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

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie

Bc. Bohumil Kubeša

Regulace penicilin vazebného proteinu Pbp2a u *Streptococcus pneumoniae*

Regulation of penicillin-binding protein Pbp2a in *Streptococcus pneumoniae*

Typ závěrečné práce:

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Linda Doubravová, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

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

V Praze, 2. 8. 2021

Podpis: ...……..

Bohumil Kubeša

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí mé diplomové práce, paní RNDr. Lindě Doubravové, Ph.D., nejen za odborné vedení, ale i za její trpělivost a ochotu mi vysvětlovat zadanou problematiku během celého mého studia. Dále děkuji panu RNDr. Pavlu Brannému, CSc. za možnost pracovat v Laboratoři buněčné signalizace MBÚ AV ČR a všem kolegům, kteří mi byli po celou dobu nápomocní. V neposlední řadě děkuji mým přátelům a rodině, především mé matce, za jejich podporu.

Regulace penicilin vazebného proteinu Pbp2a u *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae je extracelulární lidský patogen, který ve svém genomu kóduje unikátní Ser/Thr proteinkinasu eukaryotického typu StkP. Tento enzym se prostřednictvím fosforylace svých substrátu podílí zejména na regulaci buněčného dělení a syntéze buněčné stěny.

Transmembránový protein MacP byl identifikován jako substrát proteinkinasy StkP. Jedná se o aktivátor penicilin vazebného proteinu PBP2a, který se svou transpeptidasovou a transglykosylasovou aktivitou podílí na syntéze peptidoglykanu. Zjistili jsme, že MacP je fosforylován proteinkinasou StkP v pozicích T32 a T56.

Potvrdili jsme, že MacP a PBP2a vzájemně interagují a fosfoablativní ani fosfomimetické mutace majoritních fosforylovaných zbytků proteinu MacP nemají vliv na interakci s PBP2a a neovlivňují zásadně ani funkci MacP *in vivo*. Dále se nám podařilo dokázat, že delece *macP* je synteticky letální s delecí *pbp1a*, čímž jsme potvrdili, že je MacP aktivátorem proteinu PBP2a. MacP je lokalizován v buněčné přepážce a interaguje s řadou proteinů buněčného dělení *S. pneumoniae*.

Klíčová slova:

Streptococcus pneumoniae, buněčné dělení, MacP, PBP2a, fosforylace

Regulation of penicillin-binding protein Pbp2a in *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae is an extracellular human pathogen that encodes a unique eukaryotic-type Ser/Thr protein kinase StkP in its genome. This enzyme is involved in other cellular processes, such as cell division and cell wall synthesis, through phosphorylation with its substrates.

A transmembrane protein MacP has been identified as a substrate of StkP. It is an activator of penicillin-binding protein PBP2a, which is involved in the synthesis of peptidoglycan with its transpeptidase and transglycosylase activities. We found that MacP is phosphorylated by the protein kinase StkP at positions T32 and T56.

We confirmed that proteins MacP and PBP2a interact with each other and that phosphoablative and phosphomimetic mutations of the major phosphorylated residues of the MacP protein do not affect the interaction with PBP2a and do not fundamentally affect the function of MacP *in vivo*. Furthermore, we showed that the Δ*macP* mutation is synthethically lethal with the Δ*pbp1a* mutation, confirming that MacP is an activator of the PBP2a protein. MacP is located in the cell septum and interacts with a number of *S. pneumoniae* cell division proteins.

Keywords:

Streptococcus pneumoniae, cell division, MacP, PBP2a, phosphorylation

OBSAH

1. ÚVOD 8

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED 10

2.1 *Streptococcus pneumoniae* 10

2.1.1 Vakcíny 11

2.1.2 Virulenční faktory 13

2.2 Kompetence 17

2.3 Buněčné dělení u *S. pneumoniae* 19

2.4 Serin-threoninová proteinkinasa eukaryotického typu StkP 29

3. CÍLE PRÁCE 32

4. MATERIÁL A METODY 33

4.1 Materiál 33

4.1.1 *Streptococcus pneumoniae* 33

4.1.2 *Escherichia coli* 34

4.1.3 Seznam vektorů a kazet 35

4.1.4 Seznam plasmidů 36

4.1.5 Oligonukleotidy 39

4.1.6 Použité chemikálie, roztoky a pufry 41

4.1.7 Kultivační půdy a média 46

4.1.8 Enzymy 48

4.1.9 Protilátky 48

4.1.10 Seznam použitých přístrojů a zařízení 49

4.1.11 Seznam použitých programů a jejich použití 51

4.1.12 Seznam použitých komerčních souprav, standardů a jejich použití 51

4.2 Metody 52

4.2.1 Manipulace s DNA 52

4.2.2 Manipulace s proteiny 54

4.2.3 Manipulace s *E. coli* a *S. pneumoniae* 60

5. VÝSLEDKY 63

5.1 MacP 63

5.1.1 Potvrzení fosforylace proteinu MacP proteinkinasou StkP *in vitro* 64

5.1.2 Příprava a testování protilátky anti-MacP 69

5.1.3 Stanovení fosforylace proteinu MacP *in vivo* 71

5.1.4 Interakce proteinu MacP s vybranými proteiny buněčného dělení *S. pneumoniae* pomocí dvouhybridního bakteriálního adenylatcyklasového systému BACTH ... 73

5.1.5 Analýza proteinů interagujících s MacP *in vivo* pomocí koimunoprecipitace ... 83

5.1.6 Stanovení lokalizace proteinu MacP v *S. pneumoniae* ... 87

5.1.7 Analýza syntetické letality MacP a PBP1a ... 89

5.1.8 Morfologie buněk *S. pneumoniae* u kmenů nesoucích mutaci genu *macP* ... 90

5.1.9 Růstová charakterizace kmenů *S. pneumoniae* nesoucích mutaci genu *macP* ... 92

5.2 PBP2a ... 94

5.2.1 Stanovení fosforylace proteinu PBP2a proteinkinasou StkP i*n vitro* ... 95

5.2.2 Analýza proteinů buněčného dělení interagujících s PBP2a *in vivo* pomocí koimunoprecipitace ... 97

6. DISKUZE ... 100

7. SOUHRN ... 108

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY ... 109

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	alanin
Amp	ampicilin
Amk	aminokyselina
Anti	protilátka
ATB	antibiotikum
BACTH	bakteriální dvouhybridní adenylatcyklasový systém
BSA	hovězí sérový albumin
Cat	chloramfenikol
CoIP	koimunoprecipitace
CSP	peptid stimulující kompetenci
E	kyselina glutamová
ESTK	serin/threoninová proteinkinasa eukaryotického typu
g	tíhové zrychlení
GFP	zelený fluorescenční protein
His-tag	histidinová kotva
chDNA	chromozomální DNA
Kan	kanamycin
KD	kinázová doména
kDa	kilodalton
OD	optická denzita (uvedené číslo označuje, při jaké vlnové délce byla OD měřena)
PASTA	domény u penicilin vazebných proteinů a některých Ser/Thr proteinkinas
PBP	penicilin vazebný protein
PCR	polymerázová řetězová reakce
PG	peptidoglykan
PVDF	polyvinylidenfluorid
T	threonin
T32A	záměna threoninu za alanin v pozici 32
T32E	záměna threoninu za kyselinu glutamovou v pozici 32
T56A	záměna threoninu za alanin v pozici 56
T56E	záměna threoninu za kyselinu glutamovou v pozici 56
2TA	zaměna threoninu za alanin v pozicích 32 a 56
2TE	záměna threoninu za kyselinu glutamovou v pozicích 32 a 56
TCS	dvoukomponentový systém
Tet	tetracyklin
WHO	Světová zdravotnická organizace
WT	divoký typ

1. ÚVOD

Streptococcus pneumoniae je extracelulární patogen patřící mezi grampozitivní bakterie. Podle WHO je nejčastější příčinou bakteriální pneumonie a meningitidy. *S. pneumoniae* je přirozeně kompetentní, díky čemuž dokáže přijímat extracelulární DNA z prostředí a tím získávat různé selekční výhody, např. rezistenci k antibiotikům. Důležitým nástrojem v boji proti pneumokokové infekci je vakcinace. V současnosti se využívá několik typů vakcín, založené především na přítomnosti kapsulárních antigenů. V důsledku očkování se bohužel mění spektra sérotypů způsobující invazivní pneumokoková onemocnění. Proto se v posledních dvou dekádách výzkum orientuje na vývoj vakcín založené na přítomnosti proteinového antigenu rozšířeného napříč všemi pneumokokovými sérotypy, jako je např. proteinkinasa StkP.

Pro správnou léčbu infekcí je obecně důležitá rychlá zástava růstu bakterií v hostitelském organismu. Správná regulace buněčného dělení vyžaduje schopnost patogenní bakterie vnímat signály z vnějšího a vnitřního prostředí a reagovat na ně. Mezi základní mechanismy přenosu signálu u všech organismů zařazujeme fosforylaci proteinů.

Fosforylace proteinů představuje kovalentní postranslační modifikaci proteinů katalyzovanou enzymy proteinkinasami. Během této reakce dochází k navázání fosfátového zbytku na aminokyselinový zbytek proteinu, čímž může dojít ke změně konformace proteinu nebo ovlivnění interakcí s jinými proteiny a tím pádem k jeho aktivaci/deaktivaci. Opačný proces, defosforylace proteinů, je katalyzována enzymy proteinfosfatasami a jedná se o odštěpení fosfátové skupiny. U bakterií se do 80. let minulého století předpokládalo, že přenos signálu je převážně zprostředkován pomocí dvousložkových (TCS) systémů. U eukaryotických organismů je přenos signálu nejčastěji zprostředkován signálními kaskádami, které se skládají z několika Ser/Thr proteinkinas a fosfatas, které se vzájemně aktivují/deaktivují. Bylo zjištěno, že *S. pneumoniae* ve svém genomu kóduje signalizační pár Ser/Thr proteinkinasu StkP a proteinfosfatasu PhpP, které regulují řadu buněčných procesů, zejména buněčné dělení a syntézu buněčné stěny.

Proteinkinasa StkP se skládá z katalytické N- terminální, transmembránové a C- terminální extracelulární domény, která obsahuje 4 PASTA motivy. PASTA domény

jsou schopny vázat peptidoglykanové podjednotky a zodpovídají za lokalizaci StkP v buněčné přepážce. Tato proteinkinasa není esenciální pro růst pneumokoka *in vitro*, nicméně je nezbytná pro virulenci. Hlavní funkcí tohoto proteinu je koordinace syntézy buněčné přepážky a periferního růstu peptidoglykanu, a to prostřednictvím fosforylace substrátů, které jsou zapojeny do těchto procesů. V současné době je potvrzeno několik substrátů kinasy StkP, mezi které řadíme proteiny buněčného dělení (DivIVA, LocZ/MapZ, FtsA, FtsZ), proteiny účastnící se syntézy buněčné stěny (GlmM, MacP, MurC, Spr0175), transkripční regulátory (Jag/EloR/KhpB, RitR, ComE, RR06) a pyrofosfatasu PpaC.

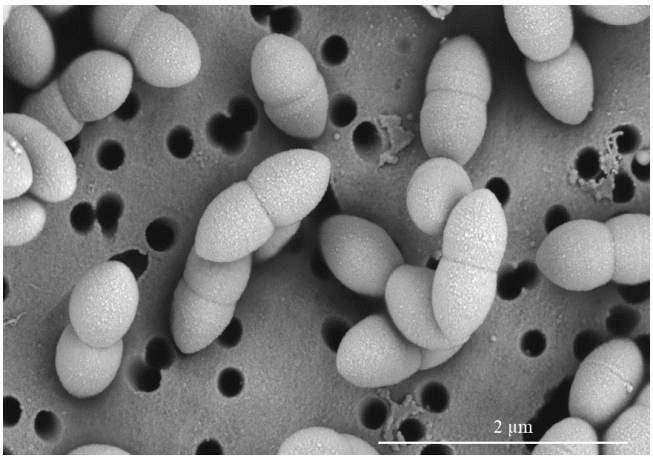
Tato práce se zaměřuje na nově identifikovaný substrát proteinkinasy StkP, protein MacP a penicilin vazebný protein PBP2a. Protein MacP je transmembránový protein a jedná se o aktivátor proteinu PBP2a. PBP2a protein patří do skupiny penicilin vazebných proteinů třídy A, které vykazují transglykosylasovou a transpeptidasovou aktivitu, čímž zajišťují syntézu peptidoglykanu.

V této práci se pokusíme zejména charakterizovat protein MacP, potvrdit fosforylaci MacP a PBP2a a stanovit vliv fosforylace na funkci, interakci a případně lokalizaci v buňce.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae je grampozitivní bakterie patřící do kmene *Firmicutes*, čeledi *Streptococcaceae*, rodu *Streptococcus*. Buňky zaujímají lancetovitý tvar a vyskytují se nejčastěji ve dvojicích, proto je *S. pneumoniae* také označován jako „diplokokus“ (viz obr. 2-1). Může se ale vyskytovat jednotlivě nebo i v krátkých řetízcích. *S. pneumoniae* je aerotolerantní anaerob. Z hlediska hemolýzy se jedná o α-hemolytického streptokoka, který způsobuje zelené zbarvení krevního agaru v důsledku produkce peroxidu vodíku, který konvertuje hemoglobin na zelený verdoglobin.



Obrázek 2-1: *Streptococcus pneumoniae*, snímek z elektronového mikroskopu (Oldřich Benada, MBÚ AV ČR)

S. pneumoniae byl objeven roku 1881 nezávisle dvěma vědci, americkým lékařem Georgem Sternbergem a francouzským biologem Louisem Pasterem. George Sternberg objevil pneumokoka, když imunizoval svými slinami dva králíky, aby otestoval, zda neškodná látka dokáže vyvolat imunitní odpověď. Tentýž rok vyšetřoval Louis Paster dítě v pozdějším stádiu vztekliny. Jeho slinami imunizoval dva králíky, kteří po dvou dnech zemřeli. Při mikroskopickém vyšetření pozorovali oba vědci v králičím séru mikroorganismy ve tvaru „8“. Nezávisle na sobě ho pojmenovali jako *Microbe septicemique du salive* a *Micrococcus pasteuri*. Louis Paster jako první pneumokoka izoloval. Roku 1902 objevil německý vědec Friedrich Neufeld v antiséru různé typy protilátek proti kapsulárním polysacharidům a identifikoval několik pneumokokových sérotypů (Watson *et al.*, 1993).

S. pneumoniae se řadí mezi hlavní kolonizátory horních cest dýchacích a na základě přítomnosti polysacharidového pouzdra se vyskytuje ve dvou formách. Neopouzdřená (rough = R) forma této bakterie je většinou nevirulentní. Opouzdřená (smooth = S) virulentní forma pneumokoka má na svém povrchu polysacharidové pouzdro. Tyto patogeny způsobují řadu méně závažných onemocnění, mezi které řadíme otitis media, bronchitidu, sinusitidu, ale i závažnější onemocnění, jako je pneumonie, sepsi či meningitidu. Pneumokoková infekce je hrozbou především pro malé děti, starší pacienty a imunodeficientní jedince. Polysacharidové pouzdro (kapsule) je hlavní determinantou pneumokokové virulence (Jonsson *et al.,* 1985; Magee a Yother, 2001; Weinberger *et al.,* 2009). Na základě kapsulárních antigenů rozlišujeme 100 pneumokokových sérotypů. Téměř všechny pneumokokové sérotypy dokážou kolonizovat nosohltan u novorozenců, proto tvoří malé děti pro *S. pneumoniae* hlavní rezervoár (Luck *et al.*, 2020).

Roku 1928 britský lékař Frederick Griffith použil pneumokoka pro svůj experiment, ve kterém poukázal na vlastnost přirozené transformace u některých bakterií. Griffith pro svůj experiment použil virulentní (S) a nevirulentní (R) kmeny *S. pneumoniae*. Infikování S kmeny bylo pro myši letální, zatímco infekce R kmeny nikoliv. Po usmrcení S kmenů infikoval myši směsí R a usmrcených S kmenů. Tyto kmeny byly rovněž schopny myši usmrtit. Griffith ze svých výsledků vyvodil, že existuje látka, která se z mrtvých buněk dostává do buněk živých a tím mění jejich vlastnosti. Tento mechanismus označil jako tzv. transformační princip (Griffith, 1928). Roku 1944 potvrdili Avery, McLeod a McCarthy, že za transformační princip je zodpovědná DNA (Avery *et al.*, 1944).

2.1.1 Vakcíny

Světová zdravotnická organizace odhaduje, že bakterie *S. pneumoniae* je jedním ze čtyř nejčastějších původců mikrobiální smrtelné infekce a je zároveň nejčastější příčinou bakteriální pneumonie a meningitidy (WHO, 2018). Prevence vzniku invazivních pneumokokových onemocnění je založena především na vakcinaci kapsulárními antigeny. Studie MacLeod *et al.*, (1945) potvrdila, že imunizace jedinců kapsulárními antigeny poskytuje ochranu proti závažným pneumokokovým onemocněním. Pneumokokové sérotypy jsou biochemicky i antigenně odlišné. Pro

kompletní ochranu proti pneumokokům by bylo potřeba vyvinout vakcínu obsahující kapsulární antigeny všech sérotypů, což není možné (Daniels *et al.*, 2016).

Roku 1945 vznikla v USA první polysacharidová 14 valentní vakcína, která zpočátku vedla ke snížení výskytu invazivních pneumokokových onemocnění. Nicméně tentýž rok došlo k masivnímu rozšíření prvního antibiotika, penicilinu, který byl objeven roku 1928 britským lékařem Alexandrem Flemingem. Vývoj a léčba se v té době začaly upínat na antibiotickou léčbu. V 70. letech minulého století se z důvodu vzniku rezistentních pneumokokových kmenů začalo více očkovat polysacharidovou 14 valentní vakcínou (Austrian a Gold, 1964; Hansman a Bullen, 1967; Jacobs *et al.,* 1978). PPSV23 je 23 valentní polysacharidová vakcína, která byla schválena k prvnímu použití roku 1983 v USA (Berical *et al.,* 1983). Tato vakcína je účinná proti 23 sérotypům, které ve vyspělých zemích způsobují až 70 % závažných pneumokokových onemocnění (Hamborsky *et al.*, 2015). Nicméně u těchto typů vakcín bylo zjištěno, že imunita jedinců očkovaných proti daným sérotypům do 5 let částečně nebo zcela vymizí. Nevýhodou těchto typů vakcín byla neschopnost vyvolání imunitní odpovědi u dětí do 2 let (Feldman a Anderson, 2014).

Na konci 20. století se začaly vyvíjet vakcíny, které obsahují kapsulární antigeny konjugované na proteinovém nosiči. Pomocí konjugovaného proteinu dochází k tvorbě protilátek, které vyvolávají dlouhodobou imunitu i u malých dětí (Hamborsky *et al.*, 2015). PCV13 je 13 valentní konjugovaná vakcína, která byla schválena v USA roku 2012 (Jackson *et al.*, 2013). V současné době se v České republice očkuje 3 vakcínami. Jedná se o konjugované 10 valentní Synflorix a 13 valentní Prevenar13 (PCV13) a nekonjugovanou 23 valentní Pneumovax23 (PPSV23).

V důsledku očkování se mění spektra sérotypů, které způsobují závažné infekce. Proto se výzkum v posledních dvou dekádách orientuje na vývoj vakcín, založených na použití proteinových antigenů. Mezi důležitá kritéria pro výběr proteinových antigenů patří přítomnost proteinu napříč různými sérotypy (tj. konzervovanost), vysoká exprese *in vivo* a vhodná dostupnost pro rozpoznání specifickou protilátkou, což znamená zejména lokalizace proteinu na povrchu buňky (D´Mello *et al.*, 2020; Gor *et al.*, 2005). Jedná se například o pneumolysin (PLY), pneumokokový povrchový protein A (PspA), cholin vazebný protein A (CbpA/PspC), pneumokokový cholin vazebný protein A (PcpA) nebo histidin triádový protein D (PhtD) (Scott *et al.*, 2021). Mnoho studií potvrdilo, že imunizace zvířat několika typy antigenů zabezpečuje účinnější ochranu ve

srovnání s imunizací jedním antigenem (Masomian *et al.*, 2020; Ogunniyi *et al.*, 2000; Ogunniyi *et al.*, 2007; Rowe *et al.*, 2019). Studie Verhoeven *et al.*, (2014) potvrdila, že trivalentní vakcína složena z antigenů proti PcpA, PhtD a PLY toxoidu, zabraňuje vzniku pneumonie způsobené sérotypy 3 a 6A.

V budoucnu není pravděpodobné, že by konjugované polysacharidové vakcíny byly zcela nahrazeny proteinovými vakcínami. Nabízí se ale možnost vzniku konjugovaných vakcín s hybridním proteinem, který bude stimulovat tvorbu protilátek proti sérotypům, na které dnešní vakcíny nefungují (Luck *et al.*, 2020).

2.1.2 Virulenční faktory

S. pneumoniae produkuje řadu virulenčních faktorů, mezi které zařazujeme polysacharidové pouzdro, pili a různé proteinové virulenční faktory, což jsou různé povrchové proteiny a řada enzymů, které určují jeho patogenitu. Funkce těchto faktorů byla částečně objasněna. Především zajišťují adhezi na povrch hostitelské buňky, pomáhají při průniku bakterií do buněk a tkání hostitele, komplikují nebo modulují imunitní odezvu. Na základě srovnání celogenomových sekvencí mezi jednotlivými kmeny lze soudit, že se kmeny mohou lišit v produkci faktorů virulence (Mitchell a Mitchell, 2010).

Pouzdro

Pouzdro patří mezi základní bakteriální virulenční faktory. Skládá se z polymerních jednotek tvořených převážně sacharidy. V přírodě ale můžeme najít různé typy pouzder, např. *Bacillus subtilis* tvoří pouzdro z polypeptidů (Yother, 2011). Pouzdro představuje společný rys téměř všech extracelulárních patogenů (Nelson *et al.*, 2007).

Polysacharidové pouzdro (CPS) je nejdůležitějším virulenčním faktorem *S. pneumoniae*. Nachází se na buněčném povrchu, kde se převážně kovalentně váže k peptidoglykanu buněčné stěny. Tloušťka pouzdra je přibližně 200-400 nm (Sorensen *et al.,* 1988). Oligosacharidové jednotky jsou syntetizované skupinou enzymů kódovaných geny v tzv. *cps* operonu, které je následně propojují do opakujícího se řetězce (Kadioglu *et al.,* 2008). Negativní náboj CPS odpuzuje glykany tvořící hlen na povrchu sliznice dýchacích cest, který slouží k zachycení a odstranění patogenů (Li *et al.*, 2013). CPS je hydrofilní povahy, čímž chrání bakterii před vysycháním. Dále CPS inhibuje fagocytózu imunitními buňkami (Melin *et al.*, 2010). Díky CPS přežívá *S. pneumoniae* v krevním

řečišti (Hathaway *et al.*, 2016). Nicméně CPS zabraňuje interakcím povrchových virulenčních faktorů s hostitelskými epiteliálními buňkami, čímž zabraňuje kolonizaci a vzniku onemocnění (Moscoso *et al.*, 2006). Z toho důvodu využívá tento patogen mechanismus zvaný fázová variace, kdy dochází k zapínání/vypínání nebo snížení/zvýšení genové exprese určitých genů. Tímto mechanismem dochází u *S. pneumoniae* k stochastickému přepínání mezi opouzdřenou a nepouzdřenou formou. Neopouzdřená forma se více vyskytuje v horních cestách dýchacích, kde dochází ke kolonizaci a opouzdřená forma se nachází zpravidla v dolních cestách dýchacích a krevním řečišti (Kim a Weiser, 1998).

K roku 2020 bylo objeveno celkem 100 odlišných sérotypů pneumokoků, jejichž pouzderné polysacharidy jsou kódovány odlišnými sadami enzymů nacházejícími se společně v operonu *cps*. Sérotyp 3 vykazuje značnou hrozbu, protože i když je antigen tohoto sérotypu obsažen ve vakcíně PCV13, jeho incidence neklesá. Pouzdro tohoto sérotypu je velmi silné a není kovalentně navázáno na bakteriální povrch, a tak dochází k jeho častému uvolnění, čímž neutralizuje protilátky a nedochází tak k opsonizaci. Tento sérotyp je spjat s řadou velmi závažných onemocnění, jako je těžká forma pneumonie či srdeční příhody a infekce tímto sérotypem vykazuje 30% mortalitu (Luck *et al.*, 2020).

Pneumolysin

Pneumolysin (PLY), původně pojmenován jako haemolysin, je jeden z nejvíce rozšířených virulenčních faktorů *S. pneumoniae*. Je přítomný téměř ve všech klinických izolátech a jeho sekvence je značně konzervovaná. PLY patří do skupiny cholesterol závislých cytolysinů produkovaných grampozitivními bakteriemi (Benton *et al.,* 1997). Tento protein o velikosti 53 kDa se váže v cílových buňkách na plazmatický cholesterol a oligomerizuje za vzniku transmembránového póru (Morgan *et al.,* 1995), což může vést k buněčné dysfunkci a apoptóze (Beno *et al.*, 2020).

Pili

Pili jsou proteinové vláknité útvary na povrchu většiny bakterií. *S. pneumoniae* tvoří 2 typy pilusů, které hrají roli ve virulenci: PI-1 a PI-2. Pili I. typu (PI-1) byly na pneumokokovém povrchu objeveny roku 2006 (Barocchi *et al.*, 2006). Lokus *rlr* kóduje 3 strukturní proteiny a 3 sortasy, které zajišťují sestavení pilusu I. typu (Barocchi *et al.*, 2006). Pilus II. typu (PI-2) je složen z opakujících se jednotek proteinu PitB, které byly sestaveny pomocí sortasy SrtG-1 a proteinu SipA (Shaik *et al.*, 2015).

Pili obou typů hrají svou roli během virulence a kolonizace, kde zajišťují navázaní k cílovým buňkám a stimulují produkci prozánětlivých cytokinů (Barocchi *et al.*, 2006).

Cholin vazebné proteiny

Cholin vazebné proteiny (CBPs) patří mezi povrchové proteiny *S. pneumoniae*. CBPs se vážou pomocí opakující se sekvence na fosforylcholin, který je součástí teiochoových kyselin v buněčné stěně. CBPs se liší svou N- terminální sekvencí, díky čemuž mají jednotlivé proteiny různou funkci (Jedrzejas, 2001). Mezi CBPs řadíme LytA, LytB a LytC, což jsou autolysiny, dále povrchové proteiny PspA, PspC a CbpD (Tuomanen, 1999). Počet CBPs závisí na daném kmeni pneumokoka, např. kmen R6 obsahuje 10 CBPs (Tettelin *et al.,* 2001).

PspA (Pneumococcal surface protein A) je důležitý virulenční faktor, který se skládá ze 3 domén (Jedrzelas *et al.,* 2001). PspA interferuje s komplementem, a tím brání vyvolání hostitelské imunitní odpovědi (Ren *et al.,* 2003). Také se váže na laktoferin, který hraje důležitou roli během počáteční fáze imunitní odpovědi (Hammerschmidt *et al.,* 1999).

PspC působí jako adhesin, který se váže na imunoglobulinový receptor (Zhang *et al.,* 2000), který v nativním stavu transportuje sekreční IgA, a také váže regulační proteinový faktor H, čímž zabraňuje aktivaci komplementu (Dave *et al.,* 2004). CbpD je mureinová hydrolasa zajišťující lyzi nekompetentních sesterských buněk (Straume *et al.*, 2015).

LytA je autolysin, který štěpí N-acetyl-muraomyl-L-alaninovou vazbu pneumokokového peptidoglykanu a také hraje roli při syntéze buněčné stěny (Howard a Gooder, 1974). Štěpení peptidoglykanu vede k buněčné lyzi (Canvin *et al.,* 1995). LytA hraje svou roli při virulenci, protože se podílí na uvolňování PLY z cytoplazmy a vzniku zánětlivých degradačních produktů buněčné stěny (Bery a Paton, 2000). LytB, LytC a CbpE hrají důležitou roli při kolonizaci v nosohltanu (Gosink *et al.,* 2000). LytB je hlavní PG hydrolasa zajišťující separaci dceřiných buněk během dělení. LytC představuje bakteriální formu lysozymu a zajišťuje autolysu buněk (Garcia *et al.*, 1999).

Peptidoglykan vazebné proteiny s LPXTG kotvou

Dalším virulenčním faktorem je skupina povrchových proteinů vyznačující se LPXTG motivem, kde X může být jakákoli aminokyselina. Nejčastěji se tento motiv nachází blízko C- terminální oblasti proteinů, ale některé pneumokokové kmeny obsahují

proteiny s LPXTG motivem blízko N-terminálnímu konci. Zatím bylo objeveno 17 povrchových proteinů s motivem LPXTG (Bender a Weiser, 2006). Pomocí enzymu sortasy dochází k ukotvení těchto proteinů k peptidoglykanu, a to kovalentní vazbou skrze threonin v LPXTG motivu. Mezi LPXTG povrchové proteiny zařazujeme neuraminidasu, hyaluronidasu a serinovou proteasu PrtA (Mitchel a Mitchel, 2010).

Neuraminidasa štěpí kyselinu sialovou z glykolipidů, lipoproteinů a oligosacharidů na buněčném povrchu a v tělních tekutinách (Camara *et al.,* 1994), čímž mohou poškodit hostitelskou buňku nebo odhalit nová vazebná místa pro *S. pneumoniae* (Linder *et al.,* 1994). *S. pneumoniae* kóduje 3 geny pro neuraminidasu: *nanA*, *nanB* a *nanC*. NanA hraje důležitou roli v kolonizaci, rozvoji otitis media a při tvorbě biofilmu. Působením NanA se uvolňuje kyselina sialová, která může sloužit jako signál kontrolující pneumokokovou virulenci (Trappetti *et al.,* 2009; Parker *et al.,* 2009).

Hyaluronidasa štěpí kyselinu hyaluronovou, která je součástí savčí pojivové tkáně a extracelulární matrix a je sekretována 99 % klinických pneumokokových izolátů (Humphrey, 1948). Odbourávání kyseliny hyaluronové napomáhá bakteriálnímu šíření a kolonizaci (Fitzgerald a Repesh, 1987).

Serinová proteasa PrtA byla detekována u všech testovaných pneumokokových izolátů (Bethe *et al.,* 2001). Přesná funkce PrtA není známa, nicméně exprese *prtA* je spjata společně s expresí dalších genů virulence, např. *ply* (Hendriksen *et al.,* 2009).

Integrální mebránové proteiny

Mezi další pneumokokové povrchové virulenční faktory řadíme lipoproteiny. Lipoproteiny jsou důležitou součástí ABC transportních komplexů, zajišťujících transport cukrů, aminokyselin, peptidů, polyaminů a různých kovových iontů (Garmory a Titball, 2004).

V genomu *S. pneumoniae* byly popsány 3 operony kódující ABC transportérové komplexy, které absorbují železo (Brown *et al.,* 2002). Jedná se o operony *pia*, *piu* a *pit*. Každý operon exprimuje proteiny vázající kovové ionty, dále membránovou permeasu a ATPasu. Lipoproteinový komplex Pia a Piu vykazuje větší významnost, protože mutace v operonech *pia* a *piu* vedla k výraznému snížení růstu pneumokoka na médiu bez železa (Brown *et al.,* 2001; Brown *et al.*, 2002).

Další lipoproteinový komplex, který je důležitý pro virulenci, je ABC transportérový komplex, který zajišťuje transport manganatých iontů. Tento komplex se

skládá z lipoproteinu PsaA, ATP vázající domény (PsaB) a permeasy PsaC (Dintilhac *et al.,* 1997). Mutace v genu *psaA* snižuje virulenci, adhezi k buňkám a zvyšuje citlivost k oxidativnímu stresu (Berry a Paton, 1996; Marra *et al.,* 2002; Ogunniyi *et al.,* 1997). Receptorem pro PsaA je E-cadherin (Anderton *et al.,* 2007).

Mezi další lipoproteiny, které se podílejí na pneumokokové virulenci a kolonizaci, patří peptidylprolylizomerasy SlrA a PpmA (Hermans *et al.,* 2006; Cron *et al.,* 2009).

Další povrchové proteiny

PavA (virulenční faktor A) je jeden z hlavních virulenčních faktorů, který váže fibronektin a zprostředkovává interakci s endoteliálními buňkami (Pracht *et al.,* 2005). Pht proteiny snižují vazbu komplementu na antigen pomocí vazby komplementačního regulačního faktoru H (Ogunniyi *et al.,* 2009). Mezi Pht proteiny zařazujeme PhtA, PhtB, PhtD a PhtE, které obsahují konzervovaný motiv HXXHHXH (Ogunniyi *et al.,* 2009). Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa a enolasa představují plasminogen vázající proteiny (Bergmann *et al.,* 2004; Bergmann *et al.,* 2005), které usnadňují průchod pneumokoka skrz bazální membránu (Eberhard *et al.,* 1999).

2.2 Kompetence

Bakterie *S. pneumoniae* je přirozeně kompetentní. Kompetence je schopnost přijímat exogenní DNA a inkorporovat ji do svého genomu pomocí homologní rekombinace. Mnoho studií potvrdilo, že tento mechanismus je klíčový pro genetickou plasticitu u *S. pneumoniae*, zejména pro přenos genů pro rezistenci k antibiotikům (Chewapreecha *et al.,* 2014; Croucher *et al.,* 2011; Engelmoer *et al.,* 2013; Hanage *et al.,* 2009).

Plasticita bakteriálního genomu je předpokladem pro rychlou adaptaci na měnící se podmínky v prostředí. Mezi molekulární mechanismy, které přispívají k plasticitě bakteriálního genomu, zařazujeme bodové mutace, přeskupování genomu, mobilní genetické elementy a horizontální přenos genů (HGT) (Darmon a Leach, 2014).

Navození kompetence je řízeno *quorum sensing* systémem, který se skládá z transportního systému ComAB a třísložkového systému ComCDE (Hui a Morrison, 1991). Tento quorum sensing systém zapojuje řadu vnitřních a vnějších signálů, na které je kompetentní buňka schopna reagovat (Håvarstein *et al.,* 1996). Gen *comC* kóduje signální peptid CSP (competence stimulating peptide), který je syntetizován jako

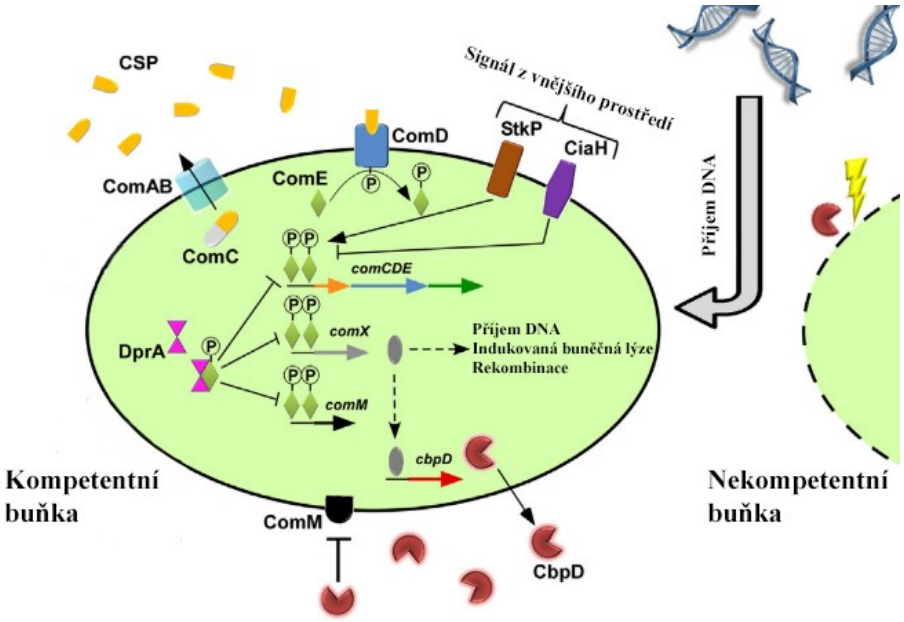
prekurzor a transportován do vnějšího prostředí pomocí ABC transportéru ComAB, který zároveň štěpí CSP na aktivní formu (Håvarstein *et al.,* 1995a,b; Hui a Morrison, 1991). Gen *comD* kóduje histidinovou proteinkinasu, která v plazmatické membráně funguje jako receptor pro CSP. Po jeho navázání dochází k autofosforylaci ComD a k přenosu fosfátové skupiny na transkripční regulátor ComE (Martin *et al.,* 2013), který aktivuje expresi 20 časných genů kompetence (Peterson *et al.,* 2004). Mezi časné geny patří také geny *comAB* a *comCDE*. Dále dochází k expresi genů *comX*, *comW*, *comM*. Gen *comX* kóduje alternativní sigma faktor, který spolu s ComW zodpovídá za expresi pozdních kompetenčních genů, což jsou geny kódující proteiny potřebné pro adsorpci a inkorporaci extracelulární DNA (Campbell *et al.*, 1998). Během transformačního procesu je extracelulární DNA navázána na transformační pilus na povrchu buňky. Tento pilus typu IV. může dorůstat do 2-3 μm a je lokalizován ve středu buňky (Briley *et al.,* 2011; Cehovin *et al.,* 2013; Laurenceau *et al.,* 2013). Poté je dsDNA štěpena pomocí EndA nukleasy (Burton and Dubnau, 2010; Johnston *et al.,* 2014a). Následně se na ssDNA vážou SsB proteiny, které ji chrání před nukleasami (Attaiech *et al.,* 2011). Na ssDNA se váže také protein DprA, který podporuje vazbu RecA na ssDNA (Lisboa *et al.,* 2014; Mortier-Barrière *et al.,* 2007; Quevillon-Cheruel *et al.,* 2012). Úroveň exprese proteinu RecA může být v kompetentních buňkách přibližně čtyřnásobná, proto je díky RecA výtěžek transformace až o 94 % větší (Mortier-Barrière *et al.,* 1998). Ukončení kompetentního stavu je zajištěno prostřednictvím proteinu DprA, který inhibuje protein ComE a tím i transkripci časných genů kompetence (Straume *et al.*, 2015). Mechanismus regulace kompetence znázorňuje obrázek 2-2.

Zdrojem DNA pro transformaci mohou být i sesterské buňky v procesu zvaném bratrovražda (fratricide), kterého se účastní protein ComM a CbpD (Guiral *et al.*, 2005). Při tomto procesu dochází k lyzi a buněčné smrti nekompetentních sesterských buněk pomocí mureinové hydrolasy CbpD. Protein ComM zajišťuje kompetentním buňkám imunitu vůči indukované buněčné lyzi a tyto buňky získávají přístup k homologní DNA (Straume *et al.,* 2015).

Při regulaci kompetence hraje důležitou roli také dvousložkový systém CiaRH a Ser/Thr proteinkinasa StkP. Tyto složky pozitivně regulují expresi kompetenčního operonu *comCDE* (Echenique *et al.*, 2004).

Navození kompetence je primárně dosažena při kritické optické denzitě kultury v laboratorních podmínkách, kde dochází k významnému nárůstu koncentrace CSP.

Indukce kompetence je také závislá na fyziologických podmínkách daného prostředí, např: pH, koncentrace kyslíku, fosfátu a může být také navozena reakcí na některé druhy stresu. Prudhomme *et al.,* (2006) zjistili, že antibiotika kanamycin nebo streptomycin indukují přirozenou kompetenci u pneumokoka. V přítomnosti těchto antibiotik dochází k častějším chybám během syntézy proteinů. Tím pádem dochází k degradaci těchto proteinů proteázou HtrA, která na buněčném povrchu štěpí CSP. Nasycení špatně překládaných proteinů proteasou HtrA vede k akumulaci CSP (Cassone *et al.,* 2012).



Obrázek 2-2: Mechanismus regulace kompetence u *S. pneumoniae*. Převzato a upraveno (Straume *et al.*, 2015)

2.3 Buněčné dělení u *S. pneumoniae*

Buněčný cyklus je posloupnost událostí, které zahrnují replikaci a segregaci chromosomu, růst buňky a tvorbu buněčné přepážky (septa), vedoucí k rozdělení buňky mateřské na dvě buňky dceřiné. Dceřiné buňky se dělí obdobným způsobem a zajišťují tak vznik další generace potomků. Klíčem k udržení životaschopných buněk je správná regulace tohoto procesu, čímž je zajištěna koordinace buněčného dělení a růstu a udržení typického tvaru, např. kulatého, vejčitého, tyčinkovitého nebo spirálního. Modelovými organismy, které byly nejvíce prozkoumány při studiu buněčného dělení, jsou tyčinkovité grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* a gramnegativní bakterie *Escherichia coli*.

S. pneumoniae patří mezi grampozitivní bakterie vejčitého tvaru. Tento tvar tvoří „přechodnou“ formu mezi sférickým a tyčinkovitým tvarem bakterií.

Pro zahájení buněčného dělení vyžaduje bakterie 3 podmínky: označení místa buněčného dělení, rekrutaci dělících komponentů do potřebných míst a aktivaci syntézy buněčné stěny. (Mahone a Goley, 2020). Buněčné dělení u pneumokoka začíná tvorbou septa uprostřed buňky. Septum se tvoří kolmo k podélné ose buňky (Higgins a Shockman, 1976).

Specifický ovoidní tvar *S. pneumoniae* je zajištěn pomocí dvou proteinových komplexů syntetizující PG. Komplex proteinů zodpovídající za syntézu buněčné přepážky, divisom, je lokalizován uprostřed buňky, kde tvoří septum. Na jeho okrajích je lokalizován komplex proteinů, elongasom, syntetizující peptidoglykan mezi ekvatoriální kruh a syntetizované septum. Tím dochází během tvorby septa k prodloužení buňky (Zapun *et al.*, 2008). U tyčinkovitých bakterií tyto proteinové komplexy nekolokalizují, zatímco u ovoidních bakterií dochází pravděpodobně ke kolokalizaci v místě tvorby buněčné přepážky (Massidda *et al.*, 2013).

Rozdělení mateřské buňky na dvě buňky dceřiné nemůže být dokončeno, dokud nedojde k segregaci replikovaného chromosomu k pólům buňky (Draper a Grober *et al.,* 2002). Mezi základní komponenty účastnící se aktivní segregace zařazujeme 2 proteinové komplexy SMC a ParABS (Toro a Shapiro, 2010). Komplex SMC se nachází u eukaryot a většiny bakterií. U bakterií je SMC komplex tvořen proteiny Smc, ScpA a SpcB (Bürmann *et al.,* 2013). SMC komplex se aktivně pohybuje po DNA pomocí ATP hydrolysy (Badrinarayanan *et al.,* 2012). U *S. pneumoniae* bylo potvrzeno, že se SMC komplex lokalizuje v blízkosti *ori* a hraje důležitou roli při organizaci a kondenzaci chromosomu (Sullivan *et al.,* 2009). Delece SMC komplexu způsobuje u pneumokoka defekty v segregaci chromosomu (Minnen *et al.,* 2011). Některé bakterie ve svém genomu SMC komplex nekódují, což naznačuje, že různé bakterie jsou závislé na různých systémech, které zajišťují segregaci chromosomů (Pinho *et al.,* 2013).

ParABS komplex zahrnuje DNA vazebný protein ParB, který váže specifickou sekvenci *parS* a ParA, což je specifická ATPasa, která po interakci s ParB polymerizuje v dlouhá vlákna (Fogel a Waldor, 2006). U *S. pneumoniae* bylo zjištěno, že ve svém genomu kóduje pouze *parB*, nikoliv *parA*. Protein ParB lokalizuje poblíž *ori*. Mutací *parB* vznikají buňky bez nukleoidu. ParB interaguje s proteinem DivIVA v blízkosti pólu

buňky. Protein ParB také interaguje s SMC komplexem. Vzájemná interakce těchto proteinů usnadňuje segregaci chromosomů. Dále segregaci u pneumokoka napomáhá protein FtsK, který je lokalizován v místě septa. Jedná se o DNA dependentní translokasu zajišťující usměrněný pohyb chromosomu (Minnen *et al.,* 2011).

Pasivní procesy segregace představují hybnou sílu některých procesů, které v důsledku své funkce napomáhají segregaci chromosomu. Jedná se např. o replikaci a transkripci. Mezi proteiny, které svou funkcí přispívají k segregaci, patří např. DNA gyrasa, replisom, topoisomerasa (Pinho *et al.,* 2013).

Hlavním cytoskeletárním proteinem, který organizuje buněčné dělení u bakterií a také pneumokoka je protein FtsZ. FtsZ řízená syntéza buněčné stěny vede v místě dělení k tvorbě buněčné přepážky (septum) (Zapun *et al.,* 2008). FtsZ je homolog tubulinu s GTPasovou doménou. Skládá se ze tří domén: GTPasová doména, která má schopnost polymerace, C- terminální doména, která FtsZ kotví k cytoplazmatické membráně a C- terminální linker spojující obě domény (Vaughan *et al.,* 2004). V přítomnosti GTP dochází k polymeraci FtsZ prostřednictvím GTPasové domény, čímž protein FtsZ tvoří tzv. Z-kruh. (Ma *et al.,* 1996). Z-kruh rekrutuje další proteiny do místa, kde bude docházet k tvorbě septa (Adams a Errington, 2009). Prostřednictvím přímých i nepřímých interakcí s FtsZ dojde ke shromáždění těchto proteinů, které tvoří koordinovaný komplex divisom (Buddelmeijer a Beckwitch, 2002). U bakterií *E. coli* a *B. subtilis* je správná pozice Z kruhu negativně regulována pomocí proteinového komplexu Min a systému chromozomální okluze (NO). Díky těmto systémům dochází k tvorbě FtsZ kruhu ve středových částech buňky (De Boer *et al.*, 1989; Minnen *et al.*, 2011). Některé bakteriální druhy mají pouze jeden z výše popsaných systémů a některé bakterie, jako např. *S. pneumoniae*, nekódují ani jejich homology, což naznačuje více možných mechanismů pro správné umístění septa. Například u *Caulobacter crescentur* bylo zjištěno, že protein MipZ negativně reguluje pozici Z kruhu (Thanbichler a Shapiro, 2006). U *Myxococcus xanthus* je pro správné umístění septa nezbytný protein PomZ (Treuner-Lange *et al.*, 2013). Jako pozitivní regulátor, který se podílí na spravném umístění Z kruhu u *S. pneumoniae*, funguje protein LocZ (Holečková *et al.*, 2015), také pojmenovaný jako MapZ (Fleurie *et al.*, 2014b). LocZ/MapZ protein se dostává do středu buňky jako první, kde následně interaguje s FtsZ, čímž určuje umístění proteinu FtsZ a zároveň umístění budoucího místa dělení (Fleurie *et al.*, 2014b, Holečková *et al.*, 2015). LocZ/MapZ není esenciální, ale deleční mutanty vykazují asymetrické dělení (Holečková *et al.*, 2015,

Fleurie *et al.*, 2014b). Stabilizace Z kruhu je u *S. pneumoniae* také uskutečněna pomocí esenciálního proteinu FtsA (Mura *et al.*, 2017). FtsA spolu s FtsZ kolokalizuje na začátku dělení uprostřed buňky a společně koordinují septální a periferní syntézu PG (Mura *et al.*, 2017). U *B. subtilis* není FtsA esenciální, nicméně delece *ftsA* způsobuje vznik termosenzitivních vláken (Beall and Lutkenhaus, 1992). Mezi další proteiny, které patří mezi regulátory Z kruhu u *S. pneumoniae,* řadíme pozitivní regulátory ZapA, ZapB (Gueiros-Filho a Losick, 2002), SepF a negativní regulátor EzrA (Massidda *et al.,* 2013). SepF stabilizující Z-kruh je do místa dělení rekrutován pomocí FtsZ a vykazuje syntetickou letalitu s mutací *ezrA* (Hamoen *et al.,* 2006). Inaktivace proteinu SepF vedla k závažným defektům buněčného dělení (Massidda *et al.,* 1998).

Mezi další proteiny, které jsou součástí dělícího aparátu, řadíme proteiny FtsQ (DivIB), FtsB (DivIC) a FtsL interagující jako trimerní komplex (Noirclerc-Savoye *et al.,* 2005). Tyto proteiny mají za úkol rekrutovat do místa dělení další komponenty. Mezi tyto komponenty řadíme proteiny syntetizující PG. Jedná se penicilin vazebné proteiny a esenciální transglykosylasy FtsW a RodA. Například pomocí proteinů FtsQ a FtsL je do septa rekrutována transglykosylasa FtsW (Maggie *et al.,* 2008). Delece *ftsQ* způsobí vytváření řetízků diplokoků a také vytvoření zvětšených buněk s nedokončenými septy (LeGouellec *et al.,* 2008).

Další proteiny důležité pro správné ukončení buněčného dělení jsou hydrolasy. Hydrolasa LytB štěpí buněčnou přepážku a je zodpovědná za rozdělení chromozómů. Hydrolasa PcsB způsobuje remodelaci PG (Ng *et al.,* 2003;2004) a pro správnou funkci vyžaduje FtsEX (Sham *et al.,* 2011), což jsou esenciální proteiny u *S. pneumoniae*, které představují ABC transportní komplex, který reguluje hydrolasu PscB zajišťující štěpení septa (Sham *et al.,* 2011).

Hlavní složkou buněčné stěny je peptidoglykan (PG). PG představuje polymerovou vrstvu složenou ze zbytků N-acetylglukosaminu a N-acetylmuramové kyseliny, které jsou propojené pomocí β-1,4-glykosidických vazeb. Jeho vlastností je ochrana buňky před vnějšími vlivy, jako je např. osmotický tlak, a především určuje tvar buňky, který je předáván z generace na generaci. Samotná syntéza PG u *S. pneumoniae* začíná v cytoplazmě, a to syntézou pentapeptidu připojeného na UDG-muramovou kyselinu prostřednictvím enzymů MurA, MurB, MurC, MurD, MurE a MurF, kdy Mur C-F jsou ATP-dependentní ligasy, které postupně za sebou připojují L-alanin, D-glutamát, L-lysin a D-alanyl-D-alanin za vzniku UDP-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-

glutamyl-L-lysyl-D-alanyl-D-alanin. Tento fosfo-N-acetylmuramyl pentapeptid je pomocí translokasy MraY přenesen na membránově vázaný undecapryl-fosfát za vzniku lipidu I, který je poté glykosylován UDP-N-acetylglukosaminem pomocí glykosyltransferasy MurG na lipid II. Následně probíhá syntéza peptidového můstku. Ligáza MurM katalyzuje připojení L-serinu nebo L-alaninu na pentapeptidový zbytek L-lysyl. Poté ligasa MurN připojí L-alanin na již připojený L-serin/L-alanin. Takto připravený prekurzor je pomocí flipázy MurJ přenesen přes cytoplazmatickou membránu na extracelulární stranu buňky. Poslední fázi syntézy PG představuje zabudování (transglykosylace) a zesíťování (transpeptidace) disacharidových podjednotek do PG vrstvy (Bugg, 1999; Vollmer *et al.*, 2008).

Penicilin vazebné proteiny (PBP) jsou membránově vázané proteiny účastnící se poslední fáze syntézy PG. Tyto proteiny jsou klasifikovány na základě jejich molekulové hmostnosti do dvou kategorií: na vysokomolekulární (HMW) a nízkomolekulární (LMW). Kategorie HMW dále rozděluje PBP proteiny do 2 skupin: A a B. Skupinu A tvoří bifunkční enzymy zajišťující zabudování disacharidových podjednotek do PG (transglykosylasy) a následné zesíťování těchto podjednotek (transpeptidasy). Skupina B zahrnuje monofunkční enzymy pouze s transpeptidasovou funkcí. Kategorie LMW, označována také jako třída C, je tvořena monofunkčními enzymy s karboxypeptidasovou, nebo endopeptidasovou aktivitou (Sauvage *et al.,* 2008).

Počet PBP proteinů se u různých bakterií liší. *B. subtilis* ve svém genomu kóduje 16 PBP proteinů a *S. aureus* jich kóduje celkem 6 (viz tab. 2-1) *S. pneumoniae* obsahuje 6 PBP proteinů, z nichž 3 proteiny (PBP1a, PBP2a, PBP1b) patří do třídy A, dále 2 esenciální proteiny (PBP2x a PBP2b) patřící do třídy B a protein PBP3, který je součástí třídy C. Strukturu pneumokokových PBP proteinů znázorňuje obr. 2-3.

Tabulka 2-1: Rozdělení a porovnání PBP proteinů kódovaných u *S. pneumoniae*, *B. subtilis* a *E. coli* (převzato z Goffin a Ghuysen, 1998)

	Třída A							Třída B						Třída C						
Podtřída →	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	B1	B2	B3	B4	B5	B6	Typ 4	Typ 5			Typ 7	Typ A	AmpH
Streptococcus pneumoniae R6			PBP1a	PBP2a	PBP1b						PBP2x	PBP2b			PBP3					
Bacillus subtilis			PBP1	PBP2c	PBP4		PBP2d	PBP3		SpoVD	PBP2b	PBP2a; PbpH	PBP4b	PBP4a	DacF	PBP5	PBP5		PBP4	PbpX
Stafylococcus aureus			PBP2				MGT	PBP2a			PBP1	PBP3			PBP4					

Esenciální skupinu PBP proteinů představuje u *S. pneumoniae* třída B. Jedná se o transpeptidasy PBP2b a PBP2x. PBP2b představuje hlavní transpeptidasu zajišťující

zesíťování PG v periferní části buňky. Inaktivace nebo deplece PBP2b vede ke vzniku sférických buněk. PBP2x je transpeptidasa lokalizována v septu. Delece tohoto proteinu způsobuje vláknitý růst (Sauvage *et al.*, 2008). PBP2x je jediný z PBP proteinů *S. pneumoniae*, který ve své struktuře obsahuje 2 PASTA (Penicillin-Binding Protein And Serin-Threonine-kinase Associated) domény (viz obr. 2-3). Díky přítomnosti PASTA domén je PBP2x lokalizován v septu (Peters *et al.*, 2014). Na základě strukturní podobnosti cílového substrátu transpeptidas (D-Ala-D-Ala pentapeptidového můstku) s β-laktamovými ATB, jsou PBP proteiny s transpeptidasovou aktivitou těmito ATB inhibovány (Sauvage *et al.,* 2008).

Proteiny RodA a FtsW jsou esenciální transglykosylasy patřící do skupiny SEDS proteinů (Shape, Elongation, Division and Sporulation). Tyto proteiny interagují s PBP proteiny třídy B, konkrétně RodA-PBP2b a FtsW-PBP2x, a společně zajišťují syntézu primárního PG během buněčného dělení v periferních částech buňky (RodA-PBP2b) a septu (FtsW-PBP2x) (Meeske *et al.*, 2016).

Skupina A je tvořena 3 proteiny. Jedná se o PBP1a, PBP1b a PBP2a. PBP1a je primárně lokalizován do střední části buňky (Land *et al.*, 2013), kde zodpovídá za periferní syntézu PG. Tento protein interaguje s proteiny MreC, MreD, CozE a CozEb, které jsou součástí komplexu elongasomu a pravděpodobně zajišťují lokalizaci PBP1a v septu (Fenton *et al.*, 2016; Land a Winkler, 2011; Stamsås *et al.*, 2020). Několik studií potvrdilo, že esencialita proteinů MreC, MreD, RodZ a MltG je potlačena u *S. pneumoniae* D39 s delecí *pbp1a* (Fenton *et al.*, 2016; Land a Winkler, 2011; Tsui *et al.*, 2016) Protein MltG působí jako endolytická transglykosylasa, která uvolňuje glykanové řetězce syntetizované pomocí PBP1a, které se následně inkorporují do periferního PG pomocí PBP2b:RodA komplexu (Tsui *et al.*, 2016). Studie Land a Winkler, (2011) potvrdila, že delece *pbp1a* zmenšuje velikost buněk *S. pneumoniae* v kmeni D39, zatímco delece *pbp2a* nikoli. Tento fakt vede k závěru, že tyto PBP proteiny třídy A ovlivňují odlišně morfologii pneumokokových buněk (Straume *et al.*, 2020). Proteiny PBP1a a PBP2a tvoří synteticky letální pár, což znamená, že pro životaschopnost *S. pneumoniae* je potřebná přítomnost pouze jednoho z nich. Funkce těchto proteinů je překryvná i nepřekryvná. Tento fakt naznačuje, že pro životaschopnost pneumokoka je potřebná pouze překrývající funkce těchto proteinů (Straume *et al.*, 2020).

Protein PBP2a vyžaduje pro svou funkci membránově vázaný aktivátor MacP, s kterým tvoří komplex v místě buněčného dělení. Delece genu *macP* je synteticky letální

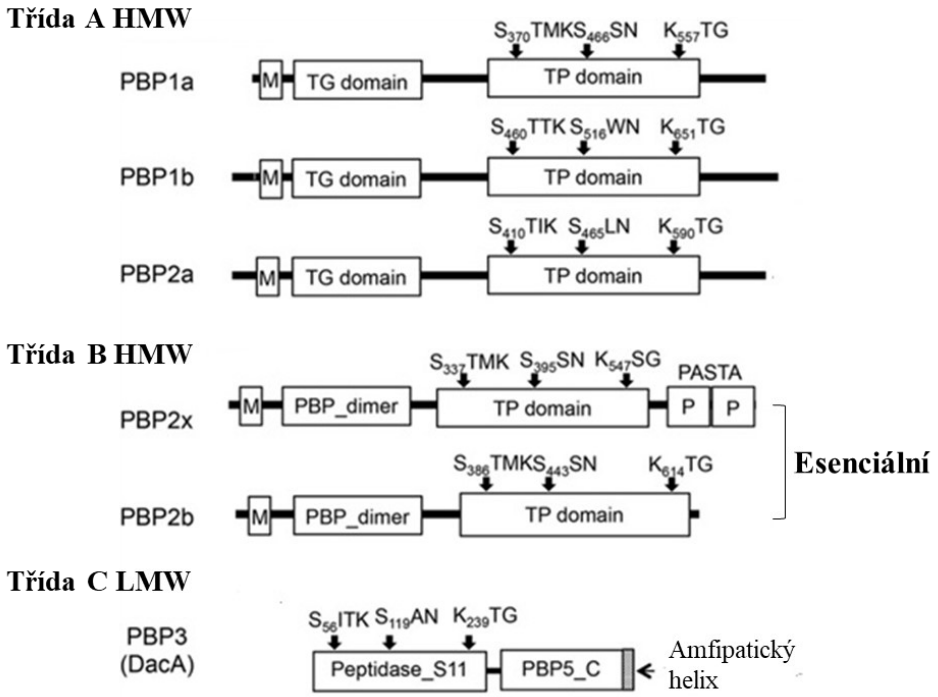
s delecí *pbp1a*, čímž je potvrzena esencialita MacP pro funkci PBP2a *in vivo*. Protein MacP byl rovněž identifikován jako substrát proteinkinasy StkP, která prostřednictvím fosforylace svých substrátů koordinuje periferní a septální růst PG. (Fenton *et al.*, 2018). Protein PBP2a interaguje s proteinem GpsB. Jedná se o adaptorový protein, který je rovněž vyžadován pro správnou funkci PBP2a (Fleurie *et al.*, 2014b; Rued *et al.*, 2017).

PBP1a a PBP2a interagují s řadou proteinů, které jsou součástí elongasomu a divisomu. Nicméně bylo zjištěno, že tyto PBP proteiny třídy A fungují také autonomně *in vivo*, konkrétně jako syntázy PG opravující jeho defektní části v místě, kde neprobíhá jeho aktivní syntéza. V místě aktivní syntézy PG tyto proteiny interagují s elongasomem/divisomem a zajišťují opravu a zesílení vrstvy primárního PG (Straume *et al.*, 2020).

O proteinu PBP1b v současné době není moc známo, nicméně deleční mutanty v *pbp1a* a *pbp1b* nebo *pbp1b* a *pbp2a* vykazují pomalý růst a defekty v syntéze septa (Hoskins *et al.*, 1999; Paik *et al.*, 1999).

PBP3 (třída C) je karboxypeptidasa štěpící PG pentapeptid v místě terminální D-alanyl-D-alaninové vazby za vzniku tetrapeptidu, čímž reguluje rozsah transpeptidace (Morlot *et al.*, 2004). Tento protein je tvořen ze dvou domén S_11 a PBP5_C. C- konec tohoto proteinu je tvořen amfipatickou dvoušroubovicí (viz obr. 2-3). PBP3 se nachází téměř na celém buněčném povrchu s výjimkou budoucího místa dělení (Morlot *et al.*, 2004). Delece *pbp3* vede k morfologickým defektům, včetně chybně umístěných dělících přepážek (Barendt *et al.*, 2011).

Nedávná studie přináší důkazy o existenci různých vrstev a struktur PG v septu, na pólech a podél buňky u *B. subtilis* a *S. aureus* (Pasquina-Lemonche *et al.*, 2020). Vnitřní vrstva PG (primární) má vysoce uspořádanou strukturu, kdežto vnější vrstva obsahuje velké póry. Byla vyslovena hypotéza, že syntézu tzv. primárního PG zajišťují komplexy SEDS:PBP třídy B, kdežto remodelaci PG v tzv. sekundárním PG zajišťují PBP proteiny třídy A. Remodelace PG probíhá po celou dobu buněčného cyklu štěpením různými hydrolytickými enzymy a vkládáním PG jednotek. Tvar ovoidních bakterií je pravděpodobně dán dynamikou mezi syntézou a štěpením PG (Trouve *et al.*, 2021).



Obr 2-3: Strukturní schéma PBP proteinů u *S. pneumoniae* (převzato z Kocaoglu *et al.*, 2015); M – membránová kotva; TG domain – transglykosylázová doména; TP domain – transpeptidázová doména; PBP_dimer – N terminální doména PBP proteinů třídy B zajišťující interakci s ostatními proteiny; P – PASTA doména; Peptidase_S11 – katalytická doména proteinu PBP3; PBP5_C – C terminální doména proteinu PBP3; jednotlivé písmena a číslice, které jsou součástí TP a S11 domén představují konzervované zbytky

Buněčné dělení je náročný a vysoce koordinovaný proces, kde je zapotřebí regulovat funkce všech komponentů. Mezi hlavní regulátory buněčného dělení u pneumokoka patří proteinkinasa StkP a adaptorový protein GpsB.

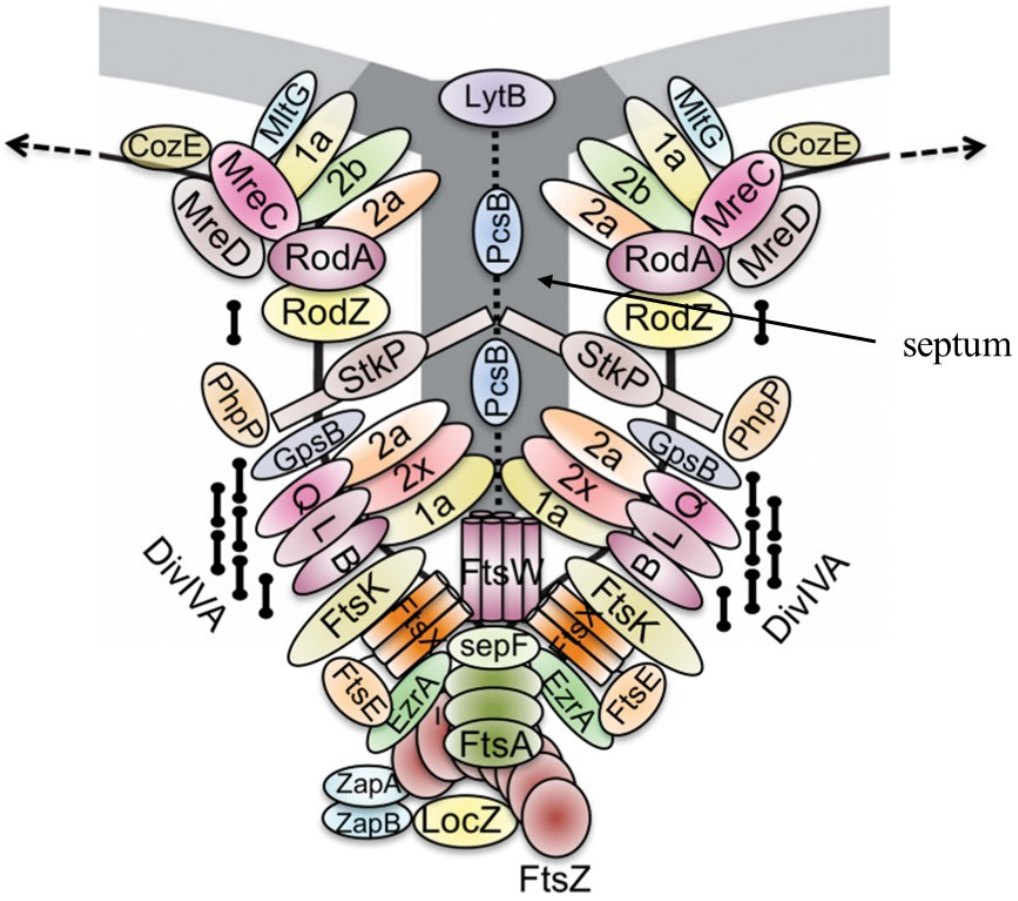
Mezi další regulátory zde zmíníme DivIVA a RNA-vazebný protein Jag (KhpB/EloR). Protein Jag (EloR/KhpB) je RNA vazebný protein, který společně s dalším RNA vazebným proteinem KhpA negativně reguluje na posttranskripční úrovni expresi FtsA (Zheng *et al.*, 2017) Inaktivace proteinu Jag vede ke vzniku kratších buněk (Ulrych *et al.*, 2016; Ståmsas *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2017).

GpsB je membránově asociovaný, cytoplazmatický, adaptorový protein (Cleverley *et al.*, 2016), hrající důležitou roli v podobě hlavního regulátoru syntézy PG u grampozitivních bakterií s nízkým obsahem GC (Claessen *et al.*, 2008). Jedná se o důležitý kofaktor PBP proteinů, který zprostředkovává interakce ve velkých

proteinových komplexech. GpsB spolu s kinasou StkP působí u *S. pneumoniae* jako molekulární přepínače mezi septální a periferní syntézou PG. Během buněčného dělení je tento protein lokalizován v septu a je vyžadován pro správnou lokalizaci proteinkinasy StkP (Fleurie *et al.*, 2014b). Interakce proteinů GpsB-StkP má za následek interakci StkP s PBP2x, který dokončuje tvorbu septa. Delece *gpsb* je synteticky letální s delecí *pbp1a*. Interakce GpsB je v *in vivo* podmínkách potvrzena u EzrA, StkP, PBP2a, PBP2b, MreC. Interakcí s PBP2b působí GpsB jako negativní regulátor periferní syntézy PG (Rued *et al.*, 2017). Při deleci *gpsb* nedochází k uzavření septa a tvoří se větší prodloužené buňky, podobně jako je tomu u mutace *stkP* (Rued *et al.*, 2017).

DivIVA je další protein nezbytný pro buněčné dělení, který hraje důležtou roli při morfogenezi, polárním růstu a segregací chromozómů (Flardh, 2003). Tento protein je konzervován u všech grampozitivních bakterií. Skládá se z konzervované N-terminální domény, která zajišťuje vazbu na cytoplazmatickou membránu a C-terminální domény, která se liší složením a délkou AMK. (Oliva *et al.,* 2010). U *S. pneumoniae* je lokalizován současně na pólech buňky a v septu, kde je rekrutován po polymeraci FtsZ (Oliva *et al.,* 2010). Předpokládá se, že DivIVa zajišťuje umístění hydrolas PcsB a LytB, potřebné pro štěpení septa. (Fadda *et al.,* 2007). Inaktivace DivIVa vedla u pneumokoka k tvorbě neoddělených řetízků, často bez nukleoidů (Fadda *et al.,* 2003).

Posledním zmíněným regulátorem buněčného dělení je proteinkinasa StkP. Vlastnosti a funkci tohoto enzymu popisuje následující kapitola. Proteiny podílející se na buněčném dělení u *S. pneumoniae* jsou shrnuty znázorněny na obr. 2-4 (převzato z Wollmer *et al.*, 2019)



Obrázek 2-4: Lokalizace proteinů buněčného dělení a syntézy PG; 1a (PBP1a); 2a (PBP2a); 2b (PBP2b); 2x (PBP2x); B (FtsB); L (FtsL); Q (FtsQ) (převzato z Wollmer *et al.*, 2019).

2.4 Serin-threoninová proteinkinasa eukaryotického typu StkP

Bakterie využívají pro přenos signálu proces zvaný fosforylace proteinů. Fosforylaci proteinů zajišťují u většiny bakterií zpravidla dvoukomponentové systémy (TCS) složeny z histidinkinasy a regulačního proteinu. Na konci minulého století bylo postupně objeveno, že bakterie kromě TCS využívají pro přenos signálu také Ser/Thr a Tyr kinasy/fosfatasy homologní k eukaryotickým enzymům. Ser/Thr proteinkinasy (ESTK) regulují různé buněčné procesy, např. buněčné dělení, sekundární metabolismus, odpověď na stres, různé metabolické procesy, tvorbu biofilmu a také virulenci u streptokokoků, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* (Hanks *et al.*, 1988).

S. pneumoniae kóduje ve svém genomu jediný gen pro ESTK, a to StkP, která společně s proteinfosfatasou PhpP tvoří signalizační pár. Geny kódující tyto enzymy se s čtyř nukleotidovým přesahem překrývají a jsou transkribovány v jediné mRNA. *S. pneumoniae* je proto vhodným modelovým organismem ke zkoumání funkce těchto enzymů (Nováková *et al.*, 2005).

StkP se skládá z N terminální domény, která zodpovídá za katalytickou aktivitu, transmembránové a extracelulární domény, která je tvořena 4 PASTA (Penicillin-binding protein and Ser/Thr protein kinase associated domain) motivy. Tyto motivy se vyskytují u STKP a některých PBP proteinů v rámci kmenů *Firmicutes* a *Actinobacteria* (Beilharz *et al.*, 2012). Proteinkinasa StkP je aktivní v dimerní formě díky oligomerizaci transmembránových a extracelulárních domén. Dimerní forma tohoto proteinu zároveň podporuje autoforylační aktivitu této proteinkinasy (Pallová *et al.*, 2007).

StkP není esenciální pro růst v laboratorních podmínkách, ale je nezbytná pro virulenci, zejména pro průnik bakterií do plic a krevního řečiště (Echenique *et al.*, 2004). Kmen *ΔstkP* tvoří větší prodloužené buňky s často neuzavřenými septy (Beilahr *et al.*, 2012) a oproti divokému kmeni má výrazně delší dobu zdvojení (z 35 na 55 min). Dále je citlivější k oxidativnímu, osmotickému a teplotnímu stresu (Sasková *et al.*, 2007). Naopak nadprodukce StkP má za následek syntézu malých kulatých buněk (Giefing *et al.*, 2010).

StkP hraje důležitou roli během biosyntézy buněčné stěny, a to koordinací syntézy buněčné přepážky a periferního růstu PG, díky čemuž má pneumokok specifický ovoidní tvar (Beilharz *et al.*, 2012).

Dále se účastní regulace exprese genů, které hrají důležitou roli během biosyntézy pyrimidinů, opravy DNA, absorpce železa, reakce na oxidační stres a regulace genetické kompetence (Sasková *et al.*, 2007). StkP je aktivní v širokém rozmezí pH od 3-9 (Nováková *et al.*, 2005), ale deleční mutant je citlivější k hodnotám pH nižší než 6,5 (Sasková *et al.*, 2007).

Proteinkinasa StkP společně s proteinfosfatasou PhpP lokalizuje v místě buněčného dělení. Pro lokalizaci v buněčném septu a aktivaci StkP je nezbytná přítomnost PASTA motivů (Nováková *et al.*, 2010). Bylo potvrzeno, že StkP váže prostřednictvím PASTA motivů podjednotky PG v *in vivo* i *in vitro* podmínkách (Maestro *et al.*, 2011; Beilharz *et al.*, 2012). Studie Zucchini *et al.*, (2018) popisuje model StkP, kde jsou první tři PASTA motivy potřebné k aktivaci StkP a regulují tloušťku buněčné stěny. Poslední čtvrtý PASTA motiv zajišťuje lokalizaci StkP v septu a prostřednictvím interakce s hydrolasou LytB reguluje separaci buněk. V rámci buněčného dělení StkP lokalizuje do oblasti septa po zformování Z-kruhu. Ve středu buňky zůstává až do doby, dokud není dělení dokončeno (Beilharz *et al.*, 2012).

Identifikace jednotlivých substrátů kinasy StkP (viz tab. 2-2) pomáhá zjistit, jak StkP reguluje buněčné procesy u pneumokoka. Z dosavadních poznatků vyplývá, že StkP reguluje zejména buněčné dělení a růst (Beilharz *et al.*, 2012).

Tabulka 2-2: Substráty kinasy StkP, jejich funkce a reference

Protein	Funkce	Reference
DivIVA	Morfogeneze, polární růst, segregace chromosomu,	(Nováková *et al.*, 2010)
FtsA	Ukotvení Z-kruhu k plazmatické membráně	(Beilharz *et al.*, 2012)
FtsZ	Hlavní cytoskeletární protein buněčného dělení, tvorba Z-kruhu	(Giefing *et al.*, 2010)
GlmM	Syntéza PG prekurzorů	(Nováková *et al.*, 2005)

Jag/KhpB/EloR	RNA vazebný protein, negativní regulace exprese FtsA	(Ulrych *et al.*, 2016) (Stamsas *et al.*, 2017) (Zheng *et al.*, 2017)
LocZ/MapZ	Pozitivní regulátor umístění Z kruhu	(Fleurie *et al.*, 2014a) (Holečková *et al.*, 2015)
MacP	Kofaktor proteinu PBP2a	(Fenton *et al.*, 2018)
MurC	Syntéza PG prekurzorů	(Falk a Weisblum, 2013)
PpaC	Hydrolýza pyrofosfátu PPi	(Nováková *et al.*, 2010)
RitR	Transkripční regulátor, regulace genů pro transport železa	(Ulijasz *et al.*, 2009)
RR06	Transkripční regulátor, regulace virulence	(Agarwal *et al.*, 2012)
Spr0175	Syntéza PG	(Ulrych *et al.*, nepublikovaná data)

3. CÍLE PRÁCE

Genom *S. pneumoniae* kóduje jediný gen pro Ser/Thr proteinkinasu eukaryotického typu StkP, která fosforyluje řadu proteinů účastnící se buněčného dělení a syntézy buněčné stěny. V naší nepublikované fosfoproteomové studii byl identifikován protein MacP jako jeden ze substrátů StkP (Ulrych *et al.*, nepublikovaná data). MacP je transmembránový protein složený ze 104 aminokyselin o velikosti 11, 809 kDa. Studie Fenton *et al.*, (2018) uvádí, že MacP funguje jako esenciální aktivátor proteinu PBP2a, což je penicilin vazebný protein skupiny A, který má transglykosylasovou a transpeptidasovou doménu a podílí se zejména na syntéze periferního PG. Cílem této práce bylo objasnit vztah těchto dvou proteinů a zjistit vliv fosforylace na vlastnosti a funkci MacP.

Dílčí cíle této práce zahrnovaly:

1. Potvrzení fosforylace na identifikovaných zbytcích proteinu MacP proteinkinasou StkP *in vitro*
2. Optimalizace použití anti-MacP protilátky
3. Potvrzení fosforylace proteinu MacP *in vivo* pomocí imunoprecipitace
4. Potvrzení interakce proteinů MacP a PBP2a *in vivo* pomocí dvouhybridního bakteriálního adenylát cyklázového systému (BACTH) a koimunoprecipitace
5. Zjištění, zda má fosforylace MacP vliv na interakci MacP a PBP2a pomocí BACTH
6. Analýza interakcí proteinu MacP s vybranými proteiny buněčného dělení *S. pneumoniae*
7. Stanovení lokalizace proteinu MacP v *S. pneumoniae*
8. Analýza fenotypu *macP*
    a. Potvrzení syntetické letality různých mutací *macP* a *pbp1a*
    b. Vliv fosforylace MacP na morfologii a růst buněk
9. Potvrzení fosforylace proteinu PBP2a proteinkinasou StkP *in vitro*
10. Analýza interakcí PBP2a s vybranými proteiny buněčného dělení u *S. pneumoniae* pomocí koimunoprecipitace

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Tabulka 4-1: Seznam kmenů *S. pneumoniae* použitých v této diplomové práci

Kmen *S. pneumoniae*	**Genotyp**	**Fenotyp**	**Použití**	**zdroj**
Sp1	*Rx derivate; str1, hexA*	StR	Nevirulentní parentální kmen	(Morrison *et al.*, 1984)
Sp339	*D39 (NCTC); cps2A; cps2H rpsL41; rpsL+*	Neopouzdřený kmen D39 (NCTC)	Nevirulentní parentální kmen	(Lanie *et al.*, 2007)
Sp399	*D39 (Δcps);* Δ*macP*		Studium funkce *macP*; testování syntetické letality, testování protilátky anti-MacP	Linda Doubravová, nepublikované výsledky
Sp480	*D39 (Δcps); Flag-macP-WT*		Studium funkce *macP*, testování protilátky anti-MacP	Linda Doubravová, nepublikované výsledky
Sp481	*D39 (Δcps); Flag-macP-2TA*		Studium fosforylace a interakcí MacP *in vivo*	Linda Doubravová, nepublikované výsledky

Sp486	*D39 (Δcps); Flag-macP-T32A*		Studium fosforylace a interakcí MacP *in vivo*	Linda Doubravová, nepublikované výsledky
Sp487	*D39 (Δcps); Flag-macP-T56A*		Studium fosforylace a interakcí MacP *in vivo*	Linda Doubravová, nepublikované výsledky
Sp503	*D39 (Δcps); pbp2a-T27A*		Studium fosforylace PBP2a *in vitro*	Linda Doubravová, nepublikované výsledky
Sp560	*D39 (Δcps); pZn-Flag-pbp2a*		Studium interakcí PBP2a *in vivo*	Linda Doubravová, nepublikované výsledky
Sp561	*D39 (Δcps); Δpbp2a, pZn-Flag-pbp2a*		Studium interakcí PBP2a *in vivo*	Linda Doubravová, nepublikované výsledky

4.1.2 *Escherichia coli*

Tabulka 4-2: Seznam kmenů *E. coli* použitých v této diplomové práci

Kmen *E. coli*	**Genotyp**	**použití**	**zdroj**
DH5α	*fhuA2, Δ(argF-lacZ) U169, phoA, glnV44, Φ80, Δ(lacZ)M15, gyrA96, recA1, relA1, endA1, thi-1, hsdR17)*	Amplifikace expresních vektorů	Invitrogen

BL21 (DE3)	F´, *ompT, hsdS$_B$ (m_B^-, r_B^-), dcm, gal, λ(DE3)*	Nadprodukce rekombinantních proteinů pomocí T7 RNA polymerázy, která je pod kontrolou *lacUV5* promotoru	Novagen®
Arctic Express (DE3)	F-, *ompT, hsdS ($r_B^-m_B^-$), dcm$^+$, Tet^R, gal, λ(DE3), endA, Hte [cpn10 cpn60 Gent^r]*	Nadprodukce rekombinantních proteinů pomocí T7 RNA polymerázy, která je pod kontrolou *lacUV5* promotoru v přítomnosti chaperonů Cpn10 a Cpn60	Agilent Technologies
BTH101	F$^-$, *cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (Str^r), hsdR2, mcrA1, mcrB1*	Interakce proteinů pomocí bakteriálního adenylát cyklázového dvouhybridního systému	EUROMEDEX

4.1.3 Seznam vektorů a kazet

Tabulka 4-3: Seznam použitých vektorů a kazet

Vektor	**Rezistence; hostitelský organismus**	**Použití, zdroj**
pETPhosLink	Amp (100 μg/ml) *E. coli* DH5α	Exprese proteinů fúzovaných s histidinovou kotvou; (Nováková *et al.*, 2010)

pJWV25	Amp (100 μg/ml) Tet (2,5 μg/ml) *E. coli* DH5α	Exprese proteinů fúzovaných s GFP pod inducibilním zinkovým promotorem P_{czcd} (Eberhardt *et al.*, 2009)
pKT25	Kan (50 μg/ml) *E. coli* BTH101	Exprese proteinů fúzovaných s T25 fragmentem adenylát cyklasy z *B. pertusis*; EUROMEDEX
pUT18C	Amp (100 μg/ml) *E. coli* BTH101	Exprese proteinů fúzovaných s T18 fragmentem adenylát cyklasy z *B. pertusis*; EUROMEDEX
pbp1a::cat	Ch (4,5 μg/ml)	Delece genu *pbp1a*

4.1.4 Seznam plasmidů

Tabulka 4-4: Seznam použitých plasmidů pro stanovení fosforylace proteinů MacP a PBP2a *in vitro* a lokalizace MacP

Plasmid	**Rezistence**	**Použití, číslo kmene nesoucí plasmid**
pETPhosLink-*macP-WT*	Amp (100 μg/ml)	Stanovení fosforylace MacP-WT *in vitro*; Ec.437
pETPhosLink-*macP-T32A*	Amp (100 μg/ml)	Stanovení fosforylace MacP-T32A *in vitro*; Ec.450
pETPhosLink-*macP-T56A*	Amp (100 μg/ml)	Stanovení fosforylace MacP-T56A *in vitro*; Ec.449
pETPhosLink-*macP-2TA*	Amp (100 μg/ml)	Stanovení fosforylace MacP-2TA *in vitro*; Ec.451

pETPhosLink-*pbp2a-WT*	Amp (100 μg/ml)	Stanovení fosforylacePBP2a-WT *in vitro*; Ec.569
pETPhosLink-*pbp2a-T27A*	Amp (100 μg/ml)	Stanovení fosforylace PBP2a-T27A *in vitro*; Ec.570
pETPhosLink-*pbp2a-WT*	Amp (100 μg/ml)	Stanovení fosforylace PBP2a-WT *in vitro*; Ec.575 (ArcticExpress)
pETPhosLink-*pbp2a-T27A*	Amp (100 μg/ml)	Stanovení fosforylace PBP2a-T27A *in vitro*; Ec.576 (ArcticExpress)
pJWV25-p*Zn-gfp-macP*	Amp (100 μg/ml) Tet (2,5 μg/ml)	Lokalizace GFP-MacP u *S. pneumoniae*; Doubravová, nepublikovaná data; Ec. 269

Tabulka 4-5: Seznam použitých plasmidů pro potvrzení interakcí proteinů pomocí dvouhybridního bakteriálního adenylátcyklázového systému BACTH

Plasmid	**Rezistence**	**Použití, reference**
pKT25	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinů, BACTH systém; EUROMEDEX
pUT18C	Amp (100 μg/ml)	
pKT25-*zip*	Kan (50 μg/ml)	
pUT18C-*zip*	Amp (100 μg/ml)	
pKT25-*gpsb*	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinu GpsB, BACTH systém, Doubravová, nepublikovaná data
pUT18C-*gpsb*	Amp (100 μg/ml)	
pKT25-*pbp2a*	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinu PPB2a, BACTH systém; Cleverley *et al.*, 2019
pUT18C-*pbp2a*	Amp (100 μg/ml)	
pKT25-*divIVA*	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinu DivIVA s MacP, BACTH systém; Rued *et al.*, 2017
pUT18C-*divIVA*	Amp (100 μg/ml)	
pKT25-*ezrA*	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinu EzrA s MacP, BACTH systém; Rued *et al.*, 2017
pUT18C-*ezrA*	Amp (100 μg/ml)	

pKT25-*ftsA*	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinu FtsA s MacP, BACTH systém; Krupka *et al.*, 2012
pUT18C-*ftsA*	Amp (100 μg/ml)	
pKT25-*ftsB/divIC*	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinu FtsB/DivIC s MacP, BACTH systém; Massidda, nepublikovaná data
pUT18C-*ftsB/divIC*	Amp (100 μg/ml)	
pKT25-f*tsL*	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinu FtsL s MacP, BACTH systém; Massidda, nepublikovaná data
pUT18C-*ftsL*	Amp (100 μg/ml)	
pKT25-*ftsQ/divIB*	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinu FtsQ/DivIB s MacP, BACTH systém; Massidda, nepublikovaná data
pUT18C-*ftsQ/divIB*	Amp (100 μg/ml)	
pKT25-*ftsW*	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinu FtsW s MacP, BACTH systém; Massidda, nepublikovaná data
pUT18C-*ftsW*	Amp (100 μg/ml)	
pKT25-*ftsZ*	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinu FtsZ s MacP, BACTH systém; Rued *et al.*, 2017
pUT18C-*ftsZ*	Amp (100 μg/ml)	
pKT25-*mltG*	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinu MltG s MacP, BACTH systém; Massidda, nepublikovaná data
pUT18C-*mltG*	Amp (100 μg/ml)	
pKT25-*mreC*	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinu MreC s MacP, BACTH systém; Cleverley *et al.*, 2019
pUT18C-*mreC*	Amp (100 μg/ml)	
pKT25-*pbp1a*	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinu PBP1a s MacP, BACTH systém; Cleverley *et al.*, 2019
pUT18C-*pbp1a*	Amp (100 μg/ml)	
pKT25-*pbp2b*	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinu PBP2b s MacP, BACTH systém; Cleverley *et al.*, 2019
pUT18C-*pbp2b*	Amp (100 μg/ml)	

pKT25-*pbp2x*	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinu PBP2x s MacP, BACTH systém; Cleverley *et al.*, 2019
pUT18C-*pbp2x*	Amp (100 μg/ml)	
pKT25-*rodA*	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinu RodA s MacP, BACTH systém; Massidda, nepublikovaná data
pUT18C-*rodA*	Amp (100 μg/ml)	
pKT25-*rodZ*	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinu RodZ s MacP, BACTH systém; Massidda, nepublikovaná data
pUT18C-*rodZ*	Amp (100 μg/ml)	
pKT25-*stkP*	Kan (50 μg/ml)	Studium interakce proteinu StkP s MacP, BACTH systém; Rued *et al.*, 2017
pUT18C-*stkP*	Amp (100 μg/ml)	

4.1.5 Oligonukleotidy

Tabulka 4-6: Použité oligonukleotidy

Název	**Směr**	**Sekvence (5´→ 3´); tučně vyznačena restrikční místa**	**Použití**
AU202	F	TAATACGACTCACTATAGGG	Ověření přítomnosti genu *macP* v pETphosLink
LN304	F	AGAAGAGGTTGGTAAAATCTTAGCTTCCTCATTATCATCTAGCAAAG	Mutageneze genu *macP*, fosfoablativní záměna T32A
LN305	R	CTTTGCTAGATGATAATGAGGAAGCTAAGATTTTACCAACCTCTTCT	Mutageneze genu *macP*, fosfoablativní záměna T32A
LN306	F	GACCTGAATCTTCAAGGCTTCCTGGCTAAAACCATGAT	Mutageneze genu *macP*, fosfoablativní záměna T56A a 2TA
LN307	R	ATCATGGTTTTAGCCAGGAAGCCTTGAAGATTCAGGTC	Mutageneze genu *macP*, fosfoablativní záměna T56A a 2TA

LN333	R	TTACAAAAGTTTCATTGCTAAAAC	Ověření přítomnosti genu *macP* v pETphosLink
LM385	F	**CATATG**GGTAAATCTTTATTAACG	Klonování *macP* do plasmidu pETPhosLink
LN386	R	**GGATCC**TTATTTATTCAACTTAGAATTGAA	Klonování *macP* bez transmembránové domény (ΔTM) do plasmidu pETPhosLink
LN409	R	GGGAAGAAGAGGTTGGTAAAATCTTCTCTTCCTCATTATCATCTAGCAAAGGAG	Mutageneze genu *macP*, fosfomimetická záměna T32E
LN410	F	CTCCTTTGCTAGATGATAATGAGGAAGAGAAGATTTTACCAACCTCTTCTTCCC	Mutageneze genu *macP*, fosfomimetická záměna T32E
LN411	R	TGGTTCGACCTGAATCTTCAACTCTTCCTGGCTAAAACCATGATCC	Mutageneze genu *macP*, fosfomimetická záměna T56E, 2TE
LN412	F	GGATCATGGTTTTAGCCAGGAAGAGTTGAAGATTCAGGTCGAACCA	Mutageneze genu *macP*, fosfomimetická záměna T56E, 2TE
LN413	F	**CATATG**AAATTAGATAAATTATTTGAG	Klonování *pbp2a* do plasmidu pETPhosLink
LN414	R	**GGATCC**TTAGCGAAATAGATTGACTATC	Klonování *pbp2a* do plasmidu pETPhosLink
LN420	F	CG**TCTAGA**GATGGGTAAATCTTTATTAACGGATGAAATG	Klonování *macP* do plasmidů pKT25 a pUT18C
LN421	R	GC**GAATTC**TTACAAAAGTTTCATTGCTAAAACAAG	Klonování *macP* do plasmidů pKT25 a pUT18C
LN422	R	GC**GAATTC**TTAATTTCTCTTGGTATTTTCAAT	Klonování zkráceného *macP* (amk 1-77) do plasmidů pKT25 a pUT18C
LN424	R	GC**GAATTC**TTATAAGATTTTATTCAACTTAGAATTG	Klonování zkráceného *macP* (amk 1-87) do plasmidů pKT25 a pUT18C

4.1.6 Použité chemikálie, roztoky a pufry

Tabulka 4-7: Použité chemikálie

Název	Zkratka/vzorec	Firma	Použití
2´-deoxyadenosin-5´-trifosfát	dATP	Promega	PCR nukleotidy
2´-deoxycytidin-5´-trifosfát	dCTP	Promega	PCR nukleotidy
2´-deoxyguanosin-5´-trifosfát	dGTP	Promega	PCR nukleotidy
2´-deoxytymidin-5´-trifosfát	dTTP	Promega	PCR nukleotidy
Adenosin trifosfát	ATP	Sigma-Aldrich®	Kinázová reakce *in vitro*
Aagaróza		Sevac	DNA agarózový gel
Akrylamid		Sigma-Aldrich®	Gel pro SDS PAGE
Amidová čerň		Lachema	Barvení proteinů
Ampicilin	Amp	Sigma-Aldrich®	Selekční média
Anti-Flag® M2 Magnetic beads		Sigma-Aldrich®	Izolace proteinů s flagovou kotvou
Bacto agar		Oxoid	Pevné kultivační půdy
Bromfenolová modř	BPB	Lachema	SDS-PAGE vzorkový pufr
Complete Mini, Protease Inhibitor EDTA free		Sigma-Aldrich®	Izolace proteinů
Kompetenci stimulující peptid	CSP	Biopharm	Indukce kompetence při transformaci
Deoxycholát sodný	DCNa	Merek	Izolace chDNA; SEDS
Dihydrogen fosforečnan draselný	KH_2PO_4	Lach-Ner	PBS

Dihydrogen fosforečnan sodný	NaH_2PO_4	Lachner	Roztoky pro purifikaci proteinů s histidinovou kotvou
Dodecylsulfát sodný	SDS	Serva	Roztoky pro izolaci DNA; roztoky pro SDS-PAGE
D-glukóza		Lachema	Média
Ethanol		Lachema	Izolace chDNA
Ethylendiamintetraoctová kyselina	EDTA	Sigma-Aldrich®	TAE pufr; SEDS roztok
Fenol		Sigma-Aldrich®	Izolace chDNA
Gel Loading Dye Purple 6x		New England Biolabs	DNA elektroforéza
Gel Red Nucleic Acid Stain		Biotium	DNA elektroforéza
Glycerol		Lach-Ner	SDS-PAGE vzorkový pufr; konzervy *E. coli* a *S. pneumoniae*
Heptahydrát hydrogen fosforečnanu sondého	$Na_2HPO_4.7H_2O$	Lach-Ner	PBS
Hovězí sérový albumin, frakce V	BSA	Carl Roth®	Blokovací roztok; roztok protilátek
Hydroxid sodný	NaOH	Sigma-Aldrich®	TSB kompetenční médium, TFB II pufr
Chlorid draselný	KCl	Serva	PBS
Chlorid sodný	NaCl	Lach-Ner	SEDS; TBS; TBS-T; kinázová reakce *in vitro*; roztoky pro purifikaci proteinů s flagovou a histidinovou kotvou

Chlorid manganatý	$MnCl_2$	Sigma-Aldrich®	Kinázová reakce *in vitro*, TFB I pufr
Chlorid rubidný	RbCl	Sigma-Aldrich®	TFB I, II pufr
Chlorid vápenatý	$CaCl_2$	Sigma-Aldrich®	TSB kompetenční médium, TFB I, II pufr
Chloroform		Lach-Ner	Izolace chDNA
Imidazol		Sigma-Aldrich®	roztoky pro purifikaci proteinů s histidinovou kotvou
Izopropanol		Lach-Ner	Izolace chDNA
Izopropyl β-D-1-thiogalaktopyranozid	IPTG	Sigma-Aldrich®	Indukce expese proteinů
Kanamycin	Kan	Sigma-Aldrich®	Selekční média
Kvasinkový extrakt		Oxoid	LB médium
Kyselina 3-(N-morpholino)-propansulfonová	MOPS	Sigma-Aldrich®	TFB I, II pufr
Kyselina chlorovodíková	HCl	Sigma-Aldrich®	TE pufr; SEDS
Kyselina octová	CH_3COOH	Lach-Ner	Amidová čerň, TFB I pufr
β-merkaptoethanol		Sigma-Aldrich®	SDS-PAGE vzorkový pufr
Methanol	CH_3OH	BDH Prolabo Chemicals	Aktivace PVDF membrán před blotováním; blotovací pufr
Ni-NTA agarose		Qiagen	Purifikace proteinů s histidinovou značkou
Octan draselný	CH_3COOK	Sigma-Aldrich®	TFB I pufr
Octan sodný	CH_3COONa	Sigma-Aldrich®	Izolace chDNA

Peroxosíran amonný	APS	Lachema	Gel pro SDS-PAGE
Síran zinečnatý	$ZnSO_4$	Sigma-Aldrich®	Indukce exprese proteinů
Tetracyklin	Tet	USB	Selekční média
Tetramethylendiamid	TEMED	Serva	Gel pro SDS-PAGE
Tris-hydroxymethyl-aminomethan hydroxychlorid	Tris-HCl	Sigma-Aldrich®	SEDS; TBS; TE; kinázová reakce *in vitro*
Trypton		Oxoid	LB médium
Tween20		Sigma-Aldrich®	Pufr TBS-T; koloniová PCR
Chloramfenikol	Cat		selekční média
16% formaldehyd		Thermo Scientific	Fixace buněk, chemické zesíťování proteinů

Použité roztoky a pufry

DNA agarózový gel

TAE pufr: 40 mM Tris; 2 mM EDTA; pH 8,5

Agarózový gel na přípravu fixovaných mikroskopických preparátů

Roztok PBS: 137 mM NaCl; 3 mM KCl; 10 mM NaH_2PO_4 . $7H_2O$; 1,8 mM KH_2PO_4; pH 7,4

Izolace chromozomální DNA *S. pneumoniae*

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

Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli* DH5α, BL21 (DE3), ArcticExpress, BTH101

TFB I pufr: 100 mM RbCl; 50 mM $MnCl_2$; 30 mM octan draselný; 9,3 mM $CaCl_2$; 15 % glycerol; pH upraveno pomocí kyseliny octové na 5,8

TFB II pufr: 10 mM MOPS (pH upraveno pomocí NaOH na 7,0); 10 mM RbCl; 75 mM $CaCl_2$; 15 % glycerol

Přenos proteinů a imunodetekce

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

Purifikace proteinů s Flagovou značkou pomocí magnetických kuliček konjugovaných s M2 Anti-Flag protilátkou

TBS pufr:	50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 7,4
SDS-PAGE pufr 2x:	125 mM Tris-HCl; 4 % SDS; 5 % glycerol; 0,004 % bromfenolová modř; pH 6,8

Purifikace proteinů s Histidinovou značkou pomocí Ni-NTA agarózy

Lyzační pufr:	50 mM NaH_2PO_4; 300 mM NaCl; 50 mM imidazol; pH 8,0
Promývací pufr:	50 mM NaH_2PO_4; 300 mM NaCl; 50 mM imidazol; pH 8,0
Eluční pufr:	50 mM NaH_2PO_4; 300 mM NaCl; 250 mM imidazol; pH 8,0
Dialyzační roztok:	25 mM Tris; 100 mM NaCl; pH 7,5

Gel pro SDS-PAGE

Tabulka 4-8: Složení polyakrylamidového gelu pro SDS-PAGE

	30 % akrylamid [ml]	**1,5 M Tris pH 8,8 [ml]**	**0,5 M Tris pH 6,8 [ml]**	**10 % SDS [µl]**	**10 % APS [µl]**	**TEMED [µl]**	**H_2O [ml]**	**Celkový objem [ml]**
Zaostřovací gel 4 %	0,8	-	1,5	60	60	7,5	3,6	6
Separační gel 10 %	6,7	5	-	200	200	20	7,9	20
Separační gel 16 %	10,7	5	-	200	200	20	3,9	20

SDS-PAGE

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

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

4.1.7 Kultivační půdy a média

Kultivace *E. coli*

Kultivace *E. coli* probíhala za aerobních podmínek za stálého třepání (250 rpm) při teplotě 37 °C v tekutém LB médiu (trypton 10 g; kvasinkový extrakt 5 g; NaCl 10 g; výsledné pH 7,5; doplněno do 1 litru destilovanou vodou). Pevné médium bylo připraveno přídáním 1,5 % agaru. K jednotlivým médiím bylo přidáno ATB v příslušných koncentracích: ampicilin (100 µg/mol), kanamycin (50 µg/mol).

Kultivace *S. pneumoniae*

Kultura *S. pneumoniae* byla kultivována v tekutém nebo pevném médiu (viz tabulka 4-9) při 37 °C. Do 10 ml tekutého média (viz tab. 4-8) byla inokulována kultura

S. pneumoniae na počáteční OD_{600} = 0,008. Směs byla dále kultivována staticky do OD_{600} = 0,4. Pro stanovení indukce exprese proteinu MacP, který byl regulován zinkem indukovaným promotorem, byl do média přidán $ZnCl_2$ o koncentracích 0,1 a 0,3 mM. Pevná média byla doplněna 1,5 % agarem. Nakonec bylo k médiím o teplotě 45 °C přidáno antibiotikum chloramfenikol (4,5 μg/ml) nebo tetracyklin (2,5 μg/ml).

Růstové křivky byly měřeny v BHI médiu pomocí spektrofotometru Microplate reader 800TS (BIOTEK). Automatické měření probíhalo každých 10 minut po dobu 9 hod při OD 600 nm. Vzorky všech kmenů byly měřeny v triplikátech. Aritmetický průměr z těchto měření a vypočítaná směrodatná odchylka představují výsledky našeho měření.

Příprava glycerolových konzerv

Glycerolové konzervy buněk *S. pneumoniae* a *E. coli* byly připraveny smícháním 250 μl 60 % glycerolu se 750 μl bakteriální kultury o OD_{600} = 0,4. Tyto konzervy byly uchovávány při teplotě -80 °C.

Tabulka 4-9: Média pro kultivaci *S. pneumoniae* (výsledný objem 1 litr).

Médium	**Složení**
TSB (Oxoid)	30 g TSB (Tryptic soy broth)
BHI (Oxoid)	37 g BHI (Brain heart infusion)
Kompetenční TSB	k TSB médiu bylo přidáno 0,2 % BSA; 1 mM $CaCl_2$; upraveno pomocí NaOH na pH 8
Krevní Columbia agar (LabMediaServis)	Columbia agar s přídavkem 5% defibrilované beraní krve

4.1.8 Enzymy

Tabulka 4-10: Modifikační enzymy

Enzym	**Firma**
Benzonáza	Merck
Pfu-X DNA polymeráza	Jena Bioscience
Purple Taq polymeráza	TOP Bio
T4 DNA ligáza	Fermentas

Tabulka 4-11: Restrikční enzymy

Enzym	**Firma**
BamHI	New England Biolabs
DpnI	
EcoRI	
NdeI	
PvuI	
XbaI	

4.1.9 Protilátky

Tabulka 4-12: Použité protilátky

Protilátka	**Typ**	**Ředění**	**Firma/Citace**	**Použití**
Anti-Flag F7425	Primární	1:10 000	Sigma-Aldrich®	Králičí protilátka proti FLAG kotvě
Anti-His	Primární	1:50 000	Sigma-Aldrich®	Monoklonální myší protilátka proti histidinové kotvě konjugovaná s křenovou peroxidázou

Anti-MacP	Primární	1:2 000 1:10 000 1:20 000	Naše nepublikované výsledky	Králičí protilátka proti MacP
Anti-GpsB	Primární	1:50 000	(Cleverley *et al.,* 2019)	Králičí protilátka proti GpsB
Anti-StkP-C-term.	Primární	1:70 000	(Nováková *et al.*, 2005)	Králičí protilátka proti C-terminální doméně StkP
Anti-GFP	Primární	1:10 000	Santa Cruz	Monoklonální myší protilátka proti GFP konjugovaná s křenovou peroxidázou
Anti-P-Thr (CS)	Primární	1:50 000 1:70 000	Cell Signaling Technology	Králičí protilátka proti fosfothreoninu
Anti-P-Thr (ECM)	Primární	1: 10 000	ECM (Sven Biolabs)	Králičí protilátka proti fosfothreoninu
Anti-Rabbit-IgG Peroxidase A8275-1ML	Sekundární	1: 10 000	Sigma-Aldrich®	Sekundární kozí protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou proti králičím IgG

4.1.10 Seznam použitých přístrojů a zařízení

Centrifugy:

- Microcentrifuge PRISM™ (Labnet)
- UNIVERSAL 320 R (Hettich)
- Centrifuge AVANTI® J-26 XPI (Beckman Coulter)

PCR cyklery:

- Mastercycler gradient (Eppendorf)
- XP cycler (BIOER)

Elektroforetické přístroje:

- OWL EASYCAST™ B1A (Thermo Scientific)
- Mini Gel Tank (Invitrogen)
- ATTO (Atto)

Spektrofotometry:

- DU-730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer (Beckman Coulter)
- Cell Density meter (WPA)
- Nanodrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific)

Váhy:

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

Vodní lázně:

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

Ostatní přístroje:

- Dezintegrátor buněk FastPrep FP120 (ThermoSavant)
- Gelový dokumentační systém G:Box Chemi XRQ instrument (SynGene)
- Mikroskop Olympus CellR IX 81 microscope (Olympus)
- Magnetická míchačka (ThermoScientific)
- Třepačka Innova®42 – Incubator Shakers Series (New Brunswick Scientific)
- Kývačka Rotamax 120 (Heidolph)
- Zdroj stejnosměrného napětí/elektrického proudu Enduro™ (Labnet)
- Termostat (LTE Scientific)
- Inkubátor CO_2 Galaxy 170S (New Brunswick)
- Vakuový centrifugační koncentrátor DNA mini (Labogene)
- Skenovací zařízení MF742Cdn (Canon)

– Rotátor Bio RS-24 Mini rotator (Biosan)
– Termostatický blok Thermomixer Comfort (Eppendorf)
– Vortex Mixer (Labnet)
– Blotovací komora GEL BOX, Vertical Blotter (Labnet)

4.1.11 Seznam použitých programů a jejich použití

- DNA STAR Lasergene, verze 7.0.0 – vytváření genetických map, kontrola sekvenovaných konstruktů
- CellR Version 2.0 – zpracování obrazu z kamery FV2T Digital B/W
- ImageJ – úprava obrázků
- MicrobeJ 5.13I – stanovení velikosti buněk
- GraphPad Prism, verze 6.0.0 – statistická analýza velikosti buněk
- Gene Tools, Syngene, verze 7.0.0 – kvantitativní stanovení imunodetekčního signálu

4.1.12 Seznam použitých komerčních souprav, standardů a jejich použití

- Amersham™ Protran ™ 0.45 µm NC, nitrocellulose blotting membrane, kat. č. 10600007 (GE Healthcare Life Science) – nitrocelulózová membrána použita k přenosu proteinů z polyakrylamidového gelu
- Min Elute® Reaction Cleanup kit 250, kat. č. 28206 (Qiagen) – přečištění DNA fragmentů amplifikovaných pomocí PCR
- Pierce™ BCA Protein Assay kit, kat. č. 23225 (Thermo Scientific) – stanovení koncentrace proteinů
- QIAquick® Gel extraction kit, kat. č. 28706 (Qiagen) – izolace DNA z agarózového gelu
- QIAprep® Spin Miniprep kit, kat. č. 27106 (Qiagen) – izolace plazmidové DNA
- QuikChange®II SiteDirected Mutagenesis kit, kat. č. 30210 (Stratagene) – místně specifická mutageneze
- WesternBright ECL HRP susbstrate, kat. č. K-12045-D20 (Advansta) – substrát pro získání chemiluminiscenčního signálu při imunodetekci
- WesternBright Sirius HRP substrate, kat. č. K-12043-D10 (Advansta) – substrát pro získání chemiluminiscenčního signálu při imunodetekci
- Color Prestained Protein Standart, katalogové číslo P7712 (New England BIOLABS)
- Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, katalogové číslo 2616 (Thermo Scientific)
- GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, katalogové číslo SM1331 (Thermo Scientific)

- Immobilon®-P Transfer membrane, kat. č. IPVH00010 (Immobilon®-P) – PVDF membrána použita k přenosu proteinů z polyakrylamidového gelu
- Novex™ WedgeWell™ Tris-Glycine gely 4-20 %, 8 %, 12 %, 16 % (Invitrogen) – komerční gely použité pro separaci proteinů v polyakrylamidovém gelu v elektroforetické komoře Mini Gel Tank (Invitrogen)
- SimplyBlue™ SafeStain, kat. č. LC6060 (Invitrogen) – barvení SDS-PAGE gelu

4.2 Metody

4.2.1 Manipulace s DNA

4.2.1.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je základní molekulárně biologická metoda, která se využívá ke zmnožení (amplifikaci) nebo modifikaci konkrétních úseků nukleové kyseliny. Tato metoda byla v našem případě využita k amplifikaci, modifikaci konkrétních DNA úseků a k přípravě expresních vektorů.

Oligonukleotidy, které byly použity při PCR, byly navrženy pomocí programu SeqBuilder (LASERGENE) a nasyntetizovány firmou EUROFINS (tab. 4-6 zahrnuje jejich název, sekvenci a použití). Pro amplifikaci, klonování a modifikaci DNA úseků byla použita Pfu-X polymeráza od společnosti Jena Bioscience. Tato polymeráza se vyznačuje nízkou chybovostí, především díky své schopnosti opravovat chyby během amplifikace. Pro kontrolní PCR byla využita Taq-purple polymeráza od společnosti TOP Bio, která sloužila k ověření správného vložení DNA do *E. coli* během transformace (koloniová PCR). Vysoká chybovost této polymerázy je v důsledku ztráty schopnosti opravovat chyby během amplifikace. Výhodou je její vysoká enzymatická aktivita a nízká cena. Jako templát při koloniové PCR sloužilo malé množství bakteriálních buněk narostlých na pevném médiu, které byly odebírány sterilní kličkou do reakční směsi. Navíc se do této reakce přidává 10% Tween-20 pro dezintegraci buněk. Složení reakční směsi a podmínky amplifikace byly dodrženy dle pokynů výrobce. Kontrola PCR reakce probíhala pomocí DNA elektroforézy v 0,7% agarózovém gelu.

4.2.1.2 DNA elektroforéza v agarózovém gelu

Elektroforéza v agarózovém gelu se používá při identifikaci, separaci a purifikaci fragmentů DNA, které jsou děleny v elektrickém poli v závislosti na jejich velikosti. Agarózový gel (0,7 %) byl připraven rozpuštěním 0,28 g agarózy v 28 ml TAE pufru. Ke směsi bylo přidáno fluorescenční barvivo Red Gel (Roche), které slouží k vizualizaci

fragmentů DNA pod UV světlem. Před nanesením byly vzorky DNA smíchány s nanášecím pufrem Loading Dye Purple 6x (New England Biolabs). Elektroforéza probíhala 1 hod při 95 V a jako standart byl použit GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Následně byla DNA vizualizována pod UV světlem. V případě potřeby byly DNA fragmenty izolovány z gelu pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) a u PCR produktů následně probíhalo přečištění pomocí MinElute™ Reaction Cleanup Kit (Qiagen).

4.2.1.3 Místně specifická mutageneze

Místně specifická mutageneze je metoda, která byla použita pro *in vitro* mutagenezi genu *macP*. K vytvoření mutovaných konstruktů byla použita komerční souprava QuickChange® II SiteDirected Mutagenesis Kit (Stratagene) podle pokynů výrobce. Místně specifická záměna byla do genu vpravena prostřednictvím PCR za použití mutagenních oligonukleotidů, které nesly požadovanou záměnu. Po amplifikaci byla původní (nemutovaná) DNA vlákna odstraněna pomocí restriktázy *DpnI*, která štěpí methylovanou DNA. V této práci byla tato metoda použita pro místně specifickou záměnu threoninů v MacP v pozicích 32 a 56 za alanin nebo kyselinu glutamovou.

4.2.1.4 Izolace chromozomální DNA *S. pneumoniae*

Do TSB média o objemu 10 ml byla inokulována kultura *S. pneumoniae* na výslednou OD_{600} 0,008. Kultura byla pěstována při 37 °C do OD_{600} = 0,5 a následně centrifugována (10 min, 2760 g). Peleta byla resuspendována ve 250 µl SEDS roztoku a inkubována 10 min při 37 °C. Dále bylo k suspenzi přidáno 1 µl proteinkinasy K (2 mg/ml) a vzorek byl dále inkubován po dobu 15 minut při 56 °C. Po přidání 250 µl TE pufru proběhla extrakce fenol/chloroformem 1:1 (500 µl). Vzorek byl několikrát v ruce překlápěním zamíchán a centrifugován (10 min, 17949 g). Vodní fáze byla odebrána a ke vzorku byl přidán chloroform (500 µl). Po zamíchání byl vzorek centrifugován (10 min, 17949 g). Vodní fáze byla odebrána a precipitována pomocí 3 M NaOAc (50 µl) a ispopropanolu (500 µl). Po zamíchání byl vzorek opět centrifugován (10 min, 17949 g). Pelet byl promyt 80% ethanolem a stočen (5 min, 17949 g). Nakonec byla chDNA rozpuštěna ve 100 µl TE pufru.

4.2.1.5 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Restrikční endonukleázy jsou enzymy štěpící DNA v tzv. palindromatické sekvenci na obou řetězcích. Reakční podmínky pro tyto enzymy byly stanoveny podle

pokynů výrobce (New England Biolabs). Použité endonukleázy zahrnuje tabulka č. 4-11 (viz kapitola 4.1.7). Štěpené DNA fragmenty byly následně přečištěny pomocí soupravy Min Elute™ Reaction Cleanup Kit (Qiagen).

4.2.1.6 Ligace

Tato metoda byla využita pro klonování fragmentů DNA do klonovacích vektorů při konstrukcích plasmidů. Reakční směs o objemu 20 µl obsahovala 1 µl T4 DNA ligázy a 2 µl ligačního pufru (10x T4 Ligase buffer – Fermentas). Množství fragmentu a vektoru byla molárně zachována 2:1. Ligace probíhala 1 hod při 22 °C.

4.2.2 Manipulace s proteiny

4.2.2.1 Koimunoprecipitace

Koimunoprecipitace je metoda, která se využívá pro studium interakčních partnerů proteinu vázaného na nosič. Při izolaci proteinu dochází ke specifické vazbě mezi protilátkou vázanou na nosič a antigenem. V našem případě jsme jako nosič použili magnetické kuličky M2 Magnetic beads (Sigma Aldrich®) fúzované s protilátkou proti Flag epitopu. Vlivem vazby antigen-protilátka dochází k imobilizaci proteinu našeho zájmu spolu s jeho interakčními partnery. Nakonec je proteinový komplex eluován, separován pomocí SDS-PAGE, přenesen na membránu pomocí Western-blot a jednotlivé komponenty proteinového komplexu jsou detekovány specifickou protilátkou.

- **I. Izolace proteinů ze *S. pneumoniae***

Pro izolaci proteinů *S. pneumoniae* byla použita metoda mechanické dezintegrace buněk. TSB médium o objemu 100 ml bylo inokulováno kulturou *S. pneumoniae* na OD_{600} 0,008. Kultura byla inkubována při 37 °C na OD_{600} = 0,4. Poté proběhla centrifugace kultury (9680 g, 10 min, 4 °C), promytí peletu v 10 ml 1x PBS a opět centrifugace (9680 g, 10 min, 4 °C). Peleta byla resuspendována v 0,8 ml TBS pufru s přídavkem 1 mM EDTA, 1 % Tritonu, 0,5 µl benzonázy, fosfatázových a proteázových inhibitorů (100x). Suspenze byla následně přepipetována do mikrozkumavek se skleněnými kuličkami a vložena do přístroje Fast Prep 120, kde probíhala mechanická dezintegrace buněk rychlostí 4,5 m/s po dobu 20 sekund. Tento krok byl uskutečněn celkem 5x, kdy během jednotlivých cyklů byly vzorky inkubovány na ledu po dobu 2 min, aby nedošlo k přehřátí vzorku. Nakonec byl vzorek centrifugován (18407 g, 15 min) a supernatant (celkový lyzát) zamrazen při -20 °C.

- **II. Izolace chemicky zesíťovaných proteinů ze *S. pneumoniae***

Pro izolaci chemicky zesíťovaných proteinů *S. pneumoniae* byla použita metoda mechanické dezintegrace buněk. BHI médium o objemu 400 ml bylo inokulováno kulturou *S. pneumoniae* na OD_{600} = 0,008. Inkubace kultury probíhala při 37 °C na OD_{600} = 0,4. Následně byla kultura centrifugována (9000 g, 10 min, 4 °C), peleta byla promyta 30 ml PBS pufru a opět centrifugována (9000 g, 10 min, 4 °C). Peleta byla resuspendována v 19,8 ml PBS pufru. Ke směsi byl přidán 16% paraformaldehyd (125 µl), čímž došlo k chemickému zesíťování proteinů. Směs byla inkubována při 37 °C po dobu 1 hod. Po inkubaci byl přidán 1 M glycin (4 ml) a směs byla dále inkubována při 25 °C po dobu 10 min. Následně byla směs centrifugována (9680 g, 8 min, 4 °C). Dále byla peleta resuspendována v TBS pufru (2 ml) s přídavkem 1 mM EDTA, 1 % Tritonu a proteázových inhibitorů. Mechanická dezintegrace buněk probíhala ve zkumavkách se skleněnými kuličkami v přístroji Fast Prep rychlostí 6 m/s po dobu 40 sekund. Tento krok byl uskutečněn celkem 10x, kdy mezi jednotlivými pulsy probíhala inkubace vzorku po dobu 5 minut na ledu. Nakonec byl vzorek centrifugován (16000 g, 8 min) a supernatant (celkový lyzát) zamrazen při -20 °C.

- **III. Imunoprecipitace proteinů pomocí anti-Flag protilátky imobilizované na magnetických kuličkách**

Proteiny, které byly značené Flag epitopem, byly z proteinového lyzátu purifikovány pomocí anti-Flag protilátky imobilizované na magnetických kuličkách (Anti-FLAG M2 Magnetic Beads, Sigma-Aldrich®). Celkem 25 µl magnetických kuliček bylo ekvilibrováno 750 µl TBS pufrem. Po odstranění TBS pufru bylo k magnetickým kuličkám přidáno 5 mg proteinového lyzátu. Směs byla inkubována přes noc při 4 °C v automatickém rotátoru. Flagované proteiny vytvořily komplex s magnetickými kuličkami prostřednictvím Flag epitopu proteinu a paratopu protilátky na magnetických kuličkách. Vzorek byl poté 3x promyt TBS pufrem. Nakonec proběhla eluce proteinů pomocí 2x SDS-PAGE vzorkového pufru a povařením směsi při 100 °C 60 minut. Tato frakce „eluát“ obsahovala proteiny označené flag-epitopem a jejich interakční partnery. Proteiny byly následně separovány pomocí SDS-PAGE, přeneseny na membránu pomocí metody Western-blot a detekovány specifickou protilátkou.

4.2.2.2 Příprava SEDS proteinových vzorků *S. pneumoniae*

Z exponenciálně rostoucí kultury *S. pneumoniae* bylo odebráno množství buněk, které odpovídá 1 ml kultury při OD_{600} = 0,4. Následně byly buňky centrifugovány (17949 g, 2 min). Supernatant byl odstraněn a buňky ještě jednou krátce centrifugovány. Po kompletním odstranění supernatantu byla peleta resuspendována ve 20 µl roztoku SEDS. Po inkubaci vzorku trvající 10 minut při 37 °C došlo k lyzi buněk a bylo přidáno 20 µl 2x SDS-PAGE vzorkového pufru. Nakonec byl vzorek povařen 10 min při 100 °C a analyzován pomocí SDS-PAGE nebo uchován při -20 °C.

4.2.2.3 Proteinová polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti SDS

SDS-PAGE elektroforéza je metoda, která slouží k analytické separaci proteinů v elektrickém poli na základě jejich molekulové hmotnosti. Díky přítomnosti SDS mají proteiny uniformní záporný náboj. Jednotlivé vzorky byly smíchány s SDS-PAGE vzorkovým pufrem a inkubovány 5 minut při 100 °C. Elektroforéza probíhala při napětí 15 V/cm^2. V této práci byly použity gely připravené v laboratoři (složení viz tab. 4-8 v kapitole 4.1.6), u kterých byl použit elektroforetický přístroj ATTO (ATTO corporation). Dále byly použity komerčně dostupné gely od firmy Invitrogen spolu s elektroforetickou komorou Mini Gel Tank.

4.2.2.4 Přenos proteinů na membránu („Western blot“) a imunodetekce

Po elektroforetické separaci proteinů pomocí SDS-PAGE bylo potřeba proteiny přenést na membránu. V této práci byly použity dva typy membrán: nitrocelulózová (Amersham™ Protran™ 0.45 µm NC) a PVDF (Immobilon®-P Transfer membrane). PVDF membrána se aktivovala inkubací v methanolu po dobu několika vteřin a aktivace nitrocelulózové membrány probíhala v blotovacím pufru po dobu 2 min. Samotný přenos proteinů na membránu byl uskutečněn v blotovací komoře dle pokynů výrobce (Gel Box Vertical Blotter, Labnet). Přenos proteinů trval 30 minut při 360 mA.

Postup imunodetekce proteinů znázorňují tabulky 4-13 a 4-14. Detekce chemiluminiscenčního signálu byla provedena pomocí přístroje G:Box Chemi XRQ (SynGene).

Tabulka 4-13: Detekce konjugovanými anti-His a anti-GFP protilátkami

Imunodetekce	
Blokace membrány	5 % BSA v TBS-T, 1 hod
Protilátka **Inkubace v 1 % BSA v TBS-T přes noc**	Anti-His, 1:50 000
	Anti-GFP, 1:10 000
Promytí	3x 10 min v TBST-T
Substrát	WesternBright ECL (Advansta)

Tabulka 4-14: Detekce primárními protilátkami

Imunodetekce	
Blokace membrány	5 % BSA v TBS-T, 1 hod
Primární protilátka **Inkubace v 1 % BSA v TBS-T přes noc**	Anti-Flag, 1:10 000
	Anti-MacP, 1:2 000, 1:10 000, 1:20 000
	Anti-GpsB, 1:50 000
	Anti-StkP-C-term, 1:70 000
	Anti-P-Thr (CS), 1:50 000, 1:70 000
	Anti-P-Thr (ECM), 1:10 000
Promytí	3 x 10 min v TBS-T
Sekundární protilátka	Anti-Rabbit IgG peroxidase A8275-1ML, 1:10 000
Promytí	3x 10 min v TBST-T
Substrát	WesternBright ECL (Advansta), WesternBright Sirius (Advansta)

4.2.2.5 Exprese rekombinantních proteinů v *E. coli*

Exprese rekombinantních proteinů jednotlivých kmenů *E. coli* byla navozena přídavkem induktoru IPTG. Nejprve došlo k zaočkování kmenů *E. coli* do 10 ml LB média s příslušným ATB a probíhala kultivace při 37 °C a 250 rpm přes noc. Další den byla změřena OD_{600} kultury a proběhlo zaočkování do 200 ml LB média tak, aby počáteční hodnota OD_{600} byla 0,05. Následně byly kultury kultivovány při 30 °C a 200 rpm do doby, než kultura měla OD_{600} = 0,5. Poté bylo ke kultuře přidáno IPTG o koncentraci 1 mM, čímž došlo k navození exprese proteinu, který byl pod kontrolou inducibilního T7 promotoru. V průběhu kultivace jsme odebírali kontrolní vzorky na SDS-PAGE analýzu. Kultura byla kultivována do dalšího dne při 200 rpm a 15 °C. Kultura byla centrifugována (4000 g, 20 minut, 4 °C) a peleta uskladněna při -20°C. Všechny kontrolní vzorky byly cetrifugovány (2 min, 13000 g), vzniklé pelety resuspendovány v 70 µl 1x vzorkového pufru a povařeny 10 minut při 100 °C. Kontrola exprese proteinu MacP-ΔTM proběhla pomocí SDS-PAGE gelu pomocí Coomassie blue G-250 barvením.

4.2.2.6 Izolace proteinů z *E. coli* pomocí afinitní chromatografie

Pelet bakteriálních buněk byl resuspendován v 5 ml lyzačního pufru s přídavkem proteázových inhibitorů a benzonázy (1 µl). Následně byly buňky dezintegrovány pomocí přístroje French Press za vysokého tlaku. Buněčné lyzáty byly centrifugovány (9000 g, 5 min, 4 °C) a tím došlo k separaci nerozbitých buněk. Po centrifugaci se v supernatantu nacházely rozpustné proteiny v nativní formě a inkluze s denaturovanými proteiny. Peleta obsahovala nerozbité buňky. Proteinový lyzát (asi 4 ml) byl centrifugován (15 min, 18407 g, 4 °C), abychom oddělili nerozpustné proteiny ve formě inkluzí. Supernatant byl použit pro izolaci proteinu fúzovaného s histidinovou značkou pomocí Ni-NTA agarózy (Qiagen). Proteinový lyzát o objemu 4 ml byl přepipetován do kolonky naplněné Ni-NTA agarózou o objemu 0,5 ml. Směs byla inkubována v automatickém rotátoru po dobu 1 hod při 4 °C. Proteiny fúzované histidinovou kotvou interagovaly s Ni^{2+} sorbentu agarózového nosiče a vytvořily komplex, který zůstal navázán v kolonce. Navázaný komplex byl dále promyt pufrem (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 50 mM imidazol, pH 8) o objemu 3x 5 ml. Následně došlo k uvolnění navázaných proteinů z komplexu pomocí imidazolu v elučním pufru (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8) o objemu 4x 500 µl. Tuto frakci jsme nazvali „eluát“. Veškeré frakce byly uchovány. Nakonec bylo z každé frakce odebráno 20 µl vzorku, které byly smíchány

s 5 µl 5x SDS-PAGE vzorkového pufru. Vzorky byly povařeny 5 minut při 100 °C a analyzovány pomocí SDS-PAGE.

4.2.2.7 Dialýza purifikovaných proteinů

Tato metoda nám umožnila výměnu pufru a odstranění solí ze vzorku obsahující námi purifikovaný protein. Purifikované proteiny byly aplikovány pomocí injekční stříkačky do dialyzační kazety (Thermo scientific, kat. č. 1060) o objemu 0,5 až 3,0 ml. Následně byla kazeta ponořena do dialyzačního pufru (25 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,5) o objemu 1 litr. Za stálého míchání byla kazeta inkubována v pufru 1 hod. Poté byl dialyzační pufr vyměněn a vzorek byl dialyzován přes noc při 4 °C. Nakonec byl vzorek z kazety vyjmut injekční stříkačkou a přidali jsme glycerol do výsledné koncentrace 10 %. Proteiny byly uchovávány při -20 °C.

4.2.2.8 Stanovení koncentrace proteinů

V této práci bylo pro stanovení koncentrace proteinů využita souprava PierceTM BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific). Principem této metody je redukce Cu^{2+} iontů na Cu^{+} pomocí peptidové vazby v alkalickém prostředí. Vzniklé ionty reagují s kyselinou bicinchoninovou (BCA) za vzniku fialového zbarvení, které je detekováno spektrofotometrem při vlnové délce 562 nm. Výsledná koncentrace proteinu byla vypočtena pomocí kalibrační křivky, která byla zjištěna pomocí známých koncentracích BSA. Proložení kalibrační křivky přímkou linearní regrese jsme získali rovnici regrese, ze které byla koncentrace proteinu ve vzorcích dopočtena.

4.2.2.9 Kinázová reakce *in vitro*

Pro průkaz fosforylace proteinů *in vitro* byla připravena reakční směs o celkovém objemu 20 µl. Reakční směs byla připravena smícháním následujících komponent o výsledných koncentracích: 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 5 mM $MnCl_2$, 0,3 µg kinázové domény StkP (KD) a vzorku, který obsahoval 2 µg testovaného proteinu. K reakční směsi bylo přidáno ATP (10 µM). Kinázová reakce probíhala 15 min při 37 °C a následně bylo přidáno 5 µl 5x vzorkového pufru. Vzorky byly nakonec povařeny po dobu 5 min při 100 °C a separovány pomocí SDS-PAGE. Následnou imunodetekcí protilátkami anti-P-Thr (CS) a anti-His byla stanovena a kvantifikována míra fosforylace proteinů v jednotlivých vzorcích. Detekcí anti-His protilátkou bylo stanoveno celkové množství proteinu MacP v jednotlivých vzorcích. Kvantifikace fosforylace proteinů byla provedena v programu GeneTools (Syngene).

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

4.2.3.1 Transformace DNA do buněk *S. pneumoniae*

Pro transformaci DNA do buněk *S. pneumoniae* jsme použili 10 ml TSB média s přídavkem 100 µl 0,1 M $CaCl_2$, 250 µl 8 % BSA a 67 µl 1M NaOH (úprava na pH 8). Poté bylo k 950 µl kompetenčního média přidáno 50 µl rozmražené bakteriální kultury, 1 µl CSP (250 ng/ml) a DNA (plasmid nebo PCR produkt 25 ng). Transformační směs byla poté inkubována 2,5 hodiny při 37 °C. Po inkubaci proběhl výsev buněk na Petriho misky s krevním agarem. Bakteriální kultura byla naředěna TSB médiem podle ředící řady $0\text{-}10^{-5}$, přičemž z každého ředění bylo vyseto 100 µl. Misky s krevním agarem, kde byla vyseta ředění transformačních směsí $0\text{-}10^{-3}$, navíc obsahovaly ATB, které umožnilo selekci transformantů. Misky s ředěním $10^{-4}\text{-}10^{-5}$ neobsahovaly antibiotikum a sloužily ke kontrole životaschopnosti buněk. Po vysetí proběhla inkubace při 37 °C do dalšího dne. Druhý den proběhlo přeočkování jednotlivých kolonií na nové krevní misky s následnou kultivací při 37 °C do dalšího dne. Třetí den byly jednotlivé klony zaočkovány do 2 ml TSB média a kultivovány při 37 °C do hustého zákalu. Nakonec bylo 750 µl bakteriální kultury smícháno s 250 µl 60 % glycerolu. Tyto bakteriální kultury v podobě prekonzerv byly uchovávány při -80 °C.

4.2.3.2 Příprava kompetentních buněk *E. coli* DH5α, BL21 (DE3), ArcticExpress (DE3) a BTH101

Do 20 ml LB média bylo inokulováno 10 µl kultury. Směs byla inkubována při 37 °C, 250 rpm dokud nedosáhla OD_{550} = 0,2. Z této směsi bylo inokulováno 12 ml narostlé kultury do 280 ml LB média a směs byla dále inkubována při 37 °C, 250 rpm dokud nedosáhla OD_{550} = 0,50. Poté byla kultura centrifugována při 3800 g, 10 min, 4 °C. Peleta byla následně resuspendována v 75 ml TFB I a znovu centrifugována při 3800 g, 10 min, 4 °C. Peleta byl poté resuspendována ve 20 ml TFB II. Suspenze byla nakonec rozpipetována do zkumavek a zamražena na -80 °C.

4.2.3.3 Transformace DNA do buněk *E. coli*

K 100 µl kompetentních buněk (DH5α, BL21 (DE3) a ArcticExpress (DE3)) bylo přidáno 10 µl ligační směsi nebo 100 ng plasmidové DNA. Směs byla inkubována 30 min na ledu. Následoval teplotní šok vložením směsi do vodní lázně na 2 min při 42 °C. Poté probíhala opět inkubace na ledu (1,5 min). Ke směsi bylo přidáno 900 µl LB média. Další inkubace probíhala tentokrát při 37 °C po dobu 1 hod. Směs obsahující transformované

buňky (100 µl) byla vyseta na Petriho misky s LB médiem, které navíc obsahovalo příslušné ATB. Inkubace probíhala v termostatu při 37 °C do druhého dne.

4.2.3.4 Bakteriální dvouhybridní adenylatcyklasovy systém (BACTH)

Tato metoda slouží k ověření interakce dvou proteinů v *E. coli in vivo* pomocí katalytické domény adenylatcyklasy izolované z *Bordetella pertusis*. Katalytická doména adenylatcyklasy se skládá ze dvou fragmentů, T25 a T18, které jsou každý zvlášť součástí vektorů pKT25, pKNT25 (T25 fragment) a pUT18C, pUT18 (T18 fragment). Vektory nesoucí T25 fragment nesou také kanamycinovou rezistenci a vektory s T18 fragmentem nesou ampicilinovou rezistenci. Klonováním genů kódující proteiny našeho zájmu vzniká fúze jednotlivých fragmentů s klonovanými geny. Podle polohy MCS ve vektoru je možné rozdělit dva typy fúze (viz tab. 4-15). Tyto rekombinantní plazmidy jsou následně kotransformovány do kompetentních buněk *E. coli* BTH101, kde probíhá fúze T25 a T18 fragmentů prostřednictvím interakce proteinů našeho zájmu. Spojením fragmentů T25 a T18 vznikne funkční adenylatcyklasa a začíná se syntetizovat cAMP. Molekula cAMP spolu s CAP pozitivně reguluje expresi *lacZ* genu kódující β-galaktosidasu, která v přítomnosti substrátu X-Gal způsobí modré zbarvení kolonií. Kolonie buněk, které nesyntetizují β-galaktosidasu, jsou bezbarvé. Jako pozitivní kontrola se využívá fúze fragmentů s leucinovými zipy. Negativní kontrolu představují prázdné plazmidy.

K 50 µl kompetentních buněk *E. coli* BTH101 bylo přidáno 100-150 ng plasmidové DNA. Směs byla inkubována 30 min na ledu. Následoval teplotní šok vložením směsi do vodní lázně na 2 min při 42 °C. Poté probíhala opět inkubace na ledu (1,5 min). Ke směsi bylo přidáno 450 µl LB média. Další inkubace probíhala tentokrát při 37 °C po dobu 1 hod. Směs obsahující transformované buňky byla nejdříve centrifugována (10 000 g, 1 min), supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována v 50 µl LB média. Transformační směs byla spotována ve formě kapek (10 µl) na misky s LB médiem a přídavkem ATB (kanamycin 50 µg/ml a ampicilin 100 µg/ml) a X-galu (40 µg/ml). Dle doporučení se pro správné vyhodnocení jednotlivých interakcí pozoruje zbarvení buněk po 24 h a 40 h inkubaci při 30 °C. Jednotlivé snímky, které jsou zahrnuty v kapitole 5.1.4, představují výsledky interakcí po 40 h inkubaci.

Tabulka 4-15: Rozdělení vektorů podle fúze fragmentů a studovaného genu

Fúze	Vektor	Schéma fúzovaného proteinu
C-terminální	pKT25	
C-terminální	pUT18C	
N-terminální	pKNT25	
N-terminální	pUT18	

4.2.3.5 Mikroskopie

Pozorování buněk *S. pneumoniae* pod mikroskopem předcházela příprava fixovaných vzorků. Do 10 ml TSB média byla zaočkována bakteriální kultura *S. pneumoniae* na OD_{600} = 0,008. Směs byla inkubována ve vodní lázni při 37 °C na OD_{600} = 0,3-0,4. Poté byl 1 ml kultury centrifugován (5000 g, 5 min), supernatant odstraněn a peleta resuspendována v 1 ml PBS pufru. Po opětovné centrifugaci (5000 g, 5 min) byl supernatant odstraněn a peleta resuspendována v 0,5 ml, 4 % formaldehydu/PBS. Inkubace vzorků proběhla nejdříve 15 min při pokojové teplotě a následně 45 min na ledu. Vzorky byly poté uchovávány při 4 °C.

Na krycí sklo byly pipetovány 2 µl fixovaných vzorků, na které byl následně položen agarózový bloček. Buňky byly pozorovány pomocí mikroskopu Olympus CellR IX 81 microscope (Olympus) s imerzním objektivem O2PH-UPLFLN/1.3 N.A. při zvětšení 100x. Jako kamera byla použita Hamamtsu Orca Flash 2.8 Mpix. Pro stanovení velikosti buněk byly buňky snímány v režimu fázového kontrastu. Jednotlivé snímky byly nahrány do programu MicrobeJ (Ducret *et al.*, 2016), který podle předem stanovených parametrů vypočítá velikosti jednotlivých buněk. Analýza naměřených hodnot byla provedena v programu GraphPad Prism. Významnost rozdílu buněčných délek byla určena pomocí nepamarametrického Mann Whitneyho testu s určenou hladinou významnosti $p < 0,05$. Počet měřených buněk byl u každého kmene minimálně 500. Pro studium lokalizace proteinu MacP byly snímky vytvořeny pomocí GFP filtru a výsledné obrázky tvořily překryv snímků pořízených s GFP filtrem a fázovým kontrastem.

5. VÝSLEDKY

Kapitola Výsledky je pro lepší přehlednost rozdělena do dvou částí. První část se zaměřuje na protein MacP, konkrétně jeho fosforylaci, interakci tohoto proteinu s ostatními proteiny buněčného dělení, lokalizaci v buňce a analýzu fenotypu. Druhá část se zabývá chakaterizací proteinu PBP2a.

5.1 MacP

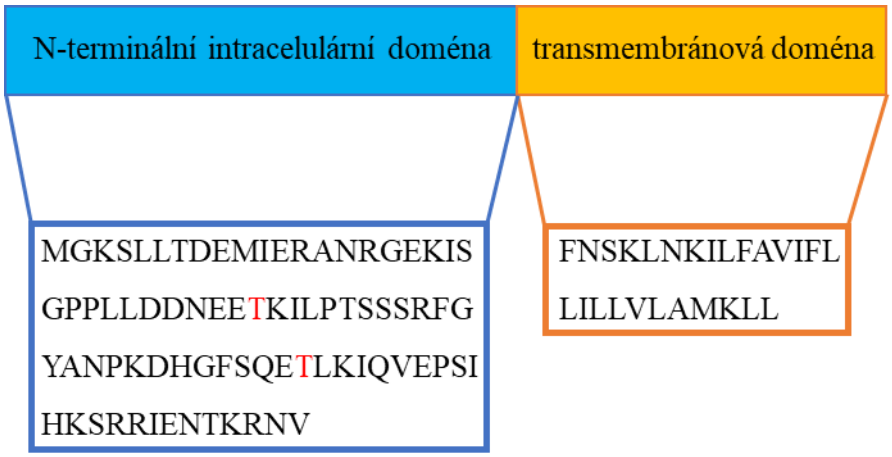
Protein MacP je popsán jako aktivátor proteinu PBP2a. Delece *macP* je synteticky letální s delecí *pbp1a*. MacP je fosforylován v pozici T32, a to pomocí proteinkinasy StkP. Fosforylace v tomto místě ovlivňuje aktivitu MacP (Fenton *et al.*, 2018).

V naší nepublikované fosfoproteomové studii (Ulrych *et al.*) jsme zjistili, že tento protein je fosforylován prostřednictvím StkP na dvou různých zbytcích, konkrétně T32 a T56, a proto jsme se rozhodli charakterizovat úlohu fosforylace těchto zbytků. Dále jsme se pokusili stanovit, zda fosforylace těchto zbytků ovlivňuje funkci proteinu MacP a jeho interakci s PBP2a.

Analýza proteinové sekvence MacP

Podle databáze ortologních skupin orthoDB (www.orthodb.org) jsme zjistili, že je gen *macP* konzervován pouze u streptokoků, laktokoků a enterokoků. Jelikož homology tohoto proteinu nebyly ještě popsány, rozhodli jsme se analyzovat jeho proteinovou sekvenci a určit přítomnost konzervovaných domén. Identifikovali jsme přítomnost transmembránové domény, ale použité programy neidentifikovaly žádnou známou konzervovanou doménu.

Protein MacP, kódovaný genem *macP (spr0893; spd0876)*, je transmembránový protein složený ze 104 aminokyselin o velikosti 11, 809 kDa (viz obr. 5-1). Pro predikci transmembránové domény (TM) proteinu MacP bylo použito několik programů. Program HMMTOP (http://www.enzim.hu/hmmtop) definoval TM v pozici 86-103, TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) predikoval TM v pozici 79-103 a SCAMPI (https://scampi.bioinfo.se) program definoval TM v pozici 89-103. Transmembránová doména se tedy nachází přímo na C- konci proteinu a jeho N- terminální část je predikována jako intracelulární.



Obrázek 5-1: Schématické znázornění domén dle programu HMMTOP a aminokyselinová sekvence proteinu MacP; T – fosforylovaný threonin v pozicích 32 a 56

5.1.1 Potvrzení fosforylace proteinu MacP proteinkinasou StkP *in vitro*

Abychom potvrdili, že MacP je skutečně substrátem StkP, rozhodli jsme se určit, zda je MacP fosforylován kinázou StkP *in vitro*. Pro stanovení fosforylace bylo nejdřív nutné eprimovat a purifikovat MacP. Nejprve byl připraven plasmid pro expresi celého genu *macP*. Nicméně díky přitomnosti transmembránové domény byl protein exprimován v nerozpustné formě (Linda Doubravová, nepublikovaná data). Abychom docílili exprese MacP v nativní formě, rozhodli jsme se pro přípravu plasmidů pro expresi MacP bez transmembránové domény (viz kapitola 5.1.1.1).

Připravili jsme několik expresních kmenů *E. coli* BL21 (DE3) exprimujících rekombinantní protein MacP divokého typu (WT) nebo mutantních alel s histidinovou kotvou (His-tag) fúzovanou na N- konci proteinu. Abychom potvrdili, že threoniny v pozici 32 a 56 (Ulrych *et al.*, nepublikovaná data) jsou skutečně fosforylační místa, byly navrženy 3 konstrukty kódující nefosforylovatelný protein MacP (Linda Doubravová, nepublikovaná data). První z nich obsahoval fosfoablativní záměnu threoninu za alanin v pozici **32 (T32A)**, druhý konstrukt obsahoval fosfoablativní záměnu threoninu za alanin v pozici **56 (T56A)** a třetí konstrukt obsahoval záměnu threoninu za alanin v pozicích 32 i 56 (dále jako **2TA**).

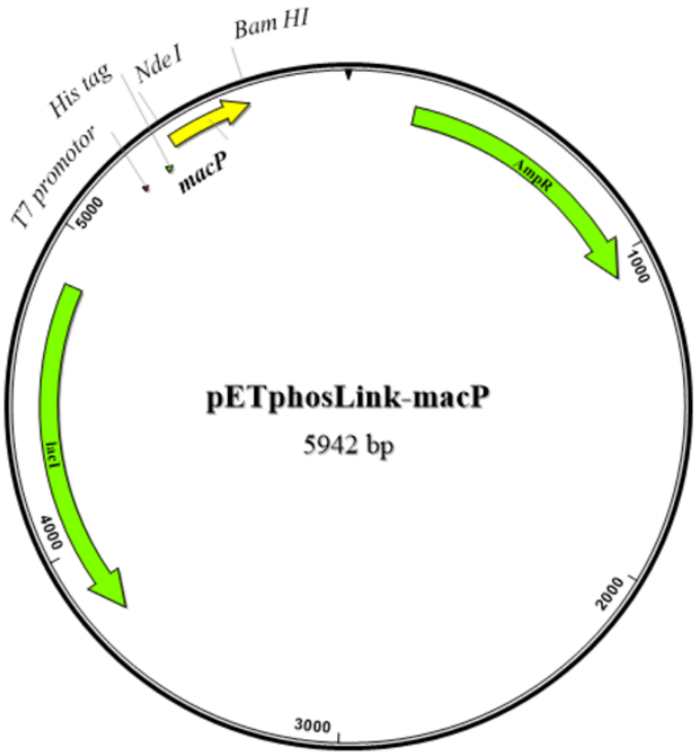
Použili jsme klonovací vektor pETPhosLink, který v naší laboratoři slouží pro studium substrátů fosforylovaných kinázou StkP. Tento vektor umožňuje expresi genu pod kontrolou inducibilního T7 promotoru a obsahuje histidinovou kotvu (6x His; His

tag), díky které byla umožněna purifikace proteinu MacP pomocí afinitní chromatografie a v sekvenci linkeru neobsahuje žádné Ser nebo Thr jako potenciální fosfoakceptory.

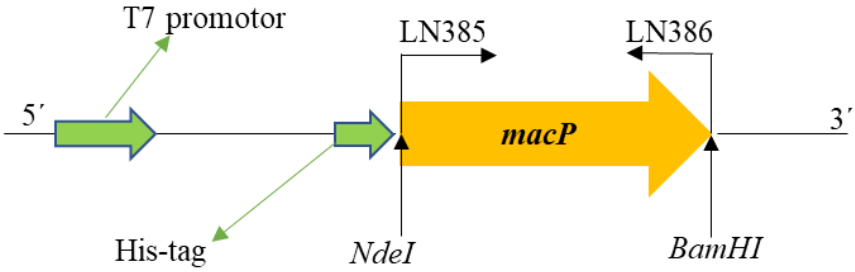
5.1.1.1 Příprava expresních kmenů *E. coli* BL21 (DE3) s plazmidem pETphosLink-His-*macP*-WT/T32A/T56A/2TA

Samotný postup klonování genu *macP* do klonovacího vektoru pETPhosLink probíhal v několika krocích. Nejprve proběhla amplifikace genu *macP-ΔTM*. Jako templát sloužila chDNA kmenů Sp339 (WT-D39) a kmenů, které již měli zavedenou mutaci genu *macP* a to Sp481 *(macP-2TA*), Sp486 (*macP-T32A*) a Sp487 (*macP-T56A*) (viz tab. 4-1). Pro tuto amplifikaci byly navrženy oligonukleotidy LN385/LN386, které jsou komplementární k sekvenci kódující intracelulární doménu a které zároveň obsahují ve své sekvenci restrikční místa *NdeI* a *BamHI*. Následně byl vektor pETPhosLink a PCR produkty štěpeny restrikčními enzymy *NdeI* a *BamHI*. Po restrikci proběhla ligace PCR produktů do linearizovaného vektoru pETphosLink-*NdeI/BamHI* (viz obr. 5-2). Připravený plazmid pETPhosLink obsahující konstrukt *His-macP-WT-ΔTM* nebo jeho mutantní alelu (*T32A*, *T56A* nebo *2TA*) byl transformován do expresního kmene *E. coli* BL21 (DE3).

a)



b)

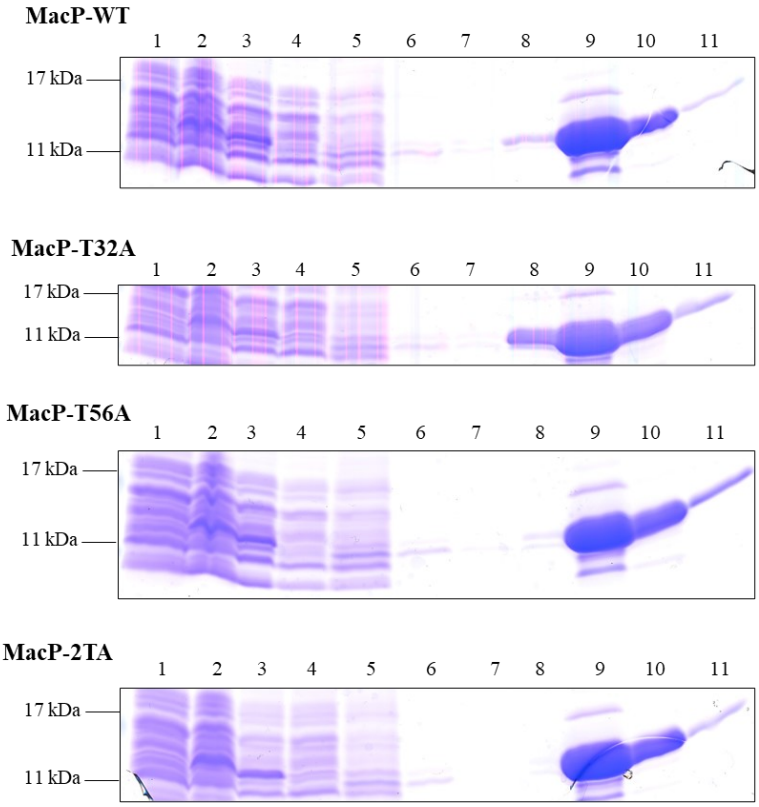


Obrázek 5-2: Schéma plasmidu pETphosLink-*macP*; a) mapa plasmidu (5942 bp) včetně pozice restrikčních míst *NdeI/BamHI*, které byly použity k inzerci genu *macP-ΔTM* do vektoru; b) pozice oligonukleotidů LN385/LN386; *T7 promotor* – promotor pro polymerázu bakteriofága T7, His tag – histidinová kotva, *NdeI/BamHI* – restrikční místa, *macP* – gen kódující protein MacP bez transmembránové domény, *AmpR* – gen kódující rezistenci k ampicilinu, *lacI* – laktózový represor, LN385/LN386 – oligonukleotidy použité pro amplifikaci genu *macP*

5.1.1.2 Exprese a purifikace His-MacP

Indukce exprese různých variant proteinu MacP byla navozena přidáním 1 mM IPTG. Vzorky byly odebrány před indukcí a po 24 hodinové indukci. Díky separaci proteinů v polyakrylamidovém gelu jsme potvrdili, že proteiny His-MacP-WT, T32A, T56A, 2TA se exprimují (viz obr. 5-3).

Bakteriální buňky získané kultivací v přítomnosti induktoru (1 mM IPTG) byly následně dezintegrovány pomocí přístroje French-press. Proteiny byly poté purifikovány pomocí afinitní chromatografie za použití Ni-NTA agarózy (viz obr. 5-3) a eluované frakce byly dialyzovány. Na dialýzu byly použity frakce 9 a 10 (viz obr. 5-3) u všech vzorků. Po dialýze byla změřena koncentrace jednotlivých proteinů pomocí BCA.



Obrázek 5-3: Purifikace proteinů His-MacP-ΔTM divokého typu a mutantních alel pomocí afinitní chromatografie s použitím Ni-NTA agarózy. Vzorky proteinů z jednotlivých kroků purifikace byly naneseny na SDS-PAGE (16% gel) a proteiny byl vizualizovány pomocí barvení Coomassie blue G-250; MacP-WT – kmen Ec. 351; MacP-T32A – kmen Ec. 450; MacP-T56A – Ec. 449; MacP-2TA – kmen Ec. 451; 1 – odběr vzorku před indukcí; 2 – odběr vzorku po indukci po 24 hod; 3 – celkový lyzát; 4 – frakce nenavázaných proteinů; 5-7 – promytí vzorků promývacím pufrem; 8-11 – eluce vzorků elučním pufrem.

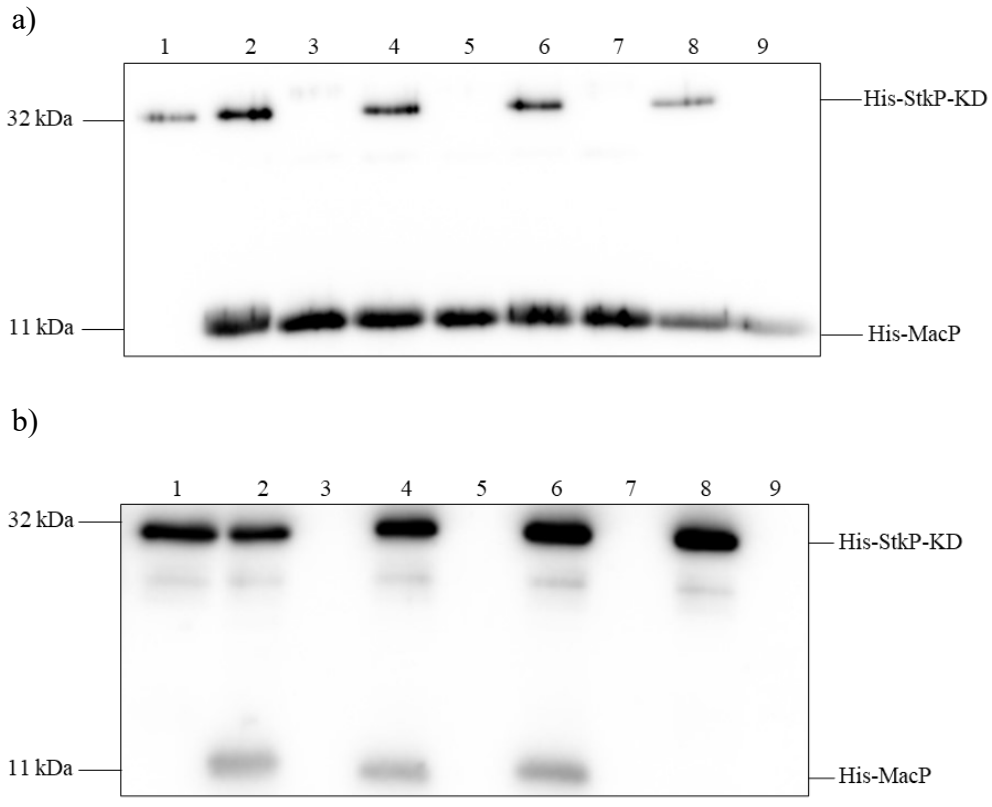
5.1.1.3 Kinázová reakce *in vitro*

Pro potvrzení fosforylace proteinu MacP divokého typu a jeho fosfoablativních záměn jsme provedli kinázovou reakci v přítomnosti rekombinatní kinázové domény StkP-KD fúzované s histidinovou kotvou. Cílem této reakce je potvrzení fosforylace substrátu příslušnou proteinkinasou v pufru v přítomnosti Mn^{2+} a ATP.

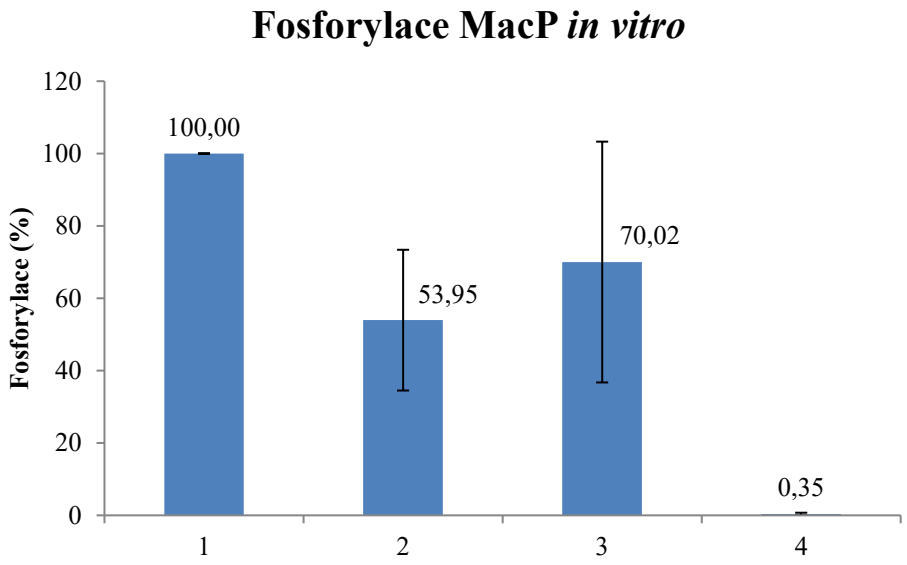
Po ukončení reakce byly proteiny z reakční směsi nejprve separovány pomocí SDS-PAGE, přeneseny na blotovací membránu a následně byla provedena imunodetekce anti His a anti-P-Thr (CS) protilátkou. Jako negativní kontrola nám sloužily vzorky, do kterých nebyla přidána His-StkP-KD.

Pomocí anti-His protilátky jsme detekovali protein His-StkP-KD (30,1 kDa) ve vzorcích kde byla KD přítomna a His-MacP (12,6 kDa) (viz obr. 5-4a). Imunodetekcí anti-P-Thr (CS) (viz obr. 5-4b) jsme detekovali signál představující autofosforylaci StkP a fosforylaci MacP-WT, MacP-T32A, MacP-T56A. Protein MacP byl fosforylován proteinkinázou StkP a potvrdili jsme tedy, že je substrátem. Autofosforylace MacP byla vyloučena, protože nebyl zaznamenán signál ve vzorcích, kde není His-StkP-KD (viz obr. 5-4b; vzorky 3,5,7,9).

Porovnali jsme intenzitu fosforylace MacP v jednotlivých vzorcích, abychom určili vliv mutace fosfoakceptorových zbytků na celkovou fosforylaci MacP a vypočítali jsme intenzitu fosforylace jednotlivých proteinů MacP (viz obr. 5-5). Intenzita fosforylace MacP-WT byla stanovena jako 100 %. Ve srovnání s WT dosahovala fosforylace MacP-T32A **54 %** (viz obr. 5-4b; vzorek 4) a MacP-T56A **70 %** (viz obr. 5-4b; vzorek 6). Fosforylace MacP-2TA byla vypočítána na **0,35 %** (viz obr. 5-4b; vzorek 8). Z výsledku vyplývá, že majoritní fosforylovaný zbytek je threonin v pozici 32. Dále lze usoudit, že threoniny v pozici 32 a 56 představují hlavní fosforylované zbytky proteinu MacP *in vitro*, protože dvojitá alelická záměna (2TA) je fosforylovaná na hranici detekčního limitu.



Obrázek 5-4: Fosforylace MacP proteinkinázou StkP *in vitro*; (a) stanovení nanášky proteinů His-MacP pomocí anti-His protilátky (b) fosforylace proteinů His-MacP *in vitro* pomocí anti-P-Thr (CS) protilátky; Proteiny byly separovány pomocí 16% SDS-PAGE gelu; 1 – StkP-KD; 2 – MacP-WT + StkP-KD; 3 – MacP-WT; 4 – MacP-T32A + StkP-KD; 5 – MacP-T32A; 6 – MacP-T56A + StkP-KD; 7 – MacP-T56A; 8 – MacP-2TA + StkP-KD; 9 – MacP-2TA; Tento pokus byl proveden celkem 4x a obr. 5-4 představuje reprezentativní výsledek.



Obrázek 5-5: Kvantifikace fosforylace proteinu MacP pomocí StkP *in vitro.* Signál detekovaný pomocí anti-pThr protilátky byl kvantifikován pomocí programu GeneTools. Tato kvantifikace fosforylace byla stanovena jako průměr ze 4 pokusů. 1 – MacP-WT + StkP-KD; 2 – MacP-T32A + StkP-KD; 3 – MacP-T56A + StkP-KD; 4 – MacP-2TA + StkP-KD; přímky u jednotlivých vzorků znázorňují standartní chybu

5.1.2 Příprava a testování protilátky anti-MacP

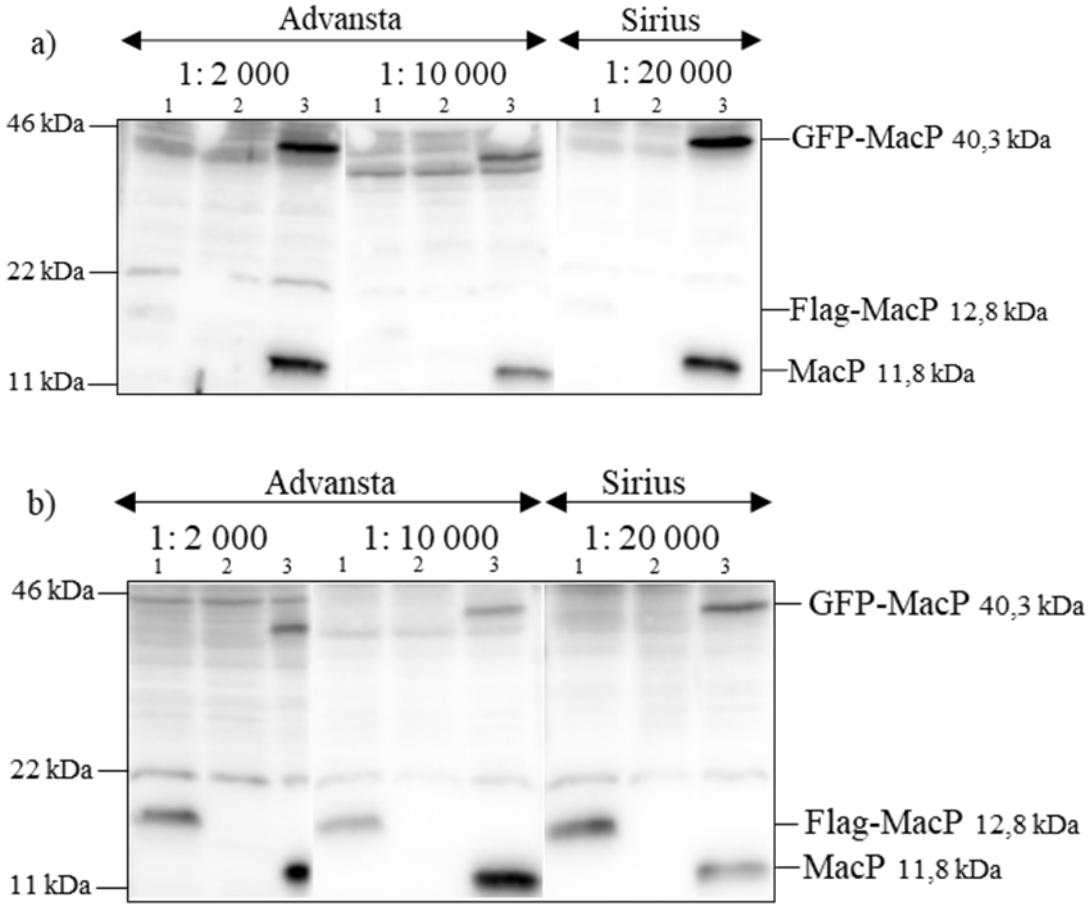
Námi purifikovaný protein MacP byl následně použit k imunizaci králíka pro přípravu polyklonální protilátky anti-MacP. Protilátka anti-MacP bude v naší laboratoři používána pro detekci MacP nebo např. pro stanovení interakcí MacP s ostatními proteiny buněčného dělení. Pokusili jsme se optimalizovat ředění protilátky anti-MacP, výběr vhodné membrány pro přenos proteinů a substrátu pro získání chemiluminiscenčního signálu imunodetekce.

Pro testování protilátky jsme jako vzorky použili proteinové lyzáty kmenů Sp480 (*flag-macP*-WT*)*, Sp399 (Δ*macP*) a Sp664 (*gfp-macP*, viz kapitola 5.1.6). Pro přenos proteinů byla po SDS-PAGE použita nitrocelulózová a PVDF membrána.

Inkubace membrán s protilátkou proběhla v 1% BSA TBS-Tween (TBS-T) přes noc a byly testovány 3 ředění protilátky anti-MacP: 1:2000, 1:10 000 a 1:20 000. Pro vyhodnocení imunodetekce byly použity chemiluminiscenční substráty Western Bright ECL (Advansta) – pro ředění anti-MacP 1:2000 a 1:10 000 a citlivější Western Bright Sirius (Advansta) – pro ředění anti-MacP 1:20 000.

Protilátkou anti-MacP jsme detekovali více proteinů v celkových lyzátech u všech zkoumaných kmenů *S. pneumoniae*, zejména při nižším ředění u obou membrán. Fúzní protein GFP-MacP je lépe vizualizován na nitrocelulózové membráně při ředění 1:20 000 (viz obr. 5-6a; vzorek 3). Dále fúzní protein Flag-MacP byl mnohem lépe detekován na PVDF membráně u všech tří ředění (obr. 5-6b; vzorek 1). Nativní protein MacP, který je přítomen pouze ve vzorku 3, byl detekován u obou typů membrán.

Pro optimální ředění protilátky anti-MacP jsme stanovili ředění 1:20 000 a jako substrát pro vizualizaci je vhodný Western Bright Sirius. Pro detekci fúzního proteinu GFP-MacP je vhodnější použít nitrocelulózovou membránu a pro detekci Flag-MacP budeme používat PVDF membránu. Pro detekci nativního proteinu MacP můžeme použít oba typy membrán.

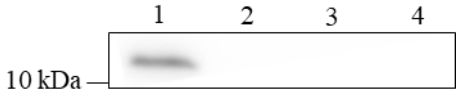


Obrázek 5-6: Testování protilátky anti-MacP na nitrocelulózové (a) a PVDF (b) membráně; separace proteinů proběhla pomocí 16% SDS-PAGE gelů; 1 – *flag-macP-WT* (Sp480); 2 – *ΔmacP* (Sp399); 3 – *gfp-macP* (Sp664)

5.1.3 Stanovení fosforylace proteinu MacP *in vivo*

Prokázali jsme, že protein MacP je fosforylován na threoninech v pozicích 32 a 56 proteinkinasou StkP *in vitro*. Dále jsme se pokusili potvrdit, zda jsou tyto 2 fosfoakceptorové zbytky fosforylovány v *in vivo* podmínkách. Pro stanovení fosforylace proteinu MacP *in vivo* byly připraveny kmeny, které exprimují *flag-macP* divokého typu (Sp480) nebo mutantní alelu (Sp481-*flag-macP-2TA*, Sp486-*flag-macP-T32A*, Sp487-*flag-macP-T56A*) v nativním lokusu (viz tab. 4-1) (Linda Doubravová, nepublikovaná data).

Nejdříve jsme z výše uvedených kmenů připravili proteinové SEDS lyzáty, které byly separovány pomocí SDS PAGE (16% gel) a přeneseny na PVDF membránu. Fosforylace proteinů byla detekována pomocí anti-P-Thr (CS) protilátky. Potvrdili jsme fosforylaci MacP-WT, ale ne u mutant MacP-T32A a MacP-T56A (viz obr. 5-7). Z toho důvodu jsme se rozhodli proteiny MacP imunoprecipitovat. Imunoprecipitace probíhala za nativních podmínek (viz metody I. Izolace proteinů ze *S. pneumoniae*). Fúze proteinu MacP s Flag kotvou nám umožnila imunoprecipitaci pomocí magnetických kuliček konjugovaných s M2-anti-Flag protilátkou.



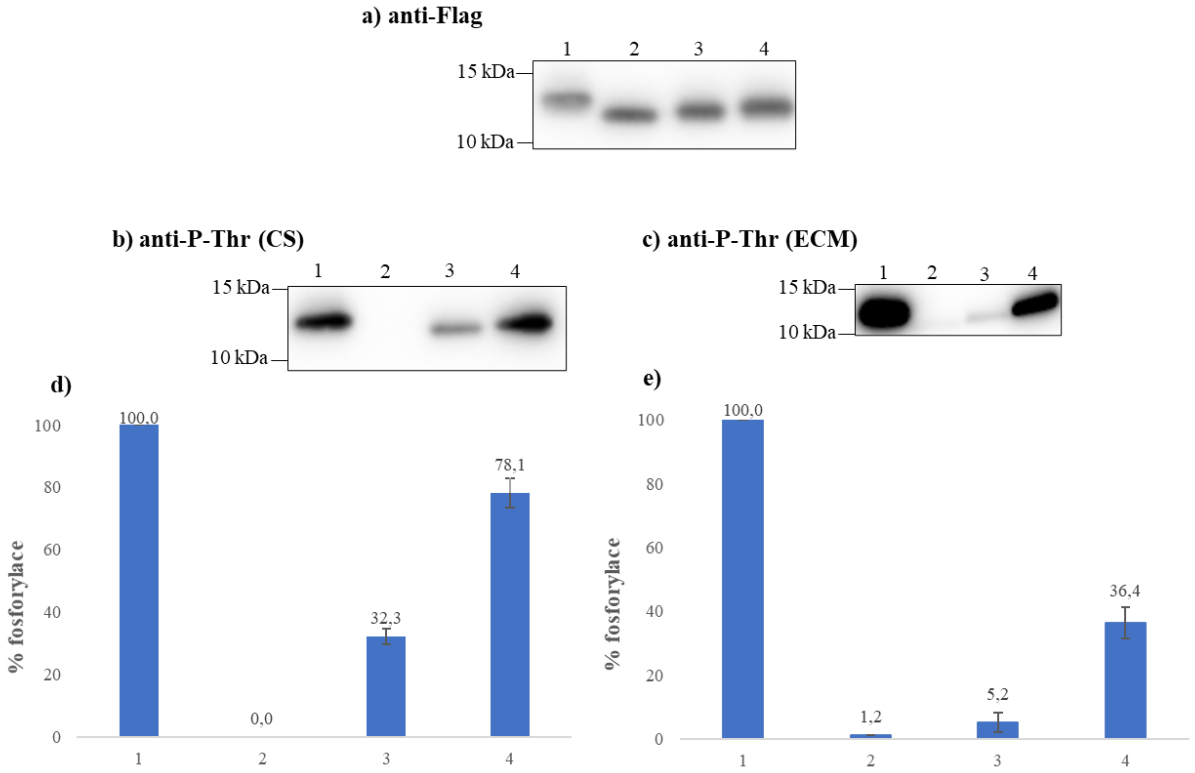
Obrázek 5-7: Fosforylace MacP-WT a mutantních alel kódující MacP-T32A, MacP-T56A, MacP-2TA; SEDS lyzáty; detekce Flag-MacP pomocí anti-P-Thr (CS) protilátky; 1 – Flag-MacP-WT; 2 – Flag-MacP-2TA; 3 – Flag-MacP-T32A; 4 – Flag-MacP-T56A

Pro detekci fosforylace MacP byly využity 2 protilátky proti fosfothreoninovému epitopu. Jedná se o anti-P-Thr (CS) a anti-P-Thr (ECM) (viz tab. 4-12). Imunoprecipitované proteiny byly nejprve separovány pomocí SDS-PAGE a následně byly blotovány na PVDF membránu. Pak byla provedena imunodetekce anti-Flag, anti-P-Thr (CS) a anti-P-Thr (ECM) protilátkami. Pomocí anti-Flag protilátky jsme detekovali

proteiny Flag-MacP, které jsou ve všech kmenech exprimovány ve stejné míře (viz obr. 5-8a).

Imunodetekcí fosfothreoninovými protilátkami anti-P-Thr (CS) a anti-P-Thr (ECM) jsme detekovali signál představující fosforylaci proteinů Flag-MacP-WT, Flag-MacP-T32A, Flag-MacP-T56A, Flag-MacP-2TA (viz obr. 5-8bc). Intenzita fosforylace byla kvantifikována pomocí analýzy obrazu a fosforylace Flag-MacP-WT (Sp480) byla stanovena jako **100 %**. Ve srovnání s WT dosahovala fosforylace Flag-MacP-T32A **32 %** v případě detekce protilátkou anti-P-Thr (CS) a **5 %** pomocí protilátky anti-P-Thr (ECM). Fosforylace proteinu Flag-MacP-T56A byla stanovena na **78 %** protilátkou anti-P-Thr (CS) a na **36 %** protilátkou anti-P-Thr (ECM) (viz obr. 5-8de). Fosforylace proteinu Flag-MacP-2TA nebyla detekována protilátkou anti-P-Thr (CS), ale protilátkou anti-P-Thr (ECM) byla stanovena na 1 % (anti-P-Thr-ECM) (viz obr. 5-8e).

Z našich dat vyplývá, že oba studované zbytky jsou *in vivo* fosforylovány a threonin v pozici 32 představuje ve srovnání s threoninem v pozici 56 majoritní fosforylační místo. Obě použité anti-pThr protilátky se liší s různou citlivostí rozeznávat fosforylované epitopy v MacP. Fosforylace Flag-MacP-2TA nebyla detekována pomocí anti-P-Thr (CS) a v případě anti-P-Thr (ECM) byla fosforylace zaznamenána na hranici detekčního limitu (1 %) (viz obr. 5-8).



Obrázek 5-8: Analýza fosforylace MacP *in vivo*. Proteiny byly separovány pomocí 16% SDS-PAGE gelů. Imunodetekce a) anti-Flag, b) anti-P-Thr (CS), c) anti-P-Thr (ECM) protilátkami představují reprezentativní výsledek; Kvantifikace fosforylace MacP detekované protilátkou d) anti-P-Thr (CS) a e) anti-P-Thr (ECM) pomocí programu GeneTools; Zjištěné hodnoty intenzity fosforylace představují průměr z 3 pokusů (viz obr. 5-16de). 1 – Flag-MacP-WT; 2 – Flag-MacP-2TA; 3 – Flag-MacP-T32A; 4 – Flag-MacP-T56A; přímky u jednotlivých vzorků znázorňují standartní chybu

5.1.4 Interakce proteinu MacP s vybranými proteiny buněčného dělení *S. pneumoniae* pomocí dvouhybridního bakteriálního adenylatcyklasového systému BACTH

Pro stanovení interakce proteinů byl v této práci využit dvouhybridní systém, konkrétně Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Kit (BACTH) od společnosti Euromedex.

Tento systém umožňuje studovat interakci proteinů *in vivo* prostřednictvím fúze studovaného genu s fragmenty adenylatcyklasy (cya) T25 a T18 izolované z *Bordetella pertusis* (viz kapitola 4.2.3.4 Bakteriální dvouhybridní adenylatcyklasový systém (BACTH)). Pro studium interakcí se využívá modelový organismu *E. coli* BTH101.

BACTH systém zahrnuje 4 typy vektorů. Fragment T25 je kódován vektory pKT25 a pKNT25. Rozdílem mezi těmito vektory je poloha mnohočetného klonovacícho místa (MCS), díky kterému je možné klonovat gen našeho zájmu buď na N- nebo C- konec fragmentu T25. Fragment T18 je kódován vektory pUT18C a pUT18. Rodíl mezi těmito vektory je stejný jako v předchozím případě. V tabulce 5-1 jsou zahrnuty všechny plasmidy, které byly v této části použity.

Kotransformací plasmidů kódujících fragmenty T25/T18 fúzované s geny kódující proteiny našeho zájmu do buněk *E. coli* BTH101 vzniká v případě interakce proteinů funkční adenylatcyklasa syntetizující cAMP, který spolu s CAP reguluje expresi lacZ genu kódující β-galaktosidasu. Tento enzym v přítomnosti substrátu (X-gal) způsobi modré zbarvení kolonií. Pokud proteiny našeho zájmu neinteragují, nevytvoří se adenylátcykláza a nedochází k expresi β-galaktosidasy – kolonie jsou bezbarvé.

Jako pozitivní kontrola se používají plasmidy, kde jsou jednotlivé fragmenty T25/T18 fúzovány s genem kódující leucinový oligopeptid, tzv. leucinový zip. Tyto struktury navzájem interagují prostřednictvím hydrofobních pásů, tvořeny převážně

leuciny. Negativní kontrolu představuje kotransformace plasmidů, které kódují pouze fragmenty T25/T18.

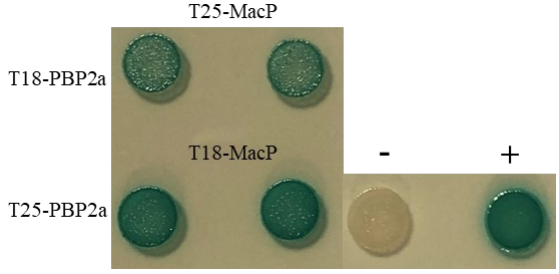
Tabulka 5-1: Použité plasmidy a schéma fúzovaných proteinů

Plasmid (fúze N-/C-)	**Schéma fúzovaného proteinu**		**Plasmid (fúze N-/C-)**	**Schéma fúzovaného proteinu**
pKT25 (prázdný plasmid, negativní kontrola)			pUT18C (prázdný plasmid, negativní kontrola)	
pKT25-*zip* (pozitivní kontrola; leucinový zip) (C-)			pUT18C-*zip* (pozitivní kontrola; leucinový zip) (C-)	
pKNT25-*macP* (N-)			pUT18-*macP* (N-)	
pKT25-*macP* (C-)			pUT18C-*macP* (N-)	
pKT25-*macP 1-77* (C-)			pUT18C-*macP 1-77* (C-)	
pKT25-*macP 1-87* (C-)			pUT18C-*macP 1-87* (C-)	
pKT25-*divIVA* (C-)			pUT18C-*divIVA* (C-)	
pKT25-*ezrA* (C-)			pUT18C-*ezrA* (C-)	
pKT25-*ftsA* (C-)			pUT18C-*ftsA* (C-)	
pKT25-*ftsB/divIC* (C-)			pUT18C-*ftsB/divIC* (C-)	

pKT25-f*tsL* (C-)			pUT18C-*ftsL* (C-)	
pKT25-*ftsQ/divIB* (C-)			pUT18C-*ftsQ/divIB* (C-)	
pKT25-*ftsW* (C-)			pUT18C-*ftsW* (C-)	
pKT25-*ftsZ* (C-)			pUT18C-*ftsZ* (C-)	
pKT25-*gpsb* (C-)			pUT18C-*gpsb* (C-)	
pKT25-*mltG* (C-)			pUT18C-*mltG* (C-)	
pKT25-*mreC* (C-)			pUT18C-*mreC* (C-)	
pKT25-*pbp1a* (C-)			pUT18C-*pbp1a* (C-)	
pKT25-*pbp2a* (C-)			pUT18C-*pbp2a* (C-)	
pKT25-*pbp2b* (C-)			pUT18C-*pbp2b* (C-)	
pKT25-*pbp2x* (C-)			pUT18C-*pbp2x* (C-)	
pKT25-*rodA* (C-)			pUT18C-*rodA* (C-)	
pKT25-*rodZ* (C-)			pUT18C-*rodZ* (C-)	
pKT25-*stkP* (C-)			pUT18C-*stkP* (C-)	

5.1.4.1 Interakce MacP a PBP2a

Nejprve jsme se pokusili potvrdit interakci proteinů MacP a PBP2a a optimalizovat použití různých typů fúzí T25 a T18 fragmentů s *macP*. Nejdříve proběhla amplifikace genu *macP* (jako templát použita chDNA Sp339) pomocí oligonukleotidů LN385 (*NdeI)*/LN386 (BamHI). Následně bylo provedeno klonování do míst *NdeI*/*BamHI* do plasmidů pKNT25/pUT18, zajišťující N-terminální fúzi fragmentů s *macP*. Pro stanovení interakce MacP-PBP2a byly použity plasmidy pKT25-*pbp2a* a pUT18C-*pbp2a* (Doubravová, nepublikovaná data). Následně proběhla kontransformace dvojic plasmidů (pKNT25-*macP*/pUT18C-*pbp2a* a pUT18-*macP*/pKT25-*pbp2a*) do buněk BTH101. Ani po 40 hod inkubace jsme nepozorovali pozitivní interakce proteinů MacP-PBP2a. Protein MacP má transmembránovou doménu na C- konci. Přítomnost fragmentů T25 a T18 v její blízkosti může bránit správnému uspořádání proteinu, a proto jsme se rozhodli *macP* klonovat do vektorů pKT25/pUT18C, které zajišťují C-terminální fúzi fragmentů s *macP*. Nejprve proběhla amplifikace genu *macP*. Pro tuto amplifikaci byly navrženy oligonukleotidy LN420/LN421, které jsou částečně komplementární ke koncovým úsekům genu *macP* a které zároveň obsahují ve své sekvenci restrikční místa *XbaI* a *EcoRI*. Následně byly vektory a PCR produkt stěpeny restrikčními enzymy *XbaI* a *EcoRI*. Po restrikci proběhla ligace PCR produktu do linearizovaných vektorů. Připravené konstrukty byly transformovány do kompetentních buněk *E. coli DH5α*. Selekce transformantů probíhala na LB agarových miskách s Amp (100 μg/ml) pro pUT18C konstrukt nebo Kan (50 μg/ml) pro pKT25 konstrukt. Z pozitivních klonů byl izolován plasmid, jehož správnost byla ověřena sekvenací. Následovala kontransformace plasmidů pKT25-*macP*/pUT18C-*pbp2a* a pKT25-*pbp2a*/pUT18C-*macP* do *E. coli* BTH101 a inkubace při 30 °C. Potvrdili jsme interakci proteinů MacP-PBP2a v rámci obou možných kombinací T18-Pbp2a/T25-MacP a T25-PBP2a/T18-MacP (viz obr. 5-9).



Obrázek 5-9: Analýza interakce MacP s PBP2a; (-) negativní kontrola – interakce prázdných plasmidů pKT25 a pUT18C; (+) pozitivní kontrola – interakce T25-zip a T18- zip

5.1.4.2 Interakce mutantních alel MacP s PBP2a

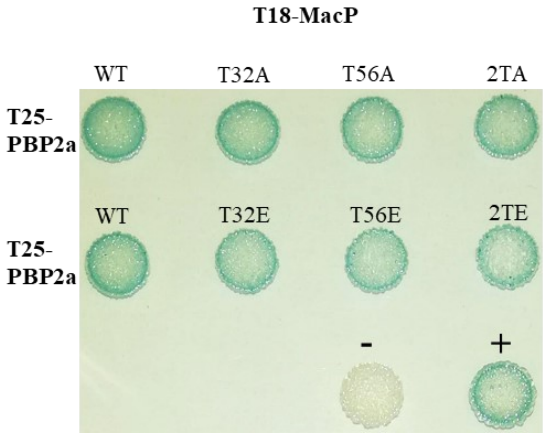
Dále jsme se snažili zjistit, zda fosfoablativní a fosfomimetické záměny fosfoakceptorových threoninů v pozicích 32 a 56 proteinu MacP ovlivní interakci s proteinem PBP2a a případně dalšími proteiny divizomu a elongazomu.

Zároveň nás zajímalo, jaký vliv na interakce MacP má přítomnost jeho transmembránové domény. Proto jsme vytvořili konstrukty kódující MacP postrádající transmembránovou doménu a poté bylo zjišťováno, zda tyto zkrácené formy proteinu ovlivňují interakci s PBP2a.

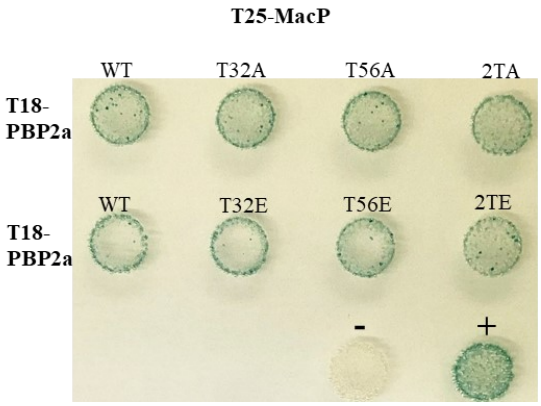
Jako templátové DNA pro zavedení požadovaných mutací zde sloužily plasmidy pUT18C-*macP* a pKT25-*macP*. Pomocí mutagenních oligonukleotidů (viz tab. 4-6) došlo pomocí PCR k vytvoření konstruktů, které obsahují fosfoablativní záměnu threoninu v pozici 32 (LN304/LN305) nebo 56 (LN306/LN307) za alanin anebo fosfomimetickou záměnu threoninu v pozici 32 (LN409/LN410) nebo 56 (LN411/LN412) za kyselinu glutamovou. Konstrukty pKT25-*macP-T32A* a pUT18C-*macP-T32E* byly dále použity pro přípravu konstruktů, které obsahují dvojitou záměnu threoninů v pozicích 32 i 56 (2TA – LN306/LN307; 2TE - LN411/LN412).

Pro přípravu dvou různých zkrácených konstruktů proteinu MacP bez transmembránové domény (amk 1-77; 1-87) byly navrženy oligonukleotidy LN420/LN422 (pro přípravu MacP-1-77) a LN420/LN424 (pro přípravu MacP-1-87).

Nejdříve jsme zkoumali vliv mutace fosforylovaných zbytků MacP na interakci s PBP2a. Dvojice plasmidů (pKT25-*pbp2a*/pUT18C-*macP-WT*; pKT25-*pbp2a*/pUT18C-*macP-T32A*; pKT25-*pbp2a*/pUT18C-*macP-T56A*; pKT25-*pbp2a*/pUT18C-*macP-2TA*; pUT18C-*pbp2a*/pKT25-*macP-WT*; pUT18C-*pbp2a*/pKT25-*macP-T32A*; pUT18C-*pbp2a*/pKT25-*macP-T56A*; pUT18C-*pbp2a*/pKT25-*macP-2TA*) byly kotransformovány do *E. coli* BTH101. Zjistili jsme, že fosfoablativní a fosfomimetické záměny fosforylovaných zbytků T32 a T56 proteinu MacP nemají vliv na interakci s PBP2a a interakce probíhá podobně jako v případě WT za použití obou fragmentů, T18 a T25 (viz obr. 5-10 a 5-11).

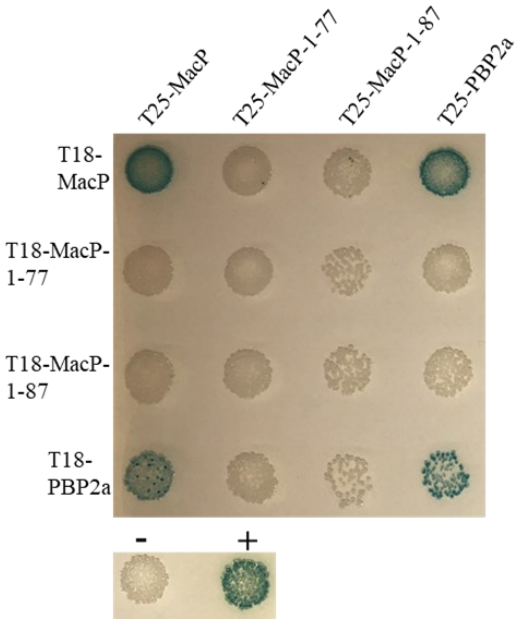


Obrázek 5-10: Analýza interakcí proteinů T18-MacP-WT, T32A, T56A, 2TA s T25-PBP2a



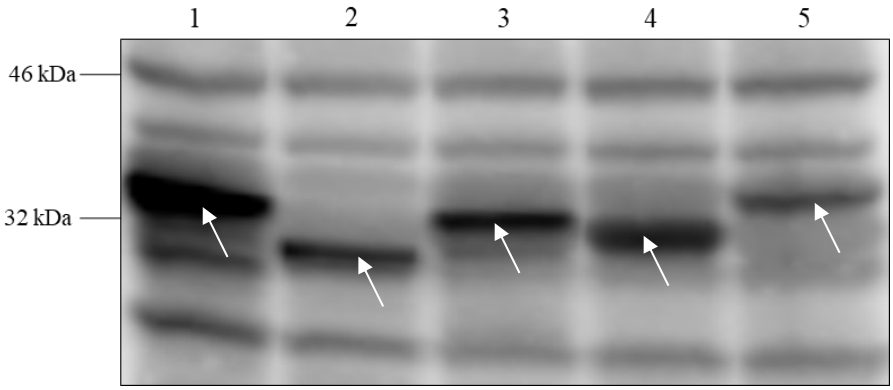
Obrázek 5-11: Analýza interakcí proteinů T25-MacP-WT, T32A, T56A, 2TA s T18-PBP2a

Poté jsme analyzovali interakce MacPΔTM s PBP2a, dále vzájemné interakce MacP-WT, MacPΔTM a PBP2a. Kotransformovali jsme příslušné dvojice plasmidů do *E. coli* BTH101. Na obr. 5-12 je zachyceno, že obě zkrácené formy proteinu MacPΔTM ztrácí schopnost interagovat s PBP2a a divokým typem proteinu MacP. Rovněž vzájemná interakce zkrácených forem proteinů MacP nebyla pozorována. Zdá se tedy, že transmembránová domény je nezbytná pro plně funkční MacP. Potvrdili jsme vzájemnou interakci proteinů T18-MacP s T25-MacP (WT) a T18-PBP2a s T25-PBP2a.



Obrázek 5-12: Analýza interakcí proteinů MacP-WT/ΔTM s PBP2a

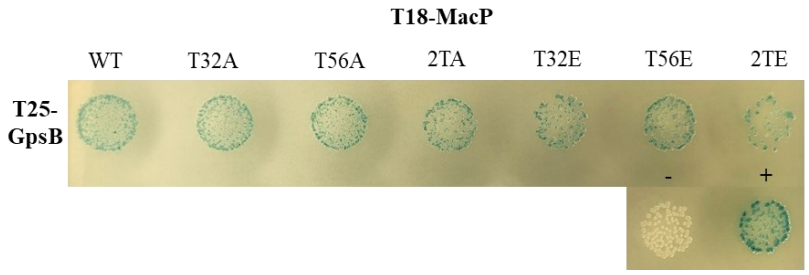
Jelikož zkrácená forma MacP není schopna interagovat, rozhodli jsme se otestovat expresi těchto proteinů (viz obr. 5-13), abychom zjistili, zda jsou proteiny exprimovány a zda nepodléhají degradaci. Vzorky proteinů z kultury byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a dále byly proteiny přeneseny na PVDF membránu a detekovány protilátkou anti-MacP. Podařilo se nám ověřit, že zkrácené proteiny T18/T25-MacPΔTM jsou v buňkách *E. coli* DH5α skutečně exprimovány a mají předpokládanou velikost. Tímto jsme dokázali, že negativní výsledek interakcí není způsoben degradací proteinů, ale zkrácené formy MacP skutečně neinteragují v důsledku nepřítomnosti transmembránové domény.



Obrázek 5-13: Analýza exprese proteinů T25/T18-MacPΔTM v *E. coli* DH5α; Proteiny byly separovány pomocí 16% SDS PAGE gelu; 1 – T18-MacP-WT; 2 – T18-MacP-1-77; 3 – T18-MacP-1-87; T25-MacP-1-77; T25-MacP-1-87; **šipky** znázoňují jednotlivé proteiny

5.1.4.3 Testování interakcí proteinu MacP s vybranými proteiny buněčného dělení *S. pneumoniae*

Naším dalším cílem bylo stanovit interakce proteinu MacP s vybranými proteiny buněčného dělení u *S. pneumoniae*. K tomu jsme využili sbírky plasmidů prof. Orietty Massidy (Univerzita Trento, Itálie), se kterou naše laboratoř dlouhodobě spolupracuje (viz tab. 4-5). Nejdříve jsme zjišťovali interakci proteinu MacP a adaptorového proteinu GpsB a zda má fosforylace proteinu MacP vliv na tuto interakci (viz obr. 5-14). Zde byly použity plasmidy pKT25-*gpsb*, pUT18C-*macP-WT,* pUT18C-*macP-T32A,* pUT18C-*macP-T56A* a pUT18C-*macP-2TA*. Dokázali jsme, že MacP interaguje s proteinem GpsB a zároveň jsme potvrdili, že žádná mutace fosforylovaných zbytků MacP nemá vliv na interakci těchto proteinů.



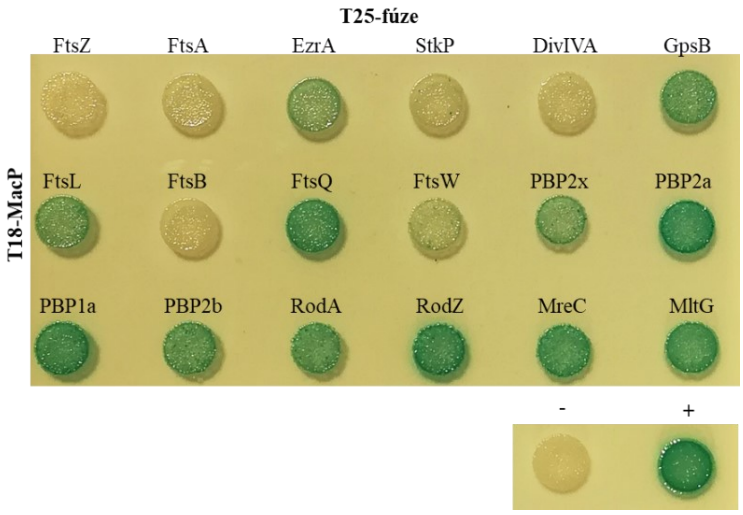
Obrázek 5-14: Analýza interakcí proteinů GpsB s MacP-WT, T32A, T56A, 2TA, T32E, T56E a 2TE

Dále jsme stanovovali interakce proteinu MacP s vybranými proteiny buněčného dělení. Pro tento pokus byly využity naše kontrukty pUT18C/pKT25-MacP (C-terminální fúze) spolu s konstrukty proteinů (T18/T25-protein; viz tab. 5-1).

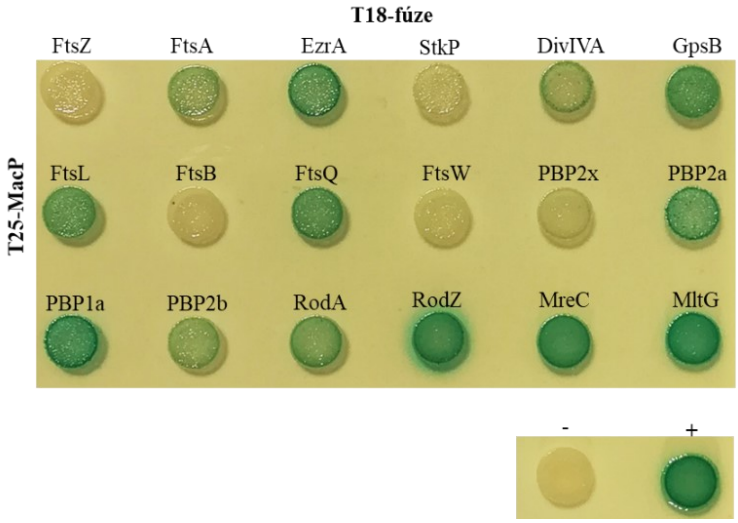
Výsledky tohoto experimentu jsou přehledně shrnuty v tabulce 5-2. Potvrdili jsme interakce proteinu MacP s některými vybranými proteiny buněčného dělení *S. pneumoniae.* Na obr. 5-15 je znázorněna interakce proteinu MacP (T18-fúze) s proteiny buněčného dělení fúzované s T25 fragmentem. Tento pokus nám potvrdil interakci proteinu MacP s EzrA, GpsB, FtsL, FtsQ, FtsW, PBP2a, PBP1a, PBP2b, RodA, RodZ, MreC a MltG. Naopak interakce nebyla potvrzena u MacP s FtsZ, FtsA, StkP, DivIVA, a FtsB.

Interakce proteinu MacP (T25-fúze) s proteiny buněčného dělení fúzované s T18 fragmentem (viz obr. 5-16) nám potvrdil stejný pozitivní výsledek interakce proteinů u všech proteinů kromě MacP-FtsW a PBP2x. Navíc je zde pozitivní výsledek interakce

u proteinů MacP-FtsA a MacP-DivIVA. Dokázali jsme, že protein MacP interaguje *in vivo* s mnoha proteiny buněčného dělení, které jsou součástí elongasomu nebo divisomu. Dále jsme potvrdili interakci MacP s adaptorovým proteinem GpsB, který zprostředkovává protein-protein interakce ve velkých komplexech a je důležitým regulátorem syntézy PG u *S. pneumoniae*. Naopak jsme prokázali, že protein MacP neinteraguje s proteiny FtsB, cytoskeletárním proteinem FtsZ a proteinkinasou StkP (viz obr. 5-15/16).



Obrázek 5-15: Analýza interakcí proteinů buněčného dělení u *S. pneumoniae* (T25-fúze) s MacP T25-fúze – fúze T25 fragmentu a proteinů buněčného dělení; (-) negativní kontrola; (+) pozitivní kontrola



Obrázek 5-16: Analýza interakcí proteinů buněčného dělení u *S. pneumoniae* (T25-fúze) s MacP T25-fúze – fúze T25 fragmentu a proteinů buněčného dělení; (-) negativní kontrola; (+) pozitivní kontrola

Tabulka 5-2: Shrnutí interakcí proteinů buněčného dělení (fúze T25/T18-protein) s T18/T25-MacP

Protein	Název plasmidů použité pro BACTH	Funkce proteinu	Součást elongasomu (E), divisomu (D), neurčeno (N)	Interakce s MacP (fúze T18-MacP)	Interakce s MacP (fúze T25-MacP)
DivIVA	pKT25-*divIVA* pUT18C-*divIVA*	Morfogeneze, polární růst, segregace chromosomu,	N	**NE**	**ANO**
EzrA	pKT25-*ezrA* pUT18C-*ezrA*	Negativní regulátor Z-kruhu	N	ANO	ANO
FtsA	pKT25-*ftsA* pUT18C-*ftsA*	Cytoskeletární protein, ukotvení Z-kruhu k plazmatické membráně	N	**NE**	**ANO**
FtsB/DivIC	pKT25-*ftsB* pUT18C-*ftsB*	Rekrutace FtsW do míst syntézy septa	D	NE	NE
FtsL	pKT25-*ftsL* pUT18C-*ftsL*		D	ANO	ANO
FtsQ/DivIB	pKT25-*ftsQ* pUT18C-*ftsQ*		D	ANO	ANO
FtsW	pKT25-*ftsW* pUT18C-*ftsW*	Interakce v komplex FtsW-PBP2x, esenciální transglykosyláza, syntéza PG	D	**ANO**	**NE**
FtsZ	pKT25-*ftsZ* pUT18C-*ftsZ*	Hlavní cytoskeletární protein buněčného dělení, tvorba Z-kruhu	N	NE	NE
GpsB	pKT25-*gpsb* pUT18C-*gpsb*	Regulátor syntézy septálního a periferního PG	N	ANO	ANO
MltG	pKT25-*mltG* pUT18C-*mltG*	Endolytická transglykosyláza, syntéza periferního PG	E	ANO	ANO

MreC	pKT25-*mreC* pUT18C-*mreC*	Zajištění lokalizace PBP1a v septu	E	ANO	ANO
PBP1a	pKT25-*pbp1a* pUT18C-*pbp1a*	Transglykosyláza, transpeptidáza; syntéza PG	N	ANO	ANO
PBP2a	pKT25-*pbp2a* pUT18C-*pbp2a*	Transglykosyláza, transpeptidáza; syntéza PG	N	ANO	ANO
PBP2b	pKT25-*pbp2b* pUT18C-*pbp2b*	Transpeptidáza, tvorba komplexu s RodA-PBP2b, syntéza periferního PG	E	ANO	ANO
PBP2x	pKT25-*pbp2x* pUT18C-*pbp2x*	Transpeptidáza, tvorba komplexu FtsW-PBP2x, syntéza septálního PG	D	**ANO**	**NE**
RodA	pKT25-*rodA* pUT18C-*rodA*	Interakce v komplex RodA-PBP2b, esenciální transglykosyláza, syntéza periferního PG	E	ANO	ANO
RodZ	pKT25-*rodZ* pUT18C-*rodZ*	Regulace aktivity PBP1a a MltG, syntéza periferního PG	E	ANO	ANO
StkP	pKT25-*stkP* pUT18C-*stkP*	Globální regulátor buněčného dělení	E	NE	NE

5.1.5 Analýza proteinů interagujících s MacP *in vivo* pomocí koimunoprecipitace

V této části jsme se pokusili stanovit interakci proteinu MacP s vybranými proteiny buněčného dělení u *S. pneumoniae* pomocí koimunoprecipitace, abychom potvrdili výsledky interakcí stanovené pomocí dvouhybridního systému. Za tímto účelem jsme použili kmen Sp480 (*flag-macP*) a jako kontrolní nám sloužil divoký kmen *S. pneumonaie* D39 (Sp339). Z těchto kmenů byly připraveny celkové lyzáty, které byly předtím podrobeny chemickému zesíťování paraformaldehydem (crosslink). Tento krok slouží k fixaci vazeb mezi proteiny, které se nacházejí v těsné blízkosti. Fúzní protein

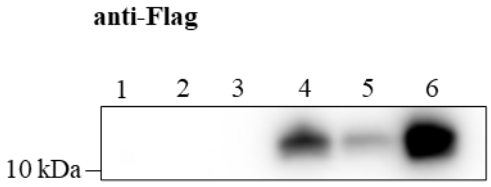
Flag-MacP byl opět imunoprecipitován pomocí magnetických kuliček konjugovaných s M2-anti-Flag protilátkou. Nachází-li se protein Flag-MacP ve vazbě s některým proteinem, dojde během imunoprecipitace k jeho koimunoprecipitaci, kterou můžeme detekovat prostřednictvím specifické protilátky.

Separace imunoprecipitovaných proteinů proběhla pomocí SDS-PAGE (16% gel), následoval přenos proteinů na PVDF membránu, a nakonec byla provedena imunodetekce celkových lyzátů a imunoprecipitovaných vzorků pomocí anti-Flag a anti-MacP protilátky (viz obr. 5-16/17).

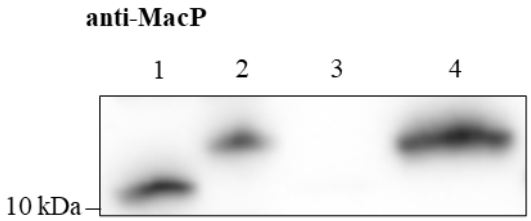
Protein Flag-MacP se nám podařilo úspěšně imunoprecipitovat z crosslinkovaných lyzátů, protože pomocí anti-Flag protilátky byl detekován dle očekávání v kmeni Sp480 (Flag-MacP) jak v celkovém lyzátu, tak v imunoprecipitátu (ciz obr. 5-17) V kmeni Sp339, který jsme využili jako negativní kontrolu, nebyl Flag-MacP detekován, (viz obr. 5-17).

Imunodetekcí anti-MacP protilátkou (viz obr. 5-18) byl protein MacP detekován v celkových lyzátech u obou kmenů. Z hlediska imunoprecipitátů byl opět MacP detekován pouze v kmeni Sp480 (Flag-MacP).

V tomto pokusu jsme v důsledku přítomnosti flagové kotvy zachytili vertikální posun Flag-MacP (viz obr. 5-18; vzorek 2,4) proteinu ve srovnání s nativním MacP (viz obr. 5-18; vzorek 1).



Obrázek 5-17: Imunoprecipitace Flag-MacP z kmenů Sp339 (WT) a Sp480 (Flag-MacP-WT); detekce pomocí anti-Flag protilátky. Separace proteinů pomocí SDS PAGE (16% gel); 1 – celkový lyzát kmene Sp339 (WT); 2 – frakce nenavázaných proteinů kmene Sp339; 3 – imunoprecipitát kmene Sp339; 4 – celkový lyzát kmene Sp480 (Flag-MacP-WT); 5 – frakce nenavázaných proteinů kmene Sp480; 6 – imunoprecipitát kmene Sp480



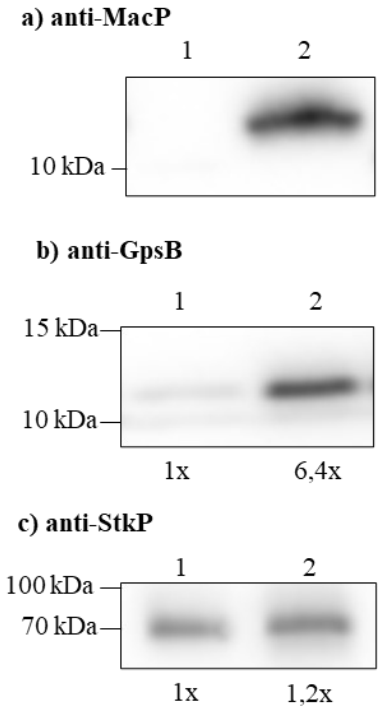
Obrázek 5-18: Imunoprecipitace Flag-MacP z kmenů Sp339 (WT) a Sp480 (Flag-MacP-WT); detekce pomocí anti-MacP protilátky. Separace proteinů pomocí SDS PAGE (16% gel); 1 – celkový lyzát kmene Sp339; 2 – celkový lyzát kmene Sp480; 3 – imunoprecipitát kmene Sp339; 4 – imunoprecipitát kmene Sp480

Dále jsme se pokusili stanovit interakce proteinu Flag-MacP s vybranými proteiny účastnícími se buněčného dělení u *S. pneumoniae*. Testovali jsme interakci s adaptorovým proteinem GpsB a proteinkinasou StkP, protože máme k dispozici protilátky proti těmto proteinům. Nejprve byla opět provedena separace imunoprecipitátu Flag-MacP pomocí SDS-PAGE, poté byly proteiny přeneseny na membrány. Pro stanovení interakce MacP s GpsB jsme pro přenos proteinů použili nitrocelulózovou membránu, která vykazuje lepší detekci GpsB (Linda Doubravová, nepublikovaná data). Pro zjištění interakce MacP s StkP jsme na imunoblot použili PVDF membránu. (viz obr. 5-19b)c).

Pomocí anti-GpsB protilátky se nám podařilo potvrdit, že GpsB koimunoprecipituje společně s MacP (viz obr. 5-19b). V negativní kontrole (Sp339-WT) není přítomen Flag-MacP. Je zde ale nepatrný signál vyvolaný nespecifickou interakcí s M2-MA nosičem, který představuje falešně pozitivní výsledek interakce MacP-GpsB (viz obr. 5-19b). V tomto případě musí být kvantifikován rozdíl množství proteinů v jednotlivých vzorcích. Stanovili jsme, že pokud dojde v negativní kontrole k nespecifické interakci, musí být množství proteinu v detekovaných vzorcích minimálně 2x vyšší (Rued *et al.*, 2018). V našem případě je v imunoprecipitátu kmene Sp480 (Flag-MacP) více jak 6× větší množství proteinu GpsB než v imunoprecipitátu kmene Sp339 (WT).

V případě stanovení koimunoprecipitace Flag-MacP a StkP je v negativní kontrole opět potvrzena přítomnost StkP v důsledku nespecifické interakce s nosičem M2-MA (viz obr. 5-19c). V imunoprecipitátu Sp480 bylo kvantifikováno pouze 1,2× vyšší množství StkP než v kontrolním vzorku a z toho vyplývá, že StkP

nekoimunoprecipituje s MacP, a tudíž jsme nepotvrdili interakci MacP-StkP v *S. pneumoniae*.



Obrázek 5-19: Analýza koimunoprecipitace proteinů MacP s GpsB a StkP. Imunoprecipitáty byly separovány pomocí SDS PAGE (16% gely), přeseneny na membrány a detekovány; a) detekce MacP pomocí protilátky anti-MacP; b) koimunoprecipitace MacP s GpsB; detekce pomocí protilátky anti-GpsB; c) koimunoprecipitace MacP s StkP; detekce pomocí protilátky StkP-C-term; 1 – imunoprecipitát kmene Sp339 (WT) - negativní kontrola; 2 – imunoprecipitát kmene Sp480 (Flag-MacP-WT)

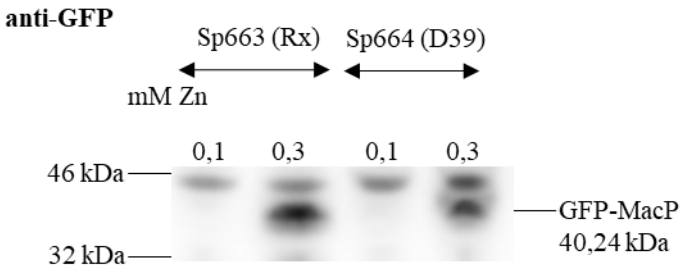
5.1.6 Stanovení lokalizace proteinu MacP v *S. pneumoniae*

Pomocí fluorescenční mikroskopie jsme se pokusili určit lokalizaci proteinu MacP *in vivo*. Pro stanovení lokalizace proteinu MacP v buňce byl v této práci využit plasmid pJWV25-*macP* (Ec. 269), který obsahuje *macP* fúzovaný na svém N konci s *gfp* (Linda Doubravová, nepublikovaná data). Exprese GFP-MacP je regulována zinkovým inducibilním promotorem (P*czcD*; viz obrázek 5-20).

Linearizovaný plasmid pJWV25-*macP* jsme transformovali do kmenů Sp1 (Rx) a Sp339 (D39), kde byl konstrukt integrován do postradatelného *bga* lokusu procesem homologní rekombinace. Výsledné kmeny byly pojmenovány Sp663 (Rx, *bga::pZn-gfp-macP*) a Sp664 (D39, *bga::pZn-gfp-macP*).

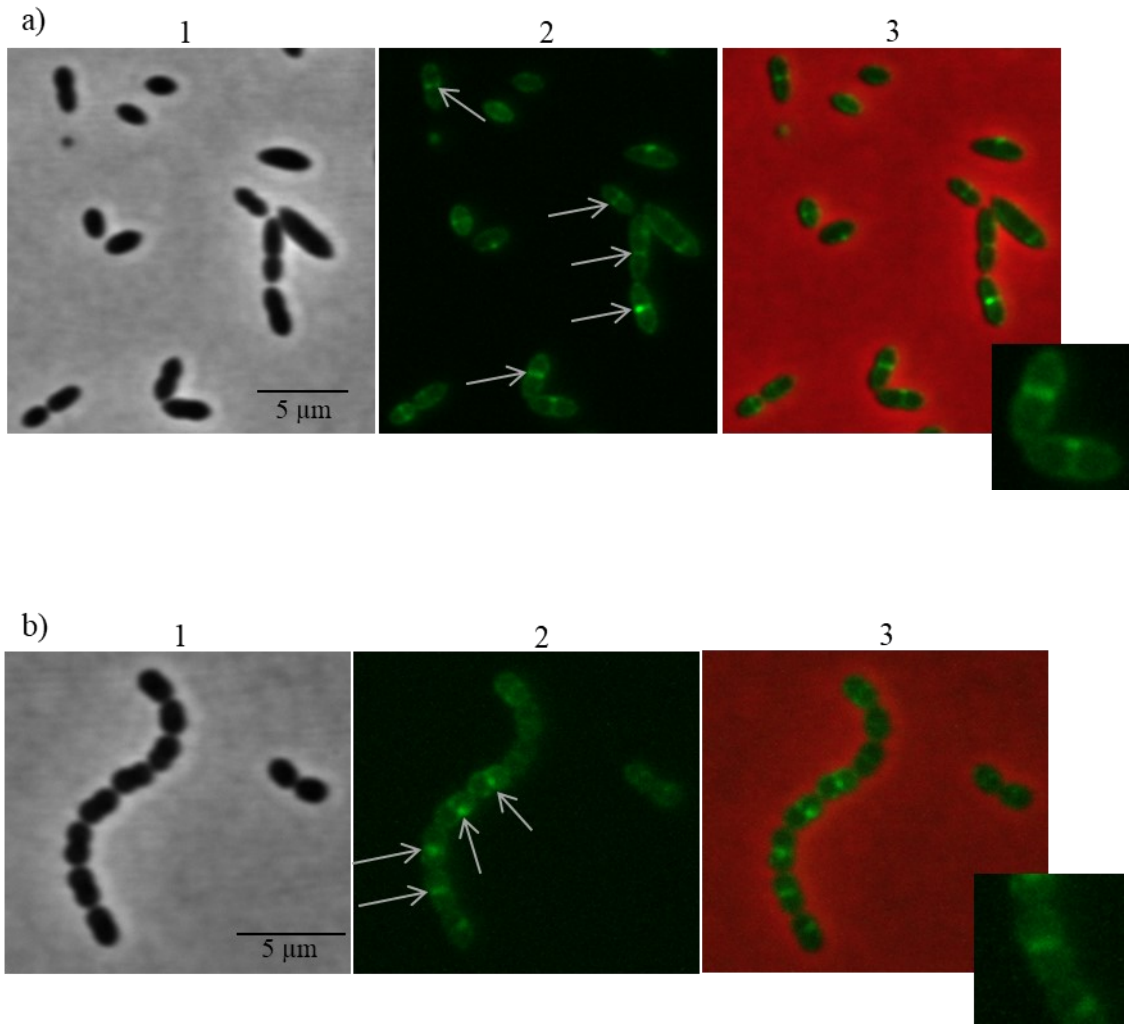
Obrázek 5-20: Schéma *bga* lokusu s integrovaným konstruktem pro expresi GFP-MacP; P*czcD* promotor – promotor indukovaný Zn, *gfp* – gen kódující GFP, *macP* – gen kódující protein MacP, *bga* – bga lokus

U pneumokokových kmenů Sp663 a Sp664 byla následně sledována exprese fúzního proteinu GFP-MacP v přítomnosti různých koncentrací induktoru $ZnCl_2$ v TSB médiu. Následně jsme provedli imunodetekci v proteinových lyzátech a pomocí anti-GFP protilátky byla potvrzena exprese GFP-MacP proteinu u obou kmenů v přítomnosti 0,3 mM $ZnCl_2$ (viz obr. 5-21).



Obrázek 5-21: Ověření exprese GFP-MacP v kmenech Sp663 (Rx, *bga::pZn-gfp-macP*) a Sp664 (D39, *bga::pZn-gfp-macP*). Separace proteinů pomocí SDS PAGE (16% gely); 0,1; 0,3 – koncentrace $ZnCl_2$ v mM

Při optické denzitě OD_{600} = 0,5 byly z jednotlivých kultur připraveny fixované vzorky, které byly pozorovány pod mikroskopem. Potvrdili jsme (viz obr. 5-22), že je GFP-MacP lokalizován ve středu buňky v místě buněčného septa u obou kmenů.



Obrázek 5-22: Lokalizace proteinu GFP-MacP v kmenech a) Sp663 (Rx, *bga::pZn-gfp-macP*); b) Sp664 (D39, *bga::pZn-gfp-macP*); 1 – fázový kontrast; 2 – snímek s použitím GFP filtru; 3 – překryv fázového kontrastu a GFP; šipky označují lokalizaci GFP-MacP

5.1.7 Analýza syntetické letality MacP a PBP1a

Studie Fenton *et al.*, (2018) potvrdila, že delece *macP* je synteticky letální s delecí genu *pbp1a*. Pokusili jsme se tedy výsledek této studie potvrdit a zároveň stanovit, zda fosforylace MacP ovlivňuje životaschopnost buněk s genetickým pozadím Δ*pbp1a.*

Bakteriální kmen Sp480 (*flag-macP*-WT) kmen Sp399 nesoucí deleci genu *macP* (Δ*macP*) a kmeny nesoucí mutace fosforylačních míst Sp481 (*flag-macP-2TA*), Sp486 (*flag-macP-T32A*) a Sp487 (*flag-macP-T56A*) byly transformovány konstruktem pro deleci *pbp1a* (*pbp1a::cat)* (Linda Doubravová, nepublikovaná data), který nese chloramfenikolovou rezistenci a je svými terminálními částmi sekvence komplementární k sekvencím ohraničující gen *pbp1a*. K inzerci kazety *pbp1a::cat* do chromosomu došlo pomocí homologní rekombinace a pozitivní klony nesoucí mutaci *pbp1a::cat* byly selektovány na základě rezistence k chlormafenikolu.

Po transformaci kmene Sp399 (Δ*macP*) jsme opakovaně nezískali žádné transfromanty, což potvrzuje, že delece *macP* je synteticky letální s delecí *pbp1a*. V případě ostatních kmenů jsme transformanty získali a vypočítali jsme transformační účinnost a frekvenci transformace (viz tab. 5-3). Frekvence transformace je u všech kmenů podobná, čímž můžeme potvrdit, že fosfoablativní mutace MacP nemají vliv na životaschopnost *S. pneumoniae*.

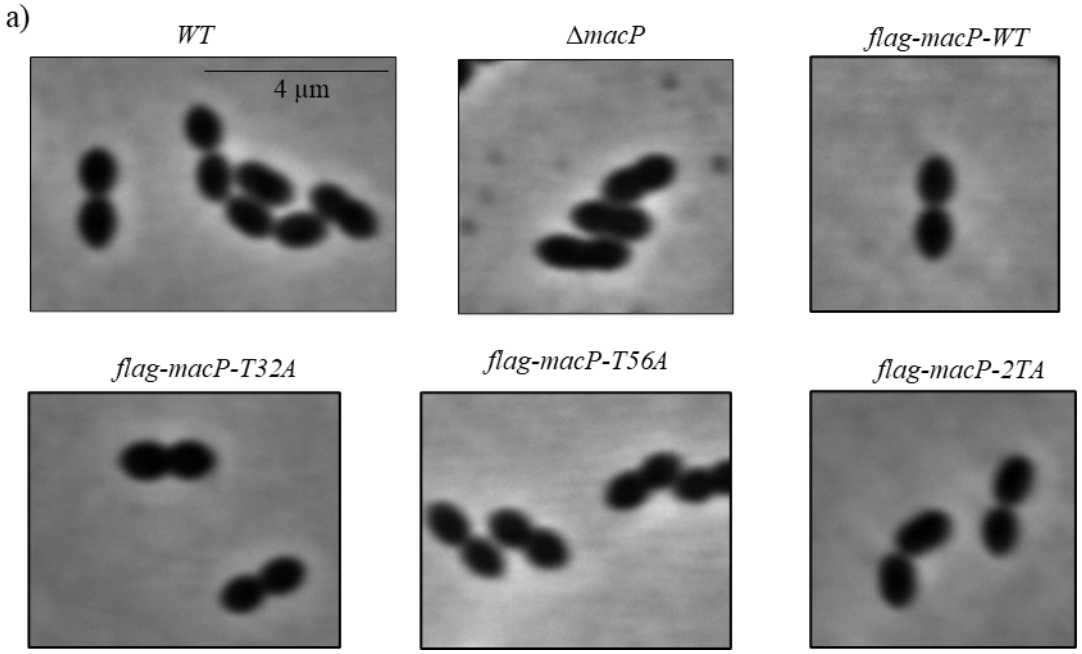
Tabulka 5-3: Transformační účinnost a frekvence transformace u kmenů transformovaných deleční kazetou *pbp1a::cat*

Kmen	Genotyp	Transformační účinnost CFU/ng DNA	Frekvence transformace [%]
Sp399	WT	-	-
Sp480	*flag-macP*-WT	14,4	0,0002
Sp481	*flag-macP-2TA*	19,6	0,0004
Sp486	*flag-macP-T32A*	12,4	0,0003
Sp487	*flag-macP-T56A*	23,6	0,0005

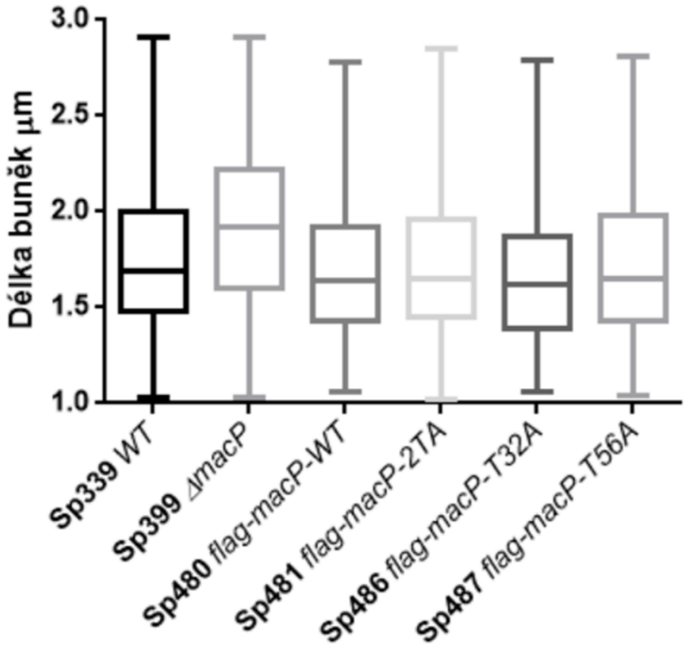
5.1.8 Morfologie buněk *S. pneumoniae* u kmenů nesoucích mutaci genu *macP*

V tomto experimentu jsme se snažili zjistit, zda má fosforylace proteinu MacP, který je důležitý pro funkci PBP2a, vliv na morfologii buněk. Z bakteriálních kmenů Sp339 (WT), Sp399 (Δ*macP*), Sp480 (*flag-macP-WT*), Sp481 (*flag-macP-2TA*), Sp486 (*flag-macP-T32A*) a Sp487 (*flag-macP-T56A*) byly připraveny fixované vzorky, které byly pozorovány mikroskopem ve fázovém kontrastu (5-23a). Získané snímky byly analyzovány v programu MicrobeJ, kde byly změřeny délky a šířky jednotlivých buněk. Poté byly délky buněk vyhodnoceny v programu GraphPadPrism. Získané délky a šířky buněk byly statisticky vyhodnoceny pomocí neparametrického Mann-Whitneyho testu, kde hladina významnosti činila $p < 0{,}05$ (viz obr. 5-23bc).

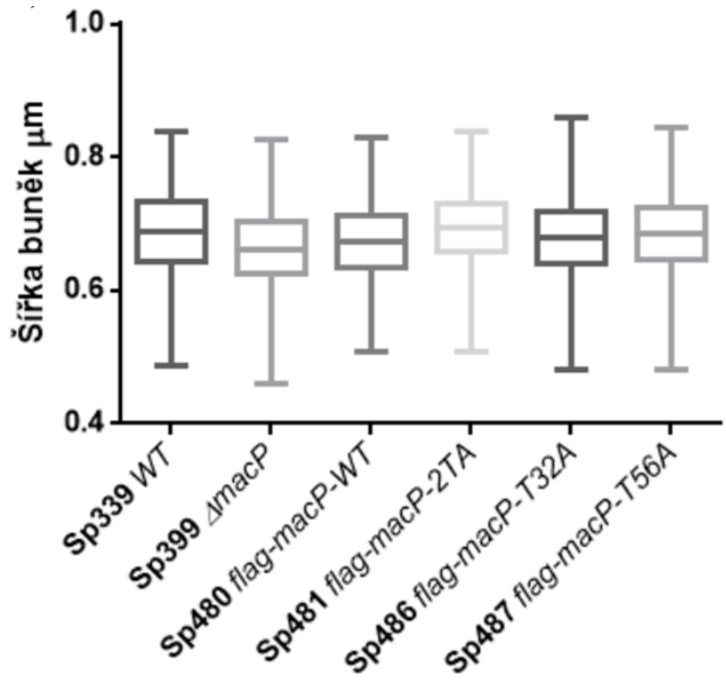
Z našich dat vyplývá, že kmen Sp480, exprimující *flag-macP*-WT a kmeny Sp481, Sp486 a Sp487 nesoucí fosfoablativní mutace *macP* mají stejně dlouhé buňky jako kmen divokéhy typu Sp339 (WT), z čehož lze usoudit, že fosforylace majoritních zbytků MacP neovlivňuje celkový fenotyp buněk. Buňky kmene Sp399 (Δ*macP*) jsou ve srovnání s ostatními kmeny signifikantně delší a mají menší šířku, čímž jsme stanovili, že delece *macP* má vliv na délku a šířku buněk.



b)



c)



Obrázek 5-23: Vliv mutace *macP* na velikost buněk *S. pneumoniae;* a) mikroskopické zobrazení kmenů Sp399 (*ΔmacP*), Sp480 (*flag-macP-WT*), Sp481 (*flag-macP-2TA*), Sp486 (*flag-macP-T32A*) a Sp487 (*flag-mac-T56A*) ve srovnání s Sp339 (WT), hodnota pod jednotlivými obrázky představuje medián délky (um) a směrodatnou odchylku; b) analýza délky buněk c) analýza šířky buněk; Velikost buněk je vyjádřena prostřednictvím krabicového grafu, kde vodorovné čáry představují maximum, horní kvartil, medián, dolní kvartil a minimum.

Tabulk 5-4: Srovnání délky a šířky buněk jednotlivých kmenů

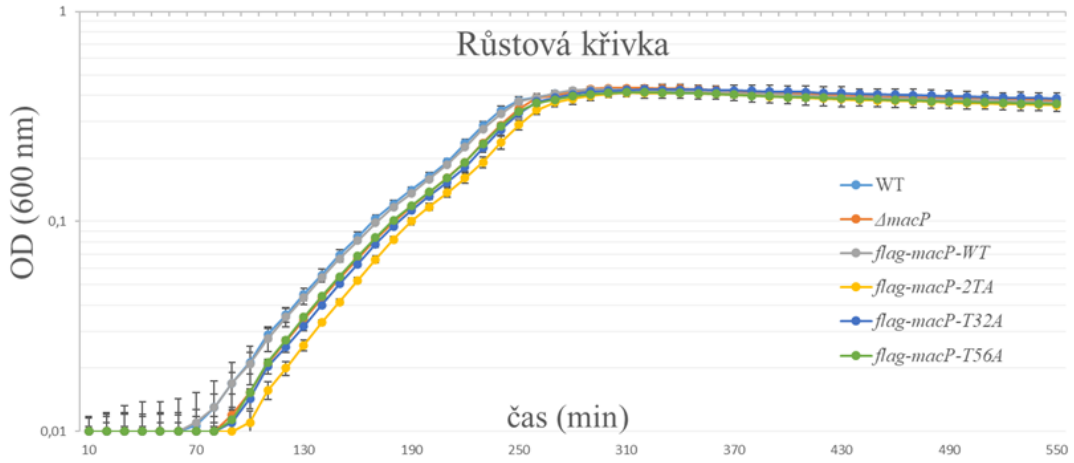
Kmen	**Délka buněk ± SD [µm]**	**Šířka buněk ± SD [µm]**
Sp339 (*WT*)	1,724 ± 0,3921	0,6878 ± 0,06357
Sp399 (*ΔmacP)*	1,925 ± 0,4076	0,6625 ± 0,06193
Sp480 (*flag-macP*-WT)	1,697 ± 0,3550	0,6738 ± 0,05653
Sp481 (*flag-macP-2TA*)	1,726 ± 0,3622	0,6903 ± 0,05758
Sp486 (*flag-macP-T32A*)	1,691 ± 0,3460	0,6778 ± 0,06099
Sp487 (*flag-macP-T56A*)	1,714 ± 0,3673	0,6856 ± 0,06096

SD – směrodatná odchylka

5.1.9 Růstová charakterizace kmenů *S. pneumoniae* nesoucích mutaci genu *macP*

V této části jsme se zaměřili na charakteristiku růstových vlastností kmenů nesoucí mutaci nebo deleci genu *macP*. Pneumokokové kmeny Sp339 (WT), Sp399 (Δ*macP*), Sp480 (*flag-macP-WT*), Sp481 (*flag-macP-2TA*), Sp486 (*flag-macP-T32A*), Sp487 (*flag-macP-T56A*) byly kultivovány staticky v BHI médiu, při 37 °C, v 96-jamkových destičkách a růstové křivky byly měřeny pomocí spektrofotometru Microplate reader 800TS (BIOTEK), který monitoroval $OD_{600\ nm}$ každých 10 min.

Na obrázku 5-24 je znázorněno semilogaritmické vynesení námi zjištěných hodnot růstových křivek, kde byl každý vzorek měřen v triplikátech. Doby zdvojení jednotlivých kmenů jsou u všech kmenů podobné a jsou uvedeny v tab. 5-5. Z průběhu růstových křivek (viz obr. 5-24) lze říci, že kmeny nesoucí mutaci *macP* rostou srovnatelně jako kmen Sp339 (WT). Pouze jsme zaznamenali, že kmeny *ΔmacP*, *flag-macP-2TA*, *flag-macP-T32A* a *flag-macP-T56A* mají ve srovnání s kmeny WT a *flag-macP*-WT delší lag fázi. Dokázali jsme, že delece genu *macP* nebo mutace jeho majoritních fosforylačních míst nemá významný vliv na charakter růstových vlastností těchto kmenů.



Obrázek 5-24: Semilogaritmické vynesení růstové křivky kmenů Sp339 (WT), Sp399 (*ΔmacP*), Sp480 (*flag-macP-WT*), Sp481 (*flag-macP-2TA*), Sp486 (*flag-macP-T32A*) a Sp487 (*flag-macP-T56A*); Φ znázorňuje směrodatné odchylky z jednotlivých měření

Tabulka 5-5: Doba zdvojení kmenů exprimující různé alely *macP*

Kmen	**Doba zdvojení [min]**
Sp339 (WT)	32
Sp399 (*ΔmacP)*	34
Sp480 (*flag-macP-WT*)	33
Sp481 (*flag-macP-2TA*)	34
Sp486 (*flag-macP-T32A*)	31
Sp487 (*flag-macP-T56A*)	32

5.2 PBP2a

Protein PBP2a se řadí mezi penicilin vazebné proteiny třídy A, které vykazují kromě transglykosylázové také transpeptidázovou aktivitu. Hlavní funkcí těchto proteinů je tedy zabudování disacharidových podjednotek PG a jejich následné zesíťování. Delece genu *pbp2a* je synteticky letální s genem *pbp1a*, kódující protein PBP1a třídy A (Straume *et al.*, 2020).

Dle databáze uniprot (www.uniprot.org) se jedná o transmembránový protein, kódovaný genem *spr1823*, složený ze 731 amk o velikosti 80,8 kDa. N-terminální část je predikována jako intracelulární v oblasti 1-56 amk, následuje transmembránová doména (57-77 amk). Největší část proteinu PBP2a tvoří extracelulární doména (78-731 amk), která se rozděluje na transglykosylázovou (78-300 amk) a transpeptidázovou (301-731 amk) doménu (viz obr. 5-25). Databáze ortologních skupin (www.orthodb.org) potvrzuje, že je gen *pbp2a* konzervován u více než 90 % bakteriálních druhů.

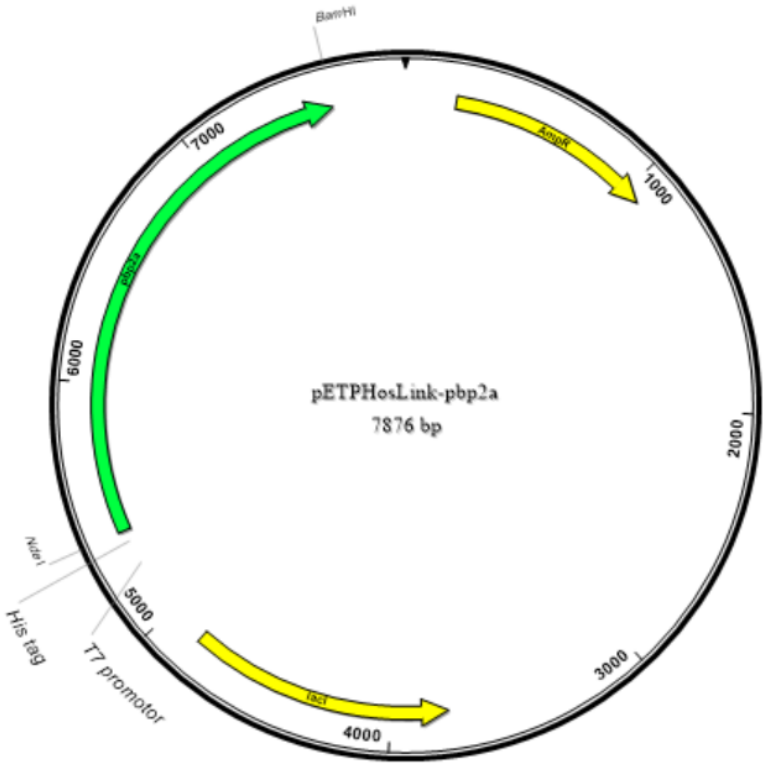
Obrázek 5-25: Schématické znázornění domén proteinu PBP2a a aminokyselinová sekvence; TG – transglykosylázová doména; TP – transpeptidázová doména; **E** – kyselina glutamová, aktivní místo TG domény; **S** – serin, aktivní místo TP domény

5.2.1 Stanovení fosforylace proteinu PBP2a proteinkinasou StkP i*n vitro*

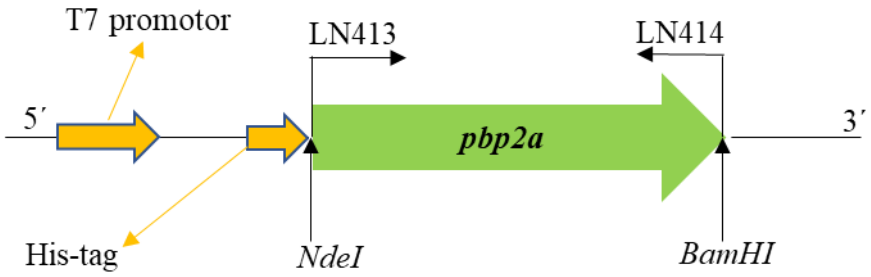
V naší fosfoproteomové studii (Ulrych *et al.*, nepublikovaná data) jsme detekovali PBP2a jako substrát StkP a jako fosforylační místo byl identifikován threonin 27, který se nachází v krátké intracelulární doméně. Dalším cílem mé diplomové práce tedy bylo potvrzení fosforylace PBP2a proteinkinázou StkP *in vitro*.

Pro stanovení fosforylace proteinu PBP2a proteinkinasou StkP *in vitro* bylo potřeba gen *pbp2a* nejdříve klonovat do expresního vektoru pETPhoLink, potvrdit jeho expresi v buňkách *E. coli* BL21 (DE3) a poté protein purifikovat. Postup klonování genu *pbp2a* do klonovacího vektoru pETPhosLink probíhal v několika krocích. Nejprve proběhla amplifikace genu *pbp2a* divokého typu a mutantní alely, který ve své sekvenci obsahoval fosfoablativní záměnu threoninu za alanin v pozici 27 (T27A). Jako templát sloužila chDNA kmene Sp339 (WT) a Sp503 (*pbp2a-T27A*). Pro tuto amplifikaci byly navrženy oligonukleotidy LN413/LN414, které obsahují ve své sekvenci restrikční místa *NdeI* a *BamHI*. Následně byl vektor pETPhosLink a PCR produkty stěpeny restrikčními enzymy *NdeI* a *BamHI*. Po restrikci proběhla ligace PCR produktu do linearizovaného vektoru pETphosLink *NdeI/BamHI* (viz obr. 5-26). Připravené konstrukty byly transformovány do expresních kmenů *E. coli* BL21 (DE3).

a)

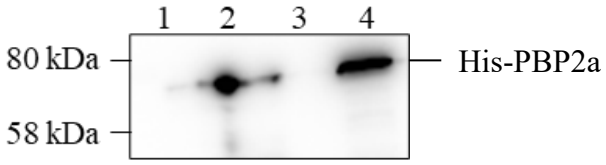


b)



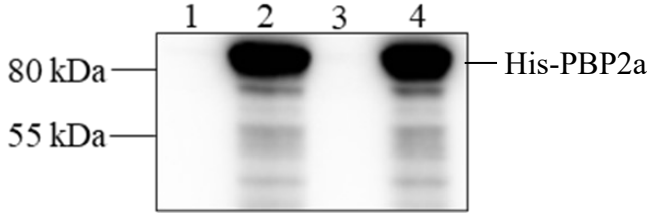
Obrázek 5-26: Schéma plasmidu pETphosLink-*pbp2a*. a) mapa plasmidu (7876 bp), včetně pozice restrikčních míst *NdeI/BamHI*, která byla použita k inzerci genu *pbp2a* do vektoru; b) pozice oligonukleotidů LN385/LN386. *T7 promotor* – promotor pro polymerázu bakteriofága T7, His tag – histidinová kotva, *NdeI/BamHI* – restrikční místa, *pbp2a* – gen kódující protein PBP2a, *AmpR* – gen kódující rezistenci k ampicilinu, *lacI* – laktózový represor, LN385/LN386 – oligonukleotidy použité pro amplifikaci genu *pbp2a*

Indukce exprese His-PBP2a-WT a His-PBP2a-T27A byla navozena přidáním 1 mM IPTG. Proteinové SEDS lyzáty byly odebrány před indukcí a po 24 hod indukci. Proteiny byly separovány pomocí SDS-PAGE (10% gel) gel byl následně barven Coomassie Brilliant Blue G-250. Barvením gelu jsme nepozorovali expresi proteinu His-PBP2a a proto jsme rozhodli potvrdit přítomnost His-PBP2a imunodetekcí pomocí anti-His protilátky. Potvrdili jsme expresi proteinů His-PBP2a-WT/T27A (viz obr. 5-27).



Obrázek 5-27: Exprese His-PBP2a-WT (Ec. 569, pETPhosLink-*pbp2a*-WT) a His-PBP2a-T27A (Ec. 570, pETPhosLink-*pbp2a-T27A*) u *E. coli* BL21 (DE3); Proteiny byly separovány pomocí SDS PAGE (10% gely), přeneseny na PVDF membránu a detekovány anti-His protilátkou; Proteinové SEDS lyzáty - 1 – His-PBP2a-WT, odběr vzorku před indukcí; 2 – His-PBP2a-WT, odběr vzorku po 24 hod; 3 - His-PBP2a-T27A, odběr vzorku před indukcí; 4 – His-PBP2a-T27A, odběr vzorku po 24 hod

Bakteriální buňky získané kultivací v přítomnosti induktoru (1 mM IPTG) byly následně dezintegrovány pomocí přístroje French-press. Proteiny His-PBP2a-WT a T27A se nicméně nepodařilo purifikovat ze solubilní frakce proteinových lyzátů pomocí afinitní chromatografie za použití Ni-NTA agarózy. Proteiny PBP2a byly pravděpodobně přítomny pouze ve formě nerozpustných inkluzí v důsledku přítomnosti transmembránové domény. Proto jsme se rozhodli pro expresi použít kmen *E. coli* ArcticExpress (DE3). V těchto buňkách se exprimují chaperony Cpn10 a Cpn60, které zajišťují efektivnější sbalení proteinů při nízkých teplotách, čímž zvyšují výtěžek rekombinantního proteinu v rozpustné frakci. Indukci exprese His-PBP2a-WT a T27A jsme se nejdříve snažili potvrdit barvením gelu Coomassie Brilliant blue G-250, nicméně jsme opět nepotvrdili přítomnost proteinů. Rozhodli jsme se potvrdit indukci epxrese proteinů PBP2a opět imunodetekcí anti-His protilátkou. Potvrdili jsme expresi proteinů HisPBP2a-WT a T27 (viz obr. 5-28), ale proteiny se opět nepodařilo purifikovat.



Obrázek 5-28: Exprese His-PBP2a-WT (Ec. 575, pETPhosLink-*pbp2a*-WT) a His-PBP2a-T27A (Ec. 576, pETPhosLink-*pbp2a-T27A*) u *E. coli* ArcticExpress (DE3); Proteiny byly separovány pomocí SDS PAGE (10% gely), přeneseny na PVDF membránu a detekovány anti-His protilátkou; Proteinové SEDS lyzáty - 1 – His-PBP2a-WT, odběr vzorku před indukcí; 2 – His-PBP2a-WT, odběr vzorku po 24 hod; 3 - His-PBP2a-T27A, odběr vzorku před indukcí; 4 – His-PBP2a-T27A, odběr vzorku po 24 hod

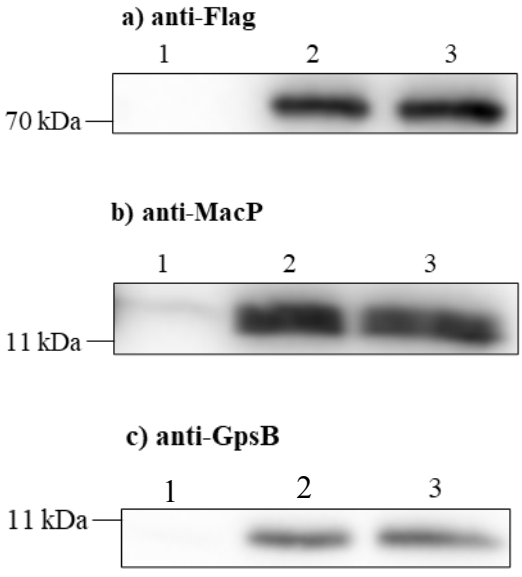
5.2.2 Analýza proteinů buněčného dělení interagujících s PBP2a *in vivo* pomocí koimunoprecipitace

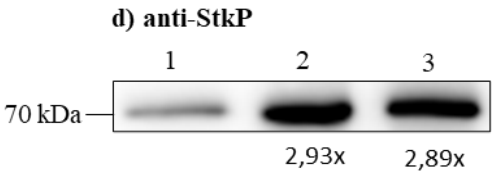
PBP2a je transmembránový protein řadící se do skupiny enzymů syntetizující PG. Spolu s PBP1a a PBP1b patří do skupiny PBP proteinů třídy A. Protein PBP2a vyžaduje pro svou funkci aktivátor MacP Fenton *et al.*, (2018). V této části se pokusíme potvrdit interakci těchto dvou a dalších vybraných proteinů pomocí koimunoprecipitace. Pro tento pokus jsme použili 2 kmeny s odlišným genetickým pozadím exprimující proteiny Flag-PBP2a. Jedná se o kmeny Sp560 (D39 *(Δcps); pZn-Flag-pbp2a*) a Sp561 (D39 *(Δcps);*

Δpbp2a, pZn-*Flag-pbp2a*) exprimující rekombinantní Flag-PBP2a. Jako kontrolní kmen jsme použili kmen divokého typu Sp339.

Z těchto kmenů byly připraveny celkové lyzáty u kterých předtím proběhl chemický crosslink formaldehydem, čímž došlo k fixaci vazeb mezi proteiny, které interagují. Poté byla provedena imunoprecipitace proteinů Flag-PBP2a pomocí magnetických kuliček konjugované s M2-anti-Flag protilátkou. Nakonec byla provedena separace proteinů pomocí SDS-PAGE, přenos proteinů na PVDF/nitrocelulózovou membránu a imunodetekce imunoprecipitovaných vzorků (viz obr. 5-29). Pomocí anti-Flag protilátky byl detekován Flag-PBP2a v obou kmenech Sp560, Sp561. (viz obr. 5-29a). Imunodetekcí anti-MacP protilátkou (viz obr. 5-28b) byl detekován MacP v imunoprecipitátech obou kmenů, zatímco v kontrolním kmeni Sp339 detekován nebyl. Podařilo se nám tedy koimunoprecipitovat protein MacP s PBP2a z celkového lyzátu po chemickém crosslinku u kmenů Sp560, Sp561 a potvrdili jsme tedy vzájemnou interakci těchto proteinů (viz obr. 5-28b).

Dále jsme se pokusili prokázat interakci PBP2a s adaptorovým proteinem GpsB a kinasou StkP. V obou kmenech, Sp560 a Sp561, byla potvrzena koimunoprecipitace Flag-PBP2a s GpsB pomocí protilátky anti-GpsB (viz obr. 5-29c). Koimunoprecipitace Flag-PBP2a s StkP pomocí anti-StkP protilátky se nám potvrdila také. V kontrolním vzorku kmene Sp339 je zachycen nespecifický signál StkP (viz obr. 5-29d), nicméně množství proteinu StkP v kmenech Sp560 a Sp561 bylo stanoveno v 3x větším množství než v kontrolním vzorku Sp339. Podařilo se nám potvrdit interakci proteinu PBP2a s proteiny MacP, GpsB a kinasou StkP *in vivo* pomocí koimunoprecipitace.





Obrázek 5-29: Analýza interakcí Flag-PBP2a *in vivo*. Imunoprecipitáty z kmenů Sp339, Sp560, Sp561 byly separovány pomocí SDS PAGE (10% gely), přeneseny na PVDF/nitrocelulózovou membránu a PBP2a byl detekován anti-Flag protilátkou; interakční partnery PBP2a jsme detekovali pomocí b) anti-MacP c) anti-GpsB d) anti-StkP protilátkami; 1 – imunoprecipitát kmene Sp339 (WT); 2 – imunoprecipitát kmene Sp560 (*pZn-flag-pbp2a*); 3 – imunoprecipitát kmene Sp561 (*Δpbp2a, pZn-flag-pbp2a*)

6. DISKUZE

Protein MacP (membrane-anchored cofactor of PBP2a) je transmembránový protein složený ze 104 aminokyselin o velikosti 11,8 kDa. Tento protein je popsán jako kofaktor proteinu PBP2a (Fenton *et al.*, 2018). Fosfoproteomová studie (Sun *et al.*, 2010) identifikovala threonin v pozici 32 jako fosforylovaný zbytek proteinu MacP. Fenton *et al.*, (2018) publikovali výsledky, podle kterých je fosforylace tohoto zbytku esenciální pro funkci MacP. V naší nepublikované fosfoproteomové studii (Ulrych *et al.*) jsme zjistili, že tento protein je fosforylován v závislosti na StkP na dvou různých zbytcích, konkrétně T32 a T56.

Studie Fenton *et al.*, (2018) vycházela z fosfoproteomové studie Sun *et al.*, (2010) a studovali fosforylaci MacP v pozici T32 *in vivo*. Pomocí imunodetekce srovnávali fosforylaci proteinů v celkových lyzátech *S. pneumoniae* u kmenů kódující v nativním lokusu *macP*-WT, Δ*macP* nebo *macP-T32A*. V rámci studia fosforylace se pro potvrzení fosforylovaného zbytku používá záměna studované aminokyseliny za alanin, který není schopen nést fosfátovou skupinu. Zjistili, že T32 je jediný fosforylovaný zbytek proteinu MacP. V rámci rodu *Streptococcus* je T32 široce konzervován. V našem případě se výsledek tohoto pokusu shodoval a při detekci fosforylace MacP v celkových lyzátech *S. pneumoniae* jsme nepozorovali žádnou zbytkovou fosforylaci fosfoablativní formy proteinu MacP-T32A. Abychom zjistili, zda je MacP fosforylován i na T56 *in vivo*, rozhodli jsme MacP divokého typu a jeho mutantní formy obohatit pomocí precipitace, a tím zvýšit citlivost imunodetekční reakce. Pro tento pokus byly použity pneumokokové kmeny exprimující divokou nebo mutantní alelu *macP* fúzovanou s flagovou kotvou, díky které byla provedena precipitace Flag-MacP. Imunodetekce eluovaných proteinů Flag-MacP-WT, Flag-MacP-T32A, Flag-MacP-T56A a Flag-MacP-2TA protilátkami anti-P-Thr potvrdila, že oba threoninové zbytky T32 a T56 jsou fosforylovány *in vivo*. Dále jsme určili, že T32 představuje ve srovnání s T56 majoritní fosforylovaný zbytek proteinu MacP *in vivo*. Fosforylace proteinu Flag-MacP-2TA byla na hranici detekčního limitu (1 %). Pro potvrzení fosforylace proteinu MacP v pozicích T32 a T56 *in vitro* jsme exprimovali a purifikovali proteiny MacP, ve kterých jsme zaměnili T32 a T56 za alanin. Dokázali jsme, že oba studované threoninové zbytky jsou fosforylovány proteinkinasou StkP *in vitro*. Ve srovnání s MacP-WT jsme stanovili, že fosforylace MacP-T32A je vyšší než MacP-T56A, čímž jsme potvrdili výsledky zjištěné *in vivo*. Dvojitá alelická záměna v těchto zbytcích (MacP-2TA) byla fosforylována na 0,35 %. Tato zbytková fosforylace,

kterou jsme pozorovali rovněž *in vivo*, potvrzuje přítomnost dalších fosforylovaných zbytků proteinu MacP. V kmeni *S. pneumoniae* Δ*phpP*, ve kterém jsou StkP substráty hyperfosforylovány, byla kromě T32 a T56 detekována fosforylace aminokyselin T7, T37 a Y44 (Ulrych *et al.*, nepublikovaná data). Studie Fenton *et al.*, (2018) se fosforylací MacP v *in vitro* podmínkách nezabývala. Na rozdíl od výše zmiňované práce jsme prokázali, že MacP je efektivně fosforylován jak na T32, tak na T56 *in vivo*, a rovněž *in vitro*. Příčinou těchto rozdílných výsledků je v případě studie Fenton *et al.*, (2018) použití méně citlivé metody pro stanovení fosforylace proteinů *in vivo*.

Delece *pbp1a* je synteticky letální s delecí *pbp2a*, což dokazuje, že funkce těchto proteinů se překrývá a buňka vyžaduje přítomnost alespoň jednoho z nich k přežití (Hoskins *et al.*, 1999). Delece *macP* je synteticky letální s delecí *pbp1a*, z čehož vyplývá, že MacP je esenciální pro funkci PBP2a (Fenton *et al.*, 2016). Letální fenotyp se nevyskytuje u kmenů se současnou delecí *macP* a *pbp2a*, kdy zůstává funkční PBP1a (Fenton *et al.*, 2018).

Studie Fenton *et al.*, (2018) zkoumala význam fosforylace MacP prostřednictvím mutace T32 pomocí komplementace. Zjistili, že fosfoablativní (alanin) i fosfomimetická (kyselina glutamová) mutace T32 MacP nepodporuje růst v kmenech s inaktivovaným PBP1a. Pro tento pokus použili kmen s Δ*pbp1a*/Δ*macP*, ve kterém byly pod inducibilním promotorem exprimovány buď PBP1a (*pZn-pbp1a*) nebo GFP-MacP (*pFuc-gfp-macP*) divokého typu (WT) nebo nesoucí mutace (T32A, T32E). V přítomnosti induktoru Zn docházelo k expresi *pbp1a*, který je pro životaschopnost buněk dostačující. Po přidání induktoru fukózy (bez Zn) docházelo ke komplementaci pouze u buněk exprimující *macP*-WT. Zjistili, že kmeny s mutací T32A nebo T32E nekomplementují ve srovnání s WT proteinu MacP a došli k závěru, že fosforylace MacP prostřednictvím StkP je nezbytná pro jeho funkci.

V naší práci jsme analyzovali syntetickou letalitu *pbp1a* a *macP* tak, že jsme transformovali deleční kazetu Δ*pbp1a* do kmene Δ*macP*. Prokázali jsme, že delece *macP* je synteticky letální s delecí *pbp1a*, protože jsme transformací kmene Sp399 (Δ*macP*) deleční kazetou Δ*pbp1a* nezískali žádné transformanty, a tím jsme rovněž potvrdili výsledky Fenton *et al.*, (2018). Abychom zjistili, jestli fosforylace zbytků T32 a T56 nějakým způsobem ovlivňuje funkci MacP, rozhodli jsme se transformovat deleční kazetu Δ*pbp1a* kmeny exprimující *flag-macP*-WT, *flag-macP-T32A*, *flag-macP-T56A* a *flag-macP-2TA* pod nativním promotorem. Ve všech těchto případech jsme získali

transformanty s podobnou transformační účinností a zjistili jsme, že kmeny jsou životaschopné. Z toho experimentu jsme usoudili, že mutace fosforylovaných zbytku MacP nemá zásadní vliv pro funkci MacP, a to ani v případě záměny T32A, kterou předchozí studie označila za esenciální.

Rozdílnost našich závěrů lze odůvodnit rozdílnou metodikou práce, zejména volbou genetického pozadí. Je třeba upozornit, že Fenton *et al.*, (2018) použili pro důkaz esenciality komplementaci, při níž využili konstrukt *pFuc-gfp-macP*. Protein GFP má velikost cca 27 kDa, tedy téměř 2,5× větší než MacP. Fúze s takto velkým proteinem může bránit správnému sbalení a exprese pod inducibilním promotorem se může lišit od exprese pod nativním promotorem, který jsme využili v naší práci. Navíc příprava kmene s delecí 2 genů (*Δpbp1a/ΔmacP*) kombinovaná s další genetickou manipulací, kterou představuje integrace 2 dalších komplementačních konstruktů, vyžaduje několik transformačních kroků, ve kterých mohou buňky hromadit supresorové mutace, což je u *S. pneumoniae* poměrně častá komplikace. Všechny tyto faktory mohly ovlivnit výsledek jejich studie.

Abychom potvrdili, že MacP interaguje s PBP2a, pokusili jsme se detekovat interakci těchto proteinů *in vivo* pomocí dvouhybridního bakteriálního adenylatcyklasového systému (BACTH) a koimunoprecipitace (CoIP). Nejprve jsme potvrdili interakci proteinů MacP a PBP2a pomocí BACTH v *E. coli*. V našem případě byla interakce těchto proteinů potvrzena v obou typech fúze (tedy T25-MacP s T18-PBP2a a T18-MacP s T25-PBP2a). V případě studie Fenton *et al.*, (2018) byla detekována pouze interakce pouze T25-PBP2a s T18-MacP. Zjistili jsme, že důvodem tohoto výsledku je v této studii špatné navržení oligonukleotidu pro konstrukt T25-*macP*, kde došlo k posunu čtecího rámce *macP*. Interakci MacP s PBP2a jsme potvrdili rovněž *v S. pneumoniae* pomocí CoIP, a to jak v případě imunoprecipitace Flag-MacP, tak v případě imunoprecipitace Flap-PBP2a. Ke stejným výsledků dospěli i ve studii Fenton *et al.*, (2018), kde ovšem provedli pouze imunoprecipitaci GFP-PBP2a a detekovali koimunopreciptovaný MacP.

Následně nás zajímalo, zda má na interakci proteinů MacP-PBP2a vliv fosforylace proteinu MacP. Pro studium fosforylace se pro potvrzení fosforylovaného zbytku používá kromě fosfoablativní záměny (A) také fosfomimetická záměna za kyselinu glutamovou (E), která mimikuje fosforylovaný protein. Připravili jsme plasmidy nesoucí fragment T18/T25 fúzovaný s genem *macP* s fosfoablativními nebo fosfomimetickými záměnami

ve fosforylačních místech (tedy T32A, T32E, T56A, T56E a dvojité záměny 2TA, 2TE). Ani jedna z výše uvedených záměn fosforylačních míst neovlivňuje interakci proteinů MacP-PBP2a, a tedy fosforylace proteinu MacP nemá vliv na interakci s PBP2a. Studie Fenton *et al.*, (2018) rovněž potvrdila interakci MacP-T32A/E s PBP2a pomocí BACTH i CoIP. Naše výsledky se shodují.

V dalším pokusu jsme potvrdili vzájemnou interakci T18-MacP a T25-MacP a protein MacP má tedy schopnost tvořit oligomery. Podle výsledků BACTH ve studii Fenton *et al.*, (2018) není MacP schopen interakce s MacP, ale to bylo, dle našeho zjištění, způsobeno použitím vadného konstruktu T25-MacP (viz výše), kde došlo k posunu čtecího rámce, a tudíž nedocházelo k expresi MacP. Na rozdíl od Fenton *et al.*, (2018) jsme v našem experimentálním uspořádání rovněž potvrdili, že PBP2a je schopen oligomerizace, což bylo již dříve publikováno (Helassa *et al.*, 2012), ale nepodařilo se potvrdit ve studii Fenton *et al.*, (2018).

Také nás zajímalo, zda má na interakční vlastnosti proteinu MacP vliv transmembránová doména (TM). Fenton *et al.*, (2018) zjistili, že MacP bez TM domény nelokalizuje v septu, ale v cytoplazmě a nekomplementuje mutaci Δ*macP*, což znamená, že TM proteinu MacP je esenciální pro lokalizaci v septu a funkci proteinu. Naše pokusy potvrdily, že přítomnost TM domény proteinu MacP je nezbytná jak pro interakci s PBP2a, tak i pro vznik dimeru/oligomeru MacP. Výsledky celkově potvrzují esencialitu TM domény proteinu MacP pro lokalizaci v septu a interakci s ostatními proteiny. TM doména může být důležitá pro sbalení proteinu nebo může sama o sobě zprostředkovávat interakce, což by dokazoval fakt, že její fúze s GFP je dostatečná pro lokalizaci přímo v septu (Fenton *et al.*, 2018). Pokud by tomu tak nebylo, tak bychom očekávali, že fúzní protein TM-GFP bude lokalizován rovnoměrně v celé buněčné membráně.

Pomocí BACTH systému a CoIP jsme zkoumali interakce MacP a vybraných proteinů buněčného dělení *S. pneumoniae*. Zajímalo nás, zda protein MacP interaguje s adaptorovým proteinem GpsB a zda fosforylace MacP ovlivňuje interakci těchto proteinů. Podařilo se nám pomocí BACTH i CoIP potvrdit interakci proteinů MacP-GpsB a zároveň jsme dokázali, že mutace fosforylovaných zbytků proteinu MacP nemá vliv na interakci s GpsB v *E. coli*. Naše výsledky dále potvrdily, že MacP interaguje s vybranými PBP proteiny třídy A (PBP1a, PBP2a), třídy B (PBP2b, PBP2x) a dále s esenciálními transglykosylasami FtsW a RodA.

Interakce MacP byla také potvrzena s proteiny EzrA, FtsL, FtsQ, MltG, MreC, FtsA a DivIVA. Interakce proteinu MacP naopak nebyla potvrzena s proteiny FtsB a FtsZ. Zároveň jsme pomocí BACTH a CoIP potvrdili, že MacP neinteraguje s StkP.

Studie Fenton *et al.*, (2018) pouze zkoumala interakce MacP s proteiny elongazomu MreC, MreD a CozE pomocí BACTH. Interakci proteinů nepotvrdili ani u jednoho z nich.

Z našich výsledků lze usoudit, že MacP má širokou škálu interakčních partnerů a interaguje jak s proteiny syntetizujícími PG (PBP proteiny, FtsW, RodA), tak s proteiny tvořícími lešení pro syntézu buněčné stěny (FtsA, EzrA) a s proteiny, které zajišťují protein-protein interakce (FtsL, FtsQ, MreC). Důležité je potvrzení interakce MacP s adaptorovým proteinem GpsB. Neprokázali jsme interakci MacP s proteinkinasou StkP, a to ani v rámci BACTH a CoIP v *S. pneumoniae*, ale zároveň jsme potvrdili, že MacP je substrátem StkP *in vitro*. Nabízí se tedy hypotéza, že interakce StkP se substrátem MacP *in vivo* může být zprostředkována pomocí adaptorového proteinu GpsB. Studie Cleverley *et al.*, (2019) potvrdila interakci GpsB s StkP.

Další částí naší práce bylo určit lokalizaci proteinu MacP v buňce. Pro stanovení lokalizace jsme využili fúze MacP s GFP, což nám umožnilo pozorovat lokalizaci MacP pomocí fluorescenční mikroskopie. Potvrdili jsme přítomnost MacP v buněčné přepážce u kmenů *S. pneumoniae* Rx a i D39. Tím byl potvrzen výsledek studie, která stanovila lokalizaci fúzního proteinu GFP-MacP v buněčné přepážce nezávisle na PBP2a (Fenton *et al.*, 2018). V této studii bylo navíc zjištěno, že protein MacP neovlivňuje lokalizaci PBP2a, čímž došli k závěru, že MacP neovlivňuje funkci PBP2a prostřednictvím jeho lokalizace, ale ovlivňuje pravděpodobně přímo jeho enzymatickou funkci. Z naší analýzy pomocí BACTH vyplývá, že za lokalizaci MacP může zodpovídat právě interakce s ostatními proteiny buněčného dělení.

Součástí naší práce byla také analýza fenotypu mutantních kmenů *macP*. Porovnávali jsme morfologii pneumokokových kmenů s rozdílnou mutací *macP* v nativním lokusu (*flag-macP*-WT, Δ*macP*, *flag-macP-T32A*, *flag-macP-T56A*, *flag-macP-2TA*) prostřednictvím měření různých buněčných parametrů jako je délka a šířka. Potvrdili jsme, že fosfoablativní záměny T32 a T56 proteinu MacP nemají vliv na morfologii buněk. Signifikantnější rozdíl v délce a šířce buněk měl ve srovnání s WT kmen Δ*macP*, jehož buňky byly delší a užší. Studie Fenton *et al.*, (2018) srovnávala kmen WT

s kmenem Δ*macP*, nicméně k rozdílům v morfologii nedospěla. Také jsme se zaměřili na růstovou charakterizaci těchto kmenů. Došli jsme k závěru, že v našem případě žádná mutace *macP* neovlivňuje významně růst buněk. Studie Fenton *et al.*, (2018) také zkoumala růst buněk. Pozorovali růst kmenů s genetickým pozadím Δ*pbp1a/*Δ*macP pZn-pbp1a*. Tento kmen transformovali konstruktem *pFuc-gfp-macP*, *pFuc-gfp-macP (T32A)* nebo *pFuc-gfp-macP (T32E)*. V případě přidání zinku došlo ke komplementaci ve všech případech, protože aktivace *pbp1a* zajišťuje viabilitu buněk. Po přidání fukózy docházelo u kmenů s *macP (T32A/E)* k výraznému úbytku růstu. Výsledek této studie se opět neshoduje s naším závěrem. Opět zde může hrát svou roli zvolené experimentální schéma.

Mezi důležité poznatky získané v poslední době o PBP proteinech třídy A patří informace, že se účastní mnoha různých protein-protein interakcí. Tyto interakce pravděpodobně nevznikají všechny současně, ale umožňují PBP proteinům zařadit se dočasně do různých proteinových komplexů, které vznikají a zanikají během buněčného cyklu (Pazos a Vollmer 2021). Interakce s některými proteiny jsou naprosto nezbytné pro funkčnost PBP proteinů a tyto proteiny bývají nazývány kofaktory. Nicméně pojem kofaktor je široce používán pro ne-proteinovou částici podporující funkci enzymu, a proto je lepší v našem případě používat pojem „aktivátor“ (O´Malley *et al.*, 2008). MacP, ačkoliv jeho název je v překladu odvozen od slovního spojení „membránově vázaný kofaktor“, můžeme tedy zařadit mezi PBP aktivátory. Aktivátory PBP proteinů se vyskytují jak v rámci gramnegativních, tak grampozitivních bakterií.

U *E. coli* je doposud známo celkem 12 PBP proteinů. Mezi bifunkční enzymy třídy A řadíme PBP1a a PBP1b. Aktivátory těchto dvou proteinů jsou nezbytné pro jejich funkci. PBP1a vyžaduje pro svou funkci lipoprotein LpoA. Vazba lipoproteinu LpoA stimuluje především transpeptidasovou funkci proteinu PBP1a. Lipoprotein LpoB svou vazbou na protein PBP1b aktivuje transglykosylaci i transpeptidaci proteinu PBP1b (Egan *et al.*, 2014; Paradis-Bleau *et al.*, 2010). Nedávno objevený lipoprotein CpoB moduluje transpeptidasovou funkci PBP1b prostřednictvím interakce s LpoB-PBP1b (Egan *et al.*, 2018). Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* vyžaduje pro aktivaci PBP1b lipoprotein LpoP. Bylo zjištěno, že během vazby LpoB a LpoP na PBP proteiny, dochází ke konformační změně příslušných PBP proteinů, a tím i k jejich aktivaci (Greene *et al.*, 2018). Tyto aktivátory PBP proteinů jsou kotveny k vnější membráně a interagují s PBP proteiny v periplazmatickém prostoru (Egan *et al.*, 2014; Jean *et al.*, 2014).

Aktivátory PBP proteinů u grampozitivních bakterií nejsou ještě detailně popsány, nicméně je jasné, že budou od aktivátorů gramnegativních bakterií, kvůli absenci vnější membrány, značně odlišné. U *S. pneumoniae* byl popsán protein CozE (coordinator of zonal elongation), který společně s proteiny MreC a MreD zajišťuje lokalizaci PBP1b v septu a řídí tak správnou syntézu periferního PG (Fenton *et al.*, 2016). CozE je v rámci grampozitivních bakterií široce konzervován, což naznačuje jeho význam v rámci regulace PBP proteinů. Homologním proteinem, který je rovněž široce konzervován je CozEb. Společně s CozE se podílí na lokalizaci PBP1a během buněčného dělení. Bylo zjištěno, že delece *cozEb* nemá sama o sobě vliv na lokalizaci PBP1a, ale jeho nadprodukce kompenzuje nepřítomnost CozE (Stamsås *et al.*, 2020).

Posledním zmíněným regulátorem PBP proteinů je membránově asociovaný, adaptorový protein GpsB. Protein GpsB představuje klíčový regulátor syntézy buněčné stěny u grampozitivních bakterií s nízkým obsahem GC párů, kde zprostředkovává interakce proteinů v rámci velkých proteinových komplexů (Claessen *et al.*, 2008). U *B. subtilis* je GpsB fosforylován kinasou PrkC. Bylo zjištěno, že fosforylace GpsB zabraňuje autofosforylaci PrkC a fosforylaci dalších substrátů kinasy PrkC (Pompeo *et al.*, 2015). GpsB je u *B. subtilis* a *L. monocytogenes* lokalizován v septu a v laterálních částí buňky, stejně jako PBP1 u *B. subtilis* (Claessen *et al.*, 2008). Delece *gpsB* vede u *L. monocytogenes* ke zvýšení citlivosti na β laktamová antibiotika a ovlivnění funkce PBPa1 (Rismondo *et al.*, 2016). GpsB spolu s kinasou StkP působí u *S. pneumoniae* jako molekulární přepínače mezi septální a periferní syntézou PG. V kmeni D39 je *gpsB* esenciální, protože inaktivace *gpsB* vede ke vzniku buněk neschopných buněčného dělení (Rued *et al.*, 2017). Během dělení je tento protein lokalizován v septu a je vyžadován pro správnou aktivaci proteinkinasy StkP a fosforylaci jejích substrátů (Fleurie *et al.*, 2014b, Rued *et al.*, 2017). Prostřednictvím GpsB dochází k interakci StkP a PBP2x, PBP proteinu, který dokončuje tvorbu septa. Delece *gpsB* je synteticky letální s delecí *pbp1a*, což potvrzuje, že PBP2a je regulován pomocí GpsB. Interakce *in vivo* byla potvrzena mezi GpsB-PBP2a a GpsB-PBP2b. Interakcí s PBP2b působí GpsB jako negativní regulátor periferní syntézy PG (Rued *et al.*, 2017). Při depleci GpsB nedochází k uzavření septa a tvoří se větší prodloužené buňky, podobně jako je tomu u mutace *stkP* (Rued *et al.*, 2017).

Jakým způsobem protein MacP ovlivňuje aktivitu PBP2a, není zatím přesně známo. Nabízí se ale řada hypotéz. PBP2a je převážně složen z extracelulární, transmembránové

a krátké intracelulární domény. MacP obsahuje kromě transmembránové pouze intracelulární doménu. Jak jsme zjistili, TM doména proteinu MacP je esenciální pro jeho interakci s PBP2a. MacP tak může pomocí TM domény zprostředkovat interakci PBP2a s řadou komponentů podílející se na syntéze PG. Na základě genetických analýz bylo prokázáno, že pro aktivitu PBP2a je vyžadován protein GpsB (Rued *et al.*, 2017). Naše studie potvrdila interakci GpsB-MacP, GpsB-PBP2a i MacP-PBP2a a je tedy zřejmé, že tyto proteiny se nachází v jednom komplexu. Jako jedna z možností se nabízí, že GpsB rekrutuje oba proteiny a zajistí tak interakci MacP-PBP2a. Dále muže MacP fungovat jako aktivátor, který změní konformaci PBP2a a stimuluje jeho enzymatickou aktivitu, jako je tomu např. u aktivátorů LpoA a LpoB.

7. SOUHRN

Výsledky této diplomové práce můžeme shrnout do následujících bodů:

- Potvrdili jsme fosforylaci MacP v pozicích T32 a T56 proteinkinasou StkP *in vitro*.
- Podařilo se nám optimalizovat použití anti-MacP protilátky pro detekci proteinu MacP.
- Pomocí imunoprecipitace jsme prokázali fosforylaci MacP v pozicích T32 a T56 *in vivo*.
- Protein MacP interaguje s PBP2a *in vivo*. Tuto interakci jsme potvrdili v *E. coli* pomocí dvouhybridního bakteriálního adenylatcyklasového systému (BACTH) a v *S. pneumoniae* pomocí koimunoprecipitace.
- Mutace fosforylovaných aminokyselin proteinu MacP nemá vliv na interakci s PBP2a.
- V modelovém organismu *E. coli* jsme pomocí BACTH systému prokázali, že protein MacP interaguje s řadou proteinů účastnících se buněčného dělení u *S. pneumoniae*. Pomocí koimunoprecipitace jsme potvrdili interakci MacP a GpsB v *S. pneumoniae*.
- Potvrdili jsme lokalizaci proteinu MacP v buněčné přepážce *S. pneumoniae*.
- Potvrdili jsme, že delece *pbp1a* je synteticky letální s delecí *macP* a MacP je tedy esenciálním aktivátorem PBP2a. Mutace fosforylovaných aminokyselin T32 a T56 nemá vliv na funkci MacP v aktivaci PBP2a.
- Mutace fosforylovaných aminokyselin MacP nemá významný vliv na morfologii a růst buněk.
- Nepodařilo se nám purifikovat PBP2a pro analýzu fosforylace proteinkinasou StkP *in vitro*.
- Potvrdili jsme interakci proteinu PBP2a s MacP a GpsB pomocí koimunoprecipitace v *S. pneumoniae*.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adams, D. W., Errington, J. (2009): Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. Nature Reviews Microbiology, 7: 642-653.

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

Anderton, J. M., Rajam, G., Romero-Steiner, S., Summer, S., Kowalczyk, A. P., Carlone, G. M., Ades, E. W. (2007): E-cadherin is a receptor for the common protein pneumococcal surface adhesin A (PsaA) of *Streptococcus pneumoniae*. Microbia l pathogenesis, 42: 225-236.

Attaiech, L., Olivier, A., Mortier-Barriere, I., Soulet, A. L., Granadel, C., Martin, B., Claverys, J. P. (2011): Role of the single-stranded DNA–binding protein SsbB in pneumococcal transformation: maintenance of a reservoir for genetic plasticity. PLoS genetics, 7: e1002156.

Austrian, R., Gold, J. (1964): Pneumococcal bacteremia with especial reference to bacteremic pneumococcal pneumonia. Annals of internal medicine, 60: 759-776.

Avery, O. T., MacLeod, C. M., McCarty, M. (1944): Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. Journal of experimental medicine, 79: 137-158.

Badrinarayanan, A., Reyes-Lamothe, R., Uphoff, S., Leake, M. C., Sherratt, D. J. (2012): *In vivo* architecture and action of bacterial structural maintenance of chromosome proteins. Science, 338: 528-531.

Barendt, S. M., Sham, L. T., Winkler, M. E. (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. Journal of bacteriology, 193: 2290-2300.

Barocchi, M. A., Ries, J., Zogaj, X., Hemsley, C., Albiger, B., Kanth, A., Henriques-Normark, B. (2006): A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103: 2857-2862.

Beall, B., Lutkenhaus, J. (1992): Impaired cell division and sporulation of a *Bacillus subtilis* strain with the ftsA gene deleted. Journal of bacteriology, 174: 2398-2403.

Beilharz, K., Nováková, L., Fadda, D., Branny, P., Massidda, O., Veening, J. W. (2012): Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109: E905-E913.

Bender, M. H., Weiser, J. N. (2006): The atypical amino-terminal LPNTG containing domain of the pneumococcal human IgA1-specific protease is required for proper enzyme localization and function. Molecular microbiology, 6: 526-543.

Beno, S. M., Riegler, A. N., Gilley, R. P., Brissac, T., Wang, Y., Kruckow, K. L., Orihuela, C. J. (2020): Inhibition of necroptosis to prevent long-term cardiac damage during pneumococcal pneumonia and invasive disease. The Journal of infectious diseases, 222: 1882-1893.

Benton, K. A., Paton, J. C., Briles, D. E. (1997): Differences in virulence for mice among *Streptococcus pneumoniae* strains of capsular types 2, 3, 4, 5, and 6 are not attributable to differences in pneumolysin production. Infection and immunity, 65: 1237-1244.

Berical, A. C., Harris, D., Dela Cruz, C. S., Possick, J. D. (2016): Pneumococcal vaccination strategies. An update and perspective. Annals of the American Thoracic Society, 13: 933-944.

Bergmann, S., Rohde, M., & Hammerschmidt, S. (2004): Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen- binding protein. Infection and immunity, 72: 2416-2419.

Bergmann, S., Rohde, M., Preissner, K. T., Hammerschmidt, S. (2005): The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. Thrombosis and haemostasis, 94: 304-311.

Berry, A. M., Paton, J. C. (1996): Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Infection and immunity, 64: 5255-5262.

Berry, A. M., Paton, J. C. (2000): Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. Infection and immunity, 68: 133-140.

Bethe, G., Nau, R., Wellmer, A., Hakenbeck, R., Reinert, R. R., Heinz, H. P., Zysk, G. (2001): The cell wall-associated serine protease PrtA: a highly conserved virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. FEMS microbiology letters, 205: 99-104.

Briley Jr, K., Dorsey-Oresto, A., Prepiak, P., Dias, M. J., Mann, J. M., Dubnau, D. (2011): The secretion ATPase ComGA is required for the binding and transport of transforming DNA. Molecular microbiology, 81: 818-830.

Brown, J. S., Gilliland, S. M., Holden, D. W. (2001): A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. Molecular microbiology, 40: 572-585.

Brown, J. S., Gilliland, S. M., Ruiz-Albert, J., Holden, D. W. (2002): Characterization of pit, a *Streptococcus pneumoniae* iron uptake ABC transporter. Infection and immunity, 70: 4389-4398.

Buddelmeijer, N., Beckwith, J. (2002): Assembly of cell division proteins at the *E. coli* cell center. Current opinion in microbiology, 5: 553-557.

Bugg, T. D. (1999): Bacterial peptidoglycan biosynthesis and its inhibition. Comprehensive natural products chemistry, 3: 241-294.

Bürmann, F., Shin, H. C., Basquin, J., Soh, Y. M., Giménez-Oya, V., Kim, Y. G., Gruber, S. (2013): An asymmetric SMC–kleisin bridge in prokaryotic condensin. Nature structural & molecular biology, 20: 371-379.

Burton, B., Dubnau, D. (2010): Membrane-associated DNA transport machines. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2: a000406.

Camara, M., Boulnois, G. J., Andrew, P. W., Mitchell, T. J. (1994): A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. Infection and immunity, 62: 3688-3695.

Campbell, E. A., Choi, S. Y., Masure, H. R. (1998): A competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* revealed by genomic analysis. Molecular microbiology, 27: 929-939.

Canvin, J. R., Marvin, A. P., Sivakumaran, M., Paton, J. C., Boulnois, G. J., Andrew, P. W., Mitchell, T. J. (1995): The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. Journal of Infectious Diseases, 172: 119-123.

Cassone, M., Gagne, A. L., Spruce, L. A., Seeholzer, S. H., Sebert, M. E. (2012): The HtrA protease from *Streptococcus pneumoniae* digests both denatured proteins and the competence-stimulating peptide. Journal of Biological Chemistry, 287: 38449-38459.

Cehovin, A., Simpson, P. J., McDowell, M. A., Brown, D. R., Noschese, R., Pallett, M., Pelicic, V. (2013): Specific DNA recognition mediated by a type IV pilin. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110: 3065-3070.

Claessen, D., Emmins, R., Hamoen, L. W., Daniel, R. A., Errington, J., Edwards, D. H. (2008): Control of the cell elongation–division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. Molecular microbiology, 68: 1029-1046.

Cleverley, R. M., Rutter, Z. J., Rismondo, J., Corona, F., Tsui, H. C. T., Alatawi, F. A., Lewis, R. J. (2019): The cell cycle regulator GpsB functions as cytosolic adaptor for multiple cell wall enzymes. Nature communications, 10: 1-17.

Cron, L. E., Bootsma, H. J., Noske, N., Burghout, P., Hammerschmidt, S., Hermans, P. W. (2009): Surface-associated lipoprotein PpmA of *Streptococcus pneumoniae* is involved in colonization in a strain-specific manner. Microbiology, 155: 2401-2410.

Croucher, N. J., Harris, S. R., Fraser, C., Quail, M. A., Burton, J., Van Der Linden, M., Bentley, S. D. (2011): Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. science, 331: 430-434.

Daniels, C. C., Rogers, P. D., Shelton, C. M. (2016): A review of pneumococcal vaccines: current polysaccharide vaccine recommendations and future protein antigens. The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics, 21: 27-35.

Darmon, E., Leach, D. R. (2014): Bacterial genome instability. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 78: 1-39.

Dave, S., Carmicle, S., Hammerschmidt, S., Pangburn, M. K., McDaniel, L. S. (2004): Dual roles of PspC, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, in binding human secretory IgA and factor H. The Journal of Immunology, 173: 471-477.

De Boer, P. A., Crossley, R. E., Rothfield, L. I. (1989): A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. Cell, 56: 641-649.

Dintilhac, A., Alloing, G., Granadel, C., Claverys, J. P. (1997): Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. Molecular microbiology, 25: 727-739.

D'Mello, A., Riegler, A. N., Martínez, E., Beno, S. M., Ricketts, T. D., Foxman, E. F., Tettelin, H. (2020): An *in vivo* atlas of host–pathogen transcriptomes during *Streptococcus pneumoniae* colonization and disease. Proceedings of the National Academy of Sciences, 117: 33507-33518.

Draper, G. C., Gober, J. W. (2002): Bacterial chromosome segregation. Annual Reviews in Microbiology, 56: 567-597.

Eberhard, T., Kronvall, G., Ullberg, M. (1999): Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. Microbial pathogenesis, 26: 175-181.

Egan, A. J., Jean, N. L., Koumoutsi, A., Bougault, C. M., Biboy, J., Sassine, J., Simorre, J. P. (2014): Outer-membrane lipoprotein LpoB spans the periplasm to stimulate the peptidoglycan synthase PBP1B. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111: 8197-8202.

Egan, A. J., Maya-Martinez, R., Ayala, I., Bougault, C. M., Banzhaf, M., Breukink, E., Simorre, J. P. (2018): Induced conformational changes activate the peptidoglycan synthase PBP1B. Molecular Microbiology, 110: 335-356.

Echenique, J., Kadioglu, A., Romao, S., Andrew, P. W., Trombe, M. C. (2004): Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. Infection and immunity, 72: 2434-2437.

Engelmoer, D. J., Donaldson, I., Rozen, D. E. (2013): Conservative sex and the benefits of transformation in *Streptococcus pneumoniae*. PLoS pathogens, 9: e1003758.

Fadda, D., Pischedda, C., Caldara, F., Whalen, M. B., Anderluzzi, D., Domenici, E., Massidda, O. (2003): Characterization of divIVA and other genes located in the chromosomal region downstream of the dcw cluster in *Streptococcus pneumoniae*. Journal of bacteriology, 185: 6209-6214.

Fadda, D., Santona, A., D'Ulisse, V., Ghelardini, P., Ennas, M. G., Whalen, M. B., Massidda, O. (2007): *Streptococcus pneumoniae* DivIVA: localization and interactions in a MinCD-free context:1288-1298.

Falk, S. P., Weisblum, B. (2013): Phosphorylation of the *Streptococcus pneumoniae* cell wall biosynthesis enzyme MurC by a eukaryotic-like Ser/Thr kinase. FEMS microbiology letters, 340: 19-23.

Feldman, C., Anderson, R. (2014): Current and new generation pneumococcal vaccines. Journal of Infection, 69: 309-325.

Fenton, A. K., Manuse, S., Flores-Kim, J., Garcia, P. S., Mercy, C., Grangeasse, C., Rudner, D. Z. (2018): Phosphorylation-dependent activation of the cell wall synthase PBP2a in *Streptococcus pneumoniae* by MacP. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115: 2812-2817.

Fenton, A. K., El Mortaji, L., Lau, D. T., Rudner, D. Z., Bernhardt, T. G. (2016): CozE is a member of the MreCD complex that directs cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. Nature microbiology, 2: 1-10.

Fitzgerald, T. J., Repesh, L. A. (1987): The hyaluronidase associated with *Treponema pallidum* facilitates treponemal dissemination. Infection and immunity, 55: 1023-1028.

Flärdh, K. (2003): Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in Streptomyces coelicolor A3 (2). Molecular microbiology, 49: 1523-1536.

Fleurie, A., Lesterlin, C., Manuse, S., Zhao, C., Cluzel, C., Lavergne, J. P., Grangeasse, C. (2014a): MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in *Streptococcus pneumoniae*. Nature, 516: 259-262.

Fleurie, A., Manuse, S., Zhao, C., Campo, N., Cluzel, C., Lavergne, J. P., Grangeasse, C. (2014b): Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the paralogs DivIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division. PLoS genetics, 10: e1004275.

Fogel, M. A., Waldor, M. K. (2006): A dynamic, mitotic-like mechanism for bacterial chromosome segregation. Genes & development, 20: 3269-3282.

Garcia, P., González, M. P., García, E., García, J. L., López, R. (1999): The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. Molecular microbiology, 33: 128-138.

Garmory, H. S., Titball, R. W. (2004): ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. Infection and immunity, 72: 6757-6763.

Giefing, C., Jelencsics, K. E., Gelbmann, D., Senn, B. M., Nagy, E. (2010): The pneumococcal eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP co-localizes with the cell division apparatus and interacts with FtsZ *in vitro*. Microbiology, 156: 1697-1707.

Goffin, C., Ghuysen, J. M. (1998): Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. Microbiology and molecular biology reviews, 62: 1079-1093.

Gor, D. O., Ding, X., Briles, D. E., Jacobs, M. R., Greenspan, N. S. (2005): Relationship between surface accessibility for PpmA, PsaA, and PspA and antibody-mediated immunity to systemic infection by *Streptococcus pneumoniae*. Infection and immunity, 73: 1304-1312.

Gosink, K. K., Mann, E. R., Guglielmo, C., Tuomanen, E. I., Masure, H. R. (2000): Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Infection and immunity, 68: 5690-5695.

Greene, N. G., Fumeaux, C., Bernhardt, T. G. (2018): Conserved mechanism of cell-wall synthase regulation revealed by the identification of a new PBP activator in *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115: 3150-3155.

Griffith, F. (1928): The significance of pneumococcal types. Epidemiology & Infection, 27: 113-159.

Gueiros-Filho, F. J., Losick, R. (2002): A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. Genes & development, 16: 2544-2556.

Guiral, S., Mitchell, T. J., Martin, B., Claverys, J. P. (2005): Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102: 8710-8715.

Hamborsky, J., Kroger, A. (2015): Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases, E-Book: The Pink Book. Public Health Foundation.

Hammerschmidt, S., Bethe, G., H. Remane, P., Chhatwal, G. S. (1999): Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. Infection and immunity, 67: 1683-1687.

Hamoen, L. W., Meile, J. C., De Jong, W., Noirot, P., Errington, J. (2006): SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. Molecular microbiology, 59: 989-999.

Hanage, W. P., Fraser, C., Tang, J., Connor, T. R., Corander, J. (2009): Hyper-recombination, diversity, and antibiotic resistance in pneumococcus. Science, 324: 1454-1457.

Hanks, S. K., Quinn, A. M., Hunter, T. (1988): The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science, 241: 42-52.

Hansman, D., Bullen, M. M. (1967): A resistant pneumococcus. Lancet ii: 264-5.

Hathaway, L. J., Grandgirard, D., Valente, L. G., Täuber, M. G., Leib, S. L. (2016): *Streptococcus pneumoniae* capsule determines disease severity in experimental pneumococcal meningitis. Open biology, 6: 150269.

Håvarstein, L. S., Coomaraswamy, G., Morrison, D. A. (1995a): An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92: 11140-11144.

Håvarstein, L. S., Diep, D. B., & Nes, I. F. (1995b): A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. Molecular microbiology, 16: 229-240.

Håvarstein, L. S., Gaustad, P., Nes, I. F., Morrison, D. A. (1996): Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor. Molecular microbiology, 21: 863-869.

Helassa, N., Vollmer, W., Breukink, E., Vernet, T., Zapun, A. (2012): The membrane anchor of penicillin-binding protein PBP2a from *Streptococcus pneumoniae* influences peptidoglycan chain length. The FEBS journal, 279: 2071-2081.

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

Hermans, P. W., Adrian, P. V., Albert, C., Estevão, S., Hoogenboezem, T., Luijendijk, I. H., Hammerschmidt, S. (2006): The streptococcal lipoprotein rotamase A (SlrA) is a functional peptidyl-prolyl isomerase involved in pneumococcal colonization. Journal of Biological Chemistry, 281: 968-976.

Higgins, M. L., Shockman, G. D. (1976): Study of cycle of cell wall assembly in *Streptococcus faecalis* by three-dimensional reconstructions of thin sections of cells. Journal of bacteriology, 127: 1346-1358.

Holečková, N., Doubravová, L., Massidda, O., Molle, V., Buriánková, K., Benada, O., Branny, P. (2015): LocZ is a new cell division protein involved in proper septum placement in *Streptococcus pneumoniae*. mBio 6: e01700-14.

Hoskins, J., Matsushima, P., Mullen, D. L., Tang, J., Zhao, G., Meier, T. I., Jaskunas, S. R. (1999): Gene disruption studies of penicillin-binding proteins 1a, 1b, and 2a in *Streptococcus pneumoniae*. Journal of bacteriology, 181: 6552-6555.

Hui, F. M., Morrison, D. A. (1991): Genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: nucleotide sequence analysis shows comA, a gene required for competence induction, to be a member of the bacterial ATP-dependent transport protein family. Journal of bacteriology, 173: 372-381.

Humphrey, J. H. (1948): Hyaluronidase production by pneumococci. J Pathol Bacteriol, 55: 273-275

Chewapreecha, C., Harris, S. R., Croucher, N. J., Turner, C., Marttinen, P., Cheng, L., Bentley, S. D. (2014): Dense genomic sampling identifies highways of pneumococcal recombination. Nature genetics, 46: 305-309.

Jackson, L. A., Gurtman, A., van Cleeff, M., Jansen, K. U., Jayawardene, D., Devlin, C., Schmoele-Thoma, B. (2013a): Immunogenicity and safety of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine compared to a 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in pneumococcal vaccine-naive adults. Vaccine, 31: 3577-3584.

Jacobs, M. R., Koornhof, H. J., Robins-Browne, R. M., Stevenson, C. M., Vermaak, Z. A., Freiman, I., Austrian, R. (1978): Emergence of multiply resistant pneumococci. New England Journal of Medicine, 299: 735-740.

Jean, N. L., Bougault, C. M., Lodge, A., Derouaux, A., Callens, G., Egan, A. J., Simorre, J. P. (2014): Elongated structure of the outer-membrane activator of peptidoglycan synthesis LpoA: implications for PBP1A stimulation. Structure, 22: 1047-1054.

Jedrzejas, M. J. (2001): Pneumococcal virulence factors: structure and function. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65: 187-207.

Jedrzejas, M. J., Lamani, E., Becker, R. S. (2001): Characterization of selected strains of pneumococcal surface protein A. Journal of Biological Chemistry, 276: 33121-33128.

Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., Claverys, J. P. (2014a): Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. Nature Reviews Microbiology, 12: 181-196.

Jonsson, S., Musher, D. M., Chapman, A., Goree, A., Lawrence, E. C. (1985): Phagocytosis and killing of common bacterial pathogens of the lung by human alveolar macrophages. Journal of Infectious Diseases, 152: 4-13.

Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C., Andrew, P. W. (2008): The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nature Reviews Microbiology, 6: 288-301.

Kim, J. O., Weiser, J. N. (1998): Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Journal of Infectious Diseases, 177: 368-377.

Kocaoglu, O., Tsui, H. C. T., Winkler, M. E., Carlson, E. E. (2015): Profiling of β-lactam selectivity for penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* D39. Antimicrobial agents and chemotherapy, 59: 3548-3555.

Krupka, M., Rivas, G., Rico, A. I., Vicente, M. (2012): Key role of two terminal domains in the bidirectional polymerization of FtsA protein. Journal of Biological Chemistry, 287: 7756-7765.

Land, A. D., Tsui, H. C. T., Kocaoglu, O., Vella, S. A., Shaw, S. L., Keen, S. K., Winkler, M. E. (2013): Requirement of essential P bp2x and GpsB for septal ring closure in *Streptococcus pneumoniae* D39. Molecular microbiology, 90: 939-955.

Land, A. D., Winkler, M. E. (2011): The requirement for pneumococcal MreC and MreD is relieved by inactivation of the gene encoding PBP1a. Journal of bacteriology, 193: 4166-4179.

Lanie, J. A., Ng, W. L., Kazmierczak, K. M., Andrzejewski, T. M., Davidsen, T. M., Wayne, K. J., Winkler, M. E. (2007): Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. Journal of bacteriology, 189: 38-51.

Laurenceau, R., Péhau-Arnaudet, G., Baconnais, S., Gault, J., Malosse, C., Dujeancourt, A., Fronzes, R. (2013): A type IV pilus mediates DNA binding during natural transformation in *Streptococcus pneumoniae*. PLoS pathogens, 9: e1003473.

Le Gouëllec, A., Roux, L., Fadda, D., Massidda, O., Vernet, T., Zapun, A. (2008): Roles of pneumococcal DivIB in cell division. Journal of bacteriology, 190: 4501-4511.

Li, Y., Weinberger, D. M., Thompson, C. M., Trzciński, K., Lipsitch, M. (2013): Surface charge of *Streptococcus pneumoniae* predicts serotype distribution. Infection and immunity, 81: 4519-4524.

Linder, T. E., Daniels, R. L., Lim, D. J., DeMaria, T. F. (1994): Effect of intranasal inoculation of *Streptococcus pneumoniae* on the structure of the surface carbohydrates of the chinchilla eustachian tube and middle ear mucosa. Microbial pathogenesis, 16: 435-441.

Lisboa, J., Andreani, J., Sanchez, D., Boudes, M., Collinet, B., Liger, D., Quevillon-Cheruel, S. (2014): Molecular determinants of the DprA− RecA interaction for nucleation on ssDNA. Nucleic acids research, 42: 7395-7408.

Luck, J. N., Tettelin, H., Orihuela, C. J. (2020): Sugar-Coated Killer: Serotype 3 Pneumococcal Disease. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology: 10.

Ma, X., Ehrhardt, D. W., Margolin, W. (1996): Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93: 12998-13003.

MacLeod, C. M., Hodges, R. G., Heidelberger, M., Bernhard, W. G. (1945): Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. The Journal of experimental medicine, 82: 445.

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

Magee, A. D., Yother, J. (2001): Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. Infection and immunity, 69: 3755-3761.

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.

Mahone, C. R., Goley, E. D. (2020): Bacterial cell division at a glance. Journal of cell science, 133: jcs237057.

Marra, A., Lawson, S., Asundi, J. S., Brigham, D., Hromockyj, A. E. (2002): *In vivo* characterization of the psa genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection. Microbiology, 148: 1483-1491.

Martin, B., Soulet, A. L., Mirouze, N., Prudhomme, M., Mortier-Barrière, I., Granadel, C., Claverys, J. P. (2013): ComE/ComE~ P interplay dictates activation or extinction status of pneumococcal X-state (competence). Molecular microbiology, 87: 394-411.

Masomian, M., Ahmad, Z., Ti Gew, L., Poh, C. L. (2020): Development of next generation *Streptococcus pneumoniae* vaccines conferring broad protection. Vaccines, 8: 132.

Massidda, O., Anderluzzi, D., Friedli, L., Feger, G. (1998): Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. Microbiology, 144: 3069-3078.

Massidda, O., Nováková, L., Vollmer, W. (2013): From models to pathogens: how much have we learned about *Streptococcus pneumoniae* cell division? Environmental microbiology, 15: 3133-3157.

Meeske, A. J., Riley, E. P., Robins, W. P., Uehara, T., Mekalanos, J. J., Kahne, D., Rudner, D. Z. (2016): SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. Nature, 537: 634-638.

Melin, M., Trzcinski, K., Meri, S., Käyhty, H., Väkeväinen, M. (2010): The capsular serotype of *Streptococcus pneumoniae* is more important than the genetic background for resistance to complement. Infection and immunity, 78: 5262-5270.

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

Mitchell, A. M., Mitchell, T. J. (2010): *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. Clinical Microbiology and Infection, 16: 411-418.

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

Morlot, C., Noirclerc-Savoye, M., Zapun, A., Dideberg, O., Vernet, T. (2004): The D, D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. Molecular microbiology, 51: 1641-1648.

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

Mortier-Barrière, I., De Saizieu, A., Claverys, J. P., Martin, B. (1998): Competence-specific induction of recA is required for full recombination proficiency during transformation in *Streptococcus pneumoniae*. Molecular microbiology, 27: 159-170.

Mortier-Barrière, I., Velten, M., Dupaigne, P., Mirouze, N., Piétrement, O., McGovern, S., Claverys, J. P. (2007): A key presynaptic role in transformation for a wide spread bacterial protein: DprA conveys incoming ssDNA to RecA. Cell, 130: 824-836.

Moscoso, M., García, E., López, R. (2006): Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. Journal of bacteriology, 188: 7785-7795.

Mura, A., Fadda, D., Perez, A. J., Danforth, M. L., Musu, D., Rico, A. I., Massidda, O. (2017): Roles of the essential protein FtsA in cell growth and division in *Streptococcus pneumoniae*. Journal of bacteriology, 199: e00608-16.

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

Ng, W. L., Kazmierczak, K. M., Winkler, M. E. (2004): Defective cell wall synthesis in *Streptococcus pneumoniae* R6 depleted for the essential PcsB putative murein hydrolase or the VicR (YycF) response regulator. Molecular microbiology, 53: 1161-1175.

Ng, W. L., Robertson, G. T., Kazmierczak, K. M., Zhao, J., Gilmour, R., Winkler, M. E. (2003): Constitutive expression of PcsB suppresses the requirement for the essential VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae* R6. Molecular microbiology, 50: 1647-1663.

Noirclerc-Savoye, M., Le Gouëllec, 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*. Molecular microbiology, 55: 413-424.

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

Nováková, L., Sasková, L., Pallová, P., Janeček, J., Novotná, J., Ulrych, A., Branny, P. (2005): Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. The FEBS journal, 272: 1243-1254.

Ogunniyi, A. D., Folland, R. L., Briles, D. E., Hollingshead, S. K., Paton, J. C. (2000): Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. Infection and immunity, 68: 3028-3033.

Ogunniyi, A. D., Grabowicz, M., Briles, D. E., Cook, J., Paton, J. C. (2007): Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. Infection and immunity, 75: 350-357.

Ogunniyi, A. D., Grabowicz, M., Mahdi, L. K., Cook, J., Gordon, D. L., Sadlon, T. A., Paton, J. C. (2009): Pneumococcal histidine triad proteins are regulated by the Zn^{2+}-dependent repressor AdcR and inhibit complement deposition through the recruitment of complement factor H. The FASEB Journal, 23: 731-738.

Oliva, M. A., Halbedel, S., Freund, S. M., Dutow, P., Leonard, T. A., Veprintsev, D. B., Löwe, J. (2010): Features critical for membrane binding revealed by DivIVA crystal structure. The EMBO journal, 29: 1988-2001.

O'Malley, B. W., McKenna, N. J. (2008): Coactivators and corepressors: what's in a name?: 2213-2214.

Paik, J., Kern, I., Lurz, R., Hakenbeck, R. (1999): Mutational analysis of the *Streptococcus pneumoniae* bimodular class A penicillin-binding proteins. Journal of bacteriology, 181: 3852-3856.

Pallová, P., Hercík, K., Sasková, L., Nováková, L., Branny, P. (2007): A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP of *Streptococcus pneumoniae* acts as a dimer *in vivo*. Biochemical and biophysical research communications, 355: 526-530.

Paradis-Bleau, C., Markovski, M., Uehara, T., Lupoli, T. J., Walker, S., Kahne, D. E., Bernhardt, T. G. (2010): Lipoprotein cofactors located in the outer membrane activate bacterial cell wall polymerases. Cell, 143: 1110-1120.

Parker, D., Soong, G., Planet, P., Brower, J., Ratner, A. J., Prince, A. (2009): The NanA neuraminidase of *Streptococcus pneumoniae* is involved in biofilm formation. Infection and immunity, 77: 3722-3730.

Pasquina-Lemonche, L., Burns, J., Turner, R. D., Kumar, S., Tank, R., Mullin, N., Hobbs, J. K. (2020): The architecture of the Gram-positive bacterial cell wall. Nature, 582: 294-297.

Pazos, M., Vollmer, W. (2021): Regulation and function of class A Penicillin-binding proteins. Curr Opin Microbiol: 80-87.

Peters, K., Schweizer, I., Beilharz, K., Stahlmann, C., Veening, J. W., Hakenbeck, R., Denapaite, D. (2014): *Streptococcus pneumoniae* PBP2x mid-cell localization requires the C-terminal PASTA domains and is essential for cell shape maintenance. Molecular microbiology, 92: 733-755.

Peterson, S. N., Sung, C. K., Cline, R., Desai, B. V., Snesrud, E. C., Luo, P., Morrison, D. A. (2004): Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. Molecular microbiology, 51: 1051-1070.

Pinho, M. G., Kjos, M., Veening, J. W. (2013): How to get (a) round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. Nature reviews microbiology, 11: 601-614.

Pompeo, F., Foulquier, E., Serrano, B., Grangeasse, C., Galinier, A. (2015): Phosphorylation of the cell division protein GpsB regulates PrkC kinase activity through a negative feedback loop in *Bacillus subtilis*. Molecular microbiology, 97: 139-150.

Pracht, D., Elm, C., Gerber, J., Bergmann, S., Rohde, M., Seiler, M., Hammerschmidt, S. (2005): PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. Infection and immunity, 73: 2680-2689.

Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., Claverys, J. P. (2006): Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. Science, 313: 89-92.

Quevillon-Cheruel, S., Campo, N., Mirouze, N., Mortier-Barrière, I., Brooks, M. A., Boudes, M., Polard, P. (2012): Structure–function analysis of pneumococcal DprA protein reveals that dimerization is crucial for loading RecA recombinase onto DNA during transformation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109: E2466-E2475.

Ren, B., Szalai, A. J., Thomas, O., Hollingshead, S. K., Briles, D. E. (2003): Both family 1 and family 2 PspA proteins can inhibit complement deposition and confer virulence to a capsular serotype 3 strain of *Streptococcus pneumoniae*. Infection and immunity, 71: 75-85.

Rismondo, J., Cleverley, R. M., Lane, H. V., Großhennig, S., Steglich, A., Möller, L., Halbedel, S. (2016): Structure of the bacterial cell division determinant GpsB and its interaction with penicillin-binding proteins. Molecular microbiology, 99: 978-998.

Rowe, H. M., Karlsson, E., Echlin, H., Chang, T. C., Wang, L., van Opijnen, T., Rosch, J. W. (2019): Bacterial factors required for transmission of *Streptococcus pneumoniae* in mammalian hosts. Cell host & microbe, 25: 884-891.

Rued, B. E., Zheng, J. J., Mura, A., Tsui, H. C. T., Boersma, M. J., Mazny, J. L., Winkler, M. E. (2017): Suppression and synthetic-lethal genetic relationships of *ΔgpsB* mutations indicate that GpsB mediates protein phosphorylation and penicillin-binding protein interactions in *Streptococcus pneumoniae* D39. Molecular microbiology, 103: 931-957.

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*. Journal of bacteriology, 189: 4168-4179.

Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., Charlier, P. (2008): The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. FEMS microbiology reviews, 32: 234-258.

Scott, N. R., Mann, B., Tuomanen, E. I., Orihuela, C. J. (2021): Multi-Valent Protein Hybrid Pneumococcal Vaccines: A Strategy for the Next Generation of Vaccines. Vaccines, 9: 209.

Shaik, M. M., Lombardi, C., Trindade, D. M., Fenel, D., Schoehn, G., Di Guilmi, A. M., Dessen, A. (2015): A structural snapshot of type II pilus formation in *Streptococcus pneumoniae*. Journal of biological chemistry, 290: 22581-22592.

Sham, L. T., Barendt, S. M., Kopecky, K. E., Winkler, M. E. (2011): Essential PcsB putative peptidoglycan hydrolase interacts with the essential FtsX Spn cell division protein in *Streptococcus pneumoniae* D39. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108: E1061-E1069.

Skov Sørensen, U. B., Blom, J., Birch-Andersen, A., Henrichsen, J. (1988): Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in pneumococci. Infection and immunity, 56: 1890-1896.

Stamsås, G. A., Straume, D., Ruud Winther, A., Kjos, M., Frantzen, C. A., Håvarstein, L. S. (2017): Identification of EloR (Spr1851) as a regulator of cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. Molecular microbiology, 105: 954-967.

Straume, D., Piechowiak, K. W., Olsen, S., Stamsås, G. A., Berg, K. H., Kjos, M., Håvarstein, L. S. (2020): Class A PBPs have a distinct and unique role in the construction of the pneumococcal cell wall. Proceedings of the National Academy of Sciences, 117: 6129-6138.

Straume, D., Stamsås, G. A., Håvarstein, L. S. (2015): Natural transformation and genome evolution in *Streptococcus pneumoniae*. Infection, Genetics and Evolution, 33: 371-380.

Sullivan, N. L., Marquis, K. A., & Rudner, D. Z. (2009): Recruitment of SMC by ParB-parS organizes the origin region and promotes efficient chromosome segregation. Cell, 137: 697-707.

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

Tettelin, H., Nelson, K. E., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Read, T. D., Peterson, S., Fraser, C. M. (2001): Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. Science, 293: 498-506.

Thanbichler, M., Shapiro, L. (2006): MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in Caulobacter. Cell, 126: 147-162.

Toro, E., Shapiro, L. (2010): Bacterial chromosome organization and segregation. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2: a000349.

Trappetti, C., Kadioglu, A., Carter, M., Hayre, J., Iannelli, F., Pozzi, G., Oggioni, M. R. (2009): Sialic acid: a preventable signal for pneumococcal biofilm formation, colonization, and invasion of the host. The Journal of infectious diseases, 199: 1497-1505.

Treuner-Lange, A., Aguiluz, K., van der Does, C., Gómez-Santos, N., Harms, A., Schumacher, D., Søgaard-Andersen, L. (2013): PomZ, a ParA-like protein, regulates Z-ring formation and cell division in *Myxococcus xanthus*. Molecular microbiology, 87: 235-253.

Trouve, J., Zapun, A., Arthaud, C., Durmort, C., Di Guilmi, A. M., Söderström, B., Morlot, C. (2021): Nanoscale dynamics of peptidoglycan assembly during the cell cycle of *Streptococcus pneumoniae*. Current Biology.

Tsui, H. C. T., Zheng, J. J., Magallon, A. N., Ryan, J. D., Yunck, R., Rued, B. E., Winkler, M. E. (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. Molecular microbiology, 100: 1039-1065.

Tuomanen, E. (1999): Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. Current opinion in microbiology, 2: 35-39.

Ulijasz, A. T., Falk, S. P., Weisblum, B. (2009): Phosphorylation of the RitR DNA-binding domain by a Ser–Thr phosphokinase: implications for global gene regulation in the streptococci. Molecular microbiology, 71: 382-390.

Ulrych, A., Holečková, N., Goldová, J., Doubravová, L., Benada, O., Kofroňová, O., 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 microbiology, 16: 1-19.

Vaughan, S., Wickstead, B., Gull, K., Addinall, S. G. (2004): Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. Journal of molecular evolution, 58: 19-29.

Verhoeven, D., Xu, Q., Pichichero, M. E. (2014): Vaccination with a *Streptococcus pneumoniae* trivalent recombinant PcpA, PhtD and PlyD1 protein vaccine candidate protects against lethal pneumonia in an infant murine model. Vaccine, 32: 3205-3210.

Vollmer, W., Blanot, D., De Pedro, M. A. (2008): Peptidoglycan structure and architecture. FEMS microbiology reviews, 32: 149-167.

Vollmer, W., Massidda, O., & Tomasz, A. (2019): The cell wall of *Streptococcus pneumoniae*. Microbiology spectrum, 7: 7-3.

Watson, D. A., Musher, D. M., Jacobson, J. W., Verhoef, J. (1993): A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. Clinical infectious diseases. 17: 913-924.

Weinberger, D. M., Trzciński, K., Lu, Y. J., Bogaert, D., Brandes, A., Galagan, J., Lipsitch, M. (2009): Pneumococcal capsular polysaccharide structure predicts serotype prevalence. PLoS pathogens, 5: e1000476.

WHO, 2018. Pneumococcus. Vaccine-Preventable Diseases. Surveillance Standards.

Yother, J. (2011): Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. Annual review of microbiology, 65: 563-581.

Zapun, A., Vernet, T., & Pinho, M. G. (2008): The different shapes of cocci. FEMS microbiology reviews, 32: 345-360.

Zhang, J. R., Mostov, K. E., Lamm, M. E., Nanno, M., Shimida, S. I., Ohwaki, M., Tuomanen, E. (2000): The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. Cell, 102: 827-837.

Zheng, J. J., Perez, A. J., Tsui, H. C. T., Massidda, O., Winkler, M. E. (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. Molecular microbiology, 106: 793-814.

Zucchini, L., Mercy, C., Garcia, P. S., Cluzel, C., Gueguen-Chaignon, V., Galisson, F., Grangeasse, C. (2018): PASTA repeats of the protein kinase StkP interconnect cell constriction and separation of *Streptococcus pneumoniae*. Nature microbiology, 3: 197-209.