná o nativní protein Spr0175, nebo se jedná o jiný substrát StkP interagující s proteinem Spr0175, byl navržen experiment, v němž byly testovány na přítomnost fosforylačního signálu dva kmeny: Sp408 (Rx, *bga::pZn-spr0175-flag*) a Sp456 (Rx, Δ *spr0175 bga::pZn-spr0175-flag*). Předpokládali jsme, že pokud by se jednalo o nativní protein Spr0175 nebude fosforylační signál v kmeni s delecí genu *spr0175* v nativním lokusu (Sp456) přítomen. Pokud by se jednalo o jiný substrát proteinkinázy StkP interagující s proteinem Spr0175-FLAG, signál bude detekován i v kmeni s odstraněnou nativní alelou genu *spr0175* (Sp456). Jako negativní kontrola byl použit divoký kmen Sp1. Expres proteinů byla navozena induktorem ZnSO₄ a proteiny byly purifikovány pomocí protilátky Anti-Flag imobilizované na magnetických kuličkách. Míra exprese proteinů byla detekována protilátkou

Anti-Flag a vizualizována použitím substrátu WesternBright ECL (Advansta). Detekce fosforylace neznámého substrátu proteinkinázou StkP byla provedena s použitím protilátky Anti-P-Thr citlivějšího chemiluminiscenčního substrátu Sirius (Advansta).

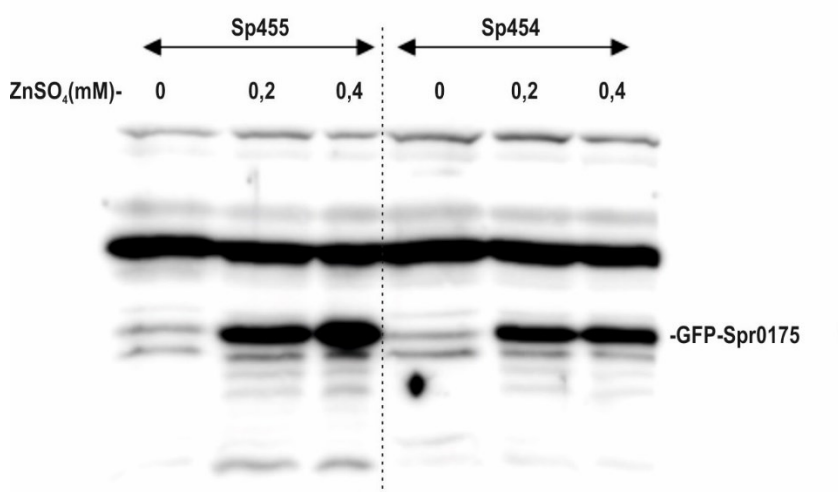
Z výsledku na obrázku č.36 v části b) lze usuzovat, že exprese proteinu detekovaná protilátkou Anti-Flag je u obou kmenů Sp408 (Rx; *bga::pZn-spr0175-flag*) a Sp456 (Rx; Δ *Spr0175 bga::pZn-spr0175-flag*) stejná. V části a) byl protilátkou Anti-P-Thr detekován fosforylační signál u kmene Sp408 (Rx; *bga::pZn-spr0175-flag*), jak u proteinu Spr0175-FLAG, tak u neznámého substrátu, zatímco fosforylace u kmene Sp456 (Rx, Δ *spr0175 bga::pZn-spr0175-flag*) byla detekována pouze u proteinu Spr0175-Flag. U divokého kmene Sp1 nebyla detekována žádná fosforylace. Lze tedy konstatovat, že nativní protein Spr0175 byl koimunoprecipitován spolu s proteinem Spr0175-FLAG exprimovaným z indukibilního promotoru, a tedy že neznámým substrátem je nativní protein Spr0175. Z tohoto pozorování lze usuzovat, že protein Spr0175 a jeho značená forma Spr0175-FLAG vzájemně interagují a pravděpodobně vytvářejí oligomerní struktury.



Obrázek č.36: Identifikace neznámého substrátu proteinkinázy StkP koimunoprecipitovaného s proteinem Spr0175-FLAG. Protein Spr0175-FLAG koprecipituje spolu s nativní formou Spr0175. Fosforylované proteiny jsou detekovány pomocí Anti-P-Thr protilátky (a). Jako kontrola stejné nanášky všech vzorků byla použita imunodetekce pomocí Anti-Flag protilátky (b). Zkratka St označuje standart molekulových hmotností. Detekce byla provedena na proteinech purifikovaných z kmenů Sp1 (WT; negativní kontrola), Sp408 (Rx; *bga::pZn-spr0175-flag*) a Sp456 (Rx; Δ *spr0175 bga::pZn-spr0175-flag*).

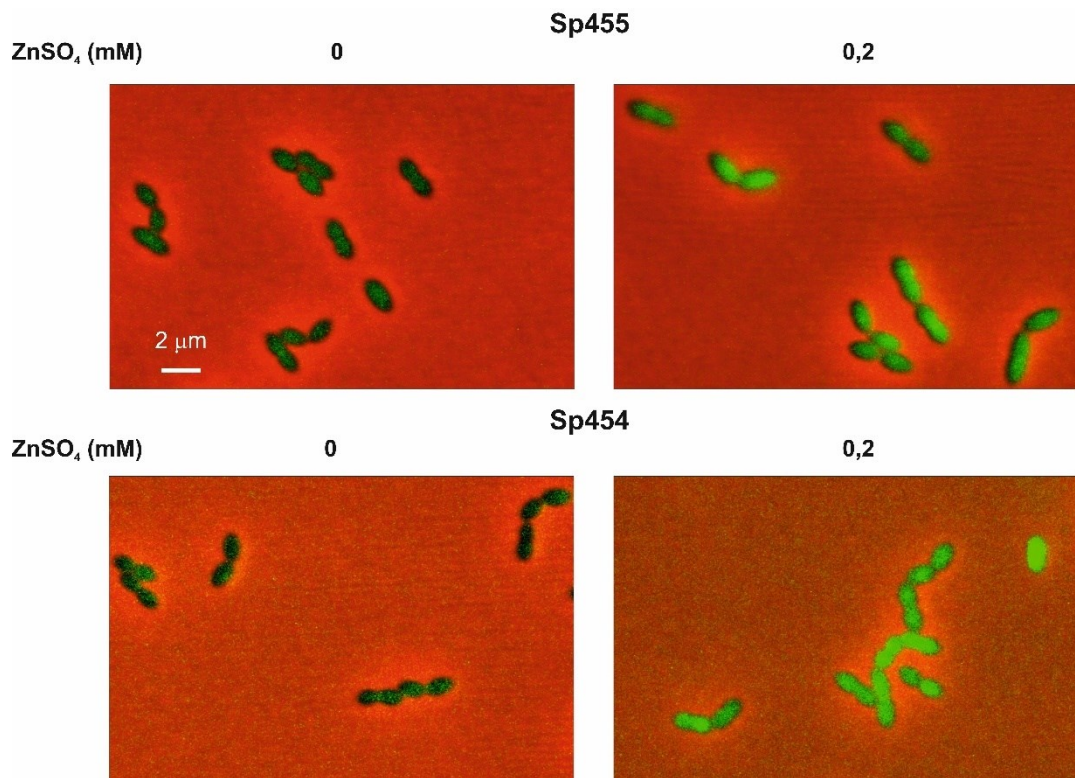
5.10 Lokalizace proteinu Spr0175 a sledování jeho exprese

Ke sledování lokalizace a exprese proteinu Spr0175 byly vytvořené kmeny Sp454 (Rx; $\Delta spr0175$ *bga::pZn-gfp-spr0175*) a Sp455 (Rx; *bga::pZn-gfp-spr0175*) kultivovaný v přítomnosti ZnSO₄, induktoru exprese ektopické kopie genu *spr0175*. Exprese proteinu GFP-Spr0175 v gradientu ZnSO₄ (0, 0,2 a 0,4 mM) byla ověřena imunodetekcí proteinových lyzátů pomocí protilátky Anti-GFP. Z obrázku č.37 vyplývá, že již při koncentraci 0,2 mM ZnSO₄ dochází k expresi proteinu GFP-Spr0175. Naproti tomu v nepřítomnosti induktoru ZnSO₄ k expresi proteinu GFP-Spr0175 buď nedochází (nespecifický signál pozadí), a nebo je podstatně nižší než po indukci.



Obrázek č.37: Kontrola exprese GFP-Spr0175 pomocí imunodetekce protilátkou Anti-GFP. Na obrázku je zobrazena imunodetekce exprese GFP-Spr0175 protilátkou Anti-GFP u dvou kmenů **Sp455** (Rx, *bga::pZn-gfp-spr0175*) a **Sp454** (Rx, $\Delta spr0175$ *bga::pZn-gfp-spr0175*) v přítomnosti různých koncentrací induktoru ZnSO₄ (mM): 0, 0,2 a 0,4.

Pro mikroskopickou analýzu byly kmeny Sp 454 (Rx, $\Delta spr0175$ *bga::pZn-gfp-spr0175*) a Sp 455 (Rx, *bga::pZn-gfp-spr0175*) kultivovaný v TSB médiu s a bez přidavku induktoru ZnSO₄. V exponenciální fázi růstu při optické denzitě bakteriální kultury OD₆₀₀ = 0,4 byly z jednotlivých vzorků připraveny mikroskopické preparáty a pořízeny mikroskopické snímky s použitím fluorescenčního filtru pro GFP. Finální obrázky byly vytvořeny překryvem obrázku pořízeného s použitím GFP filtru a obrázku vzniklého použitím fázového kontrastu. Z obrázků č.38 je patrné, že po přidavku 0,2 mM ZnSO₄ dochází k detekci viditelného fluorescenčního signálu přítomného u obou kmenů Sp454 a Sp455. Protein GFP-Spr0175 vykazuje cytoplazmatickou lokalizaci v buňce, a to jak na pozadí divokého kmene, tak v kmeni s odstraněným nativním genem *spr0175*.



Obrázek č.38: Lokalizační profil proteinu GFP-Spr0175. Na obrázku jsou zobrazeny fotografie pořízené překryvem snímků získaných z fázového kontrastu a pomocí fluorescenční mikroskopie s použitím filtru pro GFP. Fotografie byly pořízeny u kmenů **Sp454** (Rx, $\Delta spr0175$ *pJWV25-spr0175*) a **Sp455** (Rx, *pJWV25-spr0175*) s a bez přidavku induktoru ZnSO₄.

6 Diskuze

V genomu grampozitivní bakterie *S. pneumoniae* se nachází jediná kopie genu kódující Ser/Thr proteinkinázu StkP (Nováková *et al.*, 2005). Tento signalizační protein hraje důležitou roli převážně v buněčném dělení a ve virulenci bakterie prostřednictvím fosforylace celé řady substrátů přenosem fosfátové skupiny na fosforylovatelné zbytky (Echenique *et al.*, 2004, Sasková *et al.*, 2007, Beilharz *et al.*, 2012). K identifikaci těchto substrátů byl v naší laboratoři ve spolupráci s laboratoří Ústavu molekulární patologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové analyzován globální fosfoproteom provedený pomocí hmotnostní spektrometrie, přičemž jedním z takto identifikovaných substrátů proteinkinázy StkP byl protein Spr0175, hypotetický protein konzervovaný ve streptokokách. Analýza byla provedena v divokém kmeni a jeho fosfoproteom byl srovnán s mutantním kmenem s odstraněnou proteinkinázou StkP (Δ stkP). V takto provedeném experimentu byl protein Spr0175 určen jako fosforylovaný na threoninu v pozici 7 a to dokonce s nejvyšší intenzitou fosforylace v porovnání s ostatními zjištěnými substráty proteinkinázy StkP (Fabrik a Ulrych, nepublikované výsledky).

Sun *et al.* (2010) provedl také fosfoproteomickou analýzu ovšem pouze v divokém kmeni *S. pneumoniae* D39 a nikoliv ve srovnání s Δ stkP kmenem, což znamená, že identifikoval veškeré fosforylované aminokyselinové zbytky, a tedy i fosforylované proteiny bez ohledu na to, zdali jejich fosforylace je závislá na proteinkináze StkP. Podařilo se mu identifikovat rovněž protein Spr0175 jako fosforylovaný, ovšem na threoninu v pozici 25. U bakterie *Streptococcus suis* byla provedena fosfoproteomická analýza, kde byl jako fosforylovaný substrát proteinkinázou STK, orthologa pneumokokové proteinkinázy StkP, popsán protein SSU05_0066 opět na threoninu v pozici 7, což je ortholog proteinu Spr0175 (Zhang *et al.*, 2017). U *S. agalactiae* byl protein SAK_2030, opět ortholog proteinu Spr0175, určen jako fosforylovaný *in vivo* proteinkinázou Stk1, ortholog pneumokokové proteinkinázy StkP. Fosforylace SAK_2030 proteinkinázou Stk1 byla detekována na threoninu v pozici 7 a u hyperfosforylovaného kmene s odstraněnou proteinfosfátázou Stp1 také na threoninu v pozici 4. Následně byla i v experimentu *in vitro* potvrzena fosforylace na obou threoninových zbytcích v pozici 4 a 7 (Silvestroni *et al.*, 2009). U bakterie *Enterococcus faecalis* byl identifikován protein IreB, ortholog k proteinu Spr0175, který je fosforylován na zbytcích T4 a T7 proteinkinázou IreK v podmínkách *in vitro*. Podle testů fosforylace *in vivo* není však zcela jasné, který z obou threoninových zbytků je za fosforylaci proteinkinázou IreK zodpovědný (Hall *et al.*, 2013). Podobně byl protein IreB identifikován také u *Clostridium difficile*, kde je

fosforylován proteinkinázou PrkC (Martin-Verstraete Isabelle, prezentováno na konferenci: 3rd International Conference on PTMs in Bacteria, Tübingen, Německo, 2018).

Prvním cílem této diplomové práce bylo připravit mutantní kmen $\Delta spr0175$ *S. pneumoniae* na odlišném genetickém pozadí: Rx (Sp1), R6 (Sp208) a D39 (Sp339). Delece nativního genu *spr0175* byla provedena transformací lineárního konstruktů 0175::SJK, složeného ze dvou okrajových homologních oblastí s vmezeřenou SweetJanus kazetou (Li *et al.*, 2014). Transformační účinnost byla nejvyšší na pozadí Rx kmene, kde jsme získali více než 50 klonů. U *S. pneumoniae* na pozadí R6 byla transformační účinnost výrazně nižší, zde se podařilo získat pouze 7 klonů, zatímco transformace do kmene D39 se opakovaně nezdařila vůbec. Na rozdíl od progenitorového kmene D39, došlo v průběhu dekad u kmenů Rx a R6 k akumulaci mutací v genomové sekvenci, přičemž kmen R6 obsahuje více než 80 mutací oproti progenitorovému kmeni D39 (Lanie *et al.*, 2007), zatímco kmen Rx, jenž obsahuje defektní mismatch repair systém, protože nese mutaci v genu *hexA* (Negri *et al.*, 2002), obsahuje více než 600 dalších mutací oproti kmeni R6 (Rued *et al.*, 2017). Schopnost kmenů Rx a R6 akumulovat supresorové mutace se pak projeví tak, že jsme schopni získat životaschopné klony i při deleci esenciálních genů (Lanie *et al.*, 2007, Massidda *et al.*, 2013). Vzhledem k tomu, že se nám nepodařilo provést deleci genu *spr0175* v kmeni D39 a delece tohoto genu v kmeni R6 vedla k velice nízkému počtu transformantů, předpokládáme, že by tento gen mohl být pro životaschopnost *S. pneumoniae* skutečně esenciální. V souladu s touto hypotézou je i fakt, že v práci Thannasi *et al.* (2002), která byla zaměřená na studium esenciality genů *S. pneumoniae* založené na postupné inzerční inaktivaci, byl tento protein popsán jako esenciální. Naopak ve studii Martín-Galiano *et al.* (2014) se příprava $\Delta spr0175$ kmenů podařila připravit na genetickém pozadí R6 i D39 kmeni. Možnou přítomností supresorových mutací se však práce nezabývá. K potvrzení či vyvrácení možné esenciality genu *spr0175* je však třeba provést další experimenty.

Získané $\Delta spr0175$ mutantní kmeny na odlišném genetickém pozadí *S. pneumoniae*: Rx a R6 byly dále analyzovány morfologicky a růstově. Vzhledem k výše popsané genetické plastičnosti tohoto organismu bylo třeba testovat pro každý kmen několik klonů. Pokud je totiž hypotéza o esencialitě genu *spr0175* správná, získané deleční klony mohou obsahovat supresorové mutace v různých genech, což se může projevit různým chováním jednotlivých klonů. Zjistili jsme, že kmen Sp353 (Rx; $\Delta spr0175::SweetJanus$) tvoří velmi heterogenní populaci. Buňky jsou v porovnání s WT kmenem ($1,64 \pm 0,31 \mu\text{m}$) v případě klonu 353_k1 (Sp353_k1 ($1,72 \pm 0,43 \mu\text{m}$)) statisticky významně větší, v případě klonu Sp353_k8 ($1,60 \pm 0,34$

μm) je statistický rozdíl nevýznamný a u klonů Sp353_k9 ($1,48 \pm 0,40 \mu\text{m}$), Sp353_k17 ($1,43 \pm 0,37 \mu\text{m}$) a Sp353_k19 ($1,48 \pm 0,35 \mu\text{m}$) jsou buňky statisticky významně menší. Delece genu *spr0175* na pozadí Rx zároveň vedla k buněčným defektům. Část populace buněk měla lokalizovanou buněčnou přepážku mimo střed buňky, což naznačuje defekt v buněčném dělení. Naproti tomu kmen Sp352 (R6; $\Delta\text{spr0175}::\text{SweetJanus}$) tvořil značně uniformní populaci. Veškeré testované klony byly statisticky významně menší (přibližně v rozmezí 1,19 až 1,33 μm) než buňky WT kmene Sp208 ($1,46 \pm 0,27 \mu\text{m}$). Zároveň byl u všech delečních klonů $\Delta\text{spr0175}::\text{SweetJanus}$, připravených na pozadí divokého kmene R6 pozorován problém s jejich rozdělením, jenž vedl k tvorbě řetízků. U divokého kmene, který tvoří převážně diplokoky, pouze 4 % buněk se nacházela v řetízcích, zatímco procentuální zastoupení buněk v řetízcích u kmene Sp352 (R6; $\Delta\text{spr0175}::\text{SweetJanus}$) se pohybovalo v rozmezí 11-63 %, což průměrně dělá 44 ± 21 % pro 5 testovaných klonů. Shodný fenotyp jako u kmene Sp352 (R6; $\Delta\text{spr0175}::\text{SweetJanus}$) byl pozorován i u kmene Sp398 (R6; $\Delta\text{spr0175}$) s odstraněnou SweetJanus kazetou, buňky byly statisticky významně menší (přibližně 1,18–1,21 μm) v porovnání s WT kmenem Sp208 ($1,45 \pm 0,28 \mu\text{m}$). Stejně tak tvořily buňky Sp398 (R6; $\Delta\text{spr0175}$) krátké řetízky, jejichž procentuální zastoupení bylo u klonu k1 54 % a u klonu k2 32 % v porovnání s WT kmenem, kde pouze 4 % buněk je v řetízcích. Morfologický projev mutantních buněk $\Delta\text{spr0175}$ pozorovaný na genetickém pozadí R6 divokého kmene odpovídá dosavadním výsledkům publikovaným v práci Martín-Galiano *et al.* (2014), kde buňky $\Delta\text{spr0175}$ na pozadí R6 rostly v krátkých řetízcích. Buňky $\Delta\text{spr0175}$ na pozadí R6 popsané v této práci měly zároveň silně defektní autolýzu se sníženou schopností virulence a byla u nich testována také citlivost k antibiotikům vankomycinu a penicilinu. Zatímco u divokého kmene *S. pneumoniae* R6 došlo po přidání obou antibiotik k redukci optické hustoty kultury (OD_{620}) desetinásobně a ke snížení viability (přežití) buněk o 4 řády, v mutantním kmeni $\Delta\text{spr0175}$ po přidání ATB nedošlo k žádné redukci optické hustoty (OD_{620}) a viabilita bakterií byla snížena pouze o 1 řád, prokazující silný defekt v autolýze podobný jako v mutantním kmeni ΔlytA (defektní pro autolýzin). U kmene D39 pak byla zjištěna snížená schopnost virulence. (Martín-Galiano *et al.*, 2014).

Dále jsme také chtěli charakterizovat kmeny $\Delta\text{spr0175}$ připravené na genetickém pozadí divokého kmene R6 a Rx z hlediska růstových vlastností. Vzhledem k tomu, že jsme nemohli vyloučit možnost esenciality genu *spr0175*, a tedy případný výskyt supresorových mutací u připravených delečních kmene $\Delta\text{spr0175}$, které se mohou vytvořit během procesu transformace delečního konstruktů, anebo až v průběhu pasážování delečních kmenů, testovali jsme růst

vybraných klonů i v průběhu několika dalších generací. Zjistili jsme, že testované klony kmene Sp353 (Rx; $\Delta spr0175::SweetJanus$) rostou celkem podobně jako divoký kmen Sp1 s dobou zdvojení 29 minut. Doba zdvojení u kmene Sp353_k1 byla 31 minut a tato doba byla shodná i po proběhlém pasážování, stejně tak kmen Sp533_k8, který rostl s dobou zdvojení 33 minut, vlivem pasážování své růstové vlastnosti nezměnil. U dvou testovaných klonů však došlo ke zlepšení jejich růstových vlastností vlivem pasážování. Doba zdvojení pro kmen Sp353_k9 byla snížena o 1 minutu z 33 na 32 minut a doba zdvojení u kmene Sp353_k17 byla vlivem pasážování snížena o 2 minuty z 33 na 31 min. Posun křivek v grafu však není dán kratší dobou zdvojení, ale zkrácením lag fáze. Růstové vlastnosti jsme následně testovali u kmene Sp352 (R6; $\Delta spr0175::SweetJanus$) na pozadí R6 divokého kmene. Doba zdvojení byla u těchto kmenů výrazně delší v porovnání s WT kmenem Sp208 (doba zdvojení 42 minut), kde doba zdvojení pro kmen Sp352_k2 byla 65 minut, pro kmen Sp352_k3 54 minut a pro kmen Sp352_k4 61 minut. Výrazné zrychlení v růstu vlivem pasážování bylo zaznamenáno u všech testovaných klonů, zároveň bylo pozorováno významné zkrácení lag fáze. Po IV. pasážování rostly klony Sp352_k2 a Sp352_k3 jen o 2 minuty pomaleji (doba zdvojení 44 minut) a klon Sp352_k4 o 5 minut pomaleji (doba zdvojení 47 minut) než divoký kmen Sp208 (doba zdvojení 42 minut). Testování růstových vlastností následně probíhalo i u kmene Sp398 (R6; $\Delta spr0175$) s odstraněnou Sweet Janus kazetou. Byl opět zaznamenán fenomén pomalejšího růstu oproti WT a delší lag fáze. Doba zdvojení pro 4 testované klony byla v porovnání s divokým kmenem Sp208 s dobou zdvojení 42 minut, 46 minut pro kmen Sp398_k1, 51 minut pro kmen Sp398_k2, 43 minut pro kmen Sp398_k3 a 50 minut pro kmen Sp398_k4. Zajímá nás také vliv pasážování u kmene s delecí Sweet Janus kazety, proto byl klon Sp398_k1 (R6, $\Delta spr0175$) testován v dalších generacích. Zjistili jsme, že opět dochází ke zkrácení lag fáze vlivem pasážování a doba zdvojení je po III. pasážování je pouze o jednu minutu pomalejší (43 minut) než u divokého kmene (42 minut). Zároveň je zřejmé, že přítomnost Sweet Janus kazety u kmene Sp352 nemá vliv na fyziologii delečního kmene, jelikož kmen bez Sweet Janus kazety Sp398 se chová z hlediska růstových vlastností a morfologie podobně jako kmen Sp352.

Analýzou profilů růstových křivek lze usoudit, že gen *spr0175* by mohl být skutečně esenciální. Tuto hypotézu podporuje skutečnost, že jednotlivé klony získaných deleční kmenů jsou, co se týče růstových vlastností, fenotypově nestabilní. Postupným pasážování může dojít k selekci stabilních kmenů, které rostou podobně jako divoký kmen, což může souviset se selekcí vhodných supresorových mutací. Podobný fenomén byl pozorován také u $\Delta stkP$ kmene. Gen *stkP* sice není esenciální, ale během pasážování $\Delta stkP$ kmene dochází k obnovení na

morfologii divokého kmene. Tyto buňky ztrácejí svůj Δ stkP charakteristický tvar (prodloužené buňky s mnohonásobným septem) a začínají se podobat divokému typu *S. pneumoniae* (Beilharz *et al.*, 2012). K ověření hypotézy kalkulující s akumulací supresorových mutací se v nejbližší budoucnosti chystáme podrobit vybrané deleční kmeny Δ spr0175 celogenomové sekvenaci, která by nám mohla odhalit identitu těchto mutací. Na druhou stranu morfologie delečních kmenů Δ spr0175 na genetickém pozadí R6 divokého kmene (Sp352, Sp398) se zdá být stabilní, což nasvědčuje tomu, že případná existence supresorových mutací by se mohla vyskytovat v jedné společné metabolické dráze. Buňky všech testovaných klonů kmene Spr352 a Sp398 jsou statisticky významně menší a tvoří řetízky v porovnání s divokým kmenem Sp208 (R6), což naznačuje, že mutantní kmeny mají problém s periferním růstem a následným odělením dceřiných buněk. Zdá se tedy, že gen *spr0175* bude hrát nějakou úlohu v buněčném dělení.

Abychom odhalili, zdali je výsledný fenotyp delečních kmenů způsoben delecí genu *spr0175* a nebo výsledkem kumulativního efektu delece genu *spr0175* spojeného s výskytem supresorové mutace, byly připraveny kmeny pro komplementaci. Z časových důvodů bohužel nebyla analýza těchto kmenů uskutečněna, a proto bude předmětem dalšího studia.

Na základě výsledků hmotnostní spektrometrie (Fabrik a Ulrych, nepublikované výsledky) a výsledků popsané fosforylace orthologních proteinů (Zhang *et al.*, 2017, Silvestroni *et al.*, 2009) byla vyslovena hypotéza, že je protein Spr0175 fosforylovaný proteinkinázou StkP na threoninu v pozici 7 u *S. pneumoniae*. Tuto hypotézu jsme nejprve testovali v podmínkách *in vitro* a za tímto účelem připravili kmen Ec387 (*E. coli* Bl21; *pETPhos0175*) s expresním plazmidem *pETPhos0175*. Indukce exprese proteinu His-Spr0175 byla navozena přidávkou 0,5 mM IPTG. S purifikovaným proteinem His-Spr0175 byla poté provedena kinázová reakce *in vitro* v přítomnosti kinázové domény StkP (KD) s následnou imunodetekcí pomocí protilátek Anti-His a Anti-P-Thr s využitím chemiluminiscenčního substrátu WesternBright ECL (Advansta). Z výsledků imunodetekce Anti-His byla patrná jak rovnoměrná hladina nanášky proteinu His-Spr0175, tak rovnoměrná koncentrace kinázové domény KD. Funkčnost systému imunodetekce protilátkou Anti-P-Thr byla ověřena detekcí známého substrátu proteinkinázy SktP proteinu FtsA, jenž putuje jako dvojproužek (Kubincová, 2017, Beilharz *et al.*, 2012). Detekce fosforylace proteinu His-Spr0175 však byla neúspěšná. Neúspěch Anti-P-Thr detekce lze pravděpodobně vysvětlit lokalizací histidinové značky na N-konci proteinu Spr0175 znemožňující tak účinnou fosforylací aminokyselinových zbytků T4 a T7 nacházejících se v těsné blízkosti. V dalším kroku jsme se proto zaměřili na přípravu kmene Ec411 (*E. coli*

BL21; pET42b0175) obsahujícího expresní plasmid *pET42b0175* fúzovaný s histidinovou značkou na C-konci proteinu Spr0175. C-koncovou fúzi proteinu SAK_2030, ortholog Spr0175, u *S. agalactiae* úspěšně použil Silvestroni *et al.* (2009) v kinázové reakci *in vitro*. Abychom mohli identifikovat konkrétní fosforylovatelný aminokyselinový zbytek, připravili jsme kmen Ec413 (*E. coli BL21; pET42b0175 T7A*) s fosfoablativní záměnou v pozici T7 a kmen Ec416 (*E. coli BL21; pET42b0175 T4A T7A*) s fosfoablativními záměnami na obou aminokyselinových zbytcích T4 a T7 proteinu Spr0175-His. Indukce exprese proteinu byla opět navozena přidávkem 0,5 mM IPTG a purifikované rekombinantní proteiny byly podrobeny kinázové reakci *in vitro*. K detekci proteinu Spr0175-His a jeho mutovaných variant a k detekci fosforylace byly následně použity protilátky Anti-His a Anti-P-Thr. Imunodetekcí Anti-His bylo ověřeno, že hladina proteinu Spr0175-His a hladina KD je rovnoměrná. Dále výsledky ukázaly, že divoká nemutovaná forma proteinu Spr0175-His na rozdíl od fosfoablativních forem putuje na gelu jako dvojproužek, značící možnou existenci dvou izoforem. Podobným způsobem se chová celá řada fosforylovaných proteinů, jako např. KhpB/jag/EloR (Ulrych *et al.*, 2016, Stamsas *et al.*, 2017, Zheng *et al.*, 2017, Jarošová, 2017), FtsA (Kubincová, 2017, Beilharz *et al.*, 2012), GpsB (Doubravová a Ulrych, nepublikované výsledky). Po provedené imunodetekci pomocí Anti-P-Thr byl fosforylační signál detekován pouze u nemutovaného proteinu Spr0175-His, v případě mutovaného proteinu se záměnou T7A fosforylační signál nebyl přítomen, čímž byla prokázána fosforylace proteinu Spr0175 kinázovou doménou (KD) v pozici T7 v podmínkách *in vitro*. Vzhledem k tomu, že množství proteinu či kinázové domény, nebo citlivost použitého chemiluminiscenčního substrátu můžou limitovat schopnost detekce minoritních signálů, byla kinázová reakce *in vitro* zopakována s použitím větší nanášky proteinu Spr0175-His a stejně tak s větším množstvím kinázové domény StkP a pro samotnou Anti-P-Thr imunodetekci byl použit citlivější chemiluminiscenční substrát Sirius (Advansta). Silný fosforylační signál byl po přidání KD k proteinu Spr0175-His opět detekován. Významný úbytek intenzity signálu byl pozorován po záměně hlavního fosforylačního místa v pozici T7 proteinu Spr0175-His, minoritní signál byl ovšem stále přítomen. U *S. agalactiae* byl jako druhé místo fosforylace na proteinu SAK_2030, orthologu Spr0175, identifikován threonin v pozici 4 (Silvestroni *et al.*, 2009). Jelikož jsou oba zbytky T4 a T7 konzervované u streptokoků a navíc také u *E. faecalis* (viz Obrázek č.6), lze předpokládat, že T4 proteinu Spr0175 je druhým místem fosforylace proteinkinázou StkP. Po záměně obou fosforylačních míst T4 a T7 proteinu Spr0175-His došlo k redukci i tohoto slabého signálu, čímž lze tedy konstatovat, že místo T4 je minoritním fosforylačním místem proteinu Spr0175 v *in vitro* podmínkách.

Vzhledem k tomu, že i u proteinu s dvojitou záměnou Spr0175-His T4A/T7A byl stále detekován slabý fosforylační signál a podobná bazální intenzita signálu byla detekována rovněž u všech forem proteinu Spr0175-His bez přidání KD, zajímalo nás, zdali se jedná o nespecifický signál či o slabou autofosforylační aktivitu proteinu Spr0175. Provedli jsme tedy citlivější a metodicky zcela odlišný *in vitro* fosforylační test založený na radioaktivním značení pomocí γ -³²P-ATP. Abychom tedy zjistili, zdali zbytková fosforylace proteinu Spr0175-His T4A/T7A je závislá na kinázové doméně StkP či nikoliv, provedli jsme standardním způsobem kinázovou reakci *in vitro* pouze s použitím radioaktivně značeného γ -³²P-ATP. Coomassie blue G-250 barvením jsme ověřili nanášku rekombinantních proteinů Spr0175-His a KD a provedli detekci radioaktivního signálu. Nejsilnější signál byl opět přítomen u divoké formy proteinu Spr0175 potvrzující, že protein Spr0175-His je substrátem proteinkinázy StkP *in vitro*. Záměna T7A proteinu Spr0175 vedla k výraznému úbytku signálu a po dvojitě záměně T4A a T7A zbytků proteinu Spr0175-His došlo téměř k jeho úplnému vymizení. Tato skutečnost opět potvrdila zbytek T4 jako druhé místo fosforylace proteinkinázou StkP v podmínkách *in vitro*. Dále jsme také zjistili, že protein Spr0175 je fosforylován proteinkinázou StkP na dalším dosud neznámém třetím místě, jelikož i po dvojitě záměně T4A a T7A v proteinu Spr0175-His byl v přítomnosti KD velice slabý specifický signál stále detekován, zatímco v nepřítomnosti KD signál detekován není, což vylučuje možnou autofosforylacii Spr0175.

Dále nás také zajímalo, zda dochází k fosforylaci proteinu Spr0175 proteinkinázou StkP i v podmínkách *in vivo*. Připravili jsme proto několik kmenů *S. pneumoniae*: Sp407 (Rx; Δ stkP bga::pZn-spr0175-flag), Sp408 (Rx; bga::pZn-spr0175-flag) a Sp410 (Rx, bga::pZn-spr0175-flag T7A) exprimujících protein Spr0175-FLAG z lokusu bga z inducibilního zinkem řízeného promotoru. Expres proteinů Spr0175-FLAG či Spr0175-FLAG T7A byla testována protilátkou Anti-Flag s použitím chemiluminiscenčního substrátu WesternBright ECL (Advansta) a byla u všech kmenů stejná. Fosforylace proteinu Spr0175-FLAG byla detekována Anti-P-Thr protilátkou s použitím citlivějšího substrátu Sirius (Advansta). Vzhledem k tomu, že byla fosforylace detekována pouze v kmeni Sp408 (Rx; bga::pZn-spr0175-flag), zatímco v kmeni Sp407 (Rx; Δ stkP bga::pZn-spr0175-flag) s delecí proteinkinázy StkP nebyl signál přítomen, můžeme konstatovat, že se skutečně jedná o substrát proteinkinázy StkP potvrzený v podmínkách *in vivo*. Zároveň jsme potvrdili jako hlavní místo fosforylace proteinu Spr0175 v *in vivo* podmínkách zbytek T7, jelikož fosforylační signál v kmeni Sp410 (Rx; bga::pZn-spr0175-flag T7A) s fosfoablativní záměnou threoninu v pozici 7 za alanin odpovídající velikosti proteinu Spr0175-FLAG nebyl přítomen. Zmíněnou analýzou se nám podařilo také

detekovat neznámý fosforylovaný proteinový proužek putující v gelu s nižší molekulovou hmotností než Spr0175-FLAG. Tento neznámý fosforylovaný proužek je substrátem proteinkinázy StkP, jelikož byl detekován v kmenech Sp408 a Sp410, zatímco v kmeni Sp407 s delecí StkP detekován nebyl. Existují dvě varianty vysvětlující přítomnost tohoto substrátu: buď se jedná o nový substrát proteinkinázy StkP interagující zároveň s proteinem Spr0175 nebo se jedná o nativní protein Spr0175 kopurifikovaný spolu s proteinem Spr0175-FLAG, kde lze nižší pohyblivost v gelu vysvětlit nepřítomností kotvy FLAG. Abychom mohli rozlišit mezi těmi dvěma možnostmi, provedli jsme experiment, při kterém jsme testovali přítomnost fosforylačního signálu u dvou kmenů: u kmene Sp408 (Rx, *bga::pZn-spr0175-flag*) se dvěma kopiemi genu *spr0175* (nativní *spr0175* a *spr0175-flag*) a u kmene Sp456 (Rx, Δ *spr0175 bga::pZn-spr0175-flag*) s delecí genu *spr0175* v nativním lokusu, který kóduje pouze zinkem řízenou expresi ektopickou alelu *spr0175-flag*. U obou kmenů byla detekována fosforylace proteinu Spr0175-FLAG. Jelikož byl fosforylační signál neznámé proteinového proužku přítomen pouze v kmeni Sp408, zatímco v kmeni Sp456 s odstraněnou alelou nativního genu *spr0175* nikoliv, identifikovali jsme tento substrát jako nativní protein Spr0175. Na závěr lze tedy říct, že protein Spr0175 koimunoprecipitoval se značeným proteinem Spr0175-FLAG exprimovaným z inducibilního promotoru a že spolu tyto dvě formy proteinu interagují za vzniku oligomerních struktur. Jedná se tedy o důkaz oligomerizace proteinu Spr0175 v podmínkách *in vivo*, který koresponduje s potvrzenou dimerizací proteinu IreB u *E. faecalis* (Hall *et al.*, 2017) pozorovanou v podmínkách *in vitro* i *in vivo*.

Porovnáním výsledků získaných z *in vitro* a *in vivo* analýzy fosforylace Spr0175 proteinkinázou StkP vyplývá, že zatímco v *in vitro* testech se podařilo indentifikovat či detekovat pravděpodobně tři místa fosforylace (T4, T7 a neznámý fosforylační zbytek), v analýze *in vivo* pouze jeden hlavní zbytek v pozici T7. Tento rozdíl může být dán nižší specifitou kinázové reakce v podmínkách *in vitro*, kdy v přítomnosti velkého nadbytku reakčních komponent může dojít k fosforylaci i zbytků, které za fyziologických podmínek fosforylovány nejsou. Na druhou stranu detekce fosforylovaných zbytků T4 a neznámého 3. zbytku proteinu Spr0175 *in vivo* může být pod detekčním limitem použité metody. Abychom definitivně prokázali, zdali je i T4 a případně i 3. neznámý slabě fosforylovaný zbytek proteinu Spr0175 fosforylován *in vivo*, plánujeme provést MS analýzu ve spojení s obohacením fosfopeptidu na TiO₂ kolonkách proteinu Spr0175 purifikovaného přímo z *S. pneumoniae*.

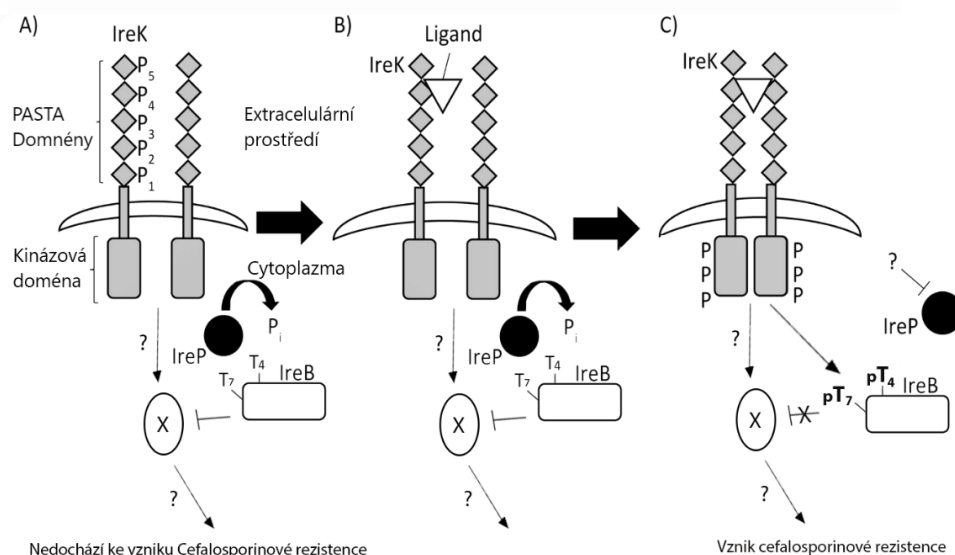
Pro stanovení lokalizace proteinu Spr0175 v buňce byly vytvořeny kmeny Sp454 (Rx; Δ *spr0175 bga::pZn-gfp-spr0175*) a Sp455 (Rx; *bga::pZn-gfp-spr0175*) exprimující protein

Spr0175 fúzovaný s GFP ze zinkem indukovaného promotoru. Protilátkou Anti-GFP byla ověřena exprese proteinu GFP-Spr0175 v přítomnosti ZnSO₄. Exprimovaný protein GFP-Spr0175 je stabilní a jako optimální hladina induktoru pro jeho expresi byla stanovena koncentrace 0,2 mM. Protein GFP-Spr0175 vykazoval cytoplazmatickou lokalizaci v buňce, a to jak na pozadí divokého kmene, tak v kmeni s odstraněným nativním genem *spr0175*. Nelze avšak zcela vyvrátit pochybnost, že pozorovaná lokalizace proteinu Spr0175 volně v cytoplazmě by mohla být artefaktem způsobeným nefunkčností či částečnou funkčností fúzního proteinu GFP-Spr0175. Je třeba vzít v úvahu velikost samotného proteinu Spr0175 a GFP fluorescenční značky. Zatímco velikost GFP je 27 kDa, velikost proteinu Spr0175 je pouze 10,3 kDa. Je tedy možné, že samotné navázání GFP značky na malý protein Spr0175 ovlivní konformaci celého fúzního proteinu natolik, že GFP-Spr0175 ztrácí schopnost lokalizace. Na druhou stranu např. protein GpsB, který má molekulovou hmotnost 27 kDa po fúzi s GFP je zcela funkční (Fleurie *et al.*, 2014). Funkčnost proteinu GFP-Spr0175 by mohla být také narušena nevhodně připravenou fúzí N-konce proteinu Spr0175 s GFP. Oba fosforylované zbytky T4 a T7 leží prakticky na N-konci proteinu, takže vzniklá N-koncová fúze s GFP může mít za následek neschopnost proteinu Spr0175 být regulován prostřednictvím fosforylace a defosforylace signalizačního páru StkP/PhpP, co by mohlo vést k nesprávné lokalizaci či delokalizaci proteinu GFP-Spr0175. Vzhledem k tomu, že ani fosforylace *in vitro* fúzního proteinu Spr0175 s histidinovou kotvou na N-konci nebyla funkční, lze předpokládat, že i fosforylace *in vivo* u proteinu GFP-Spr0175 nefunguje a že tedy N-koncová fúze proteinu GFP-Spr0175 má vliv na funkčnost proteinu. Ovšem je také možné, že fosforylace Spr0175 na jeho lokalizaci vliv nemá, a tedy GFP-Spr0175 může být z hlediska lokalizace funkční. Zda má vliv fosforylace proteinu Spr0175 na lokalizaci zatím však nelze říci. V současné době se chystáme testovat lokalizaci proteinu Spr0175-GFP s C-koncovou fúzí, která by nám mohla pomoc vyřešit lokalizační kvíz.

Jak již bylo uvedeno na začátku diskuze, u bakterie *Enterococcus faecalis* byl identifikován protein IreB, ortholog k proteinu Spr0175 *S. pneumoniae* (Hall *et al.*, 2013). Vzhledem k tomu, že IreB je zatím nejlépe prostudovaným proteinem, je na místě zde o něm uvést dosavadní nasbírané znalosti a zmínit model působení IreB v buňce.

E. faecalis je významný nemocniční patogen, zejména co se týče rezistence k cefalosporinu. Důležitou regulační úlohu v rezistenci k cefalosporinům sehrává proteinfosfatáza IreP a Ser/Thr proteinkináza IreK, obsahující 5 neidentických PASTA domén a intracelulární Ser/Thr proteinkinázovou doménu; orthologní proteiny k signalizačnímu páru

StkP/PhpP u *S. pneumoniae*. Role IreK a IreP je antagonistická. Zatímco delece *ireK* vede ke zvýšené citlivosti k cefalosporinovým ATB, mutantní kmeny $\Delta ireP$ jsou hyper-rezistentní (Kristich *et al.*, 2011). V práci Hall *et al.*, (2013) byl identifikován substrát IreK/IreP signalizačního páru nazvaný IreB, který je orthologem proteinu Spr0175. IreB je jak v podmínkách *in vitro*, tak *in vivo* fosforylovaný na threoninech v pozicích 4 a 7, které odpovídají threoninovým zbytkům identifikovaným u proteinu Spr0175 *S. pneumoniae*. IreB působí jako negativní regulátor v cefalosporinové rezistenci. Mutace fosforylovaných zbytků v pozicích T4 a T7, které brání modifikaci proteinu IreB proteinkinázou IreK, tj. záměny threoninových zbytků na alaninové, ovlivňují schopnost IreB modulovat cefalosporinovou rezistenci. Dále bylo prokázáno, že protein IreB je funkční v podobě dimeru (Hall *et al.*, 2017). V nepřítomnosti signálního ligandu je podle navrženého modelu proteinkináza IreK málo aktivní a IreB je udržován v nefosforylovaném stavu skrze fosfatázovou aktivitu proteinfosfatázy IreP. Nefosforylovaný IreB tak inhibuje doposud neznámý předpokládaný rezistenční faktor (Hall *et al.*, 2013). V odpovědi na antimikrobiální látky poškozující buněčnou stěnu dochází ke stimulaci IreK vedoucí k homodimerizaci PASTA domén a k autofosforylaci IreK. Takto aktivovaná proteinkináza fosforyluje substrát IreB, který je následně uvolněn z neznámého rezistenčního faktoru, čímž je aktivována dráha vzniku cefalosporinové rezistence. Mechanismus regulace cefalosporinové rezistence je znázorněn na obrázku č.39. V nepřítomnosti antimikrobiálních látek odpovídá IreK na signály asociované s růstem a buněčným dělením, extracelulární PASTA domény nejsou v této signalizační dráze zahrnuty. Naopak jsou PASTA domény vyžadovány při odpovědi IreK na stresové podmínky působící na buněčnou stěnu (Labbe a Kristich, 2017).



Obrázek č.39: Regulace cefalosporinové rezistence IreK a IreP. Na obrázku je zobrazena regulace cefalosporinové rezistence Ser/Thr proteinkinázou IreK a proteinfosfatázou IreP. Po navázání stimulační molekuly (ligandu), dochází k dimerizaci IreK a její autofosforylaci. Takto aktivovaná proteinkináza IreK následně fosforyluje jí příslušný substrát IreB, který ve fosforylovaném stavu uvolňuje neznámý rezistenční faktor X a tím aktivuje dráhu pro cefalosporinovou rezistenci. Upraveno a převzato (Labbe a Kristich, 2017).

Protože kmen $\Delta ireB$ u *E. faecalis* vykazuje zvýšenou rezistenci k cefalosporinu (Hall *et al.*, 2013) a podobně u kmene $\Delta spr0175$ *S. pneumoniae* R6 byla pozorována zvýšená rezistence k vankomycinu a penicilinu (Martín-Galiano *et al.*, 2014), lze předpokládat, že IreB/Spr0175 působí jako negativní regulátor antibiotikové rezistence (Hall *et al.*, 2013; Labbe a Kristich, 2017). Jinými slovy Spr0175/IreB je protein, který zřejmě prostřednictvím fosforylace a defosforylace příslušnou proteinkinázou StkP/IreK reguluje rezistenci k antibiotikům působícím na buněčnou stěnu. Je tedy pravděpodobné, že Spr0175/IreB je protein účastnící se syntézy peptidoglykanu, což koresponduje rovněž s morfologií $\Delta spr0175$ kmene připraveného na pozadí divokého kmene R6 (tato práce, viz kap. 5.5; Martín-Galiano *et al.*, 2014) Mikroorganismy s rezistencí na antimikrobiální látky jsou dnes považovány za jednu z nejvážnějších globálních hrozeb týkajících se lidského zdraví. Je proto nezbytné hledat nové potenciální terapeutické cíle. Studium proteinů buněčného dělení, syntézy buněčné stěny, ale i proteinů uplatňujících se v patogenezi tak zůstává neustálým předmětem zájmu mikrobiologů.

7 Souhrn:

Výsledky této diplomové práce je možné shrnout do následujících bodů:

- Byly připraveny mutantní kmeny $\Delta spr0175$ *S. pneumoniae* na genetickém pozadí laboratorních kmenů Rx a R6. Neúspěšili jsme s delecí genu *spr0175* na genetickém pozadí D39.
- Delece genu *spr0175* na pozadí Rx vede ke značné morfologické heterogenitě. Vznikají buňky větších i menších rozměrů v porovnání s WT. Část populace buněk má buněčnou přepážku lokalizovanou mimo střed. Zároveň se u nich projevuje lehce prodloužená doba zdvojení v porovnání s WT a lze pozorovat lag fázi. Pasážování některých klonů s delecí genu *spr0175* vede ke zlepšení jejich růstových vlastností a k vymizení lag fáze.
- Delece genu *spr0175* na pozadí R6 vede ke vzniku buněk menších rozměrů v porovnání s WT a je u nich přítomna častější tvorba řetízků, značící problémy s jejich rozdělením. Doba zdvojení buněk je podstatně delší v porovnání s WT a je zde přítomna lag fáze. Pasážování klonů s delecí genu *spr0175* na pozadí R6 vede ke zlepšení růstových vlastností a k vymizení lag fáze.
- Vzhledem k výše uvedeným poznatkům se domníváme, že by protein Spr0175 mohl být esenciální, jelikož se zdá, že připravené deleční kmeny akumulují supresorové mutace. Jedná se však o hypotézu, která musí být teprve ověřena pomocí celogenomového sekvenování.
- Defektní morfologie mutantních kmenů $\Delta spr0175$ naznačuje, že Spr0175 by mohl být proteinem buněčného dělení.
- Protein Spr0175 je substrátem proteinkinázy StkP *in vitro*. Hlavním fosforylačním místem je threonin v pozici 7. Minoritním místem fosforylace je threonin v pozici 4. Protein Spr0175 je však fosforylován na dalším třetím dosud neznámém místě, tento signál je však velmi slabý.
- Protein Spr0175 je substrátem proteinkinázy StkP *in vivo*. Hlavním místem fosforylace je threonin v pozici 7.
- Divoká forma proteinu Spr0175 interaguje s fúzním proteinem Spr0175-FLAG za vzniku oligomerních struktur v podmínkách *in vivo*.
- Protein GFP-Spr0175 má difuzní cytoplazmatický lokalizační profil.

8 Citace

- Agarwal S, Agarwal S, Pancholi P & Pancholi V (2012): Strain-specific regulatory role of eukaryote-like serine/threonine phosphatase in pneumococcal adherence. *Infect Immun* 80: 1361-1372.
- Alouf JE & Horaud T (1997): Streptococcal research at Pasteur Institute from Louis Pasteur's time to date. *Adv Exp Med Biol* 418: 7-14.
- Apfel CM, Takacs B, Fountoulakis M, Stieger M & Keck W (1999): Use of genomics to identify bacterial undecaprenyl pyrophosphate synthetase: cloning, expression, and characterization of the essential uppS gene. *J Bacteriol* 181: 483-492.
- Attaiech L, Minnen A, Kjos M, Gruber S & Veening JW (2015): The ParB-parS Chromosome Segregation System Modulates Competence Development in *Streptococcus pneumoniae*. *MBio* 6: e00662.
- Badet B, Vermoote P, Haumont PY, Lederer F & LeGoffic F (1987): Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: purification, properties, and glutamine-utilizing site location. *Biochemistry* 26: 1940-1948.
- Bajaj R, Bruce KE, Davidson AL, Rued BE, Stauffacher CV & Winkler ME (2016): Biochemical characterization of essential cell division proteins FtsX and FtsE that mediate peptidoglycan hydrolysis by PcsB in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiologyopen* 5: 738-752.
- Bakaletz LO (2017): Viral-bacterial co-infections in the respiratory tract. *Curr Opin Microbiol* 35: 30-35.
- Barendt SM, Sham LT & Winkler ME (2011): Characterization of mutants deficient in the L,D-carboxypeptidase (DacB) and WalRK (VicRK) regulon, involved in peptidoglycan maturation of *Streptococcus pneumoniae* serotype 2 strain D39. *J Bacteriol* 193: 2290-2300.
- Barreteau H, Kovac A, Boniface A, Sova M, Gobec S & Blanot D (2008): Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 32: 168-207.
- Barthe P, Mukamolova GV, Roumestand C & Cohen-Gonsaud M (2010): The structure of PknB extracellular PASTA domain from *Mycobacterium tuberculosis* suggests a ligand-dependent kinase activation. *Structure* 18: 606-615.
- Beall B & Lutkenhaus J (1992): Impaired cell division and sporulation of a *Bacillus subtilis* strain with the ftsA gene deleted. *J Bacteriol* 174: 2398-2403.
- Beilharz K, Nováková L, Fadda D, Branny P, Massidda O & Veening JW (2012): Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E905-913.

- Berg KH, Stamsas GA, Straume D & Havarstein LS (2013): Effects of low PBP2b levels on cell morphology and peptidoglycan composition in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Bacteriol* 195: 4342-4354.
- Bi EF & Lutkenhaus J (1991): FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* 354: 161-164.
- Bogaert D, De Groot R & Hermans PW (2004): *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 4: 144-154.
- Bouhss A, Crouvoisier M, Blanot D & Mengin-Lecreulx D (2004): Purification and characterization of the bacterial MraY translocase catalyzing the first membrane step of peptidoglycan biosynthesis. *J Biol Chem* 279: 29974-29980.
- Bramkamp M & van Baarle S (2009): Division site selection in rod-shaped bacteria. *Curr Opin Microbiol* 12: 683-688.
- Brooks LRK & Mias GI (2018): *Streptococcus pneumoniae*'s Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Front Immunol* 9: 1366.
- Busiek KK & Margolin W (2015): Bacterial actin and tubulin homologs in cell growth and division. *Curr Biol* 25: R243-R254.
- Canova MJ, Kremer L & 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.
- De Boer P, Crossley R & Rothfield L (1992): The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature* 359: 254-256.
- De Las Rivas B, Garcia JL, Lopez R & 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 Pascale G, Lloyd AJ, Schouten JA, Gilbey AM, Roper DI, Dowson CG & Bugg TD (2008): Kinetic characterization of lipid II-Ala:alanyl-tRNA ligase (MurN) from *Streptococcus pneumoniae* using semisynthetic aminoacyl-lipid II substrates. *J Biol Chem* 283: 34571-34579.
- Downie AW (1972): Pneumococcal transformation a backward view. Fourth Griffith Memorial Lecture. *J Gen Microbiol* 73: 1-11.
- Dubendorff JW & Studier FW (1991): Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol* 219: 45-59.
- Dworkin J (2015): Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 24: 47-52.

- Eberhardt A, Wu LJ, Errington J, Vollmer W & Veening JW (2009): Cellular localization of choline-utilization proteins in *Streptococcus pneumoniae* using novel fluorescent reporter systems. *Mol Microbiol* 74: 395-408.
- Echenique J, Kadioglu A, Romao S, Andrew PW & Trombe MC (2004): Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 72: 2434-2437.
- El Ghachi M, Bouhss A, Blanot D & Mengin-Lecreux D (2004): The *bacA* gene of *Escherichia coli* encodes an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase activity. *J Biol Chem* 279: 30106-30113.
- Erickson HP, Anderson DE & Osawa M (2010): FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 504-528.
- Fadda D, Pishedda C, Caldara F, Whalen MB, Anderluzzi D, Domenici E & Massidda O (2003): Characterization of *divIVA* and other genes located in the chromosomal region downstream of the *dew* cluster in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 185: 6209-6214.
- Fadda D, Santona A, D'Ulisse V, Ghelardini P, Ennas MG, Whalen MB & Massidda O (2007): *Streptococcus pneumoniae* DivIVA: localization and interactions in a MinCD-free context. *J Bacteriol* 189: 1288-1298.
- Falk SP & Weisblum B (2013): Phosphorylation of the *Streptococcus pneumoniae* cell wall biosynthesis enzyme MurC by a eukaryotic-like Ser/Thr kinase. *FEMS Microbiol Lett* 340: 19-23.
- Fenton AK, El Mortaji L, Lau DT, Rudner DZ & Bernhardt TG (2016): CozE is a member of the MreCD complex that directs cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Microbiol* 2: 16237.
- Fenton AK, Manuse S, Flores-Kim J, Garcia PS, Mercy C, Grangeasse C, Bernhardt TG & Rudner DZ (2018): Phosphorylation-dependent activation of the cell wall synthase PBP2a in *Streptococcus pneumoniae* by MacP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: 2812-2817.
- Fleurie A, Lesterlin C, Manuse S, Zhao C, Cluzel C, Lavergne JP, Franz-Wachtel M, Macek B, Combet C, Kuru E, van Nieuwenhze MS, Brun YV, Sherratt D & Grangeasse C (2014): MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* 516: 259-262.
- Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, Konradsen HB & Nahm MH (2015): Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin Microbiol Rev* 28: 871-899.
- Gerard P, Vernet T & Zapun A (2002): Membrane topology of the *Streptococcus pneumoniae* FtsW division protein. *J Bacteriol* 184: 1925-1931.

- Giefing C, Jelencsics KE, Gelbmann D, Senn BM & 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.
- Grangeasse C (2016): Rewiring the Pneumococcal Cell Cycle with Serine/Threonine- and Tyrosine-kinases. *Trends Microbiol* 24: 713-724.
- Ha S, Walker D, Shi Y & Walker S (2000): The 1.9 Å crystal structure of Escherichia coli MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. *Protein Sci* 9: 1045-1052.
- Hall CL, Tschannen M, Worthey EA & Kristich CJ (2013): IreB, a Ser/Thr kinase substrate, influences antimicrobial resistance in Enterococcus faecalis. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 6179-6186.
- Hall CL, Lytle BL, Jensen D, Hoff JS, Peterson FC, Volkman BF & Kristich CJ (2017): Structure and Dimerization of IreB, a Negative Regulator of Cephalosporin Resistance in Enterococcus faecalis. *J Mol Biol* 429: 2324-2336.
- Hardt P, Engels I, Rausch M, *et al.* (2017): The cell wall precursor lipid II acts as a molecular signal for the Ser/Thr kinase PknB of Staphylococcus aureus. *Int J Med Microbiol* 307: 1-10.
- Havarstein LS, Gaustad P, Nes IF & Morrison DA (1996): Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor. *Mol Microbiol* 21: 863-869.
- Herbert JA, Mitchell AM & Mitchell TJ (2015): A Serine-Threonine Kinase (StkP) Regulates Expression of the Pneumococcal Pilus and Modulates Bacterial Adherence to Human Epithelial and Endothelial Cells In Vitro. *PLoS One* 10: e0127212.
- Holečková N, Doubravova L, Massidda O, Molle V, Buriankova K, Benada O, Kofronova O, Ulrych A & Branny P (2014): LocZ is a new cell division protein involved in proper septum placement in Streptococcus pneumoniae. *MBio* 6: e01700-01714.
- Hussain H, Branny P & 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.
- Chao Y, Marks LR, Pettigrew MM & Hakansson AP (2014): Streptococcus pneumoniae biofilm formation and dispersion during colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol* 4: 194.
- Inoue A, Murata Y, Takahashi H, Tsuji N, Fujisaki S & Kato J (2008): Involvement of an essential gene, mviN, in murein synthesis in Escherichia coli. *J Bacteriol* 190: 7298-7301.
- Ishino F, Park W, Tomioka S, *et al.* (1986): Peptidoglycan synthetic activities in membranes of Escherichia coli caused by overproduction of penicillin-binding protein 2 and rodA protein. *J Biol Chem* 261: 7024-7031.

- Jacq M, Arthaud C, Manuse S, *et al.* (2018): The cell wall hydrolase Pmp23 is important for assembly and stability of the division ring in *Streptococcus pneumoniae*. *Sci Rep* 8: 7591.
- Jung K, Fried L, Behr S & Heermann R (2012): Histidine kinases and response regulators in networks. *Curr Opin Microbiol* 15: 118-124.
- Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC & Andrew PW (2008): The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* 6: 288-301.
- Keller LE, Robinson DA & McDaniel LS (2016): Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*: Emergence and Pathogenesis. *MBio* 7: e01792.
- Kristich CJ, Little JL, Hall CL & Hoff JS (2011): Reciprocal regulation of cephalosporin resistance in *Enterococcus faecalis*. *MBio* 2: e00199-00111.
- Kubincová, H. (2017): Kontrola buněčného dělení *Streptococcus pneumoniae* unikátní signální dráhou. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Labbe BD & Kristich CJ (2017): Growth- and Stress-Induced PASTA Kinase Phosphorylation in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 199.
- Land AD & Winkler ME (2011): The requirement for pneumococcal MreC and MreD is relieved by inactivation of the gene encoding PBP1a. *J Bacteriol* 193: 4166-4179.
- Land AD, Tsui HC, Kocaoglu O, Vella SA, Shaw SL, Keen SK, Sham LT, Carlson EE & Winkler ME (2013): Requirement of essential Pbp2x and GpsB for septal ring closure in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol* 90: 939-955.
- Lanie JA, Ng WL, Kazmierczak KM, Andrzejewski TM, Davidsen TM, Wayne KJ, Tettelin H, Glass JI & Winkler ME (2007): Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J Bacteriol* 189: 38-51.
- Lara B, Rico AI, Petruzzelli S, Santona A, Dumas J, Biton J, Vicente M, Mingorance J & Massidda O (2005): Cell division in cocci: localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA protein. *Mol Microbiol* 55: 699-711.
- Li Y, Thompson CM & Lipsitch M (2014): A modified Janus cassette (Sweet Janus) to improve allelic replacement efficiency by high-stringency negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* 9: e100510.
- Li YH, Tang N, Aspiras MB, Lau PC, Lee JH, Ellen RP & Cvitkovitch DG (2002): A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 184: 2699-2708.
- Lloyd AJ, Gilbey AM, Blewett AM, *et al.* (2008): Characterization of tRNA-dependent peptide bond formation by MurM in the synthesis of *Streptococcus pneumoniae* peptidoglycan. *J Biol Chem* 283: 6402-6417.

- Lobocka M, Hennig J, Wild J & Klotkowski T (1994): Organization and expression of the Escherichia coli K-12 *dad* operon encoding the smaller subunit of D-amino acid dehydrogenase and the catabolic alanine racemase. *J Bacteriol* 176: 1500-1510.
- Maestro B, Nováková L, Heseck D, Lee M, Leyva E, Mobashery S, Sanz JM & 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 & 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 (2009): Sculpting the bacterial cell. *Curr Biol* 19: R812-822.
- Marks LR, Reddinger RM & Hakansson AP (2014): Biofilm formation enhances fomite survival of Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pyogenes. *Infect Immun* 82: 1141-1146.
- Marston AL & 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.
- Martin-Galiano AJ, Yuste J, Cercenado MI & de la Campa AG (2014): Inspecting the potential physiological and biomedical value of 44 conserved uncharacterised proteins of Streptococcus pneumoniae. *BMC Genomics* 15: 652.
- Massidda O, Nováková L & Vollmer W (2013): From models to pathogens: how much have we learned about Streptococcus pneumoniae cell division? *Environ Microbiol* 15: 3133-3157.
- Meeske AJ, Sham LT, Kimsey H, Koo BM, Gross CA, Bernhardt TG & Rudner DZ (2015): MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in Bacillus subtilis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 6437-6442.
- Mellroth P, Daniels R, Eberhardt A, Ronnlund D, Blom H, Widengren J, Normark S & Henriques-Normark B (2012): LytA, major autolysin of Streptococcus pneumoniae, requires access to nascent peptidoglycan. *J Biol Chem* 287: 11018-11029.
- Mengin-Lecreulx D & van Heijenoort J (1994): Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase activities of Escherichia coli: characterization of the glmU gene product as a bifunctional enzyme catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-N-acetylglucosamine synthesis. *J Bacteriol* 176: 5788-5795.
- Mengin-Lecreulx D & van Heijenoort J (1996): Characterization of the essential gene glmM encoding phosphoglucosamine mutase in Escherichia coli. *J Biol Chem* 271: 32-39.

- Mercer KL & Weiss DS (2002): The Escherichia coli cell division protein FtsW is required to recruit its cognate transpeptidase, FtsI (PBP3), to the division site. *J Bacteriol* 184: 904-912.
- Minnen A, Attaiech L, Thon M, Gruber S & Veening JW (2011): SMC is recruited to oriC by ParB and promotes chromosome segregation in Streptococcus pneumoniae. *Mol Microbiol* 81: 676-688.
- Mitchell AM & Mitchell TJ (2010): Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect* 16: 411-418.
- Mitchell TJ (2000): Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by Streptococcus pneumoniae. *Res Microbiol* 151: 413-419.
- Mohammadi T, van Dam V, Sijbrandi R, Vernet T, Zapun A, Bouhss A, Diepeveen-de Bruin M, Nguyen-Disteche M, de Kruijff B & Breukink E (2011): Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J* 30: 1425-1432.
- Morens DM, Taubenberger JK & Fauci AS (2008) Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis* 198: 962-970.
- Morlot C, Noirclerc-Savoie M, Zapun A, Dideberg O & Vernet T (2004): The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of Streptococcus pneumoniae. *Mol Microbiol* 51: 1641-1648.
- Morona JK, Morona R, Miller DC & Paton JC (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: 3009-19.
- Morrison DA, Trombe MC, Hayden MK, Waszak GA & Chen JD (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.
- Mura A, Fadda D, Perez AJ, Danforth ML, Musu D, Rico AI, Krupka M, Denapaite D, Tsui HT, Winkler ME, Branny P, Vicente M, Margolin W & Massidda O (2017): Roles of the Essential Protein FtsA in Cell Growth and Division in Streptococcus pneumoniae. *J Bacteriol* 199.
- Negri MC, Morosini MI, Baquero MR, del Campo R, Blazquez J & Baquero F (2002): Very low cefotaxime concentrations select for hypermutable Streptococcus pneumoniae populations. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 528-30.
- Nemmara VV, Dzhekueva L, Sarkar KS, Adediran SA, Duez C, Nicholas RA & Pratt RF (2011): Substrate specificity of low-molecular mass bacterial DD-peptidases. *Biochemistry* 50: 10091-10101.

- Neuhaus FC (1962): The enzymatic synthesis of D-alanyl-D-alanine. I. Purification and properties of D-alanyl-D-alanine synthetase. *J Biol Chem* 237: 778-786.
- Noirclerc-Savoie M, Le Gouellec A, Morlot C, Dideberg O, Vernet T & Zapun A (2005): In vitro reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 55: 413-424.
- Noirclerc-Savoie M, Lantez V, Signor L, Philippe J, Vernet T & Zapun A (2013): Reconstitution of membrane protein complexes involved in pneumococcal septal cell wall assembly. *PLoS One* 8: e75522.
- Nováková L, Bezoušková S, Pompach P, Spidlova P, Sasková L, Weiser J & Branny P (2010): Identification of multiple substrates of the StkP Ser/Thr protein kinase in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 192: 3629-3638.
- Nováková L, Sasková L, Pallová P, Janecek J, Novotna J, Ulrych A, Echenique J, Trombe MC & 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.
- Ogura K & Koyama T (1998): Enzymatic Aspects of Isoprenoid Chain Elongation. *Chem Rev* 98: 1263-1276.
- Ottolenghi E & Hotchkiss RD (1962): Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. *J Exp Med* 116: 491-519.
- Pallová P, Hercik K, Sasková L, Nováková L & Branny P (2007): A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP of *Streptococcus pneumoniae* acts as a dimer in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 355: 526-530.
- Pereira SF, Goss L & Dworkin J (2011) Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 192-212.
- Pérez J, Castañeda-García A, Jenke-Kodama H, Müller R & Muñoz-Dorado J (2008): Eukaryotic-Like Protein Kinases in the Prokaryotes and the Myxobacterial Kinome. *Proc. Natl. Acad. Sci* 105: 15950–15955.
- Philippe J, Vernet T & Zapun A (2014): The elongation of ovococci. *Microb Drug Resist* 20: 215-221.
- Pichoff S & Lutkenhaus J (2005): Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol Microbiol* 55: 1722-1734.
- Pichoff S, Shen B, Sullivan B & Lutkenhaus J (2012): FtsA mutants impaired for self-interaction bypass ZipA suggesting a model in which FtsA's self-interaction competes with its ability to recruit downstream division proteins. *Mol Microbiol* 83: 151-167.
- Pinas GE, Reinoso-Vizcaino NM, Yandar Barahona NY, Cortes PR, Duran R, Badapanda C, Rathore A, Bichara DR, Cian MB, Olivero NB, Perez DR & Echenique J(2018):

- Crosstalk between the serine/threonine kinase StkP and the response regulator ComE controls the stress response and intracellular survival of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog* 14: e1007118.
- Pozzi G, Masala L, Iannelli F, Manganelli R, Havarstein LS, Piccoli L, Simon D & Morrison DA (1996): Competence for genetic transformation in encapsulated strains of *Streptococcus pneumoniae*: two allelic variants of the peptide pheromone. *J Bacteriol* 178: 6087-6090.
- Rajagopal L, Clancy A & Rubens CE (2003): A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence. *J Biol Chem* 278: 14429-14441.
- Rajagopal L, Vo A, Silvestroni A & Rubens CE (2005): Regulation of purine biosynthesis by a eukaryotic-type kinase in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol* 56: 1329-1346.
- Rued BE, Zheng JJ, Mura A, Tsui HT, Boersma MJ, Mazny JL, Corona F, Perez AJ, Fadda D, Doubravova L, Buriankova K, Branny P, Massidda O & Winkler ME (2017): Suppression and synthetic-lethal genetic relationships of DeltagsB mutations indicate that GpsB mediates protein phosphorylation and penicillin-binding protein interactions in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol* 103: 931-957.
- Ruiz N (2008): Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15553-15557.
- Salvarelli E, Krupka M, Rivas G, Mingorance J, Gomez-Puertas P, Alfonso C & Rico AI (2015): The Cell Division Protein FtsZ from *Streptococcus pneumoniae* Exhibits a GTPase Activity Delay. *J Biol Chem* 290: 25081-25089.
- Sasková L, Nováková L, Basler M & Branny P (2007): Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 189: 4168-4179.
- Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA & Charlier P (2008): The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 32: 234-258.
- Severin A, Schuster C, Hakenbeck R & Tomasz A (1992): Altered murein composition in a DD-carboxypeptidase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 174: 5152-5155.
- Shah IM, Laaberki MH, Popham DL & Dworkin J (2008): A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell* 135: 486-496.
- Sham LT, Tsui HC, Land AD, Barendt SM & Winkler ME (2012): Recent advances in pneumococcal peptidoglycan biosynthesis suggest new vaccine and antimicrobial targets. *Curr Opin Microbiol* 15: 194-203.

- Shanker E & Federle MJ (2017): Quorum Sensing Regulation of Competence and Bacteriocins in *Streptococcus pneumoniae* and mutants. *Genes (Basel)* 8.
- Silvestroni A, Jewell KA, Lin WJ, Connelly JE, Ivancic MM, Tao WA & Rajagopal L (2009): Identification of serine/threonine kinase substrates in the human pathogen group B streptococcus. *J Proteome Res* 8: 2563-2574.
- Smith CA (2006): Structure, function and dynamics in the mur family of bacterial cell wall ligases. *J Mol Biol* 362: 640-655.
- Smith DB & Johnson KS (1988): Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67: 31-40.
- Sohail I, Ghosh S, Mukundan S, Zelewski S & Khan MN (2018): Role of Inflammatory Risk Factors in the Pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*. *Front Immunol* 9: 2275.
- Stamsas GA, Straume D, Ruud Winther A, Kjos M, Frantzen CA & Havarstein LS (2017): Identification of EloR (Spr1851) as a regulator of cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 105: 954-967.
- Stancik IA, Sestak MS, Ji B, Axelson-Fisk M, Franjevic D, Jers C, Domazet-Loso T & Mijakovic I (2018): Serine/Threonine Protein Kinases from Bacteria, Archaea and Eukarya Share a Common Evolutionary Origin Deeply Rooted in the Tree of Life. *J Mol Biol* 430: 27-32.
- Stock AM, Robinson VL & Goudreau PN (2000): Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69: 183-215.
- Straume D, Stamsas GA & Havarstein LS (2015): Natural transformation and genome evolution in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Genet Evol* 33: 371-380.
- Straume D, Stamsas GA, Berg KH, Salehian Z & Havarstein LS (2017): Identification of pneumococcal proteins that are functionally linked to penicillin-binding protein 2b (PBP2b). *Mol Microbiol* 103: 99-116.
- Strych U, Davlieva M, Longtin JP, Murphy EL, Im H, Benedik MJ & Krause KL (2007): Purification and preliminary crystallization of alanine racemase from *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Microbiol* 7: 40.
- Sun X, Ge F, Xiao CL, Yin XF, Ge R, Zhang LH & He QY (2010): Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteome Res* 9: 275-282.
- Thanassi JA, Hartman-Neumann SL, Dougherty TJ, Dougherty BA & Pucci MJ (2002): Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* 30: 3152-3162.
- Thanbichler M & Shapiro L (2006): MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. *Cell* 126: 147-162.

- Treuner-Lange A, Aguiluz K, van der Does C, Gomez-Santos N, Harms A, Schumacher D, Lenz P, Hoppert M, Kahnt J, Munoz-Dorado J & Sogaard-Andersen L (2013): PomZ, a ParA-like protein, regulates Z-ring formation and cell division in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* 87: 235-253.
- Tsui HC, Zheng JJ, Magallon AN, Ryan JD, Yunck R, Rued BE, Bernhardt TG & Winkler ME (2016): Suppression of a deletion mutation in the gene encoding essential PBP2b reveals a new lytic transglycosylase involved in peripheral peptidoglycan synthesis in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol* 100: 1039-1065.
- Ulijasz AT, Falk SP & 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.
- Ulijasz AT, Andes DR, Glasner JD & Weisblum B (2004): Regulation of iron transport in *Streptococcus pneumoniae* by RitR, an orphan response regulator. *J Bacteriol* 186: 8123-8136.
- Ulrych A, Holečková N, Goldova J, Doubravova L, Benada O, Kofronova O, Halada P & Branny P (2016): Characterization of pneumococcal Ser/Thr protein phosphatase phpP mutant and identification of a novel PhpP substrate, putative RNA binding protein Jag. *BMC Microbiol* 16: 247.
- Van Heijenoort J (2011): Peptidoglycan hydrolases of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 636-663.
- Van Raaphorst R, Kjos M & Veening JW (2017): Chromosome segregation drives division site selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E5959-E5968.
- Vollmer W, Blanot D & de Pedro MA (2008): Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 32: 149-167.
- Vu HT, Yoshida LM, Suzuki M, Nguyen HA, Nguyen CD, Nguyen AT, Oishi K, Yamamoto T, Watanabe K & Vu TD (2011): Association between nasopharyngeal load of *Streptococcus pneumoniae*, viral coinfection, and radiologically confirmed pneumonia in Vietnamese children. *Pediatr Infect Dis J* 30: 11-18.
- Willemse J, Borst JW, de Waal E, Bisseling T & van Wezel GP (2011): Positive control of cell division: FtsZ is recruited by SsgB during sporulation of *Streptomyces*. *Genes Dev* 25: 89-99.
- Yeats C, Finn RD & Bateman A (2002): The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends Biochem Sci* 27: 438.
- Yoshimura T, Ashiuchi M, Esaki N, Kobatake C, Choi SY & Soda K (1993): Expression of glr (murI, dga) gene encoding glutamate racemase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268: 24242-24246.

Zhang C, Sun W, Tan M, Dong M, Liu W, Gao T, Li L, Xu Z & Zhou R (2017): The Eukaryote-Like Serine/Threonine Kinase STK Regulates the Growth and Metabolism of Zoonotic *Streptococcus suis*. *Front Cell Infect Microbiol* 7: 66.

Zheng JJ, Perez AJ, Tsui HT, Massidda O & Winkler ME (2017): Absence of the KhpA and KhpB (JAG/EloR) RNA-binding proteins suppresses the requirement for PBP2b by overproduction of FtsA in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol* 106: 793-814.