

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

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Zuzana Stehlíková

Studium funkce proteinu Spr1057 *Streptococcus pneumoniae*
Functional analysis of Spr1057 protein *Streptococcus pneumoniae*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Pavel Branny, CSc.

Praha 2014

Prohlášení:

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

V Praze, 29.7.2014

Zuzana Stehlíková

Poděkování:

Za odborné vedení této práce děkuji Pavlovi Brannymu. Dále patří můj dík především Janě Goldové a Aleši Ulrychovi za obětavou pomoc v laboratoři, za čas který mi věnovali a za jejich trpělivost a ochotu při sepisování diplomové práce. Za všestranné rady a velmi příjemné a přátelské pracovní prostředí pak děkuji celému kolektivu Laboratoře buněčné signalizace.

Své rodině a všem přátelům děkuji za důvěru, za jejich podporu a povzbuzení. Práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České republiky (projekty byly registrovány pod čísly 302/12/0256 a 207/12/1568).

Studium funkce proteinu Spr1057 *Streptococcus pneumoniae*

V genomu významného lidského patogena *Streptococcus pneumoniae* je kódován pouze jediný gen pro serin/threoninovou proteinkinázu eukaryotního typu, označovanou StkP.

Analýzou globálního transkriptomu mutantního kmene s delecí genu pro StkP byl identifikován gen *spr1057*, jehož exprese byla v kmeni Δ *stkP* významně reprimována. Produktem tohoto genu je protein Spr1057, člen enzymatické skupiny haloacid dehalogenáz. Z výsledků biochemické charakterizace a testování substrátové specifity proteinu Spr1057 byla potvrzena jeho nukleotidázová aktivita v podmínkách *in vitro*.

Za účelem studia funkce tohoto proteinu *in vivo* byly připraveny mutantní kmeny *S. pneumoniae*. Růstové vlastnosti vytvořených kmenů byly sledovány v přítomnosti modifikovaných nukleotidů 5-fluoro-2'-deoxyuridinu (5-FdU) a 5-bromo-2'-deoxyuridinu (5-BrdU) a byla porovnávána míra inkorporace 5-BrdU do chromozomální DNA mutantních kmenů oproti divokému kmeni *S. pneumoniae*.

Růst kmene Δ *spr1057* byl v přítomnosti modifikovaných nukleotidů výrazně inhibován a zaznamenána byla rovněž okamžitá inkorporace 5-BrdU do DNA, zatímco u divokého kmene k inhibici růstu ani inkorporaci 5-BrdU do DNA nedošlo. Expese ektopické kopie genu *spr1057* z indukibilního promotoru vedla ke komplementaci deficiencie proteinu Spr1057 a k obnovení fenotypu na úroveň kmene bez přidaného toxického nukleotidu.

Protein Spr1057 je nukleotidáza s „*house cleaning*“ funkcí, jejíž přítomnost má zásadní vliv na degradaci toxických modifikovaných bazí v buňkách *S. pneumoniae*.

Klíčová slova: serin/threoninová proteinkináza, Spr1057, YjjG, modifikované nukleotidy, *Streptococcus pneumoniae*, nukleotidáza

Functional analysis of Spr1057 protein *Streptococcus pneumoniae*

The genome of important human pathogen *Streptococcus pneumoniae* encodes a single gene of an eukaryotic type serine/threonine protein kinase StkP.

Analysis of the global transcriptome of a mutant strain with inactivated *stkP* gene identified *spr1057* gene whose expression was significantly repressed in Δ *stkP* strain. This gene is coding for Spr1057 protein which is a member of haloacid dehalogenase family. The analysis of the substrate specificity of the Spr1057 protein confirmed nucleotidase activity of this protein *in vitro*.

To study the function of this protein *in vivo* we prepared several mutant *S. pneumoniae* strains. Growth characteristics of mutant strains were observed in the presence of modified nucleotides, 5-fluoro-2'-deoxyuridine (5-FdU) and 5-bromo-2'-deoxyuridine (5-BrdU). In addition, we monitored the rate of incorporation of 5-BrdU into the chromosomal DNA of the mutant strains in comparison with the wild type *S. pneumoniae* strain.

The growth of the Δ *spr1057* strain was significantly inhibited in the presence of the modified nucleotides and increased incorporation of 5-BrdU in DNA was showed. Neither growth inhibition nor incorporation of 5-BrdU in DNA was observed for the wild type strain. The expression of an ectopic copy of *spr1057* gene from inducible promotor resulted in complementation of Spr1057 protein deficiency and rescued the phenotype to the level without toxic nucleotide added.

Spr1057 protein is a nucleotidase with a house cleaning function, whose presence has a major influence on the degradation of toxic modified nucleotides in *S. pneumoniae* cells.

Keywords: serine/threonine protein kinase, Spr1057, YjjG, modified nucleotides, *Streptococcus pneumoniae*, nucleotidase

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	12
2.1.1	Od Pasteura a Sternberga po současné poznatky.....	12
2.1.2	Stavba buněčné stěny <i>S. pneumoniae</i>	14
2.1.3	Patogenita a virulence <i>S. pneumoniae</i>	15
2.1.3.1	<i>Pouzdro</i>	15
2.1.3.2	<i>Extracelulární proteiny</i>	16
2.1.3.3	<i>Cholin</i>	16
2.1.3.4	<i>Pneumolyzin</i>	16
2.1.4	Patogeneze, obrana organismu a terapie.....	18
2.1.5	Přirozená kompetence a genetická transformace u pneumokoka.....	19
2.1.5.1	<i>Produkce CSP a genetická podstata quorum sensing</i>	20
2.2	Komunikace bakterií s vnějším prostředím	21
2.2.1	Přenos signálů pomocí dvousložkových systémů <i>S. pneumoniae</i>	22
2.2.2	Ser/Thr proteinkinázy a proteinfosfatázy eukaryotního typu.....	23
2.2.2.1	<i>Ser/Thr proteinkináza StkP a proteinfosfatáza PhpP S. pneumoniae</i>	24
2.3	Hydrolázy nadčeledi haloacid-dehalogenáz („ <i>HAD-like hydrolases superfamily</i> “)	27
2.4	„ <i>House - cleaning</i> “ fosfatázy nadčeledi haloacid dehalogenáz.....	29
3	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	31
4	MATERIÁL A METODY	32
4.1	Materiál.....	32
4.1.1	Bakteriální kmeny a vektory	32
4.1.2	Oligonukleotidy.....	34
4.1.3	Enzymy	36
4.1.4	Protilátky.....	36
4.1.5	Pufry, roztoky a standardy	37
4.1.6	Kultivační půdy a použitá antibiotika	38
4.1.6.1	<i>Média pro kultivaci S. pneumoniae</i>	38
4.1.6.2	<i>Média pro kultivaci E. coli</i>	39
4.1.6.3	<i>Antibiotika</i>	39
4.1.7	Chemikálie.....	40

4.1.8	Komerční soupravy (kity), membrány, filmy a kazety.....	42
4.1.9	Laboratorní přístroje, programy a software.....	43
4.2	Metody	45
4.2.1	Manipulace s DNA.....	45
4.2.1.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR) a následná purifikace PCR produktů.....	45
4.2.1.2	Agarová elektroforéza a extrakce DNA z gelu.....	45
4.2.1.3	Štěpení DNA pomocí restričních endonukleáz.....	45
4.2.1.4	Ligace.....	46
4.2.2	Manipulace s RNA.....	46
4.2.2.1	Izolace celkové RNA <i>S. pneumoniae</i>	46
4.2.2.2	Syntéza cDNA (RT-PCR).....	47
4.2.2.3	Kotranskripční analýza a RT-PCR.....	47
4.2.2.4	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR).....	48
4.2.3	Manipulace s proteiny	49
4.2.3.1	Izolace proteinů – mechanická dezintegrace buněk.....	49
4.2.3.2	Stanovení koncentrace proteinů.....	50
4.2.3.3	Izolace proteinů – chemická dezintegrace buněk.....	50
4.2.3.4	Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS (SDS-PAGE).....	50
4.2.3.5	Přenos proteinů na membránu („Western blotting“) a jejich detekce	51
4.2.4	Manipulace s buňkami <i>E. coli</i>	52
4.2.4.1	Kultivace <i>E. coli</i>	52
4.2.4.2	Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i> DH5 α	52
4.2.4.3	Transformace <i>E. coli</i>	53
4.2.4.4	Izolace plazmidové DNA.....	53
4.2.5	Manipulace s buňkami <i>S. pneumoniae</i>	53
4.2.5.1	Kultivace <i>S. pneumoniae</i>	53
4.2.5.2	Sledování citlivosti bakterií k modifikovaným nukleotidům.....	54
4.2.5.3	Sledování inkorporace 5-BrdU do DNA <i>S. pneumoniae</i>	54
4.2.5.4	Transformace DNA do <i>S. pneumoniae</i>	54
4.2.5.5	Izolace chromozomální DNA <i>S. pneumoniae</i>	55
5	VÝSLEDKY	56
5.1.	Příprava mutantních kmenů <i>S. pneumoniae</i>	57
5.1.1	Kmen Δ <i>spr1057 S. pneumoniae</i>	57
5.1.2	Komplementační kmen Δ <i>spr1057 pZn-spr1057-FLAG S. pneumoniae</i>	59
5.1.3	Kmen <i>S. pneumoniae</i> s nadprodukcí proteinu Spr1057.....	61
5.1.4	Kmen Δ <i>stkP S. pneumoniae</i> s indukovanou expresí <i>spr1057-FLAG</i>	61

5.1.5	Kmen exprimující <i>spr1057</i> -FLAG z nativního promotoru	62
5.2	Vyloučení polárního efektu delece genu <i>spr1057</i> na sousední geny a testování exprese genů <i>spr1055</i> - <i>spr1058</i> na pozadí mutantních kmenů Sp158, Sp167 a Sp10.....	65
5.3	Kotranskripční analýza předpokládaného operonu	66
5.4	Indukce exprese genu <i>spr1057</i> a monitorování růstu kmenů <i>S. pneumoniae</i>	68
5.5	Citlivost <i>S. pneumoniae</i> k modifikovaným nukleotidům.....	72
5.5.1	Růstové vlastnosti kmenů v přítomnosti 5-FdU.....	73
5.5.2	Růstové vlastnosti kmenů v přítomnosti 5-BrdU.....	75
5.5.3	Inkorporace 5-BrdU do chromozomální DNA <i>S. pneumoniae</i>	77
6	DISKUZE	79
6.1	<i>Spr1057 S. pneumoniae</i> jako homolog YjjG <i>E. coli</i>	79
6.2	Příprava mutantních kmenů a vyloučení polárního efektu delece genu <i>spr1057</i>	80
6.3	Kotranskripční analýza předpokládaného operonu	81
6.4	Růstové charakteristiky mutantních kmenů <i>S. pneumoniae</i>	82
6.5	Citlivost <i>S. pneumoniae</i> k modifikovaným nukleotidům.....	83
7	SOUHRN	86
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	87

SEZNAM ZKRATEK

A ₂₆₀ , A ₂₈₀	absorbance při 260 nm / absorbance při 280 nm
Anti	protilátka
BCA	kyselina bicinchoninová
BSA	hovězí sérový albumin
5-BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
cDNA	„complementary“ DNA
CSP	kompetenci stimulující peptid
DTT	dithiothreitol
5-FdU	5-fluoro-2'-deoxyuridin
FLAG	epitop složený z aminokyselin DYKDDDDK
NaOAc	octan sodný
OD ₄₀₀ , OD ₆₀₀	optická denzita při 400 nm nebo 600 nm
pb	páry bazí
POD	peroxidáza
pZn	zinkový promotor
PVDF	polyvinylidenfluorid
RT-PCR	reverzní transkriptázová PCR
T _m	teplota tání
qPCR	kvantitativní („real-time“) PCR

1 ÚVOD

Z pohledu bakteriální buňky je okolní svět nestálé, rychle se měnící prostředí, v němž jsou bakterie nepřetržitě vystavovány působení toxických látek, pocházejících jak z vnějšího prostředí, tak z vlastního metabolismu. V takovém prostředí je umožněno přežít a množit se jen za podmínek včasné adaptace. Tato adaptace však není možná bez předchozí komunikace bakterií s vnějším prostředím, která je uskutečňována zejména přenosem signálu mechanismem fosforylace a defosforylace proteinů. Zmíněné procesy aktivace a deaktivace proteinů jsou posttranslačními modifikacemi proteinů, které jsou katalyzovány proteinkinázami a s nimi asociovanými proteinfosfatázami.

Koncem 80. let byly v signalizačních drahách bakterií objeveny serin/threoninové proteinkinázy a proteinfosfatázy eukaryotního typu, jejichž studiem se u gram-pozitivní bakterie *Streptococcus pneumoniae* zabývá naše laboratoř. *S. pneumoniae* je pro studium těchto signalizačních enzymů velmi vhodným modelovým organismem, neboť nese v genomu pouze jedinou kopii genu pro proteinkinázu eukaryotního typu StkP a s ní asociovanou proteinfosfatázu PhpP.

Při studiu vlivu StkP na buněčné funkce *S. pneumoniae* byl analýzou globálního transkriptomu mutantního kmene s delecí v genu kódující StkP v naší laboratoři identifikován gen *spr1057*, jehož exprese byla v mutantním kmeni Δ *stkP* výrazně reprimována. Tento původně hypotetický protein nadčeledi haloacid dehalogenáz byl identifikován jako sekvenční a funkční homolog proteinu YjjG *Escherichia coli*. Odhalení nukleotidázové funkce proteinu YjjG *E. coli* *in vitro* a posléze *in vivo* vedlo k sestavení experimentů, jejichž účelem bylo charakterizovat protein Spr1057 *S. pneumoniae*. Z výsledků biochemické charakterizace a testování substrátové specifity tohoto proteinu byla potvrzena jeho nukleotidázová aktivita a „house cleaning“ funkce v podmínkách *in vitro*. Předkládaná diplomová práce se zabývá objasněním funkce tohoto proteinu studiem mutantních kmenů *S. pneumoniae* *in vivo*.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 *Streptococcus pneumoniae*

2.1.1 Od Pasteura a Sternberga po současné poznatky

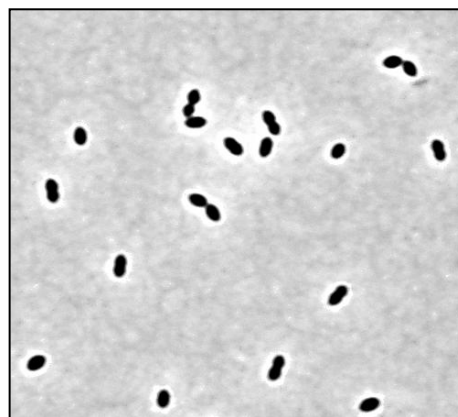
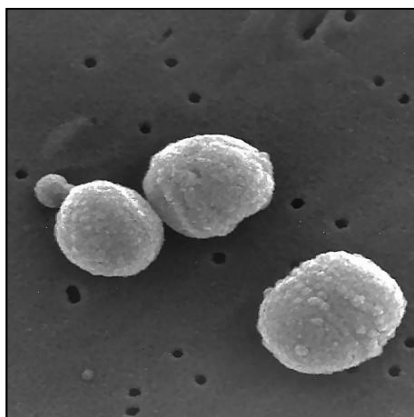
První zmínky o bakterii *Streptococcus pneumoniae* sahají až do druhé poloviny 19. století. Tehdy bakterii nezávisle na sobě objevili Louis Pasteur a George Miller Sternberg.

O necelé století později (1928) se *Streptococcus pneumoniae* významně zapsal do historie při výzkumu přirozené kompetence, kdy Frederick Griffith zjistil, že bakterie jsou schopné přijmout cizorodou DNA z prostředí (Griffith, 1928). Podstatu transformace pak později objasnili Avery, McLeod a McCarty (Avery *et al.*, 1944).

Od té doby patří *S. pneumoniae* (též pneumokok) mezi hlavní objekty vědeckých studií, neboť to není jen modelový organismus, ale také významný lidský patogen.

Taxonomické zařazení *Streptococcus pneumoniae*:

Doména	Bacteria
Oddělení	Firmicutes
Třída	Bacilli
Řád	Lactobacillales
Čeleď	Streptococcaceae
Rod	<i>Streptococcus</i>
Druh	<i>Streptococcus pneumoniae</i>



Obr. 2.1. Mikroskopické snímky *S. pneumoniae* pořízené elektronovou mikroskopií a světelnou mikroskopií s použitím fázového kontrastu (www.biomed.cas.cz)

Streptococcus pneumoniae je gram-pozitivní diplokok lancetovitého tvaru. Je anaerobní, aerotolerantní a stejně jako ostatní příslušníci rodu *Streptococcus*, i pneumokok získává energii fermentací.

Pneumokoky se běžně vyskytují jako komenzálové horních cest dýchacích, kde se nacházejí ve své nevirulentní (neopouzdržené) formě. Při změně okolních podmínek ale mohou pouzdro vytvořit a stát se virulentními. Řadíme je proto do skupiny podmíněně patogenních bakterií. Jako většina ostatních patogenních (či podmíněně patogenních) bakterií je i pneumokok mezofilní (optimální teplota růstu mezi 20 - 40°C) a je pro něj tedy ideální teplota prostředí okolo 37°C. Nejlépe se mu daří při neutrálním pH. Za nepříznivých podmínek netvoří spory.

Podle schopnosti rozrušovat membránu erytrocytů řadíme pneumokoky mezi tzv. alfa-hemolytické bakterie, jejichž růst je na krevním agaru provázen prosvětlením blízkého okolí kolonií, označovaného jako viridace (zelené zabarvení okolo kolonií, způsobené přeměnou červeného hemoglobinu na zelený verdoglobin).

S ohledem na přítomnost pouzdra mohou pneumokoky na pevných médiích vytvářet až tři typy kolonií:

- Typ „R“ je charakteristický pro neopouzdržené a tudíž nevirulentní kmeny. Pneumokoky rostou v tzv. drsných („Rough“) koloniích.
- Typy kolonií „S“ a „M“ tvoří kmeny virulentní, které obklopuje polysacharidové pouzdro. Tyto kmeny rostou na pevných médiích v hladkých („Smooth“), až mukózních („Mucous“) koloniích. U mukózních forem můžeme ještě navíc rozlišit dvě varianty, a to průhledné („transparent“) a neprůhledné („opaque“). Pro přehlednost jsou fenotypové rozdíly těchto dvou variant shrnuty v tabulce 2.1, která je součástí kapitoly Patogenita a virulence *Streptococcus pneumoniae*.

Do dnešní doby jsou známy úplné sekvence několika kmenů *S. pneumoniae*, například virulentních kmenů D39 (Lanie *et al.*, 2007) a TIGR4 (Tettelin *et al.*, 2001), laboratorně používaného avirulentního kmene R6 (Hoskins *et al.*, 2001) a dále částečné sekvence pro několik dalších, především klinických izolátů. Sekvence virulentních a avirulentních kmenů se liší zejména přítomností 7,5 kbp dlouhého úseku, který kóduje geny pro tvorbu pouzdra.

2.1.2 Stavba buněčné stěny *S. pneumoniae*

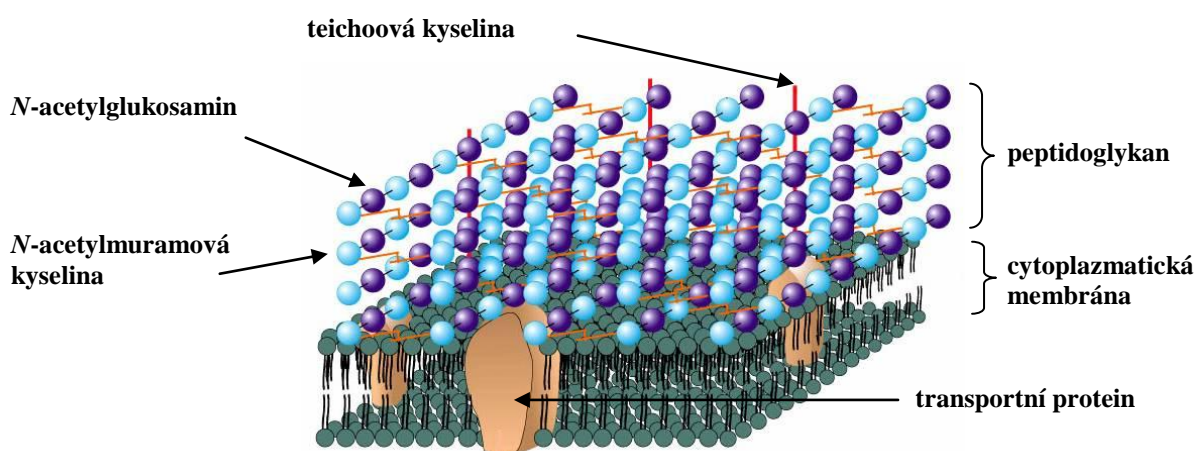
Buněčná stěna gram-pozitivních bakterií se skládá ze dvou základních složek, z peptidoglykanu a teichoových kyselin. Nedílnou součástí buněčné stěny jsou také transportní proteiny, zajišťující výměnu látek mezi buňkou a prostředím.

Peptidoglykan je biopolymer *N*-acetylglukosaminu a *N*-acetylmuramové kyseliny, které jsou lineárně propojené β -1,4-glykosidickými vazbami. Hustá síťovina je pak dotvořena vzájemným propojením krátkých peptidů, navázaných na hydroxylovém konci *N*-acetylmuramové kyseliny.

Teichoové kyseliny se nacházejí pouze u gram-pozitivních bakterií. Ukotveny jsou buď v cytoplazmatické membráně (lipoteichoové kyseliny) nebo jsou kovalentně připevněny k muramové kyselině peptidoglykanu (stěnové teichoové kyseliny), odkud procházejí až na povrch buňky (Brown *et al.*, 2013). Zde slouží například jako adheziny, antigeny, či pro vychytávání hořčnatých a vápenatých kationtů z prostředí, čímž ovlivňují propustnost membrány a zajišťují její integritu (Swoboda *et al.*, 2010). Stěnové teichoové kyseliny díky tzv. cholin-vazebným proteinům váží cholinové zbytky, nezbytné pro aktivitu lytických enzymů.

Teichoové kyseliny *S. pneumoniae* jsou známé také jako tzv. C-polysacharidy, s nimiž reaguje protein akutní fáze zánětu (C-reaktivní protein), přítomný v séru savčích buněk (Fischer *et al.*, 1993; Vialle *et al.*, 2005).

Buněčná stěna gram-pozitivních bakterií, až na výjimky (mykobakterie, nokardie a korynebakterie), neobsahuje lipidy.



Obr. 2.2. Buněčná stěna gram-pozitivních bakterií

(Převzato a upraveno z <http://www2.bc.cc.ca.us/bio16/PAL/Lecture%202.htm>).

2.1.3 Patogenita a virulence *S. pneumoniae*

Pojmy patogenita a virulence jsou v souvislosti s bakteriemi skloňovány velmi často. Patogenita se týká určitého druhu bakterií a je charakterizována schopností poškodit hostitele a vyvolat onemocnění. Kvantitativním vyjádřením patogenity je pak virulence, která je vlastností jednotlivých bakteriálních kmenů. Virulenčními faktory bakteriálních kmenů rozumíme proteiny a jiné molekuly, které umožňují mikroorganismu proniknout do hostitele a úspěšně se v něm pomnožit.

Z obecného hlediska lze virulenční faktory rozdělit do dvou skupin, a to podle toho, ve kterých stádiích onemocnění se uplatňují. První skupina zahrnuje faktory na povrchu neporušených buněk pneumokoků, působících zejména v prvních fázích onemocnění a druhá skupina faktory virulence uvolněné po rozrušení bakteriálních buněk (Alonso de Velasco *et al.*, 1995). Vybrané virulenční faktory popisují následující podkapitoly.

2.1.3.1 Pouzdro

Polysacharidové pouzdro patří mezi významné nástroje virulence. Je to vnější obal bakteriální buňky, který, pokud je přítomen, obklopuje celou dvojici pneumokoků. Funguje nejen jako ochranná vrstva, která izoluje bakterii od okolního prostředí a umožňuje tak unikat fagocytóze, ale je také důležité pro adhezi a má antigenní vlastnosti (López, 2006). Podle chemické struktury polysacharidu pouzdra se u pneumokoků rozlišuje více než devadesát různých sérotypů, z nichž některé se využívají pro vakcinaci (Lovečková *et al.*, 2002).

Pneumokoky dokáží regulovat syntézu pouzdra v závislosti na tom, v jakém prostředí se právě nacházejí. Pro systémové onemocnění je nezbytná maximální exprese pouzdrného polysacharidu (tzv. „neprůhledná varianta“ kolonií), neboť díky němu odolávají fagocytóze a tak snadněji unikají imunitnímu systému hostitele. Naopak pro kolonizaci hostitele je výhodnější tenčí pouzdro, které umožní lepší adhezi na sliznice (tzv. „průhledná varianta“ kolonií, tabulka 2.1) (Morona *et al.*, 2006).

K syntéze pouzdra jsou nezbytné geny lokusu *cps*, a to *cpsA* až *cpsD*. *CpsD* je tyrosinová proteinkináza, která svou autofosforylací negativně působí na syntézu pouzdrného polysacharidu (Morona *et al.*, 2000).

Tabulka 2.1. Fenotypové rozdíly průhledných a neprůhledných mukózních kolonií *S. pneumoniae* (Gillespie a Balakrishnan, 2000).

FENOTYP	PRŮHLEDNÁ VARIANTA	NEPRŮHLEDNÁ VARIANTA
Tvorba pouzdra	+	+++
Přítomnost teichoové kyseliny	++++	+
Povrchová exprese <i>lytA</i>	+++	+
Produkce PspA	+	++
Schopnost kolonizace	+++	+
Virulence	+	+++

+ označuje intenzitu daného fenotypu

2.1.3.2 *Extracelulární proteiny*

Na adhezi pneumokoků na sliznice hostitele se podílí zejména povrchový antigen A (PsaA) (Rajam *et al.*, 2008), povrchový protein A (PspA) (Yother a White, 1994) a cholin vazebný protein A (CbpA) (Rosenow *et al.*, 1997). Schopnost adherovat na sliznice hostitele úzce souvisí s opacitou, která se dá snadno pozorovat kultivací na krevním agaru.

2.1.3.3 *Cholin*

Cholin bývá také často považován za faktor virulence, neboť představuje pro pneumokoky nezbytný růstový faktor (Rane a Subbarow, 1940), důležitý jak pro aktivitu lytických enzymů, tak pro přijímání cizorodé DNA. Pneumokoky získávají cholin z média a zabudovávají ho do teichoových kyselin. Nedostatek či absence cholinu v prostředí vedou k tvorbě dlouhých řetězků buněk (Tomasz, 1968), k rezistenci k autolýze a ke ztrátě virulence (Kharat a Tomasz, 2006).

2.1.3.4 *Pneumolysin*

Po zahájení infekce a rozkladu buněk pneumokoků autolytickými enzymy se do prostředí uvolňují intracelulární virulenční faktory. Mezi nejznámější patří pneumolysin, toxin, který se váže na cholesterol v hostitelské membráně, v níž následně tvoří póry (Hirst *et al.*, 2004).

Tyto a některé další faktory virulence *S. pneumoniae* jsou vypsány v tabulce 2.2, upravené podle Jedrzejcas (2001).

Tabulka 2.2. Hlavní virulenční faktory *Streptococcus pneumoniae* (Jedrzejcas, 2001).

VIRULENČNÍ FAKTOR	POPIS	ZDROJ
CbpA	Cholin vazebný protein A; adhezin <i>S. pneumoniae</i>	Rosenow <i>et al.</i> , 1997
LytA	Amidáza; separace dceřiných buněk během buněčného dělení; důležitý pro buněčnou lyzi; cholin-vazebný protein	Ronda <i>et al.</i> , 1987
Hyaluronidáza	Průnik a šíření bakterií; štěpení kyseliny hyaluronové	Ponnuraj a Jedrzejcas, 2000
Neuraminidáza	Šíření bakterií v infikované tkáni; štěpení terminální kyseliny sialové z glykoproteinů a glykolipidů	Kelly a Greiff, 1970
Pouzdro	Ochrana buňky před imunitním systémem hostitele	
Pneumolysin	Cytoplazmatický enzym, uvolněný funkcí LytA	Jedrzejcas, 2001
PsaA	Povrchový antigen A; transport Mn^{2+} a Zn^{2+} do cytoplazmy	Rajam <i>et al.</i> , 2008
PspA	Ochrana před komplementem; cholin-vazebný protein	Yother a White, 1994

Spolupráce několika virulenčních faktorů, především neuraminidázy a hyaluronidázy, umožňuje pneumokokům invazi do sterilních prostor hostitelského organismu. Pro penetraci do krevního řečiště je nezbytný protein CbpA (Ring *et al.*, 1998).

2.1.4 Patogeneze, obrana organismu a terapie

Pochopení vzniku a vývoje určitého onemocnění znamená porozumět způsobu, jak patogen do organismu vniká, kde převážně působí a co hostiteli způsobuje. To vše pak umožní lépe zvolit terapii a dané onemocnění léčit.

Důležitými předpoklady proto, aby se mohl *S. pneumoniae* uplatnit jako patogen, je jednak předchozí kolonizace prostředí (Faden *et al.*, 1997) a jednak vhodné okolní podmínky. Ty často nastávají po prodělané virové infekci, kdy dojde ke snížení lokální imunity.

Po kolonizaci pak mohou pneumokoky pronikat do sterilních prostor hostitelského organismu (dolní cesty dýchací, oblast středouší, krevní oběh, mozkové a míšní pleny) a vyvolat až systémové infekce. V dalších fázích infekčního procesu se na zánětlivé reakci kromě imunitního systému hostitele uplatňuje spolu s autolytickými enzymy i následně uvolněný pneumolysin, který poškozuje hostitelské buňky.

Onemocnění vzniká buď endogenně (kdy se uplatní původní kolonizující kmen) a nebo exogenně (Lovečková *et al.*, 2002). Přenos infekce z člověka na člověka se pak uskutečňuje kapénkovou infekcí a nejčastějším místem vstupu bývá nosohltan. Napadenými skupinami obyvatel bývají obvykle děti, starší lidé a osoby se sníženou obranyschopností.

Mezi onemocnění s lehčím průběhem, které *S. pneumoniae* způsobuje, patří infekce horních cest dýchacích, jako je zánět vedlejších nosních dutin (sinusitida) nebo zánět středního ucha (otitis media). Závažnými infekčními onemocněními jsou zápal plic (pneumonie), zánět mozkových blan (meningitida), zánět pobřišnice (peritonitis), či kloubní infekce. Těžké infekce mohou vyústit až v sepse či septické šoky, zapříčiněné průnikem pneumokoků do krevního řečiště, kde fermentují glukózu za vzniku kyseliny mléčné, čímž spotřebovávají krevní cukr a způsobují tak laktátovou acidózu.

V případě infekce a tudíž nutnosti zavedení antibiotické terapie je lékem první volby penicilin. Pacientům alergickým na betalaktamová antibiotika se podává erytromycin, cefalosporiny, makrolidy nebo chloramfenikol. Před zahájením terapie je nezbytné stanovit citlivost izolovaného pneumokokového kmene k antibiotikům, neboť přibývá druhů rezistentních, a to nejen na penicilin.

K evoluci antimikrobiální rezistence přispívá velkou měrou nosičství a kolonizace organismu bakteriemi *S. pneumoniae*, neboť pak snadno dochází k horizontálnímu přenosu genetické informace mezi ostatními komenzálními streptokoky (Brugger *et al.*, 2009).

S ohledem k narůstající rezistenci pneumokoků na antimikrobiální látky je potřeba zvážit prevenci onemocnění případnou vakcinací. Důležité je to zejména u dětí, u kterých je imunitní odpověď pomalejší a infekce mívají často závažnější průběh, než u dospělých. U dospělých se očkuje polyvalentní polysacharidovou vakcínou, sestávající z 23 sérotypů *S. pneumoniae*, které jsou nejčastějšími příčinami invazivních pneumokokových onemocnění. Tato vakcína ovšem není vhodná pro děti mladší 2 let, u kterých ještě není imunitní systém plně vyvinutý. U dětí se s ohledem na vyšší indukci tvorby protilátek očkuje polyvalentní konjugovanou vakcínou (Bogaert *et al.*, 2004).

2.1.5 Přirozená kompetence a genetická transformace u pneumokoka

Transformace DNA je jedním ze způsobů horizontálního přenosu genetické informace a tudíž jedním z nástrojů bakteriální evoluce. Genom bakterií je díky příjmu cizorodé DNA velmi tvárný. Při přirozené kompetenci je do buňky přijímána lineární jednořetězcová DNA, kterou mohou bakterie v případě vysokého stupně sekvenční homologie zabudovat do genomu. Schopnost přirozeně přijímat DNA z prostředí není jen výsadou pneumokoků, ale je studována také u dalších bakterií (*Neisseria* spp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis*). Na rozdíl od konjugace a transdukce, přirozená transformace je iniciována recipientní buňkou a je tedy normální součástí fyziologie kompetentní buňky (Johnsborg *et al.*, 2007).

Hlavním mechanismem regulace příjmu cizorodé DNA z prostředí je u *S. pneumoniae* *quorum sensing*. Tento termín označuje způsob chemické komunikace závislý na hustotě bakteriální populace. Komunikace pomocí *quorum sensing* zahrnuje produkci, vnímání a odpověď na malé signální molekuly, tzv. autoinduktory, jejichž koncentrace v prostředí je přímo úměrná nárůstu bakteriální populace. Pomocí těchto malých molekul dokáží bakterie monitorovat vnější prostředí, tvořit biofilm a chovat se ve výsledku jako mnohobuněčný organismus (Waters a Bassler, 2005).

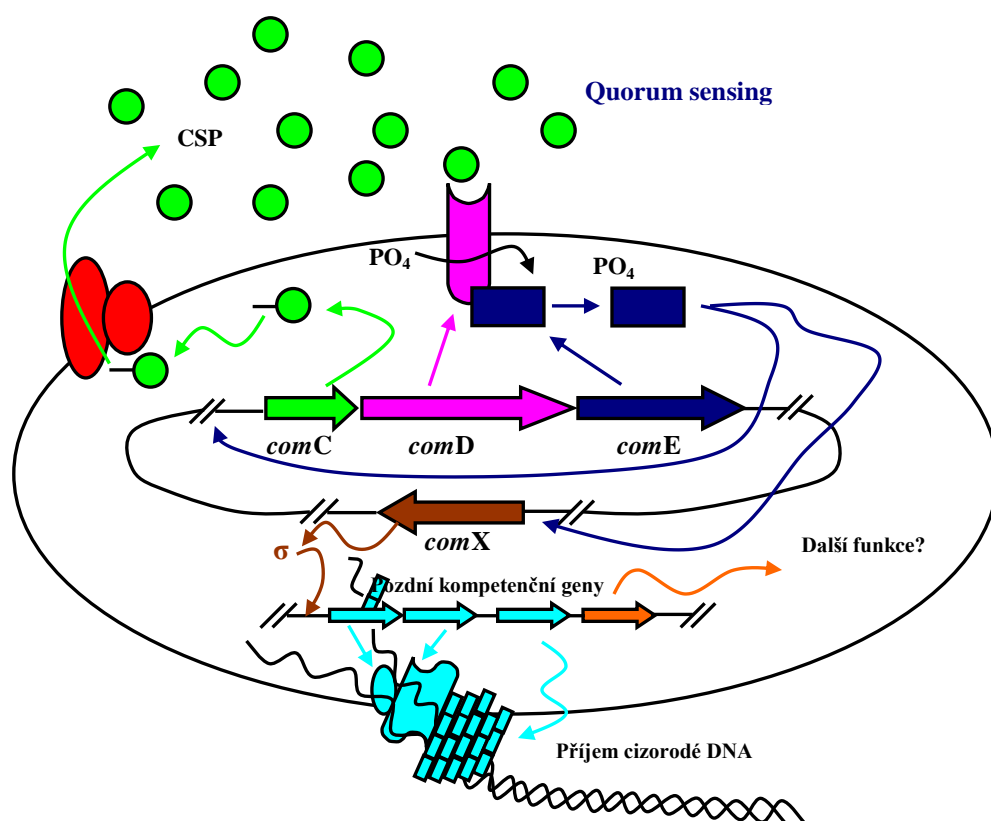
Centrální signální molekulou, jež spouští regulační kaskádu vedoucí k přirozené kompetenci pro příjem DNA *S. pneumoniae*, je protein CSP („*competence-stimulating peptide*“). U *S. pneumoniae* je přirozená kompetence krátkodobý fyziologický stav buňky, který trvá přibližně 20 minut (Alloing *et al.*, 1998).

2.1.5.1 *Produkce CSP a genetická podstata quorum sensing*

Prekurzor CSP je produktem genu *comC*, jehož exprese je součástí regulační sítě, zahrnující signální páry ComDE (indukce kompetence) a CiaRH (inhibice exprese *comCDE* operonu) (Hakenbeck, 2000).

Prekurzor CSP je sekretován z buňky pomocí ABC transportního mechanismu ComAB. Po dosažení prahové koncentrace CSP v prostředí dojde fosforylační kaskádou pomocí dvousložkového systému ComDE k indukci operonu *comCDE* a dalších časných genů kompetence (Pestova *et al.*, 1996). Mezi časně kompetenční geny patří také gen *comX* (produkt ComX je alternativní sigma faktor a spojovací článek mezi *quorum sensing* a geny specifickými pro kompetenci) (Luo *et al.*, 2003) a *comW*, důležitý pro transkripci pozdních genů, účastnících se příjmu DNA z prostředí (Luo *et al.*, 2004).

Schéma regulace kompetence pomocí CSP proteinu u streptokoků je znázorněno na obrázku 2.3.



Obr. 2.3. Schéma regulace kompetence pomocí CSP proteinu u streptokoků.

CSP: kompetenci stimulující peptid. ***comC*:** gen pro produkci CSP. ***comDE*:** geny pro signální pár ComDE. ***comX*:** gen kódující alternativní sigma faktor. (Upraveno podle: <http://www.philipsinstitute.vcu.edu/>).

2.2 Komunikace bakterií s vnějším prostředím

Bakterie patří bezesporu mezi nejrozšířenější organismy na světě, obývající všechna prostředí od vzduchu, půdy a vody přes extrémní prostředí horkých pramenů či kyselých jezer (Whitman *et al.*, 1998). V těchto na živiny často chudých životních prostředích musí být schopny získat zdroje uhlíku, dusíku či energie, musí odolávat toxickým produktům nejen vlastního metabolismu a nezbytná je také rychlá adaptace na okolní podmínky, neboť vnější prostředí se velmi rychle a náhle mění. Tyto adaptace vyžadují vnímání velkého množství extracelulárních signálů následované adekvátní odpovědí, kterou je ve většině případů kontrola specifické genové exprese (Foussard *et al.*, 2001).

Jedním ze základních mechanismů adaptivní odpovědi u všech organismů je přenos signálu zprostředkovaný fosforylací a defosforylací jednotlivých proteinů. Fosforylace proteinů je reverzibilní modifikace proteinů kovalentním připojením fosfátové skupiny, probíhající na posttranslační úrovni. Enzymy katalyzující fosforylací proteinu se označují jako proteinkinázy. Naopak enzymy, které fosfátovou skupinu odštěpují, nazýváme proteinfosfatázy.

Až do 80. let 20. století se předpokládalo, že signalizace prostřednictvím fosforylace proteinů na hydroxylových skupinách serinu, threoninu nebo tyrosinu je vlastnost týkající se pouze eukaryotických buněk. U bakterií se vědci dlouhou dobu domnívali, že k přenosu signálů dochází výhradně pomocí dvousložkových systémů (TCS). Tuto domněnku vyvrátil první zaznamenaný případ fosforylace proteinů u prokaryot, který pozorovali Garnak a Reeves (1979) během adaptace *Escherichia coli* na využívání acetátu v médiu. O několik let později pak byla u bakterií prokázána přítomnost nejen prokaryotních proteinkináz, ale také Ser/Thr a tyrosinových proteinkináz a proteinfosfatáz eukaryotického typu (Hanks *et al.*, 1988).

2.2.1 Přenos signálů pomocí dvousložkových systémů *S. pneumoniae*

Dvousložkové signální systémy („*two-component systems*“, TCS) se vyskytují u všech domén organismů v různém zastoupení (Stock *et al.*, 2000). Skládají se ze dvou hlavních komponent, z membránové histidinové proteinkinázy (HK) a cytoplazmatického regulátorového proteinu (RR). HK reaguje na environmentální podněty autofosforylací na histidinovém zbytku. Fosfátovou skupinu následně přeneše na aspartátový zbytek příslušného regulátorového proteinu. Ten tímto podstoupí konformační změnu a jakožto transkripční regulátor ovlivňuje odpověď buňky (Stock *et al.*, 2000). Tento histidin-aspartátový systém je zřejmě nejrozšířenějším způsobem přenosu signálu u bakterií.

S. pneumoniae kóduje 13 TCS a jeden „osiřelý“ (orphan) transkripční regulátor RitR (jejich přehled shrnuje tabulka 2.3). Některé z těchto dvousložkových systémů jsou esenciální jak pro růst, tak pro virulenci *S. pneumoniae* a mohou tedy sloužit jako potenciální cíl antibiotické léčby (Throup *et al.*, 2000). Reagují na širokou škálu environmentálních signálů, jakými mohou být změny osmolarity či dostupnost živin (Appleby *et al.*, 1996) a prokázán byl i vliv těchto drah na buněčný cyklus a životaschopnost některých bakterií (Quon *et al.*, 1996).

Tabulka 2.3. Dvousložkové systémy *S. pneumoniae*
(Upraveno dle Paterson *et al.*, 2006)

TCS	NÁZEV	REGULACE	ZDROJ
TCS01	480*	Virulence	Throup <i>et al.</i> (2000)
TCS02	<i>micAB</i> (492*)	Virulence a kompetence	Echenique a Trombe (2001) Throup <i>et al.</i> (2000)
TCS03	474*	?	
TCS04	<i>pnpRS</i> (481*)	Expese PsaA, zvýšená rezistence k oxidativnímu stresu	McCluskey <i>et al.</i> (2004) Throup <i>et al.</i> (2000)
TCS05	<i>ciaRH</i> (494*)	Kompetence, virulence, produkce bakteriocinů	Halfmann <i>et al.</i> (2011) Throup <i>et al.</i> (2000)
TCS06	478*	Adheze a virulence	Standish <i>et al.</i> (2005) Throup <i>et al.</i> (2000)

Tabulka 2.3. Pokračování

TCS	NÁZEV	REGULACE	ZDROJ
TCS07	539*	Virulence	Throup <i>et al.</i> (2000)
TCS08	484*	Virulence	Throup <i>et al.</i> (2000)
TCS09	<i>zmpSR</i> (488*)	Virulence, kompetence	Blue a Mitchell (2003) Throup <i>et al.</i> (2000)
TCS10	<i>vncRS</i> (491*)	autolýza	Novak <i>et al.</i> (2000)
TCS11	479*	?	
TCS12	ComDE (498*)	Kompetence, virulence, <i>quorum sensing</i>	Pestova <i>et al.</i> (1996) Throup <i>et al.</i> (2000)
TCS13	<i>blpRH</i> (486*)	Virulence, produkce bakteriocinů	Dawid <i>et al.</i> (2007) Throup <i>et al.</i> (2000)
Transkripční regulátor	<i>ritR</i> (489*)	Virulence, transport železa	Throup <i>et al.</i> (2000) Ulijasz <i>et al.</i> (2004)

* číselné kódy dle Throup *et al.* (2000) ? regulační funkce neznámá

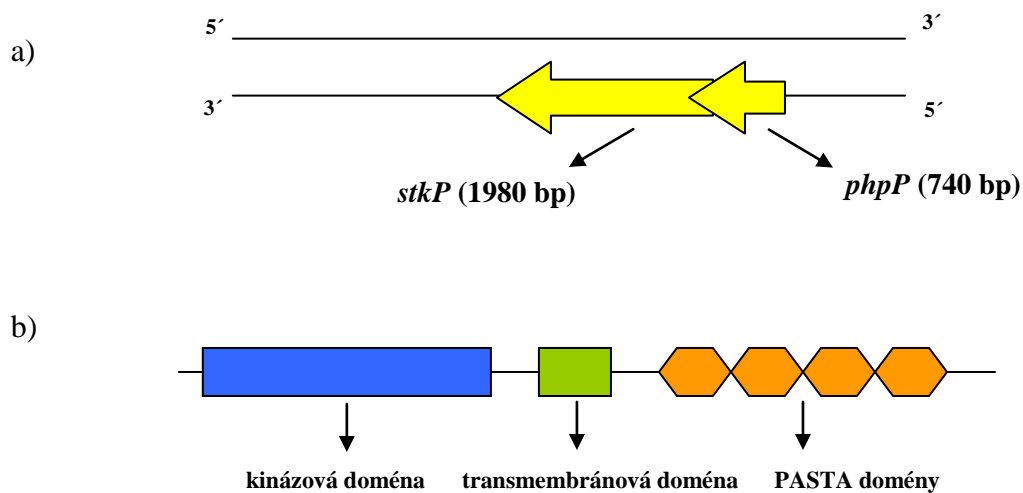
2.2.2 Ser/Thr proteinkinázy a proteinfosfatázy eukaryotního typu

Kromě již zmíněných proteinkináz prokaryotního typu byly u bakterií objeveny také proteinkinázy typu eukaryotního. Signalizační síť Ser/Thr proteinkináz eukaryotního typu (ESTPKs) a s nimi asociovaných proteinfosfatáz (ESTPPs) má u prokaryot nezastupitelnou roli. Tyto signalizační dráhy fungují sice na podobném principu jako dvousložkové systémy, ale jinak jsou na TCS úplně nezávislé (Sasková *et al.*, 2007).

Ukázalo se, že ESTPKs regulují u bakterií rozličné buněčné funkce, z nichž můžeme pro příklad jmenovat životní cyklus (*Bacillus subtilis*; Madec *et al.*, 2002) či sekundární metabolismus (*Streptomyces* sp.; Umeyama *et al.*, 2002). ESTPKs mají vliv také na formaci biofilmu (*Streptococcus mutans*; Hussain *et al.*, 2006) a v neposlední řadě i na virulenci (*Yersinia pseudotuberculosis*, Galyov *et al.*, 1993; *Streptococcus pneumoniae*, Echenique *et al.*, 2004; *Mycobacterium* sp., Walburger *et al.*, 2004).

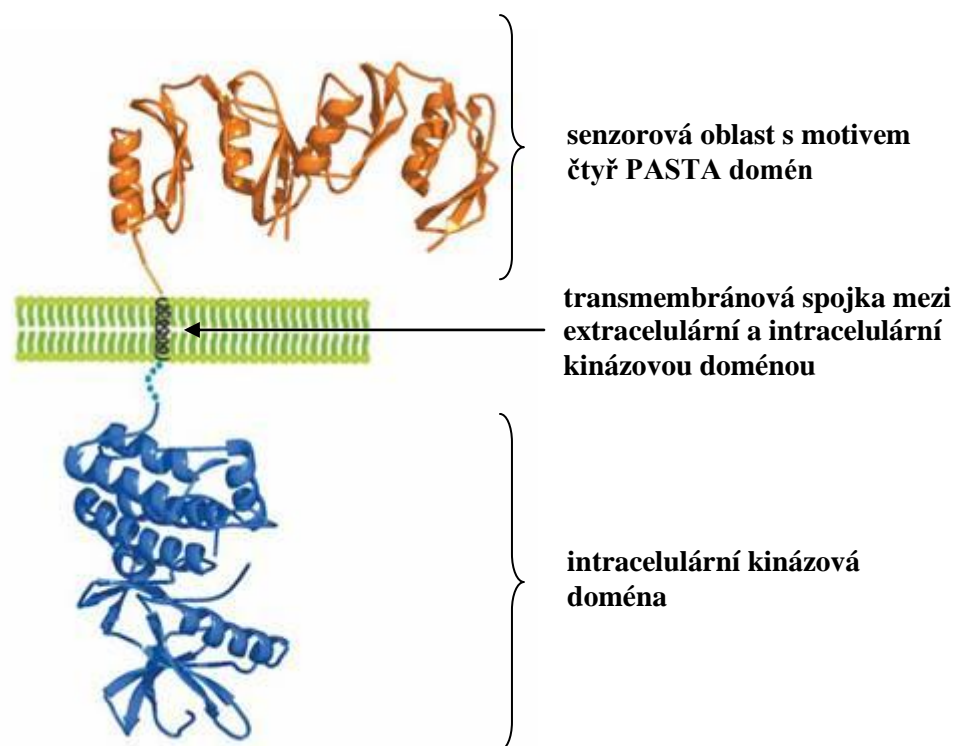
2.2.2.1 *Ser/Thr* proteinkináza StkP a proteinfosfatáza PhpP *S. pneumoniae*

Různé mikroorganismy kódují ve svém genomu různý počet proteinkináz a proteinfosfatáz eukaryotního typu. V porovnání s nimi je *S. pneumoniae* vhodný model pro studium těchto proteinů, neboť ve svém genomu nese pouze jedinou kopii genu, a to jak pro Ser/Thr proteinkinázu eukaryotního typu (StkP), tak také pro proteinfosfatázu, označovanou jako PhpP. Oba geny jsou součástí téhož operonu (Nováková *et al.*, 2005), jejich schéma je znázorněno na obrázku 2.4. StkP je v autofosforylované podobě substrátem proteinfosfatázy PhpP, což potvrzuje domněnku, že StkP a PhpP tvoří funkční signální pár *in vivo* (Nováková *et al.*, 2005; Agarwal *et al.*, 2012; Beilharz *et al.*, 2012).



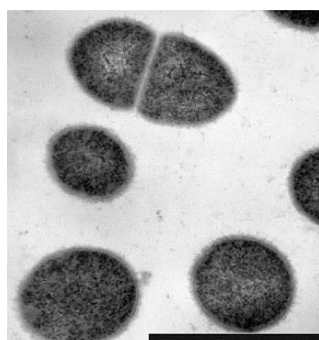
Obr. 2.4. Schéma polohy genů *stkP* a *phpP* a struktura proteinkinázy StkP. a) Schéma části genomu *S. pneumoniae* s geny kódujícími StkP a PhpP. b) Schéma struktury StkP. (Upraveno podle Nováková *et al.*, 2010).

StkP je transmembránový protein, který se skládá z extracelulární sensorové domény a intracelulární kinázové domény. Na svém C-konci (sensorová oblast) nese StkP čtyři kopie tzv. PASTA domén („*p*enicillin-*b*inding proteins *a*nd *s*erin/*t*hreonine kinase *a*ssociated domain“), shodných s PASTA doménami vyskytujícími se u penicilin-vazebných proteinů („*p*enicilin-*b*inding *p*roteins“, PBPs) v buněčné stěně bakterií (Yeasts *et al.*, 2002). Protože jsou PASTA domény extracelulární a nevyskytují se u eukaryot, mohla by proteinkináza StkP teoreticky představovat potenciální cíl antimikrobní terapie, jako je tomu například u proteinkinázy PknB *Mycobacterium tuberculosis*, která je k StkP homologní (obrázek 2.5) (Zhou *et al.*, 2012).



Obr. 2.5. Model Ser/Thr proteinkinázy PknB *Mycobacterium tuberculosis*. (Upraveno podle Young *et al.*, 2003).

Proteinkináza StkP není pro životaschopnost pneumokoka esenciální, ale její vliv na buněčné funkce byl jasně prokázán. Týká se to zejména vlivu na buněčné dělení. Giefing *et al.* (2008) pomocí mikroskopie kmenů $\Delta stkP$ odhalili zvláštní podlouhlý tvar buněk, způsobený defekty v buněčném dělení (obrázek 2.6). Pozdější studie potvrdily, že StkP je spolu s dalšími proteiny součástí aparátu buněčného dělení (Giefing *et al.*, 2010; Nováková *et al.*, 2010; Beilharz *et al.*, 2012; Fleurie *et al.*, 2012; Fleurie *et al.*, 2014).



divoký typ *S. pneumoniae*



$\Delta stkP$ *S. pneumoniae*

Obr. 2.6. Porovnání buněčné morfologie divokého typu a mutantu v genu *stkP* *S. pneumoniae*. U mutantního kmene $\Delta stkP$ dochází v porovnání s divokým typem k atypickému prodloužení buněk. Měřítka 1 μm . (Převzato z Giefing *et al.*, 2008)

Porovnáním genové exprese divokého kmene *S. pneumoniae* a kmene s delecí genu pro StkP (Δ stkP) se zjistilo, že StkP pozitivně ovlivňuje transkripci genů účastnících se odpovědi buňky na stresové podmínky (zvýšená teplota, osmotický tlak, kyselé pH), příjmu železa či tvorby buněčné stěny. Kmen Δ stkP v porovnání s divokým kmenem vykazuje pomalejší růst a zvýšenou míru autolýzy ve stacionární fázi růstu (Sasková *et al.*, 2007).

Do dnešní doby bylo identifikováno 9 substrátů StkP, které jsou uvedeny v tabulce 2.4.

Tabulka 2.4. Dosud identifikované substráty proteinkinázy StkP a jejich funkce.

SUBSTRÁT	POPIS	ZDROJ
GlmM	Fosfoglukosaminmutáza, katalyzuje první krok v biosyntéze peptidoglykanu, který vede k syntéze UDP- <i>N</i> -acetylglukosaminu, klíčovému prekurzoru buněčných komponent	Nováková <i>et al.</i> , 2005
Spr0334	Protein buněčného dělení	Nováková <i>et al.</i> , 2010 Štekerová (2012)
DivIVA	Protein buněčného dělení u gram-pozitivních bakterií; spolu s dalšími proteiny určuje střed buňky při buněčném dělení	Nováková <i>et al.</i> , 2010
RR06	Transkripční regulátor dvousložkového systému TCS06; reguluje expresi genu, který kóduje důležitý adhezín <i>S. pneumoniae</i> - CbpA	Agarwal <i>et al.</i> , 2012
PpaC**	Mangan-dependentní pyrofosfatáza, katalyzuje hydrolýzu anorganického pyrofosfátu PP _i	Nováková <i>et al.</i> , 2010
RitR*	Transkripční regulátor TCS, postrádá svou histidinovou kinázu; pomáhá udržet stálou hladinu železa v buňce	Ulijasz <i>et al.</i> , 2009
FtsZ*	Časný protein buněčného dělení, homolog eukaryotického tubulinu; v místě tvorby buněčné přepážky tvoří Z-kruh	Giefing <i>et al.</i> , 2010
FtsA*	Protein buněčného dělení, homolog eukaryotického aktinu	Beilharz <i>et al.</i> , 2012
MurC*	Enzym důležitý pro syntézu esenciálního meziprojektu při tvorbě peptidoglykanu	Falk a Weisblum, 2013

* fosforylace zatím neprokázána *in vivo*; ** fosforylace zatím neprokázána *in vitro*

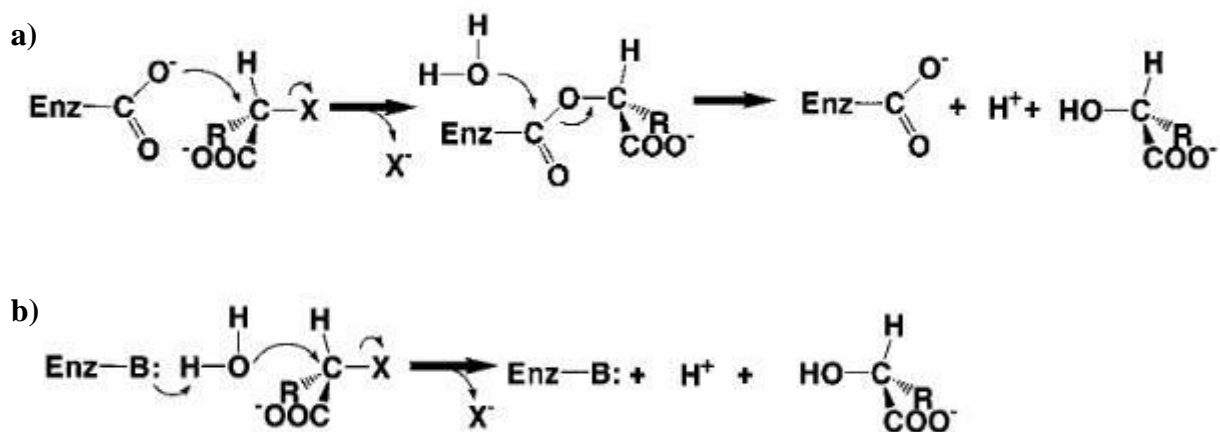
Sasková *et al.* (2007) ve své studii dále klasifikovali desítky genů s ovlivněnou expresí v kmeni Δ stkP *S. pneumoniae*. Nejvýznamněji byl ovlivněn gen *spr1057*, kódující hypotetický protein ze skupiny hydroláz, jehož exprese byla v mutantním kmeni v porovnání s divokým kmenem snížena téměř šedesátkrát (zjištěno použitím metody DNA microarrays), což bylo následně potvrzeno pomocí qRT-PCR analýzy. Objasnění a bližší charakterizace funkce produktu genu *spr1057* je předmětem této diplomové práce.

2.3 Hydrolázy nadčeledi haloacid-dehalogenáz („*HAD-like hydrolases superfamily*“)

V každém okamžiku života bakterie působí v buňce stovky enzymů. Pro pochopení vzájemného vztahu proteomu (soubor všech proteinů buňky) a metabolomu (kompletní soubor metabolitů v buňce) určitého mikroorganismu je nezbytné znát substrátové specifity enzymů, které jsou součástí metabolických drah daného organismu.

Pro přehlednost bylo v 70. letech 20. století vytvořeno systematické názvosloví a enzymy byly podle druhu katalyzované reakce rozděleny do několika tříd. Jednu z nejpočetnějších tříd enzymů představují **hydrolázy**, enzymy, které katalyzují hydrolytické štěpení chemických vazeb. Mezi hydrolytické enzymy se kromě jiných řadí **dehalogenázy**, štěpící vazbu uhlík – halogen organohalogenových sloučenin (herbicidy, insekticidy, antibiotika, plasty, ale také produkty mořských organismů). Je jim věnováno mnoho pozornosti pro jejich možné využití v chemickém průmyslu či bioremediaci (Furukawa, 2006). V metabolických drahách organohalogenových sloučenin působí haloacid dehalogenázy, haloalkan dehalogenázy a nebo haloalkohol dehalogenázy (de Jong *et al.*, 2003; Janssen *et al.*, 2005). Jednotlivé dehalogenázy se liší mechanismem štěpení uhlík – halogenových vazeb.

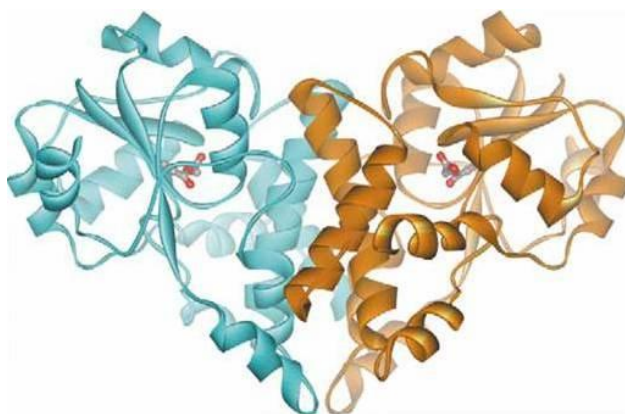
Haloacid dehalogenázy katalyzují hydrolýzu alfa-halogenovaných karboxylových kyselin (např. 2-chloroacetát, meziproduct degradace 1,2-dichlorethanu (DCE, karcinogenní těkavá látka, používá se pro výrobu vinylchloridu či jako rozpouštědlo)) (de Jong a Dijkstra, 2003). Můžeme je rozdělit do dvou skupin, a to na **L-2-haloacid dehalogenázy** (karboxylová skupina asparagové kyseliny nukleofilně atakuje alfa-uhlík substrátu, dojde k uvolnění halogenu) a **DL-2-haloacid dehalogenázy** (molekula vody přímo atakuje substrát, dojde k uvolnění halogenu) (Kurihara a Esaki, 2008). Mechanismus dehalogenace těchto enzymů je znázorněn na obrázku 2.7.



Obr. 2.7. Mechanismus dehalogenace alfa-halogenovaných karboxylových kyselin.

a) L-2-haloacid dehalogenázy; b) DL-2-haloacid dehalogenázy. **Enz**: enzym; **X⁻**: halogenid; **Enz-B**: zbytek asparagové či glutamové kyseliny, aktivující molekulu vody. (Převzato z Nardi-dei *et al.*, 1997)

Výše zmíněné enzymy patří spolu s P-typy ATPáz a Mg²⁺-dependentními fosfatázami do **nadčeledi haloacid dehalogenáz (HAD)**. HAD jsou dimery (obrázek 2.8), které lze jednoznačně identifikovat na základě přítomnosti tří krátkých konzervovaných sekvenčních motivů (Koonin a Tatusov, 1994), ale jejich substrátovou specifitu lze bez experimentální práce předpovědět jen velmi obtížně.



Obr. 2.8. Struktura dimeru haloacid dehalogenázy s kovalentně navázaným meziproductem. Navázaný meziproduct je označen červeně. Modře a oranžově jsou od sebe odlišeny podjednotky dimeru. Převzato z de Jong a Dijkstra, 2003

Většinu nadčeledi HAD tvoří tedy enzymy s blíže necharakterizovanou funkcí. Ostatní členové této nadčeledi jsou určeny jako β -fosfoglukomutázy, fosfonatázy a nebo již výše popsané fosfatázy a dehalogenázy (Kuznetsova *et al.*, 2006).

Svým nejčtetnějším zastoupením ve všech doménách organismů je reprezentují **fosfatázy**. U gram-negativní bakterie *Escherichia coli* tvoří až 40% kódovaných fosfatáz proteiny HAD (Keseler *et al.*, 2005). Tyto takzvaně promiskuitní fosfatázy zkříženě reagují s různými fosforylovanými metabolity a jsou schopné hydrolyzovat uhlovodíky, nukleotidy, organické kyseliny či koenzymy (Kuznetsova *et al.*, 2006).

Nukleotidy hydrolyzující fosfatázy (**nukleotidázy**) štěpí tyto molekuly za vzniku nukleosidu a fosfátu. Rozdělují se na dvě skupiny, podle toho, zda hydrolyzují nukleotidy od 3' nebo od 5' konce. 5'-nukleotidázy se účastní nejrůznějších buněčných funkcí, jakými jsou mezibuněčná komunikace, oprava nukleových kyselin, přenos signálu, membránový transport či metabolismus purinů (Hunsucker *et al.*, 2005).

Žádný enzym z nadčeledi haloacid dehalogenáz *E. coli* není esenciální pro životaschopnost bakterie (Gerdes *et al.*, 2003), ale některé z nich mohou v bakteriálním metabolismu zastávat významné „úklidové“ funkce.

2.4 „House - cleaning“ fosfatázy nadčeledi haloacid dehalogenáz

Jednou z nezbytných podmínek přežití jednobuněčných organismů je neustálá ochrana buňky před toxickými látkami, pocházejícími z okolního prostředí i z vlastního metabolismu. Mezi toxické produkty vlastního metabolismu patří kromě reaktivních forem kyslíku také modifikované nukleotidy, jakými mohou být dUTP, 8-oxo-dGTP nebo 2-oxo-dATP, vznikající oxidací, deaminací nebo jinými modifikacemi základních nukleotidů (Kamiya, 2003). Pokud by se tyto modifikované nukleotidy začlenily do nově vznikající DNA, mohly by způsobit chybné párování bazí, které by enormně zvýšilo mutační rychlost. Eliminaci těchto netypických nukleotidů zajišťují tzv. „house-cleaning“ (úklidové) enzymy, které ještě navíc kontrolují akumulaci meziproduktů metabolismu (Galperin *et al.*, 2006).

Pravděpodobně nejznámější, nejvíce studovaný a poprvé objevený „house-cleaning“ enzym je enzym MutT bakterie *E. coli*, který specificky defosforyluje 8-oxo-dGTP. Mutace v genu *mutT* zvýší výskyt A-T / G-C transverzí 100 - 10 000 krát, v porovnání s divokým typem (Maki a Sekiguchi, 1992).

Proudfoot *et al.* (2004) charakterizovali jeden z mnoha dalších enzymů *E. coli*, **YjjG**, který funguje jako nukleotidová fosfatáza (nukleotidáza) a má tedy „house-cleaning“ funkci *in vivo*. Tento enzym chrání buňku před pyrimidinovými deriváty (např. 5-fluoro-2'-deoxyuridin (5-FdU)) a brání inkorporaci potenciálně mutagenních nukleotidů (5-bromo-2'-deoxyuridin) do DNA. Enzymatická aktivita YjjG *in vitro* je daleko vyšší vůči atypickému 5-fluoro-2'-deoxyuridin monofosfátu (5'-FdUMP), než vůči běžnému thymidin monofosfátu (dTMP) (Titz *et al.*, 2007) a její aktivita je striktně závislá na přítomnosti Mn²⁺ (Proudfoot *et al.*, 2004).

Při studiu transkriptomu *S. pneumoniae* se zjistilo, že v kmeni Δ stkP je v porovnání s divokým kmenem Sp1 výrazně utlumena exprese genu *spr1057* (Sasková *et al.*, 2007). Produkt tohoto genu, protein **Spr1057**, byl charakterizován jako hypotetický protein z enzymatické nadčeledi „HAD-like hydrolases superfamily“, homologní k proteinu YjjG *E. coli* v podmínkách *in vitro*.

Studiem tohoto proteinu se zabývala již Zuzana Vacková ve své diplomové práci (Vacková, 2010). Z výsledků biochemické charakterizace proteinu Spr1057 *in vitro* bylo zjištěno, že proteiny Spr1057 *S. pneumoniae* a YjjG *E. coli* jsou funkčně příbuzné. U mutantního kmene Δ stkP *S. pneumoniae* se prokázala snížená růstová rychlost oproti divokému kmeni Sp1 (Rx derivát) *S. pneumoniae* v přítomnosti modifikovaných nukleotidů. Také míra inkorporace mutagenního nukleotidu byla u kmene Δ stkP se zvyšující se koncentrací této toxické látky v médiu vyšší, než u divokého kmene.

Zatímco Zuzana Vacková (2010) se ve své diplomové práci zabývala charakterizací aktivity proteinu Spr1057 *in vitro* a testováním účinku atypických nukleotidů na mutantní kmen Δ stkP, hlavním cílem mé diplomové práce je navázat na dosud zjištěné skutečnosti a pomoci objasnit funkci proteinu Spr1057 studiem mutantních kmenů *in vivo*.

3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

1. Připravit mutantní kmeny *S. pneumoniae* za účelem sledování funkce proteinu Spr1057.
2. Testovat citlivost mutantních kmenů *S. pneumoniae* k modifikovaným nukleotidům, konkrétně k 5-fluoro-2'-deoxyuridinu a 5-bromo-2'-deoxyuridinu.
3. Testovat míru inkorporace atypického nukleotidu 5-bromo-2'-deoxyuridinu do DNA mutantních kmenů v porovnání s divokým kmenem *S. pneumoniae*.
4. Pomocí kotranskripční analýzy ověřit existenci předpokládaného operonu genu *spr1057 S. pneumoniae*

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Bakteriální kmeny a vektory

Používané bakteriální kmeny jsou uvedeny v tabulce 4.1. Kmeny *S. pneumoniae* i *E. coli* byly skladovány v 15% glycerolu při -80°C.

Tabulka 4.1. Seznam bakteriálních kmenů.

	BAKTERIÁLNÍ KMENY / (ORIGINÁLNÍ NÁZEV)	GENOTYP / POPIS	FENOTYP	ZDROJ
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Sp1 / (Cp1015)	<i>Rx derivát; str1, hexA</i>	Sm ^R	Morrison <i>et al.</i> , 1984
	Sp5 / (Cp1016)	<i>rif-23</i>	Rif ^R	Morrison <i>et al.</i> , 1984
	Sp10 / (Cp1015 Δ <i>stkP</i>)	<i>Sp1. str1, hexA; stkP::cat</i>	Sm ^R , Cm ^R	Nováková <i>et al.</i> , 2005
	Sp152 / (Cp1015 pZn- <i>spr1057</i> FLAG)	<i>Sp1. bgaA::PczcD-spr1057-FLAG</i>	Tet ^R	tato práce
	Sp153 / (Cp1015 <i>spr1057::Cheshire</i> cassette (<i>erm-cre</i>))	<i>Sp1. spr1057::erm-cre</i>	Erm ^R	tato práce
	Sp158 / (Cp1015 Δ <i>spr1057</i>)	<i>Sp1. spr1057::lox72</i>	---	tato práce
	Sp167 / (Cp1015 Δ <i>spr1057</i> pZn- <i>spr1057</i> FLAG)	<i>Sp1. spr1057::lox72 bgaA::PczcD-spr1057-FLAG</i>	Tet ^R	tato práce
	Sp176 / (Cp1015 pZn- <i>spr1057</i> FLAG Δ <i>stkP</i>)	<i>Sp1. stkP::cat bgaA::PczcD-spr1057-FLAG</i>	Cm ^R , Tet ^R	tato práce
	Sp237 / (Cp1015 <i>spr1057::janus</i>)	<i>Sp1. spr1057::kan-rpsL</i>	Kan ^R	tato práce
Sp238 / (Cp1015 <i>spr1057</i> -FLAG)	<i>Sp1. spr1057-FLAG</i>	---	tato práce	
	<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i> ; Kompetentní buňky		Promega

Vektory a kazety

Cheshire kazeta (Weng *et al.*, 2009)

Lineární DNA konstrukt (2495 pb) pro delecí vybraného genu v *S. pneumoniae*. Cheshire kazeta (*lox/erm/cre/lox* kazeta) je „samovyštěpovací“ konstrukt, který využívá Cre rekombinázu bakteriofága P1 umístěnou pod inducibilní fukózový promotor. Selekčním znakem kazety je gen rezistence k erytromycinu. Na obou koncích je Cheshire kazeta ohraničena tzv. *loxP* místy (*lox66* a *lox71*), které rozpoznává Cre rekombináza a dochází zde k vyštěpení celé kazety. Pozůstatkem po vyštěpení je sekvence *lox72* (24 pb), která zůstává na chromozomu po delecí příslušného genu. Cheshire kazeta byla použita pro přípravu konstruktu ChK1057 k delecí genu *spr1057* (kapitola 5.1.1).

pJWV25 (Eberhardt *et al.*, 2009)

Vektor o velikosti 8578 bp, určený pro expresi proteinů v *S. pneumoniae*. Obsahuje inducibilní zinkový promotor (P_{czd}) a sekvence *gatC* a *bgaA*, homologní se sekvencemi na chromozomu *S. pneumoniae*. Pro selekci v *S. pneumoniae* nese tento vektor gen rezistence k tetracyklinu, pro selekci v *E. coli* gen rezistence k ampicilinu. Lokus *bgaA* není pro *S. pneumoniae* esenciální a je tudíž možné do něj pomocí vektoru vložit konstrukt mechanismem homologní rekombinace. Plazmid pJWV25 byl použit na přípravu komplementačního kmene Sp167 (kapitola 5.1.2), nadprodukčního kmene Sp152 (kapitola 5.1.3) a kmene Sp176 (kapitola 5.1.4).

pAkCmDk (Nováková *et al.*, 2005)

Vektor pro přípravu mutanta *S. pneumoniae* v genu *stkP*. Obsahuje okolí před a za genem *stkP* pro pohodlné začlenění vektoru homologní rekombinací, a selekční gen rezistence k chloramfenikolu. Vektor jsme použili pro přípravu kmene Sp176 (kapitola 5.1.4)

Janus kazeta (Sung *et al.*, 2001)

Lineární DNA konstrukt (1333 pb) pro delecí vybraného genu *S. pneumoniae*. Obsahuje gen pro rezistenci ke kanamycinu (*kan*) a gen *rpsL*⁺. Díky genu *rpsL*⁺, který je v okamžiku inserce kazety do genomu v diploidním stavu, propůjčuje Janus kazeta jinak streptomycin-rezistentním kmenům Sp1 streptomycin-senzitivní fenotyp. Janus kazeta byla použita pro přípravu kmene Sp238 (viz kapitola 5.1.5).

4.1.2 Oligonukleotidy

V tabulce 4.2 jsou uvedeny používané oligonukleotidy. Oligonukleotidy byly navrženy pomocí programu SeqBuilder (Lasergene), vyráběla je společnost Metabion international AG (Německo).

Tabulka 4.2. Seznam oligonukleotidů a jejich využití.

NÁZEV	SEKVENCE 5' → 3'	VYUŽITÍ
DAM868 F	GGGGACGCGTTGGCTTACCGTTCGTATAG	Amplifikace Cheshire kazety
DAM869 R	GGGGCCATGGTCGATACCGTTCGTATAATGT	Amplifikace Cheshire kazety
JG46/1057-Flag-R	GCGGCCGCTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCAAA TGTGATCTTTTCAAGAATATTTT	Amplifikace části genu <i>spr1057</i> s FLAGovou kotvou z pJWV25
JG28/janusF	CCGTTTGATTTTAAATGGATAATG	Amplifikace Janus kazety
JG29/janusR	GGGCCCCTTTCCTTATGCTT	Amplifikace Janus kazety
LN21/StkP-R (pET151)	AGGAGTAGCTGAAGTTGT	Ověření vložení AkCmDk konstruktů do genomu <i>Sp152</i>
LN32/C-bga-F	GCTCATCATGTTGATTGTC	Ověření integrace do <i>bgaA</i> lokusu chromozomu <i>S. pneumoniae</i>
LN33/C-bga-R	TCGAGTTTTGGAAGATCTTC	Ověření integrace do <i>bgaA</i> lokusu chromozomu <i>S. pneumoniae</i>
LN123/JW25-1b-F	TTCGCTACTTGGAGCCACTAT	Amplifikace oblasti indukibilního zinkového promotoru z pJWV25
PB001	AATGTAAAGTAAATGATTCAAAATC	Ověření vložení konstruktů ChK1057 do genomu <i>Sp1</i>
PB005	TAGAAATTTGTAGAACATATTTGCCTCCTTAAGATCC	Amplifikace oblasti indukibilního zinkového promotoru z pJWV25
PB006	AAGGAGGCAAATATGTTCTACAAATTTCTACTCTTC	Amplifikace <i>spr1057</i>
ZS1/spr1057 UP F	GTAAGCTATTGATTATCTCAACT	Ověření vložení <i>spr1057</i> -FLAG pod nativní promotor <i>Sp237</i>
spr1057-2ndf	GCCGGATGCTCTCTTTTATG	Koexpresní analýza

Tabulka 4.2. Pokračování.

NÁZEV	SEKVENCE 5' → 3'	VYUŽITÍ
ZS3/spr1056-r	GCTACATGATCTAGGTATATATC	Ověření vložení konstruktů ChK1057 do genomu Sp1 + koexpresní analýza
ZS5/spr1055-R	GCAGGAACAGTCAAACAAGC	Amplifikace oblasti za genem ve směru transkripce <i>spr1057</i> v divokém typu Sp1 + koexpresní analýza
ZS7/spr1054-R	CCTCAAACCTCCGTCACCTTA	Ověření vložení Janus kazety + koexpresní analýza
ZS8/spr1054-F	CAGATTTAGACTGGTACACCT	Koexpresní analýza
ZS9/spr1053-R	AACCGCACCAGCTTCTAAGA	Koexpresní analýza
ZS10/spr1053-F	GGTCCAGCAGATATCACTATT	Koexpresní analýza
ZS11/spr1052-R	TCGACCAAGATGGTGACCAA	Koexpresní analýza
ZS12/spr1057 UP F	CTATTTACTGGCTAATTAATCAG	Amplifikace oblasti před genem ve směru transkripce <i>spr1057</i> v divokém typu Sp1
ZS13/spr1057 UP R	CATTATCCATTA AAAATCAAACGGAGAGTGTGGTTCG AGGTCGAA	Amplifikace oblasti před genem ve směru transkripce <i>spr1057</i> v divokém typu Sp1
ZS14/spr1057 DN F	AAGCATAAGGAAAGGGGCCCTAAAGGAGATTAGCT AATGACTA	Amplifikace oblasti za genem ve směru transkripce <i>spr1057</i> v divokém typu Sp1
ZS15/spr1057- FLAG F	TTGTTCTACAAATTTCTACTCTT	Amplifikace <i>spr1057</i> s FLAGovou kotvou z pJWV25
ZS16/1057-FLAG UP R	AAGAGTAGAAATTTGTAGAACAA	Amplifikace oblasti před genem <i>spr1057</i> v divokém typu Sp1 + koexpresní analýza
ZS17/1057-FLAG DN F	CAAGGATGACGACGATAAGTAAAGGAGATTAGCTAA TGACTACA	Amplifikace oblasti za genem ve směru transkripce <i>spr1057</i> v divokém typu Sp1
ZS18/1057-FLAG R	TTACTTATCGTCGTCATCCTTG	Amplifikace <i>spr1057</i> s FLAGovou kotvou z pJWV25
ZS19/spr1057FLAG F	AGACGCTGATGATTGGAGATT	Ověření vložení <i>spr1057</i> -FLAG pod nativní promotor Sp237, sekvenace
ZS20/spr1058-F	TTATTCAAACACAGTTAGCGG	Koexpresní analýza
PH	CAGGATGAAGCTTACAGAGG	Ověření vložení AkCmDk konstruktů do genomu Sp152

4.1.3 Enzymy

Polymerázy

LA DNA polymerázový mix	(Top Bio)
Phusion polymeráza	(New England Biolabs (NEB))
Taq polymeráza	(Top Bio, Qiagen, Sigma Aldrich [®])

Restrikční enzymy

<i>KpnI, NotI, PvuI</i>	(NEB)
-------------------------	-------

Ostatní enzymy

Benzonáza	(Merck)
Lysozym, Proteináza K	(Sigma-Aldrich [®])
T4 DNA ligáza	(Fermentas)
SuperScript [™] III Reverse Transcriptase	Invitrogen
RNasin	Promega
Dnase I	Qiagen

4.1.4 Protilátky

Primární protilátky

Anti-bromodeoxyuridine-POD (Roche)

Myší monoklonální protilátka proti 5-BrdU konjugovaná s křenovou peroxidázou (POD); ředění 1 : 1 000

Anti-FLAG (Sigma-Aldrich[®])

Myší monoklonální protilátka proti FLAGovému epitopu; ředění 1 : 1 000

Anti-FLAG (Sigma-Aldrich[®] a GeneScript)

Králičí protilátka proti FLAGovému epitopu proteinu; ředění 1 : 1 000

Sekundární protilátky

Anti-Rabbit IgG-POD (Sigma-Aldrich[®])

Protilátka proti králičím IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou; ředění 1 : 10 000

Anti-Mouse IgG-POD (Sigma-Aldrich[®])

Protilátka proti myším IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou; ředění 1 : 10 000

4.1.5 Pufry, roztoky a standardy

Název a složení používaných pufřů a roztoků shrnuje tabulka 4.3.

Tabulka 4.3. Název a složení pufřů a roztoků.

NÁZEV	SLOŽENÍ
ADAMS I	<u>Objem 500 ml</u> : biotin 75mg, kyselina nikotinová 75 mg, pyridoxin hydrochlorid 87,5 mg, pantotenát vápenatý 300 mg, thiamin hydrochlorid 80 mg, riboflavin 35 mg; pH 7,0; sterilizace 15 min autokláv
ADAMS II	<u>Objem 500 ml</u> : FeSO ₄ *7H ₂ O 500 mg, CuSO ₄ *5H ₂ O 500 mg, ZnSO ₄ *7H ₂ O 500 mg, MnCl ₂ *4H ₂ O 200 mg; sterilizace 15 min var
ADAMS III	<u>Objem 100 ml</u> : ADAMS I 16 ml, ADAMS II 0,4 ml, L-asparagin 0,175 g, cholin 0,02 g, CaCl ₂ 0,05 g, MgCl ₂ *6H ₂ O 2 g; pH 7,6, sterilizace filtrací
Amido Black (Lachema)	40% metanol, 10% kyselina octová, 0,1% amidová čern
Blokovací pufr	TBS-T pufr, 5% BSA
Blotovací pufr	48 mM Tris, 39 mM glycin, 0,0375 % SDS, 20 % metanol
DCNa - SDS	0,5% deoxycholát sodný, 0,25% SDS
Denaturační pufr	350 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glycerol, 15% SDS, 25% β-merkaptioetanol
Dezintegrační pufr	10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,5
DNA Loading Dye (Fermentas)	10 mM Tris-HCl (pH 7,6); 0,03% bromfenolová modř; 0,03% xylene cyanol; 60% glycerol, 60 mM EDTA
Elektroforetický pufr	0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1 % SDS
Ledový pufr	10 mM Tris, pH 7,5
Ligační pufr (Fermentas)	400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8
NaCl - EDTA	150 mM NaCl, 30 mM EDTA, pH 8,0
PBS	137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O, 1,8 mM K ₂ HPO ₄ , pH 7,4
Phusion HF pufr (NEB)	7,5 mM MgCl ₂
SEDS	A: 150 mM NaCl + 30 mM EDTA, pH 8; B: 0,5 % DCNa + 0,25 % SDS; výsledný roztok v poměru 24A : 1B
TAE	40 mM Tris acetát, 2 mM EDTA, pH 8,2
TB	10 mM PIPES, 15 mM CaCl ₂ , 250 mM KCl; sterilizace filtrací, poté přidán MnCl ₂ (výsledná koncentrace 55 mM); pH 6,7
TE	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
TBS-T	20 mM Tris base, 137 mM NaCl, 0,38 % HCl, 0,05 % Tween-20, pH 7,6

Proteinové a DNA standardy

GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo-Scientific) - DNA standard, rozsah 75 - 2 000 pb

ColorPlus Prestained Protein Marker (NEB) - proteinový standard, rozsah 7 - 175 kDa

4.1.6 Kultivační půdy a použítá antibiotika

*4.1.6.1 Média pro kultivaci *S. pneumoniae**

Množství jednotlivých složek je udáváno na 1 litr kultivačního média. Média byla do výsledného objemu doplněna destilovanou vodou. Do pevných půd byl přidán 1,5% agar. Kultivace probíhala staticky, anaerobně při 37°C.

BHI médium (Brain Heart Infusion) (Oxoid)

Bacto brain heart infusion 37 g; po sterilizaci přidán 20% cholin a 15mg/ml L-glutamin

CAT médium (Casein-trypton medium; Morrison *et al.*, 1983)

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

CATc médium (CATcomplet; Morrison *et al.*, 1983)

Ke CAT médi přidáno: 0,5 M K₂HPO₄ 34 ml; 20% glukóza 10 ml; pH 7,5

Pre-C (Lacks a Hotchkiss, 1960)

L-cystein HCl 0,01125 g; octan sodný 2 g; kasein hydrolyzát 5 g; L-tryptofan 0,006 g; K₂HPO₄ 8,5 g

C+Y médium (Lacks a Hotchkiss, 1960)

K Pre-C médiu přidáno: 0,4 mM MnCl₂ 1 ml; 20% glukóza 10 ml; roztok ADAMS III 25 ml; 3% glutamin 7,3 ml; 2% pyruvát sodný 15 ml, 1,5 M sacharóza 6,3 ml; 0,2% uridin-adenosin 10 ml; 10% kvasničný extrakt 25 ml; 1 M HCl 20 ml; pH 6,8

TSB médium (Oxoid)

Trypton soya broth 30 g

TSBc

K TSB médiu přidáno: 0,1 mM CaCl₂ 10 ml, 8% BSA 25 ml; pH 8,0

Gelóza (pevné médium)

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

Krevní agar (LabMediaServis)

5% Columbia krevní agar s defibrinovanou beranní krví

4.1.6.2 Média pro kultivaci *E. coli*

Bakterie *E. coli* jsme kultivovali v tekutém i na pevném médiu, do pevného média byl přidán 1,5% agar. Množství jednotlivých složek je udáváno na 1 litr kultivačního média. Kultivace probíhala při 37°C.

LB médium (Lauria Bertani)

Trypton 10 g, kvasničný extrakt 5 g, NaCl 10 g; pH 7,5

SOB médium (Super Optimal Broth)

Trypton 20 g, kvasničný extrakt 5 g, NaCl 0,58 g, KCl 0,186 g; po sterilizaci byl přidán 1 M MgCl₂ 10 ml a 1 M MgSO₄ 10 ml

4.1.6.3 Antibiotika

Při přípravě pevných selekčních půd pro kultivaci *S. pneumoniae* a *E. coli* byla příslušná antibiotika přidána do rozehrátého média, temperovaného přibližně na 50°C. Použitá antibiotika a jejich výsledná koncentrace byly následující:

S. pneumoniae:

Erytromycin	1 µg/ml
Chloramfenikol	4,5 µg/ml
Kanamycin	200 µg/ml
Rifampicin	1 µg/ml
Streptomycin	500 µg/ml
Tetracyklin	2,5 µg/ml

E. coli:

Ampicilin	100 µg/ml
-----------	-----------

4.1.7 Chemikálie

Seznam chemikálií je uveden v tabulce 4.4.

Tabulka 4.4. Seznam chemikálií.

NÁZEV	ZKRATKA	VZOREC	VÝROBCE
Adenosin		$C_{10}H_{13}N_5O_4$	Sigma-Aldrich®
Agaróza			Sevac
Akrylamid		C_3H_5NO	Sigma-Aldrich®
Ampicilin	Amp	$C_{16}H_{19}N_3O_4S$	Sigma-Aldrich®
L-Asparagin		$C_4H_8N_2O_3$	Sigma-Aldrich®
Bacto agar			Oxoid
Biotin	vit H	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	Sigma-Aldrich®
5-Bromo-2'-deoxyuridin	5-BrdU	$C_9H_{11}BrN_2O_5$	Sigma-Aldrich®
kompetenci stimulující peptid	CSP		Biopharm
2'- deoxyadenosin - 5' - trifosfát	dATP	$C_{10}H_{16}N_5O_{12}P_3$	Promega
2'- deoxycytidin - 5' - trifosfát	dCTP	$C_9H_{16}N_3O_{13}P_3$	Promega
2'- deoxyguanosin - 5' - trifosfát	dGTP	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	Promega
2'- deoxythymidin - 5' - trifosfát	dTTP	$C_{10}H_{17}N_2O_{14}P_3$	Promega
D-Glukóza	Glc	$C_6H_{12}O_6$	Lach-Ner
Dimethylketon (aceton)		C_3H_6O	Lach-Ner
Dodecylsírán sodný	SDS	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	Sigma-Aldrich®
Erytromycin	Ery	$C_{37}H_{67}NO_{13}$	Sigma-Aldrich®
Ethanol	EtOH	C_2H_6O	Lach-Ner
Ethidium bromid	EtBr	$C_{21}H_{20}BrN_3$	Sigma-Aldrich®
Ethylendiamintetraoctová kyselina	EDTA	$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$	Sigma-Aldrich®
Fenol		C_6H_6O	Lach-Ner
5-Fluoro-2'-deoxyuridin	5-FdU	$C_9H_{11}F_1N_2O_5$	Fluka
L - fukóza 95%		$C_6H_{12}O_5$	Sigma-Aldrich®
GelRed Nucleic Acid Stain			Biotium

Tabulka 4.4. Pokračování

NÁZEV	ZKRATKA	VZOREC	VÝROBCE
L-Glutamin		$C_5H_{10}N_2O_3$	Sigma-Aldrich®
Glycerol		$C_3H_8O_3$	Lach-Ner
Glycin	Gly	$C_2H_5NO_2$	Serva
Hovězí sérový albumin, frakce V	BSA		Carl Roth®
Chloramfenikol	Cm	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	Sigma
Chlorid hořečnatý, hexahydrát		$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Lach-Ner
Chlorid manganatý		$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	Lachema
Chlorid sodný		NaCl	Lach-Ner
Chlorid vápenatý		$CaCl_2$	Lachema
Chloroform		$CHCl_3$	Lach-Ner
Izopropanol		$C_3H_8O_3$	Lach-Ner
Kanamycin		$C_{18}H_{36}N_4O_{11}$	Fluka
Kyselina chlorovodíková		HCl	Lach-Ner
Kyselina nikotinová		$C_6H_5NO_2$	Sigma-Aldrich®
Kyselina octová		CH_3COOH	Lach-Ner
β -merkптоethanol		C_2H_6OS	Sigma-Aldrich®
Metanol	MetOH	CH_4O	Lach-Ner
Neopeptone			Dufci
Octan sodný	NaOAc	CH_3COONa	Lach-Ner
Pantothenát vápenatý	vit B ₅	$C_9H_{16}NO_5 \cdot 0,5Ca$	Sigma-Aldrich®
Peroxodisíran amonný	APS	$(NH_4)_2S_2O_8$	Lachema
Piperazin-N,N'-bis-2-ethansulfonová kyselina	PIPES	$C_8H_{18}N_2O_6S_2$	Sigma-Aldrich®
Polyoxyetylenorbitan-monolaurat	TWEEN® 20	$C_{58}H_{114}O_{26}$	Sigma-Aldrich®
Pyridoxin hydrochlorid	vit B ₆	$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	Sigma-Aldrich®
Pyrohroznan sodný		$C_3H_3NaO_3$	Sigma-Aldrich®
Riboflavin	vit B ₂	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	Sigma-Aldrich®
Rifampicin	Rif	$C_{43}H_{58}N_4O_{12}$	Sigma-Aldrich®

Tabulka 4.4. Pokračování

NÁZEV	ZKRATKA	VZOREC	VÝROBCE
RNaseZap™			Sigma-Aldrich®
Sacharosa		C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Lachema
Síran měďnatý, pentahydrát (modrá skalice)		CuSO ₄ .5H ₂ O	Lachema
Síran zinečnatý, heptahydrát (bílá skalice)		ZnSO ₄ .7H ₂ O	Lachema
Síran železnatý, heptahydrát (zelená skalice)		FeSO ₄ .7H ₂ O	Lachema
Tetracyklin	Tet	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	Serva
Tetramethylethyldiamin	TEMED	C ₆ H ₁₆ N ₂	Serva
Thiamin hydrochlorid	vit B ₁	C ₁₂ H ₁₇ Cl ₂ N ₄ OS.HCl	Sigma-Aldrich®
Tris-hydroxymethyl-aminomethan	Trizma® BASE		Sigma-Aldrich®
Tris-hydroxymethyl-aminomethan hydrochlorid	Trizma® hydrochlorid		Sigma-Aldrich®
Uridin		C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	Sigma-Aldrich®

4.1.8 Komerční soupravy (kity), membrány, filmy a kazety

Membrány na přenos proteinů nebo DNA z polyakrylamidového či agarózového gelu

Immobilon®-P (PVDF membrána - polyvinyliden fluoridová membrána) (Millipore)

Hybond™-N+ (nylonová membrána) (Amersham Biosciences)

Filmy na záchyt signálu při imunodetekci

MEDIX XBU (MEDICAL X-RAY FILM) (Foma Bohemia, s.r.o.)

CP-BU new (MEDICAL X-RAY FILM BLUE) (Agfa)

Kazety na vyvolání chemiluminiscenčního signálu při imunodetekci

OKAMOTO PL-B_{TYPE}13x18™ (Okamoto)

FUJIFILM BAS CASSETTE 2025 (Fujifilm)

V tabulce 4.5 je uveden seznam používaných komerčních souprav a jejich využití.

Tabulka 4.5. Seznam a využití komerčních souprav.

NÁZEV	VYUŽITÍ	VÝROBCE
Pierce [®] BCA Protein Assay Kit	Stanovení koncentrace proteinů	Thermo Scientific
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Imunodetekce	Thermo Scientific
Taq PCR Core Kit	PCR reakce	Qiagen
SuperScript [™] III Reverse Transcriptase	Syntéza cDNA	Invitrogen
SYBR [®] Green JumpStart [™] Taq ReadyMix [™] for Quantitative PCR	qPCR	Sigma Aldrich [®]
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Extrakce DNA z agarózového gelu	Qiagen
QIAprep [®] Spin Miniprep kit	Izolace plazmidové DNA	Qiagen
MinElute [™] Reaction CleanUp Kit	Přečištění izolovaných restrikčních fragmentů	Qiagen

4.1.9 Laboratorní přístroje, programy a software

Centrifugy

Centrifuge 5417C, Centrifuge 5424 (Eppendorf)
 Biofuge pico (Heraeus Instruments)

Cyklery

Mastercycler gradient (Eppendorf)
 BIOER (GenePro)
 iQ5 real-time PCR detection system (BioRad)

Elektroforézy

OWL EASYCAST[™] B1A (ThermoScientific)
 ATTO (Atto)

Spektrofotometry

DU-730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer	(Beckman Coulter)
SECOMAM PRIM	(BioTech)
CO8000 Cell Density Meter	(WPA)

Váhy

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

Vodní lázně

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

Ostatní přístroje

FastPrep FP120	(ThermoSavant)
GEL BOX, VERTICAL BLOTTER	(Labnet)
Magnetická míchačka s možným ohřevem	(ThermoScientific)
U.V. Transilluminator	(BioTech)
SYNGENE BIO IMAGING	(Syngene)

Programy a software

GeneSnap - snímání obrazu gelu pod UV kamerou	(Syngene)
SeqBuilder - tvoření genetických map	(Lasergene)
SeqMan - ověření sekvenovaných částí genomu	(Lasergene)

4.2 Metody

4.2.1 Manipulace s DNA

4.2.1.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR) a následná purifikace PCR produktů

Tato molekulárně-biochemická metoda umožňuje syntetizování požadovaného úseku DNA ve velkém množství, a to díky cyklickému opakování jednotlivých částí reakce (denaturace, hybridizace oligonukleotidů a elongace požadovaného úseku DNA).

Teplota hybridizace oligonukleotidů (T_m ; °C) se určuje na základě jejich sekvence, a to podle vzorce:

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

Doba elongace závisí na délce amplifikovaného fragmentu a na použité polymeráze a byla tedy zvolena podle pokynů výrobce. Při použití chromozomální DNA jako matrice bylo zvoleno 35 amplifikačních cyklů, zatímco pokud byla matricí plazmidová DNA, pro amplifikaci stačilo 25 cyklů.

V případě potřeby byl amplifikovaný fragment pročištěn pomocí komerční soupravy PCR Purification Spin Kit (Genomed). Při práci byly dodrženy pokyny výrobce.

4.2.1.2 Agarová elektroforéza a extrakce DNA z gelu

Pro analýzu DNA pomocí gelové elektroforézy byl použit agarózový gel, do nějž byly pro zviditelnění DNA pod UV zářením přidány GelRed (Biotium) nebo ethidium bromid (Sigma-Aldrich®). K nanášených vzorků byl použit 6x Loading Dye (Fermentas). Elektroforéza probíhala v TAE pufru při napětí 5 V/cm.

S použitím komerční soupravy Gel Extraction Spin Kit (Qiagen) byly pokyny výrobce izolovány separované fragmenty z gelu.

4.2.1.3 Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleáz

Restrikční endonukleázy (RE; restriktázy) jsou enzymy, které štěpí oba řetězce DNA najednou, v místě vazby deoxyribózy a fosfátového zbytku. Reakční podmínky byly zvoleny podle použité restriktázy a pokynů od výrobce (New England Biolabs). V případě potřeby byly vzniklé fragmenty rozděleny na agarózovém gelu a extrahovány s použitím komerční soupravy Gel Extraction Spin Kit (Qiagen) nebo rovnou přečištěny kitem MinElute™ Reaction CleanUp Kit (Qiagen).

4.2.1.4 Ligace

Ligace je metoda přímého spojování částí DNA různého původu. Tuto reakci provádí enzym T4 DNA ligáza, který katalyzuje vytvoření fosfodiesterové vazby mezi úseky DNA. Ligační reakce byla provedena v objemu 20 µl a inkubována přes noc při pokojové teplotě. Při práci byly respektovány pokyny výrobce.

4.2.2 Manipulace s RNA

4.2.2.1 Izolace celkové RNA *S. pneumoniae*

U této metody bylo potřeba dodržovat některá opatření, týkající se zejména sterilizace materiálů a čistoty prostředí, neboť všudypřítomné RNázy velmi komplikují práci s RNA.

Byly používány špičky s filtrem (Axygen) a speciální mikroskopické pipety (Axygen), roztoky byly připravovány z 2x sterilizované deionizované vody. Pipety, pracovní plocha i rukavice byly vždy před prací očištěny roztokem RNaseZap™ (Sigma-Aldrich®).

Izolace RNA byla provedena metodou upravenou podle Cheng *et al.* (1997). Kmeny *S. pneumoniae* byly pěstovány v 50 ml média, které bylo inokulováno buňkami z glycerolové konzervy v poměru 1:50. Při $OD_{400} = 0,4$ byly buňky krátce zchlazeny na ledu a centrifugovány (5 min / 5 000 rpm / 4 °C). Supernatant byl odstraněn, peleta promyta ledovým pufrům a směs znovu centrifugována (5 min / 5 000 rpm / 4 °C). Poté byl k peletě přidán 1 ml lyzačního roztoku RNA blue (Top Bio) a vzorek byl inkubován 5 min při pokojové teplotě. RNA byla vysrážena přidáním 100 µl 3 M NaOAc a 1 ml kyselého fenolu, zahřátého na 65 °C. Směs byla inkubována 10 min při 65 °C, centrifugována (10 min, 10 000 rpm, 4 °C) a tato extrakce byla provedena ještě dvakrát. Po poslední centrifugaci byla horní fáze odebrána do čisté mikroskopické pipety a byl k ní přidán ekvivalentní objem izopropanolu. Směs byla inkubována při -20 °C, čímž došlo k vysrážení RNA. Vzniklý precipitát byl centrifugován (20 min, 10 000 rpm, 4 °C) a 2x promýván 80% etanolem. Peleta byla 5 min sušena při pokojové teplotě a následně rozpuštěna v 50 µl 2x sterilizované vody. Vzorky byly skladovány při -80 °C.

Měření absorbance při 260 nm byla určena koncentrace izolované RNA ve vzorku. Její čistota byla dále ověřena měřením poměru absorbancí A_{260}/A_{280} . Kvalita izolované RNA byla ověřena pomocí elektroforézy v agarózovém gelu: 5 µg purifikované RNA bylo rozpuštěno ve vzorkovém pufru, denaturováno 5 min při 75 °C a separováno na agarové elektroforéze.

4.2.2.2 Syntéza cDNA (RT-PCR)

Pro syntézu cDNA (pro přepis genetické informace molekuly RNA do molekuly DNA) byla využita komerční souprava s reverzní transkriptázou SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen), při práci byly dodržovány pokyny výrobce. 5 µg celkové RNA *S. pneumoniae* bylo smícháno s 2 µg náhodných hexanukleotidů (Invitrogen) a doplněno vodou do 8,8 µl. Směs byla inkubována 10 min při 70 °C a poté krátce ochlazená (2 min, 4 °C). Do reakční směsi o celkovém objemu 15 µl byly následně přidány 3 µl 5x First-strand buffer, 0,3 µl 25 mM dNTPs (Promega), 1,5 µl 0,1 M DTT a 1 µl polymerázy Superscript III a 0,4 µl inhibitoru RNáz RNasinu (Promega). Směs byla inkubována 10 min při 25 °C a vlastní reverzní transkripce probíhala 2 hodiny při teplotě 42 °C. Následovala inaktivace reakce 15 min při 70 °C. Výsledná cDNA byla uchovávána v -80 °C.

4.2.2.3 Kotranskripční analýza a RT-PCR

Pro kotranskripční analýzu provedenou pomocí semikvantitativní RT-PCR byla použita Taq polymeráza (Taq PCR Core Kit; Qiagen), při práci byly respektovány pokyny výrobce. V jedné PCR reakci bylo amplifikováno 50 ng templátové cDNA a jako negativní kontrola byla použita cDNA syntetizovaná bez přídavku reverzní transkriptázy. Reakce byla zahájena počáteční denaturací (3 min při 94 °C) a následný PCR program sestával z těchto kroků: denaturace (30 s při 94 °C), hybridizace oligonukleotidů (60 s při 58 °C), elongace (2 min při 72 °C). Opakování cyklů probíhalo 30x. Vzorby byly uchovávány v -80 °C.

Seznam oligonukleotidů použitých při kotranskripční analýze a velikost PCR produktu jsou uvedeny v tabulce 4.6. Použité oligonukleotidy byly navrženy tak, abychom mohli ověřit přítomnost PCR produktu společného vždy pro dva sousední testované geny.

Tabulka 4.6. Oligonukleotidy použité při kotranskripční analýze a velikost jejich PCR produktu

GEN	REAKCE	OLIGONUKLEOTIDY	VELIKOST PCR PRODUKTU
<i>spr1058</i>			
	1.	ZS16 + ZS20	518 pb
<i>spr1057</i>			
	2.	ZS3 + <i>spr1057</i> 2ndf	661 pb
<i>spr1056</i>			
	3.	ZS4 + ZS5	644 pb
<i>spr1055</i>			
	4.	ZS6 + ZS7	695 pb
<i>spr1054</i>			
	5.	ZS8 + ZS9	683 pb
<i>spr1053</i>			
	6.	ZS10 + ZS11	683 pb
<i>spr1052</i>			
	7.	AU33 + AU34	424 pb
<i>spr1051</i>			
	8.	AU35 + AU36	397 pb
<i>spr1050</i>			
	9.	AU37 + AU38	403 pb
<i>spr1049</i>			
	10.	AU39 + AU40	499 pb
<i>spr1048</i>			
	11.	AU41 + AU42	493 pb
<i>spr1047</i>			
	12.	AU43 + AU44	483 pb
<i>spr1046</i>			

4.2.2.4 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

Kvantitativní PCR („*real-time PCR*“, PCR v reálném čase) byla provedena za účelem stanovení změny genové exprese vybraných genů, zejména pak pro porovnání exprese genu *spr1057* u divokého kmene Sp1 a vybraných mutantních kmenů *S. pneumoniae*. Od běžné PCR se qPCR liší tím, že produkt není analyzován až na konci reakce (použitím agarózové gelové elektroforézy), ale již v jejím průběhu, kdy je emitované fluorescenční záření použitého fluoroforu zaznamenáno během jednotlivých amplifikačních cyklů.

Pro qPCR byla použita komerční souprava SYBR[®] Green JumpStart[™] Taq ReadyMix[™] for Quantitative PCR (Sigma Aldrich[®]). Finální koncentrace reakčních komponent ve 20 µl reakci byly následující: 0,5 µM každý z oligonukleotidů,

10 nM fluorescein, 20 ng cDNA jako templát a 1x koncentrovaný SYBR[®] Green JumpStart[™] Taq ReadyMix (Sigma Aldrich[®]). Jako negativní kontrola byl použit produkt PCR reakce bez předešlé reverzní transkripce. Seznam všech použitých oligonukleotidů pro qPCR analýzu je uveden v tabulce 4.6.

Cyklus byl zahájen počáteční denaturací (2 min při 94 °C). Následoval obvyklý tříkrokový program, sestávající z denaturace (15 s při 94 °C), hybridizace oligonukleotidů (25 s při 56 °C) a prodlužování řetězce (25 s při 72 °C). Závěrečné teploty tání PCR produktů proběhly podle následujícího programu: 95 °C 1 min, 54 °C 1 min a gradient 54–94 °C, kdy se každých 10 s mění teplota o 0,5 °C. Specifická amplifikace byla ověřena analýzou disociačních křivek (teplot tání).

Amplifikace probíhala na cykleru iQ5 real-time PCR detection system (BioRad) pro každý z analyzovaných vzorků v triplicátech. Ze získaných dat pak byla spočítána změna genové exprese u testovaných genů metodou relativní kvantifikace podle Pfaffla (Pfaffl, 2001). Za statisticky významné geny s ovlivněnou expresí byly považovány ty geny, které dosáhly minimální změny genové exprese 2x. Jako referenční gen byl použit gen *gyrA* (*spr1099*), kódující α podjednotku DNA gyrázy *S. pneumoniae* (Sasková *et al.*, 2007).

Manipulace s proteiny

4.2.3.1 Izolace proteinů – mechanická dezintegrace buněk

Růst exponenciálně rostoucí kultury *S. pneumoniae* byl přerušen při OD₆₀₀ = 0,4, kdy byla kultura centrifugována 10 min / 5 000 rpm. Supernatant byl pak odstraněn a vzniklá peleta byla resuspendována ve 400 μ l dezintegračního pufru. Byly přidány inhibitory proteáz (4 μ l) a benzonáza (0,5 μ l) a pro mechanické rozrušení buněk skleněné kuličky. Suspenze byla homogenizována na přístroji Fast Prep (ThermoSavant) za těchto podmínek: rychlost 4,5 m/s při 4 °C po dobu 20 vteřin, následně umístění vzorků na 2 minuty do ledu. Tento postup byl opakován 4x. Po homogenizaci byly kultury odstředěny 10 min / 5 000 rpm. Supernatant byl odebrán do čistých 1,5 ml zkumavek a v 10 μ l vzorku byla pomocí komerční soupravy Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) změřena koncentrace proteinů.

4.2.3.2 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů ve vzorku byla stanovena použitím komerční soupravy Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Principem této kolorimetrické metody je reakce bicinchoninové kyseliny (BCA) s měďnatými kationty, uvolněnými po vazbě Cu^{2+} s peptidovou vazbou proteinů (Smith *et al.*, 1985).

Pro výpočet koncentrace proteinů ze zjištěné absorbance byla dle pokynů výrobce připravena ředící řada proteinu BSA o známé koncentraci. Intenzita vzniklého zabarvení byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm. Následně byla sestrojena kalibrační křivka, proložena přímkou a pomocí získané rovnice regrese vypočítána koncentrace proteinů.

4.2.3.3 Izolace proteinů – chemická dezintegrace buněk

Z exponenciálně rostoucí kultury *S. pneumoniae* bylo do čisté 1,5 ml zkumavky odebráno takové množství kultury, které odpovídalo ekvivalentu 1 ml = OD_{600} 0,4. Odebrané množství bylo odstředěno 2 min / 13 000 rpm, supernatant byl důkladně odstraněn a vzniklá peleta byla resuspendována ve 20 μl roztoku SEDS. Tato suspenze byla inkubována ve 37 °C dokud buňky nezlyzovaly (došlo k vyčerení roztoku; délka inkubace závisela na použitém kmeni, obvyklá doba byla přibližně 3 min). Ke vzorku bylo následně přidáno 20 μl 2x koncentrovaného denaturačního pufru a vše bylo inkubováno 10 min při 100 °C. Takto připravené vzorky na analýzu pomocí SDS-PAGE byly uchovávány v -20 °C.

4.2.3.4 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS (SDS-PAGE)

SDS-PAGE je separační metoda, pomocí které se proteiny v polyakrylamidovém gelu dělí pouze na základě své molekulární hmotnosti. Působení dodecylsírany sodného (SDS) totiž proteiny nejen denaturuje, ale uděluje jim také shodný záporný náboj.

Proteinový vzorek byl před nanesením smíchán s denaturačním pufrům a inkubován 10 minut při 100°C. SDS-PAGE elektroforéza probíhala v elektroforetickém pufru při napětí 15 V/cm^2 . Pro naše účely byly používány 12 % a 14 % separační gely a 4 % gely zaostřovací. V tabulce 4.7 je uvedeno složení používaných gelů.

Tabulka 4.7. Složení a koncentrace používaných polyakrylamidových gelů.

GEL		ZAOŠŤŮVACÍ	SEPARAČNÍ	
KONCENTRACE		4 %	12 %	14 %
SLOŽENÍ	akrylamid 30%	800 µl	8 ml	9,3 ml
	Tris 1,5M (pH 8,8)	---	5 ml	5 ml
	Tris 0,5M (pH6,8)	1,5 ml	---	---
	SDS 10%	60 µl	200 µl	200 µl
	APS 10%	60 µl	200 µl	200 µl
	TEMED	7,5 µl	20 µl	20 µl
	H ₂ O	3,6 ml	6,6 ml	5,3 ml
OBJEM		6 ml	20 ml	20 ml

4.2.3.5 Přenos proteinů na membránu („Western blotting“) a jejich detekce

Pro imunodetekci proteinů v analyzovaném vzorku, rozdělených na polyakrylamidovém gelu, bylo potřeba přenést tyto proteiny na membránu. Proteiny z gelu byly přenášeny v blotovacím pufru na Immobilon[®]-P PVDF membránu (Millipore), která je za normálních podmínek hydrofilní a proto byla před začátkem práce aktivována metanolem. Samotný přenos proteinů probíhal v blotovacím pufru pomocí mokrého elektroblotovacího přístroje (GEL BOX VERTICAL BLOTTER; Labnet), 30 minut při 360 mA. Při práci bylo postupováno dle pokynů výrobce.

Vybrané proteiny přenesené na PVDF membráně byly následně detekovány pomocí specifických protilátek proti epitopu FLAG.

Imunodetekce proteinů značených epitopem FLAG

Byly používány myši (Sigma-Aldrich[®]) nebo králíci (Sigma-Aldrich[®] a GeneScript) primární protilátky proti FLAGovému epitopu proteinu (Anti-FLAG) a sekundární Anti-Rabbit IgG-POD (Sigma-Aldrich[®]) nebo Anti-Mouse IgG-POD (Sigma-Aldrich[®]) protilátky konjugované s křenovou peroxidázou.

Postup při imunodetekci proteinů s epitopem FLAG byl následující:

- zablokování nespecifických míst povrchu membrány inkubací membrány v roztoku TBS-T s 5% BSA (přes noc při 4°C)
- inkubace s primární protilátkou; ředění 1:1 000 v TBS-T pufru s 1% BSA (1 hodina, pokojová teplota)
- promývání membrány v TBS-T pufru (3 x 10 minut, pokojová teplota)
- inkubace membrány se sekundární protilátkou; ředění 1:10 000 v TBS-T pufru s 1% BSA (1 hodina, pokojová teplota)
- promývání membrány v TBS-T pufru (3 x 10 minut, pokojová teplota)
- vyvolání peroxidázové aktivity pomocí komerční soupravy SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)
- vizualizace peroxidázové reakce na rentgenovém filmu

4.2.4 Manipulace s buňkami *E. coli*

*4.2.4.1 Kultivace *E. coli**

Pro kultivaci bakterií *E. coli* bylo používáno buď tekuté nebo pevné LB médium. Pro přípravu kompetentních buněk byly bakterie kultivovány v SOB médiu. Kultivace probíhala při 37°C. V případě tekutého média probíhala kultivace za stálého třepání.

*4.2.4.2 Příprava kompetentních buněk *E.coli DH5α**

Příprava kompetentních buněk byla provedena metodou podle Inoue *et al.* (1990). Bakteriální kultura *E. coli* byla kultivována v LB médiu do dosažení stacionární fáze růstu, přibližně $OD_{600} = 0,6$. V této fázi bylo odebráno 400 μ l suspenze a inokulováno do 100 ml SOB média. Za stálého třepání byla tato směs kultivována při teplotě 18 °C opět do stacionární fáze růstu (přibližně $OD_{600} = 0,6$). Po dosažení této optické denzity byly buňky inkubovány 10 min při 4 °C a následně centrifugovány (10 min / 2 500 g / 4 °C). Peleta byla rozpuštěna ve 32 ml ledového TB pufru a buňky byly opět inkubovány 10 min při 4 °C a odstředěny (10 min / 2 500 g / 4 °C). Peleta byla resuspendována v 8 ml TB pufru, bylo přidáno DMSO (výsledná koncentrace 7 %) a vše bylo inkubováno 10 min při 4 °C. Výsledná suspenze byla rozdělena po 100 μ l do mikrozkušavek, rychle zamrzána kapalným dusíkem a uchovávána v -80 °C.

4.2.4.3 Transformace *E. coli*

Kompetentní buňky (100 µl) byly rozmrazeny při 4°C, byla k nim přidána ligační směs a po dobu 30 minut bylo vše inkubováno při 4°C. Následný teplotní šok (45 sekund při 42 °C, 45 sekund při 4°C) usnadnil příjem plazmidové DNA do buňky bakterie. K suspenzi buněk bylo následně přidáno 400 µl LB média a buňky byly kultivovány 1 hodinu při 37 °C na třepačce. Poté byla buněčná suspenze vyseta na LB agar s příslušným antibiotikem (pro selekci buněk s vektorem) a kultivována přes noc při 37 °C.

4.2.4.4 Izolace plazmidové DNA

Pro izolaci plazmidové DNA byla využita komerční souprava QIAprep® Spin Miniprep kit (Qiagen), při práci byly respektovány pokyny výrobce.

4.2.5 **Manipulace s buňkami *S. pneumoniae***

4.2.5.1 Kultivace *S. pneumoniae*

Kmeny *S. pneumoniae* byly kultivovány v tekutých (BHI, TSB, CAT, C+Y) i na pevných médiích (gelóza, krevní agar). Kultivace probíhala při 37 °C, v případě tekutých médií staticky ve vodní lázni.

Pro indukci exprese genu *spr1057* z inducibilního zinkového promotoru byl do média přidán 0,1 mM ZnCl₂. Současně s tím byl ale do média přidán také 0,1 mM MnCl₂, neboť přítomnost 100 – 200 µM Zn²⁺ vede ke stresu *S. pneumoniae* a k růstovým defektům a dodatečné přidání Mn²⁺ do média plně obnoví normální růst *S. pneumoniae* (Jacobsen *et al.*, 2011).

Měření růstu bakteriálních kultur a příprava konzerv

Za účelem sledování růstu bylo zvolené tekuté médium inokulováno bakteriemi v poměru 1:50 a v pravidelných 30 minutových intervalech byla na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm (OD₆₀₀) měřena optická denzita kultury. Získaná data byla následně použita na vytvoření růstové křivky bakteriální kultury. Data uvedených růstových křivek byla, pokud není uvedeno jinak, získána z měření v triplicátech, přičemž i jednotlivé experimenty byly opakovány 3x. Bakteriální konzervy byly připraveny z exponenciálně rostoucí kultury (OD₆₀₀ = 0,4) a skladovány v 15% glycerolu v -80 °C.

4.2.5.2 Sledování citlivosti bakterií k modifikovaným nukleotidům

C+Y médium bylo inokulováno buňkami *S. pneumoniae* v poměru 1:50. V případě potřeby byl do média přidán $ZnCl_2$ jako induktor exprese genu *spr1057*, a dále $MnCl_2$, oba v koncentraci 0,1 mM. Bakteriální růst v přítomnosti různých koncentrací modifikovaných nukleotidů 5-FdU (0, 2 a 5 μM) nebo 5-BrdU (0, 2, 5 a 10 μM) byl monitorován v pravidelných 30 minutových intervalech na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm (OD_{600}).

4.2.5.3 Sledování inkorporace 5-BrdU do DNA *S. pneumoniae*

C+Y médium bylo inokulováno buňkami *S. pneumoniae* v poměru 1:50. Do média byl v případě potřeby přidán induktor exprese genu *spr1057* $ZnCl_2$ a také $MnCl_2$ v koncentraci 0,1 mM. V příslušné koncentraci byl do média přidán rovněž modifikovaný nukleotid 5-BrdU (Sigma-Aldrich®). Při $OD_{600} = 0,25$ byly kultury sklizeny a byla izolována chromozomální DNA. Detekce inkorporace 5-BrdU do chromozomální DNA byla provedena podle následujícího protokolu.

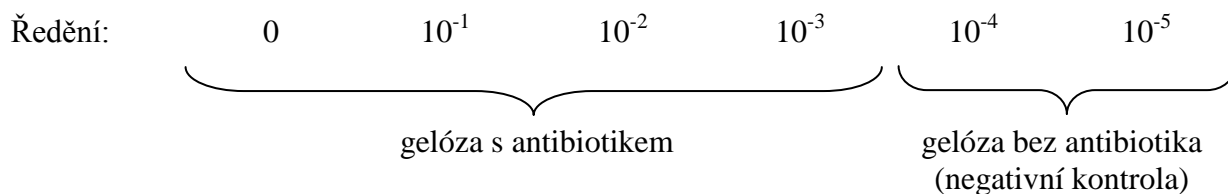
Postup při detekci inkorporace 5-BrdU do chromozomální DNA *S. pneumoniae*:

- izolovaná DNA naředěna na 1 $\mu g/\mu l$, denaturována (10 minut při 99 °C) a nanesena na membránu Hybond™-N+ (Amersham Biosciences)
- DNA na membráně fixována pod UV zářením (3 minuty)
- membrána inkubována s primární protilátkou Anti-bromodeoxyuridine-POD, ředění 1:1 000 v PBS-T pufru s 5% BSA (přes noc, 4 °C)
- další den membrána promývána v PBS-T pufru (3 x 10 minut, pokojová teplota)
- peroxidázová aktivita vyvolána pomocí komerční soupravy SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)
- vizualizace peroxidázové reakce na rentgenovém filmu

4.2.5.4 Transformace DNA do *S. pneumoniae*

Transformace DNA do bakterií *S. pneumoniae* byla provedena v TSBc médiu pomocí syntetického peptidu CSP. K 950 μl transformačního média bylo přidáno 50 μl bakteriální suspenze *S. pneumoniae* přímo z bakteriální konzervy, 12 μl transformované DNA (1 $\mu g/ml$ pro chromozomální DNA, 20 – 100 ng/ml pro plazmid či PCR produkt) a 250 ng CSP.

Transformační směs byla inkubována 2 hodiny při 37 °C. Poté byla vytvořena ředící řada a z každého ředění bylo inokulováno 100 µl na misky s gelózou (a případně selekčním antibiotikem) následujícím způsobem:



Pro testování transformační účinnosti a jako pozitivní kontrola sloužila chromozomální DNA izolovaná z kmene Sp5 *S. pneumoniae*, která nese gen pro rezistenci k rifampicinu. V případě pozitivní kontroly bylo na gelózu s antibiotikem inokulováno pouze ředění 10⁻² a 10⁻³.

Transformační účinnost byla vypočítána jako poměr získaných kolonií na miskách s antibiotikem k počtu všech kolonií získaných na miskách bez antibiotika.

4.2.5.5 Izolace chromozomální DNA *S. pneumoniae*

Bakteriální kmen byl inokulován do 10 ml média a v exponenciální fázi růstu (přibližně OD₆₀₀ = 0,6) byla kultura centrifugována (10 min / 5 000 rpm) a supernatant důkladně odstraněn. K peletě bylo přidáno 250 µl roztoku SEDS a suspenze byla inkubována při 37°C po dobu přibližně 3 min (lyze buněk). Proteiny ve vzorku byly degradovány přidáním 1 µl proteinázy K (10 mg/ml) a následnou inkubací 15 min při 56°C. Ke vzorku bylo po inkubaci přidáno 250 µl TE pufru a 500 µl směsi fenol/chloroform. Vše bylo intenzivně promícháno. Následovala centrifugace (10 min při 13 000 rpm), po které byla horní fáze přenesena do čisté 1,5 ml zkumavky. K tomu bylo přidáno 500 µl chloroformu, směs byla intenzivně promíchána a opět centrifugována (10 min / 13 000 rpm). Horní fáze byla poté opět přenesena do čisté 1,5 ml zkumavky a DNA byla vysrážena přidáním 50 µl 3 M NaOAc a 500 µl izopropanolu. Obsah zkumavky byl lehce promíchán a centrifugován (10 min / 13 000 rpm). Supernatant byl odstraněn a peleta promývána 80% ethanolem. Na závěr byl obsah zkumavky opět odstředěn (5 min / 13 000 rpm), dobře odstraněn etanol a peleta byla resuspendována v 50 µl TE pufru.

5 VÝSLEDKY

Analýzou globálního transkriptomu mutantního kmene s delecí v genu kódujícího Ser/Thr proteinkinázu eukaryotického typu StkP u *S. pneumoniae* byla odhalena významně snížená exprese genu *spr1057* a snížená exprese genů v jeho okolí, zejména pak genů *spr1056*, *spr1055*, *spr1054*, *spr1053* a *spr1052*. Nejsilnější represe v Δ *stkP* kmeni byla detekována u genu *spr1057* a následně potvrzena pomocí qPCR analýzy (500x snížená exprese *spr1057* v porovnání s divokým typem) (Sasková *et al.* 2007).

Velikost genu *spr1057* je 714 pb a ze sekvenční analýzy DNA *in silico* se lze domnívat, že se jedná o první gen v předpokládaném operonu *spr1057 – spr1052* (podrobněji v kapitole 5.3). Enzymy kódované těmito geny jsou součástí metabolismu nukleotidů nebo dalších buněčných procesů, týkajících se zejména oprav DNA (<http://www.genome.jp/kegg/>). Produkt genu *spr1052* je členem skupiny efluxních proteinů rodiny MATE („*multi-antimicrobial extrusion protein*“). Gen *spr1053* (gen *pyrC*) kóduje dihydroorotázu (účastní se syntézy pyrimidinových nukleotidů). Produktem genu *spr1054* (gen *mutX*) je 8-oxo-dGTP nukleosidáza. Spolu s produktem genu *spr1055* (gen *ung*; produkt DNA-uracil glykosyláza) se účastní opravných mechanismů DNA. Gen *spr1056* kóduje protein s doposud neobjasněnou funkcí. Produktem genu *spr1057* je protein Spr1057, který je tvořen 237 aminokyselinami (obrázek 5.1) a jeho hmotnost je přibližně 26 kDa.

```
MFYKFLFLDLDHTLLDFDAAEDVALTQLLKEEGVADIQAYKDYYVPMNKALWKDLELKKISKQELVNTRFSRL
FSHFGQEKDGSFLAQRYYFYLAQQGQTLSGAHDLLSLIERDYDLYAATNGITAIQTGRLAQSGLVYPYFNQVVIS
EQLQTQKPDALFYEKIGQIQIAGFSKEKTLMIGDSLADIQGGNNAGIDTIWYNPHHLENHTQAQPTYEVYSYQD
LLDCLDKNILEKITF
```

Obr. 5.1. Sekvence proteinu Spr1057 *Streptococcus pneumoniae*. (Zdroj: <http://www.genome.jp/kegg/>)

Jedná se o hypotetický protein z enzymatické nadčeledi „*HAD-like hydrolases superfamily*“, u něhož byla zjištěna 32% sekvenční homologie s proteinem YjjG *E. coli*. Na základě této sekvenční podobnosti a konzervovanosti všech aminokyselin v katalytických doménách se předpokládá, že patří mezi „*house-cleaning*“ nukleotidázy nadčeledi HAD. Nasvědčuje tomu také testovaná substrátová specifita tohoto proteinu, která je nejvyšší k 5-FdUMP (5-flourodeoxyuridin monofosfát) (Vacková, 2010), stejně jako u proteinu YjjG *E. coli* (Proudfoot *et al.*, 2004).

5.1. Příprava mutantních kmenů *S. pneumoniae*

Za účelem studia funkce proteinu Spr1057 *in vivo* bylo připraveno několik mutantních kmenů *S. pneumoniae*, jejichž přehled je uveden v tabulce 4.1. Kromě delečního kmene (Δ spr1057) byly dále připraveny kmeny exprimující spr1057 z indukibilního zinkového či z nativního promotoru na různém genetickém pozadí. Pro možnost detekce proteinu v analyzovaném vzorku byl gen spr1057 na C-konci fúzován s epitopem FLAG (osm aminokyselin v pořadí DYKDDDDK). Takto značené proteiny byly detekovány protilátkami proti tomuto epitopu.

5.1.1 Kmen Δ spr1057 *S. pneumoniae*

Pro přípravu kmene s chromozomální delecí genu spr1057 byla použita Cheshire kazeta (Weng *et al.*, 2009). Princip fungování kazety je podrobněji popsán v kapitole 4.1.1.

Příprava konstruktů

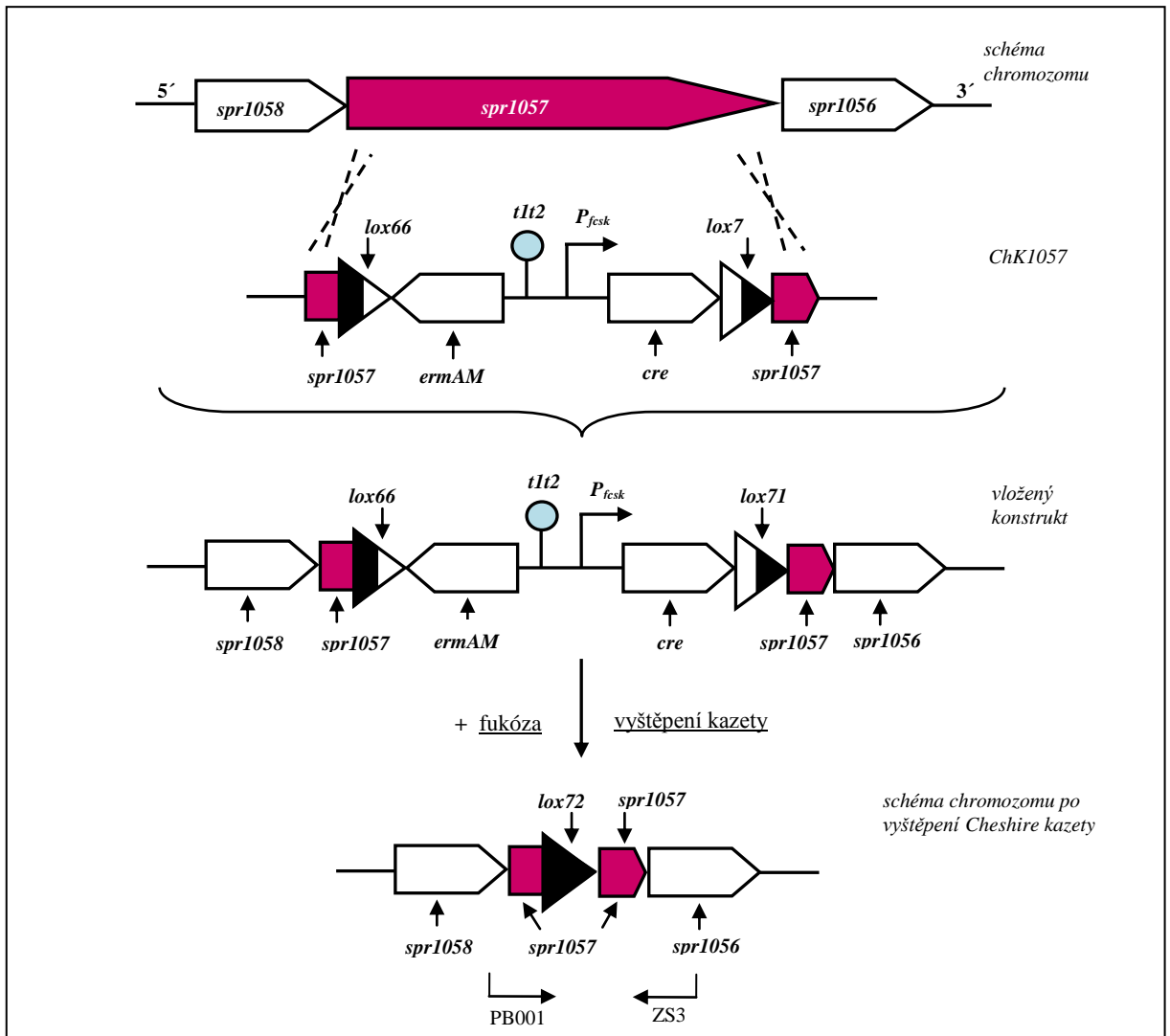
Konstrukt pro delecí genu spr1057 Cheshire kazetou byl připraven spojením této kazety s okolím deletovaného genu a pojmenován ChK1057 (Vacková, 2010). Kromě sekvencí homologních k sekvencím chromozomálního lokusu nacházejícího se před a za genem spr1057 obsahuje tento konstrukt z každé strany loxP místa, gen pro Cre rekombinázu a gen rezistence k erytromycinu (obrázek 5.2). Tento konstrukt byl použit k přípravě kmenů Sp153 a Sp158.

Příprava kmenů

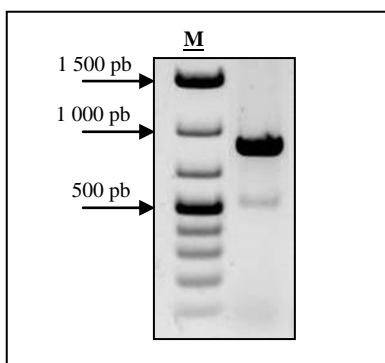
Konstrukt ChK1057 byl transformován do divokého kmene Sp1 a inzertován do genomu mechanismem homologní rekombinace. Po transformaci byla u kolonií rezistentních na erytromycin ověřena správnost vložení kazety pomocí PCR reakce s použitím oligonukleotidů PB001 a ZS3. Kmen byl označen jako **Sp153**.

Kmen Sp153 byl inkubován v médiu s přidavkem 0,5% L-fukózy, čímž došlo k aktivaci exprese Cre rekombinázy a následnému vyštěpení Cheshire kazety z genomu *S. pneumoniae* při zachování čtecího rámce zbylé sekvence deletovaného genu (obrázek 5.2). V místě delece genu spr1057 zůstaly pouze krátké okrajové sekvence 5' (29 pb) a 3' (48 pb) deletovaného genu a lox72 sekvence (34 pb). Důkazem vyštěpení kazety byla ztráta

erytromycinové rezistence pneumokoka. Výsledný deleční kmen v genu *spr1057*, označený jako Sp158, byl ověřen pomocí PCR amplifikace (s oligonukleotidy PB001 a ZS3, obrázek 5.3) a následnou sekvenční analýzou.



Obr. 5.2. Schéma přípravy delece genu *spr1057* v divokém kmeni *S. pneumoniae*. *ermAM*: gen pro rezistenci k erytromycinu; *t1t2*: terminátor; *P_{fesk}*: inducibilní fukózový promotor; *lox66*, *lox71*: specifické sekvence, které rozpoznává Cre rekombináza; *lox72*: pozůstatek po vyštěpení Cheshire kazety z genomu *S. pneumoniae*; *cre*: gen kódující Cre rekombinázu; **PB001** a **ZS3**: oligonukleotidy pro ověření vyštěpení kazety. (Upraveno podle Weng *et al.*, 2009)



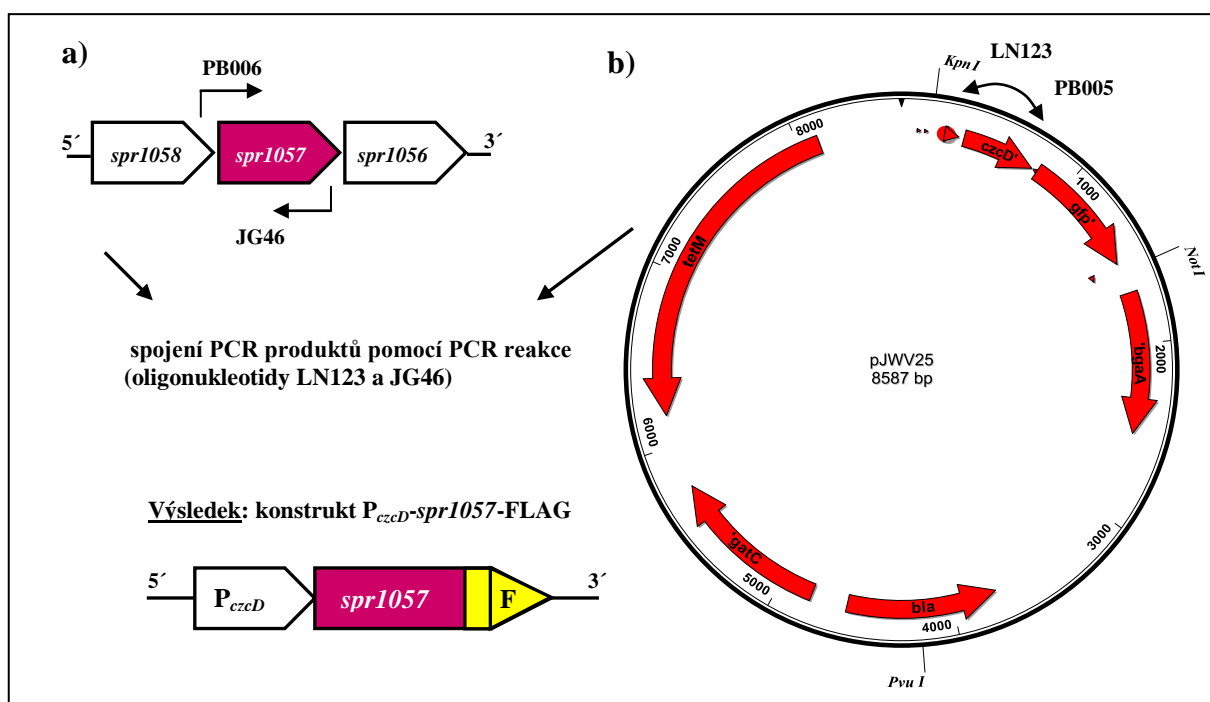
Obr. 5.3. Ověření vyštěpení Cheshire kazety z genomu kmene Sp158 pomocí oligonukleotidů PB001 a ZS3. Výsledný PCR produkt má velikost 901 pb. **M**: Standard velikosti 1kb.

5.1.2 Komplementační kmen $\Delta spr1057$ pZn-*spr1057*-FLAG *S. pneumoniae*

Pro komplementaci delece genu *spr1057* v kmeni $\Delta spr1057$ byl vytvořen kmen, u něhož bylo možné indukovat expresi genu *spr1057* přidáním $ZnCl_2$ do média. Pro tyto účely byl zkonstruován plazmid nesoucí gen *spr1057* s připojeným epitomem FLAG pod indukibilním zinkovým promotorem - pJWV25- P_{czcD} -*spr1057*-FLAG.

Příprava konstruktů

Konstrukt pro komplementaci delece genu *spr1057* byl připraven pomocí fúzní PCR. Z chromozomální DNA pneumokoka byl v první PCR reakci pomocí oligonukleotidů PB006 a JG46 amplifikován gen *spr1057*. Oligonukleotid JG46 byl navržen tak, že kromě komplementární sekvence k C-koncové oblasti genu *spr1057* obsahoval sekvenci pro FLAG epitop a restrikční místo *NotI*. Ve druhé PCR reakci byla amplifikována oblast indukibilního zinkového promotoru z vektoru pJWV25 s použitím oligonukleotidů LN123 (obsahuje restrikční místo *KpnI*) a PB005. Oligonukleotidy PB005 a PB006 obsahují vzájemně komplementární sekvenci, a tak bylo možné ve třetí PCR reakci spojit PCR produkty obou předchozích reakcí pomocí oligonukleotidů LN123 a JG46. Výsledkem byl konstrukt pojmenovaný P_{czcD} -*spr1057*-FLAG (obrázek 5.4).

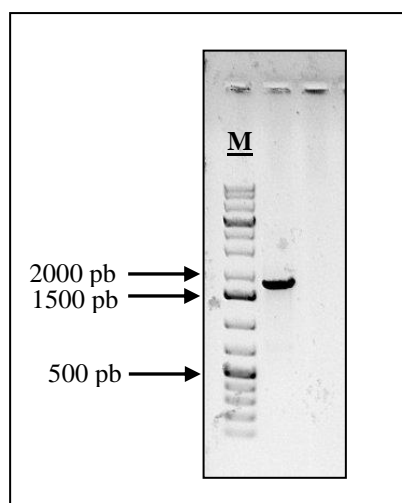


Obr. 5.4. Schéma přípravy konstruktů P_{czcD} -*spr1057*-FLAG *S. pneumoniae*. a) Amplifikace genu *spr1057* z chromozomu *S. pneumoniae* pomocí oligonukleotidů PB006 a JG46. b) Amplifikace indukibilního zinkového promotoru P_{czcD} z vektoru pJWV25 pomocí oligonukleotidů LN123 a PB005. F: epitop FLAG.

$P_{czcD-spr1057}$ -FLAG a vektor pJWV25 byly štěpeny pomocí restričních enzymů *KpnI* a *NotI* a následně oba produkty spojeny v ligační reakci. Ligační směs byla transformována do kompetentních buněk *E. coli* DH5 α v poměru 1:10. Selektce klonů obsahujících výsledný plazmid pJWV25- $P_{czcD-spr1057}$ -FLAG proběhla na pevném médiu s ampicilinem (výsledná koncentrace 100 μ g/ml). Z rezistentních klonů byl následně plazmid izolován pomocí komerční soupravy QIAprep[®] Spin Miniprep kit (Qiagen). Vložení $P_{czcD-spr1057}$ -FLAG do pJWV25 bylo ověřeno sekvenováním.

Příprava kmene

Plazmid pJWV25- $P_{czcD-spr1057}$ -FLAG linearizovaný *PvuI* restriktázou byl transformován do kmene Sp158 ($\Delta spr1057$), kde byl vložen homologní rekombinací pomocí *gatC* a *bgaA* sekvencí nacházejících se jak na plazmidu pJWV25, tak na chromozomu *S. pneumoniae*. Selektce klonů s inzertovaným plazmidem byla provedena na krevním agaru s tetracyklinem (2,5 μ g/ml). Tímto byl získán kmen *S. pneumoniae*, u něhož bylo možné indukovat expresi genu *spr1057* na pozadí mutantního kmene $\Delta spr1057$ přidáním $ZnCl_2$ do média. Správnost vložení konstruktu pJWV25- $P_{czcD-spr1057}$ -FLAG do *bgaA* lokusu chromozomu kmene $\Delta spr1057$ *S. pneumoniae* byla ověřena pomocí PCR reakce s použitím oligonukleotidů LN123 a LN33 (obrázek 5.4). Nový komplementační kmen byl označen jako **Sp167** a jeho sekvence byla ověřena sekvenační analýzou.



Obr. 5.4. Ověření integrace $P_{czcD-spr1057}$ -FLAG do *bgaA* lokusu kmene Sp167 pomocí oligonukleotidů LN123 a LN33. Výsledný PCR produkt má velikost 1990 pb. M: Standard velikosti 1kb.

5.1.3 Kmen *S. pneumoniae* s nadprodukcí proteinu Spr1057

Pro stanovení vlivu nadprodukce proteinu Spr1057 na fenotyp divokého kmene *S. pneumoniae* byl připraven kmen, u něhož dochází k expresi genu *spr1057* z nativního i inducibilního zinkového promotoru.

Příprava kmene

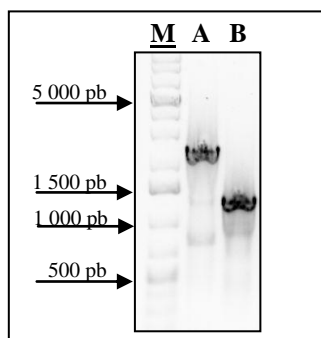
Plazmid pJWV25- P_{czcD} -*spr1057*-FLAG linearizovaný restriktázou *PvuI* byl transformován do divokého kmene *S. pneumoniae*. Klony s integrovaným plazmidem byly selektovány na krevním agaru s tetracyklinem (2,5 μ g/ml). Inzerce P_{czcD} -*spr1057*-FLAG do *bgaA* lokusu chromozomu *S. pneumoniae* byla ověřena PCR reakcí s použitím oligonukleotidů LN123 a LN33 a následným sekvenováním. Nově vytvořený kmen (Sp1 pZn-*spr1057*-FLAG) byl pojmenován **Sp152**.

5.1.4 Kmen Δ *stkP* *S. pneumoniae* s indukovanou expresí *spr1057*-FLAG

Pro vytvoření mutantního kmene s delecí genu *stkP*, u kterého dochází k expresi genu *spr1057* pod nativním a zároveň také inducibilním zinkovým promotorem byl použit vektor pAkCmDk (Nováková *et al.*, 2005). Bližší popis vektoru viz kapitola 4.1.1.

Příprava kmene

Vektor pAkCmDk byl transformován do kmene Sp152. Klony s integrovaným vektorem byly selektovány na pevném médiu s chloramfenikolem (4,5 μ g/ml). U vybraných klonů byla ověřena delece genu *stkP* a tedy inzerce vektoru na správné místo pomocí PCR (oligonukleotidy PH a LN21; obrázek 5.5) a následného sekvenování. Kmen Δ *stkP* s indukovanou expresí genu *spr1057* (Δ *stkP* pZn-*spr1057*-FLAG) nese označení **Sp176**.



Obr. 5.5. Ověření delece genu *stkP* v kmeni Sp176 pomocí oligonukleotidů PH a LN21. **A:** oblast genu *stkP* v kmeni Sp1 (velikost 2447 pb). **B:** oblast po delecí genu *stkP* (velikost 1397 pb). **M:** standard velikosti 1 kb.

5.1.5 Kmen exprimující *spr1057*-FLAG z nativního promotoru

Pro zjištění hladiny exprese genu *spr1057* v divokém typu *S. pneumoniae* a pro porovnání s hladinou exprese *spr1057* ve vybraných mutantních kmenech byl připraven kmen, u něhož dochází k expresi genu *spr1057* fúzovaného s epitopem FLAG pod nativním promotorem. K přípravě konstruktů, nezbytného pro vložení *spr1057*-FLAG pod nativní promotor byla použita Janus kazeta (Sung *et al.*, 2001). Podrobnější popis kazety viz kapitola 4.1.1.

Příprava konstruktů

Pomocí PCR reakcí byla z chromozomální DNA divokého typu *S. pneumoniae* amplifikována oblast před genem *spr1057* pomocí oligonukleotidů ZS12 a ZS13 (označena „A“; obrázek 5.6, tabulka 5.1) a oblast za genem *spr1057* pomocí oligonukleotidů ZS14 a ZS5 (označena „B“; obrázek 5.6, tabulka 5.1) ve směru transkripce. Janus kazeta byla amplifikována s použitím oligonukleotidů JG28 a JG29 (tabulka 5.1). Oligonukleotid ZS13 obsahoval komplementární úsek k N-koncové oblasti oligonukleotidu JG28 (k N-konci Janus kazety) a oligonukleotid ZS14 obsahoval komplementární úsek k C-koncové oblasti oligonukleotidu JG29 (k C-konci Janus kazety), proto mohly být následně PCR produkty „A“ a „B“ pomocí fúzní PCR s použitím oligonukleotidů ZS12 a ZS5 připojeny k Janus kazetě. Výsledný konstrukt byl pojmenován Janus1057.

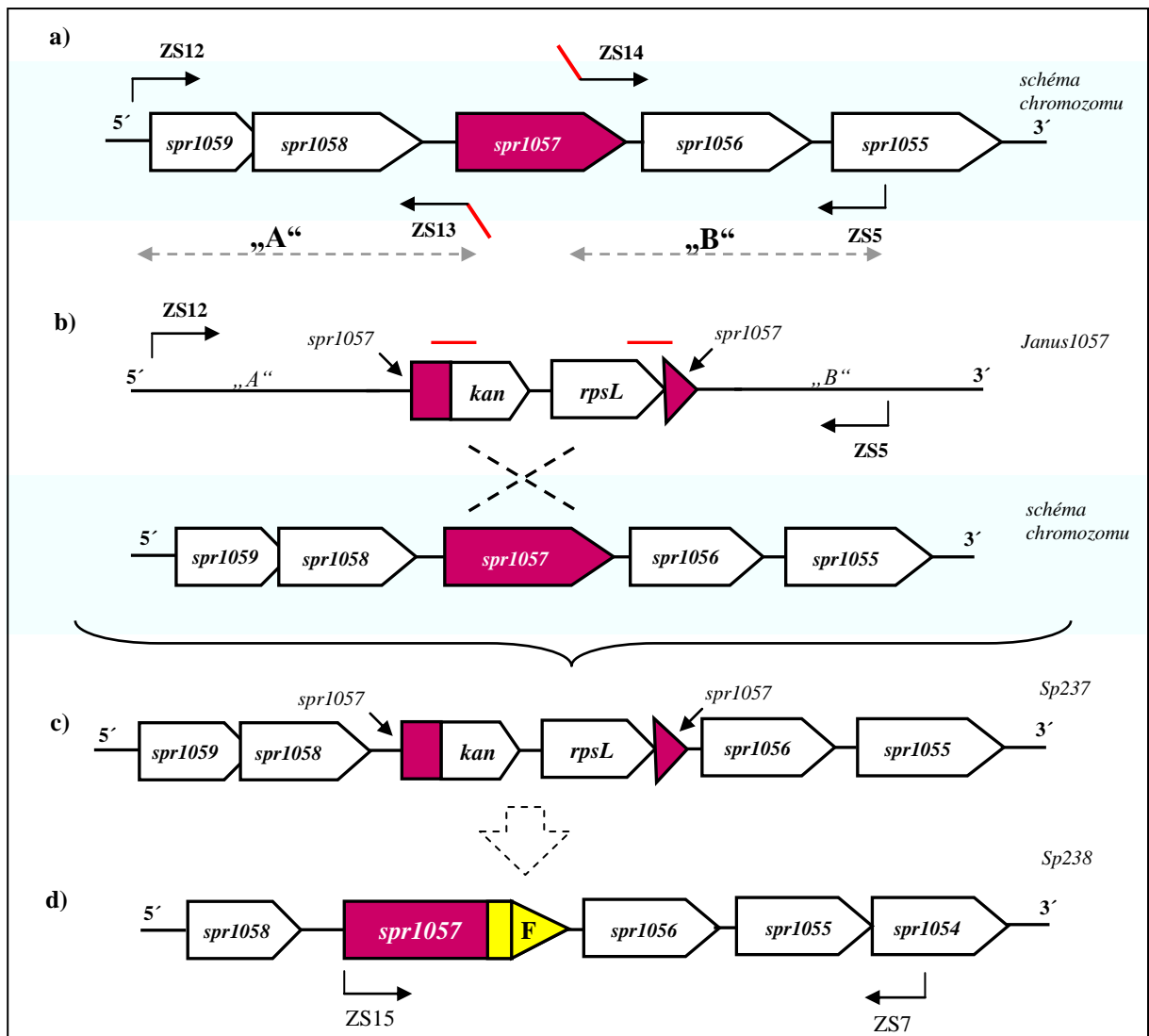
Příprava kmenů

Celý postup přípravy je možno rozdělit na dvě části. V první části dochází k deleci genu *spr1057* pomocí Janus kazety, ve druhé části jde o zpětné vložení tohoto genu (již konjugovaného s epitopem FLAG) pod nativní promotor. Údaje o použitých oligonukleotidech, templátech a výsledných produktech reakcí jsou pro přehlednost popsány v tabulce 5.1.

I.

V prvním kroku byl konstrukt Janus1057 transformován do divokého kmene Sp1 (obrázek 5.5). Selektce klonů s vloženou Janus kazetou byla provedena na krevním agaru s kanamycinem (200 µg/ml). Kanamycin-rezistentní klony byly následně testovány na ztrátu rezistence ke streptomycinu na krevním agaru se streptomycinem (500 µg/ml). Klony se správným fenotypem (kanamycin-rezistentní, streptomycin-citlivé) byly dále ověřeny PCR

reakcí s použitím oligonukleotidů ZS7 a JG28. Kmen *S. pneumoniae* s vloženým konstruktem Janus1057 byl označen **Sp237**.



Obr. 5.6. Schéma přípravy kmenů Sp237 a Sp238. a) Schéma amplifikace oblastí před genem *spr1057* (označeno „A“; oligonukleotidy ZS12 a ZS13) a za genem *spr1057* (označeno „B“; oligonukleotidy ZS14 a ZS5) ve směru transkripce. Červeně: homologní sekvence oligonukleotidů a Janus kazety. Fialově: sekvence genu *spr1057*. Šedé šipky: vymezení oblasti „A“ a oblasti „B“. b) Konstrukt Janus1057 (spojený pomocí oligonukleotidů ZS12 a ZS5) a homologní rekombinace. *kan*: gen pro kanamycinovou rezistenci. *rpsL*: gen pro ribozomální protein udělující citlivost kmene ke streptomycinu. c) Schéma chromozomu *S. pneumoniae* Sp237 s vloženým konstruktem Janus1057. d) Schéma chromozomu *S. pneumoniae* Sp238 se *spr1057*-FLAG pod nativním promotorem. ZS15 a ZS7: oligonukleotidy pro ověření správného vložení *spr1057*-FLAG. Žlutě, F: FLAG epitop.

II.

Ve druhém kroku byla z chromozomální DNA divokého kmene amplifikována oblast před genem *spr1057* pomocí oligonukleotidů ZS12 a ZS16 (označena „C“; tabulka 5.2) a za genem *spr1057* pomocí oligonukleotidů ZS17 a ZS5 (označena „D“; tabulka 5.1) ve směru

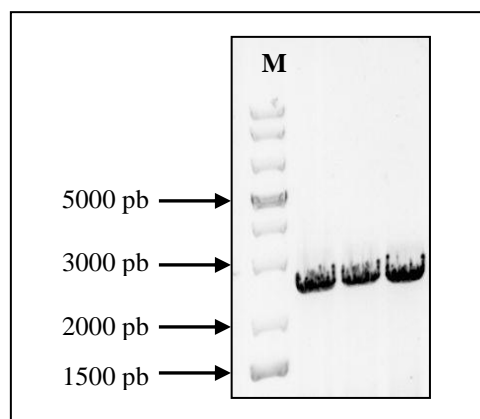
transkripce. Dále byl amplifikován také samotný gen *spr1057* s epitopem FLAG s použitím oligonukleotidů ZS15 a ZS18 – v tomto případě byl jako templát použit plazmid pJWV25-*P_{czcD}-spr1057-FLAG* (označeno „E“; tabulka 5.1). Oligonukleotidy ZS15 + ZS16 a ZS17 + ZS18 obsahovaly vzájemně komplementární úseky, proto bylo možné pomocí fúzní PCR reakce s oligonukleotidy ZS12 a ZS5 fragmenty „C“ + „D“ + „E“ spojit. Výsledný produkt *spr1057-FLAG* byl transformován do kmene Sp237.

Tabulka 5.1. Oligonukleotidy a templátová DNA použité při přípravě kmene Sp238.

	OLIGONUKLEOTIDY	TEMPLÁT	VÝSLEDEK AMPLIFIKACE
část I.	ZS12/ <i>spr1057</i> UP F	chromozomální DNA Sp1	oblast před genem <i>spr1057</i> („A“)
	ZS13/ <i>spr1057</i> UP R		
	ZS14/ <i>spr1057</i> DN F	chromozomální DNA Sp1	oblast za genem <i>spr1057</i> („B“)
	ZS5/ <i>spr1055-R</i>		
	JG28/ <i>janusF</i>	Janus kazeta	Janus kazeta
	JG29/ <i>janusF</i>		
ZS12/ <i>spr1057</i> UP F	„A“ + „B“ + Janus kazeta	Janus1057	
ZS5/ <i>spr1055-R</i>			
část II.	ZS12/ <i>spr1057</i> UP F	chromozomální DNA Sp1	oblast před genem <i>spr1057</i> („C“)
	ZS16/1057FLAG UP R		
	ZS17/1057FLAG DN F	chromozomální DNA Sp1	oblast za genem <i>spr1057</i> („D“)
	ZS5/ <i>spr1055-R</i>		
	ZS15/ <i>spr1057FLAG</i> F	pJWV25- <i>P_{czcD}-spr1057-FLAG</i>	gen <i>spr1057</i> s epitopem FLAG („E“)
	ZS18/1057FLAG R		
	ZS12/ <i>spr1057</i> UP F	„C“ + „D“ + „E“	konstrukt <i>spr1057</i> s epitopem FLAG pro transformaci do Sp237
ZS5/ <i>spr1055-R</i>			

Selekce klonů s vloženým *spr1057-FLAG* byla provedena na krevním agaru se streptomycinem (500 µg/ml) (tj. selekce na obnovenou rezistenci ke streptomycinu). Streptomycin-rezistentní klony byly následně testovány na ztrátu kanamycinové rezistence na krevním agaru s kanamycinem (200 µg/ml).

Kolonie se správným fenotypem (streptomycin rezistentní, kanamycin senzitivní) jsme ověřili PCR reakcí s použitím oligonukleotidů ZS7 a ZS15 (obrázek 5.7) a sekvenováním. Nový kmen, u něhož dochází k expresi *spr1057-FLAG* pod nativním promotorem, byl pojmenován **Sp238**.



Obr. 5.7. Ověření integrace *spr1057*-FLAG pod nativní promotor kmene Sp238 s použitím oligonukleotidů ZS7 a ZS15. Ověření bylo provedeno u tří klonů Sp238. Výsledný PCR produkt má velikost 2474 bp. M: marker 1kb.

5.2 Vyloučení polárního efektu delece genu *spr1057* na sousední geny a testování exprese genů *spr1055* - *spr1058* na pozadí mutantních kmenů Sp158, Sp167 a Sp10

Pro vyloučení případného polárního efektu způsobeného delecí genu *spr1057* na sousední geny bylo pomocí qPCR provedeno stanovení hladiny exprese genů *spr1055*, *spr1056* a *spr1058* na pozadí mutantních kmenů **Sp158** ($\Delta spr1057$), **Sp167** ($\Delta spr1057$ pZn-*spr1057*-FLAG) a kmene **Sp10** ($\Delta stkP$), kde je exprese sledovaného genu *spr1057* výrazně reprimována (Sasková *et al.*, 2007) (tabulka 5.2). Hladiny exprese genů byly vztaheny k hladinám exprese v divokém kmeni Sp1.

Tabulka 5.2. Změna exprese genů v okolí genu *spr1057* u vybraných kmenů.

TESTOVANÉ KMENY		TESTOVANÉ GENY*			
		<i>spr1055</i>	<i>spr1056</i>	<i>spr1057</i>	<i>spr1058</i>
Sp158	Průměr	-1.55	-1.75	---	-1.24
	SmOdch	(±0.15)	(±0.15)	---	(±0.31)
Sp167	Průměr	-1.61	-2.18	-203.69	1.21
	SmOdch	(±0.18)	(±0.41)	(±137.14)	(±0.15)
Sp167 + Zn	Průměr	-1.71	-1.71	-2.07	-0.96
	SmOdch	(±0.34)	(±0.55)	(±4.67)	(±0.23)
Sp10	Průměr	-5.80	-311.63	-357.21	-0.94
	SmOdch	(±1.96)	(±43.36)	(±21.21)	(±0.15)

SmOdch - směrodatná odchylka; --- exprese nedetekována; * naměřené hodnoty reprezentují změny exprese sledovaných genů u kmenů Sp10, Sp158 a Sp167 v porovnání s divokým typem *S. pneumoniae*; pozitivní či negativní hodnoty udávají zvýšenou (+) či sníženou (-) hladinu exprese genů u testovaných kmenů; **červeně**: indukce exprese genu *spr1057* u Sp167 po přidání 0,1 mM ZnCl₂ do média.

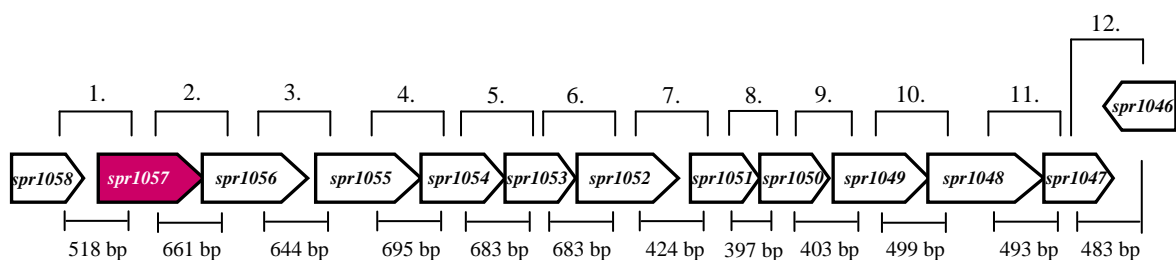
Bylo zjištěno, že u těchto testovaných kmenů nedochází ke změně exprese okolních testovaných genů (tabulka 5.2) a z výsledků lze usoudit, že delece genu *spr1057* nemá na přilehlé geny žádný polární efekt.

Analýzou transkriptomu *S. pneumoniae* bylo zjištěno, že u mutantního kmene Sp10 (Δ *stkP*) dochází ke snížení exprese genů *spr1052* (-2,12x), *spr1053* (-2,83x), *spr1054* (-3,88x), *spr1055* (-4,08x), *spr1056* (-8,81x) a *spr1057* (-58,52x) (hodnoty získané z analýzy DNA microarrays; (Sasková *et al.*, 2007). Snížená exprese genu *spr1057* byla dále potvrzena pomocí qPCR (Sasková *et al.*, 2007; tato práce tabulka 5.2). Naše výsledky ukázaly, že kromě represe genu *spr1057* byla v kmeni Sp10 zaznamenána také výrazně snížená exprese následujícího genu *spr1056* (-311,63x) ve směru transkripce a mírná represe genu *spr105* (-5,8x) (tabulka 5.2), které jsou dohromady součástí společné polycistronní mRNA (kapitola 5.3).

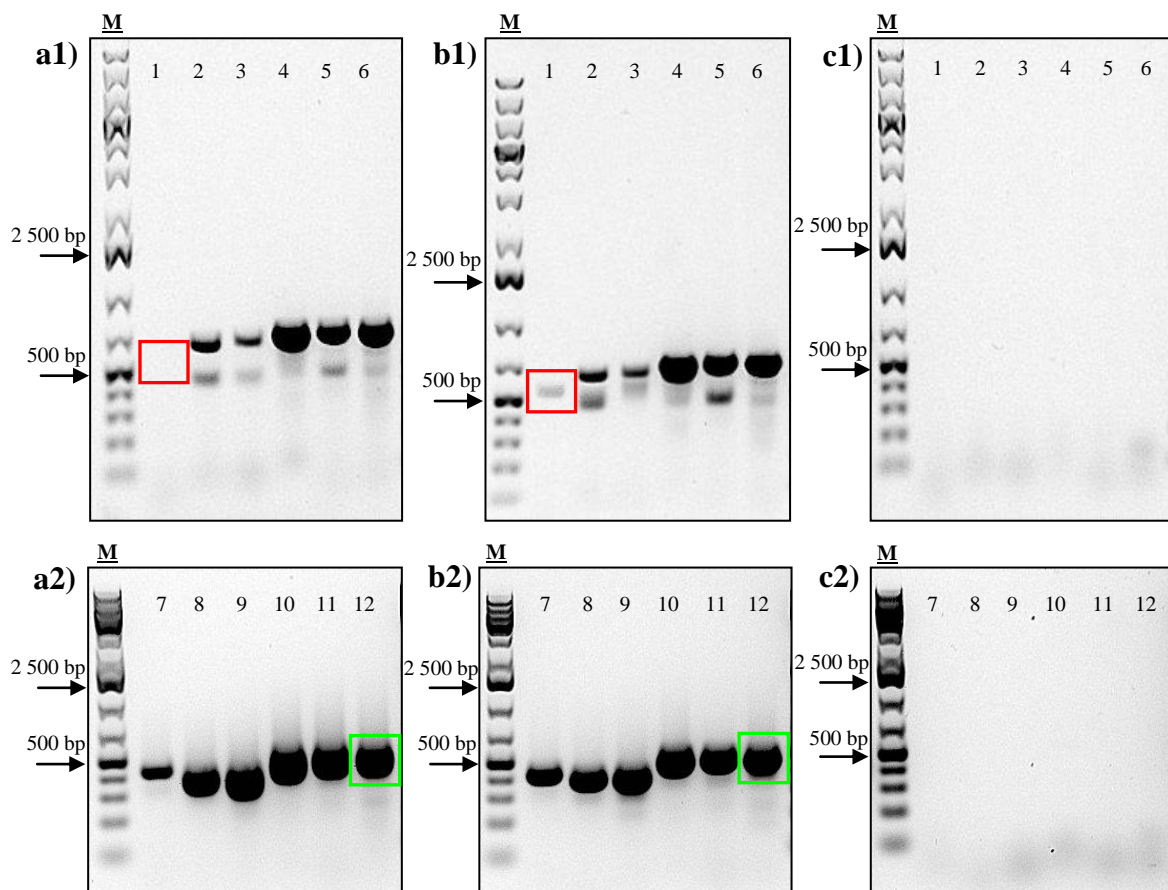
5.3 Kotranskripční analýza předpokládaného operonu

Abychom mohli zjistit, zda je gen *spr1057* přepisován v podobě monocistronní nebo polycistronní mRNA, byla provedena kotranskripční analýza pomocí RT-PCR. Z celkové RNA izolované z buněk kultivovaných v C+Y médiu byla syntetizována cDNA, která byla použita jako templátová DNA pro amplifikaci pomocí PCR. Za tímto účelem byly navrženy specifické oligonukleotidy, jejichž PCR produkty měly být sekvence DNA tvořené vždy koncem jednoho a začátkem následujícího genu (tabulka 4.6, obrázek 5.8) Jako pozitivní kontrola byla v PCR reakci použita chromozomální DNA a jako negativní kontrola cDNA syntetizovaná bez přítomnosti reverzní transkriptázy.

Na obrázku 5.8 je znázorněno schéma části genomu kmene Sp1 *S. pneumoniae* s geny *spr1046-1058*, jejichž koexprese byla testována. Číslování 1. – 12. představuje jednotlivé PCR reakce, použité oligonukleotidy jsou zapsány v tabulce 4.6. Obrázek 5.9 demonstruje výsledek kotranskripční analýzy pro geny *spr1058 – spr1046*.



Obr. 5.8. Schéma genomu *S. pneumoniae* s geny zahrnutými v kotranskripční analýze. Číslice 1-12 označují jednotlivé PCR reakce s vyznačenou velikostí PCR produktu (pb). Gen *spr1046* se nachází na opačném vlákně ve směru proti transkripci. Schéma je orientováno ve směru transkripce.



Obr. 5.9. Kotranskripční analýza genů *spr1058* – *spr1046*.

Použité templáty: **a1) + a2)** cDNA. **b1) + b2)** chromozomální DNA *S. pneumoniae* (pozitivní kontrola). **c1) + c2)** celková RNA (cDNA syntetizovaná bez reverzní transkriptázy jako negativní kontrola). **Červeně:** rozdíl přítomnosti PCR produktu. **Zeleně:** shodný PCR produkt. **Čísla 1 – 12:** jednotlivé PCR reakce. **M:** Marker molekulových hmotností 1kb.

Získané specifické PCR produkty odpovídaly kotranskripci sousedních genů *spr1057-1056* (2), *spr1056-1055* (3), *spr1055-1054* (4), *spr1054-1053* (5), *spr1053-1052* (6), *spr1052-1051* (7), *spr1051-1050* (8), *spr1050-1049* (9), *spr1049-1048* (10), *spr1048-1047* (11), *spr1047-1046* (12) (obrázek 5.9). Nepřítomnost transkriptu první PCR reakce (kotranskripcie sousedních genů *spr1058-1057*), jejímž templátem byla cDNA, v porovnání se stejnou PCR reakcí, která byla provedena na chromozomální DNA jako templátu (pozitivní kontrola experimentu) (vyznačeno červeně, obrázek 5.9) je důkazem toho, že gen *spr1058* již součástí společné polycistronní mRNA není a že gen *spr1057* je prvním genem v operonu. Konec operonu se touto metodou stanovit nepodařilo a z dosažených výsledků tedy nelze vyloučit, že geny *spr1057-1047* jsou koexprimovány v podobě polycistronní mRNA.

Gen *spr1046* je v genomu *Sp1* orientován v opačném směru vzhledem k ostatním testovaným genům a z tohoto důvodu jsme nepředpokládali, že po PCR amplifikaci cDNA

i chromozomální DNA bude získán u obou reakcí PCR produkt o správné velikosti korespondující s koexpresí genů *spr1047-1046* (na obrázku 5.9 vyznačeno zeleně a číslem 12). Přesto se z předběžné analýzy zdá, že součástí polycistronní mRNA zmíněné výše je zřejmě i část sekvence genu *spr1046*, což může být ovšem artefakt způsobený nevhodně navrženým oligonukleotidem genu *spr1046* (viz diskuze).

5.4 Indukce exprese genu *spr1057* a monitorování růstu kmenů *S. pneumoniae*

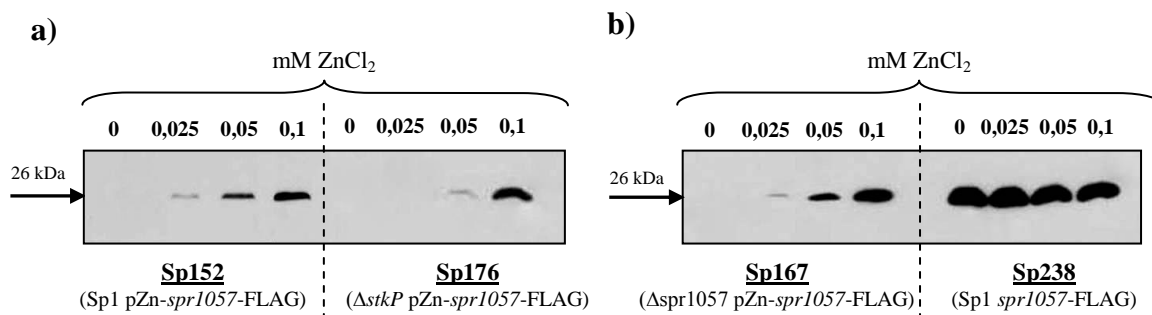
Za účelem stanovení optimálních kultivačních podmínek a pro ověření, zda mají vytvořené mutace vliv na růst bakteriálních kmenů *S. pneumoniae*, byly sledovány růstové vlastnosti divokého typu (**Sp1**), Δ *stkP* kmene (**Sp10**) a vytvořených mutantních kmenů **Sp152** (Sp1 pZn-*spr1057*FLAG), **Sp158** (Δ *spr1057*), **Sp167** (Δ *spr1057* pZn-*spr1057*FLAG) a **Sp176** (Δ *stkP* pZn-*spr1057*FLAG) v komplexních médiích BHI, TSB, CAT a C+Y.

Růstové charakteristiky jednotlivých kmenů i doba zdvojení byla u všech kmenů v komplexních médiích, tj. BHI, TSB a CAT, podobná (data nejsou uvedena). Nicméně, při sledování exprese genu *spr1057* pomocí imunodetekce s Anti-FLAG protilátkou se ukázalo, že tato média nejsou pro naše účely vhodná, neboť zde docházelo k expresi *spr1057* z inducibilního zinkového promotoru i bez dodatečně přidaného ZnCl₂, induktoru ektopické exprese genu *spr1057*. Veškeré pokusy byly proto prováděny v C+Y médiu, kde k indukci exprese genu *spr1057* ze zinkového promotoru docházelo až po přidání induktoru do média.

Pro indukci exprese genu *spr1057* z inducibilního zinkového promotoru byl do médií přidáván ZnCl₂ a MnCl₂ v koncentraci 0,1 mM. Tato koncentrace byla zvolena na základě experimentů, při kterých byla s použitím imunodetekce proteinu Spr1057-FLAG ověřována indukce exprese genu *spr1057*-FLAG z inducibilního zinkového promotoru (kmeny Sp152, Sp176; obrázek 5.10a) a stanovována optimální hladina induktoru v médiu (kmeny Sp167, Sp238; obrázek 5.10b). Účelem stanovení optimální hladiny induktoru v médiu bylo nalézt takovou koncentraci induktoru, která v komplementačním kmeni Sp167 vyvolá expresi ektopické kopie genu *spr1057*-FLAG srovnatelnou s divokým kmenem Sp1.

Kmeny **Sp152** (Sp1 pZn-*spr1057*FLAG), **Sp167** (Δ *spr1057* pZn-*spr1057*FLAG), **Sp176** (Δ *stkP* pZn-*spr1057*FLAG) a **Sp238** (Sp1 *spr1057*-FLAG) byly kultivovány v C+Y médiu v přítomnosti gradientu induktoru exprese ZnCl₂ (0 mM; 0,025 mM; 0,05 mM; 0,1 mM) a v přítomnosti 0,1 mM MnCl₂. Pomocí mechanického či chemického rozrušení buněk

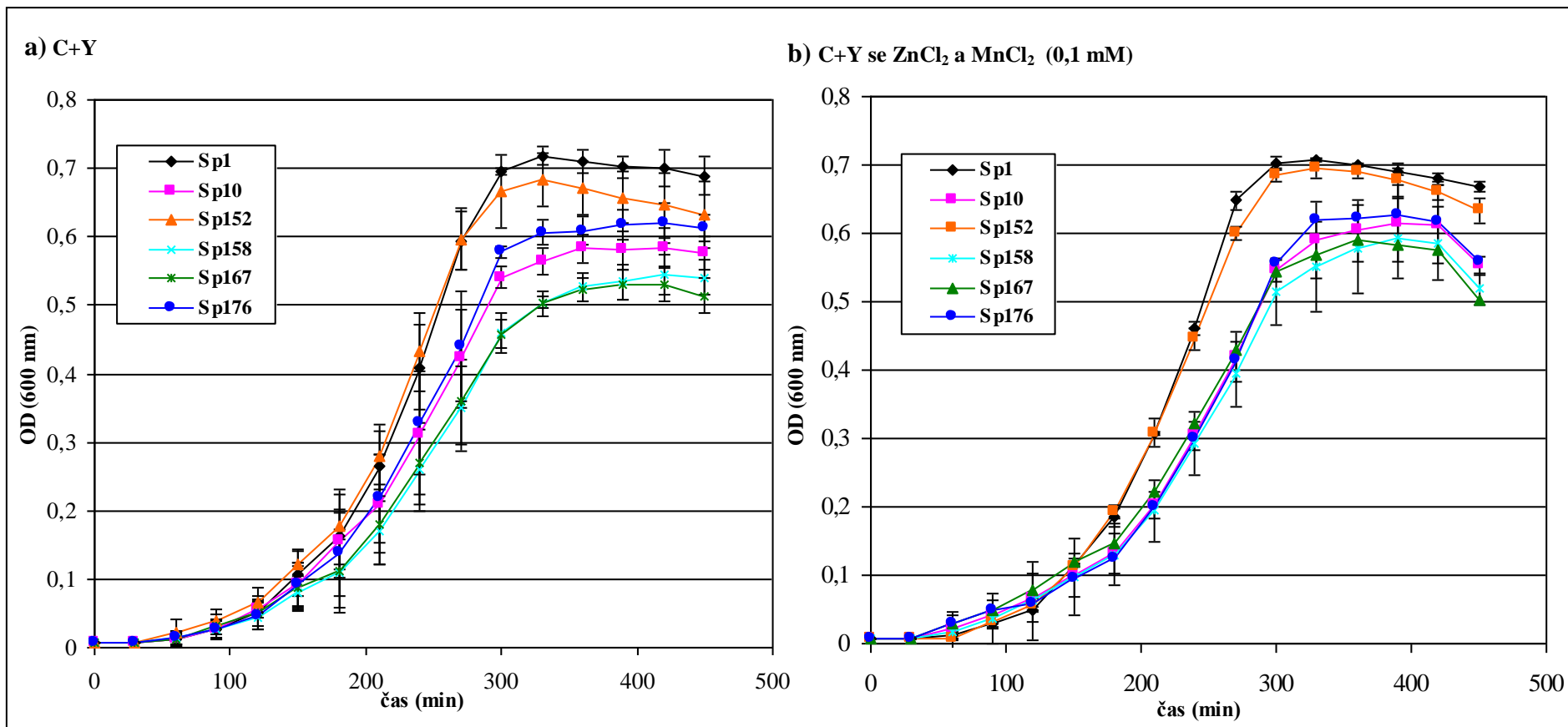
S. pneumoniae byly z kultur připraveny celkové lyzáty. Proteinové vzorky jednotlivých kmenů byly rozděleny pomocí denaturační SDS-PAGE elektroforézy a produkce Spr1057-FLAG byla sledována imunodetekcí s Anti-FLAG protilátkou.



Obr. 5.10. Detekce proteinu Spr1057 značeného epitopem FLAG pomocí protilátky proti tomuto epitopu (Anti-FLAG králičí 1 : 1 000; sekundární protilátka Anti-Rabbit IgG-POD 1 : 10 000; detekce signálu po 10 minutové expozici snímku). **a)** ověření indukce exprese *spr1057* z indukibilního zinkového promotoru u kmenů Sp152 a Sp176. **b)** exprese ektopické kopie genu *spr1057-FLAG* v porovnání s expresí *spr1057-FLAG* z nativního promotoru divokého kmene.

Z obrázkem 5.10a je zřejmé, že se zvyšující se koncentrací ZnCl₂ v médiu dochází ke zvyšující se produkci proteinu Spr1057-FLAG ze zinkového promotoru. Z obrázkem 5.10b vyplývá, že nejvhodnější koncentrace induktoru, která v komplementačním kmeni Sp167 vyvolá expresi ektopické kopie genu *spr1057-FLAG* srovnatelnou s divokým kmenem Sp1 je koncentrace 0,1 mM ZnCl₂. Vyšší testované koncentrace ZnCl₂ již na růst kmenů *S. pneumoniae* působily inhibičně (data neuvedena). Na základě těchto výsledků byla pro další experimenty zvolena koncentrace 0,1 mM ZnCl₂.

Růst kmenů **Sp1**, **Sp10** (Δ *stkP*), **Sp152** (Sp1 pZn-*spr1057-FLAG*), **Sp158** (Δ *spr1057*), **Sp167** (Δ *spr1057* pZn-*spr1057-FLAG*) a **Sp176** (Δ *stkP* pZn-*spr1057-FLAG*) *S. pneumoniae* byl následně porovnáván v C+Y médiu a v C+Y médiu s 0,1 mM ZnCl₂ a 0,1 mM MnCl₂ (obrázek 5.11).



Obr. 5.11. Růstové křivky kmenů *S. pneumoniae* v C+Y médiu a v C+Y médiu s přidavkem ZnCl₂ a MnCl₂ (oba 0,1 mM) pro indukci exprese genu *spr1057*. Sp1: divoký typ (wt); Sp10: $\Delta stkP$; Sp152: Sp1 pZn-*spr1057*-FLAG; Sp158: $\Delta spr1057$; Sp167: $\Delta spr1057$ pZn-*spr1057*-FLAG; Sp176: $\Delta stkP$ pZn-*spr1057*-FLAG. a) C+Y médium bez induktoru exprese; b) C+Y médium s induktorem exprese.

Z obrázku 5.11a je patrné, že růst kmenů s delecí genu *spr1057* (Sp158, Sp167) byl v C+Y médiu bez přídavku induktoru pomalejší (doba zdvojení těchto kmenů byla shodně 53 min) a že tyto kmeny dosahovaly nižších optických denzit ve stacionární fázi růstu, než divoký typ Sp1. Totéž platilo pro kmeny s delecí genu *stkP* (Sp10, Sp176), jejichž doby zdvojení byly v médiu bez induktoru přibližně 49 min. Nadprodukční kmen Sp152 vykazoval podobné růstové vlastnosti jako divoký typ Sp1 (doba zdvojení Sp152 byla 35 min, pro Sp1 to bylo 33 min).

Po přidání $ZnCl_2$ do média (obrázek 5.11b) došlo u kmenů Sp152 (Sp1 *pZn-spr1057-FLAG*), Sp167 ($\Delta spr1057$ *pZn-spr1057-FLAG*) a Sp176 ($\Delta stkP+pZn-spr1057-FLAG$) k expresi genu *spr1057* z inducibilního zinkového promotoru. Za přítomnosti induktoru v médiu došlo ve stacionární fázi růstu ke zvýšení hodnot optické denzity kmenů Sp158 a Sp167, jejichž doba zdvojení byla shodně o 10 minut kratší (tj. 43 min), než v médiu bez $ZnCl_2$. Protože doba zdvojení těchto kmenů dosahovala v obou případech stejných hodnot, pro eliminaci vlivu $ZnCl_2$ na růst kmenů byly všechny další růstové experimenty provedeny v C+Y médiu s přídavkem 0,1 mM $ZnCl_2$ a to vždy u všech testovaných kmenů. Růstové rychlosti divokého (Sp1) a nadprodukčního kmene (Sp152) byly naopak nepatrně zpomaleny a delší doby zdvojení byly zaznamenány také pro kmeny Sp10 a Sp176, v porovnání s růstem těchto kmenů bez přidaného $ZnCl_2$. Doby zdvojení kmenů jsou pro přehlednost shrnuty v tabulce 5.3.

Tabulka 5.3. Doba zdvojení testovaných kmenů v C+Y médiu a v C+Y médiu s induktorem exprese genu *spr1057* (0,1 mM $ZnCl_2$)

MÉDIUM	TESTOVANÉ KMENY					
	Sp1	Sp10	Sp152	Sp158	Sp167	Sp176
C+Y	33 min	49 min	35 min	53 min	53 min	49 min
C+Y + Zn^{2+}	38 min	53 min	38 min	43 min	43 min	52 min

Z porovnání růstových křivek kmenů v C+Y médiu a v C+Y médiu se ZnCl_2 bylo zjištěno, že nadprodukční kmen **Sp152** vykazuje stejné růstové charakteristiky jako divoký kmen Sp1. Kmen **Sp158** ($\Delta\text{spr1057}$) dosahuje významně nižších optických denzit v porovnání s divokým kmenem Sp1. U komplementačního kmene **Sp167** nebylo po přidání 0,1 mM ZnCl_2 , induktoru exprese genu *spr1057*, zaznamenáno obnovení růstu na úroveň divokého kmene Sp1, přestože hladina exprese genu *spr1057* se po přidání ZnCl_2 na úroveň divokého kmene vrací (tabulka 5.2) a podobně se obnovuje i produkce proteinu Spr1057-FLAG (obrázek 5.10b). Kmen **Sp176** (ΔstkP pZn-*spr1057*-FLAG) odpovídá svým růstem kmeni Sp10 (ΔstkP). Na přítomnost ZnCl_2 v médiu obnovením růstu nereaguje, přestože produkce proteinu Spr1057 byla pomocí imunodetekce s použitím Anti-FLAG protilátky prokázána i u tohoto kmene (obrázek 5.10a).

5.5 Citlivost *S. pneumoniae* k modifikovaným nukleotidům

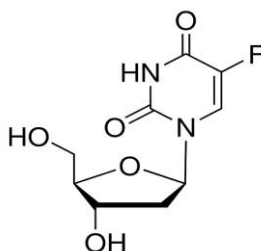
Při studiu funkce proteinu Spr1057 jsme se inspirovali experimenty Titz *et al.* (2007), kteří stanovili funkci proteinu YjjG *E. coli*, homologa proteinu Spr1057 *S. pneumoniae*, *in vivo* a navázali jsme na dříve dosažené výsledky u *S. pneumoniae* (Vacková, 2010). Pro potvrzení nukleotidázové funkce proteinu Spr1057 byl sledován růst kmenů *S. pneumoniae* v přítomnosti 5-fluoro-2'-deoxyuridinu (5-FdU) a 5-bromo-2'-deoxyuridinu (5-BrdU) a porovnávána míra inkorporace 5-BrdU do chromozomální DNA mutantních kmenů *S. pneumoniae* oproti divokému typu Sp1.

Z výsledků experimentů bylo zjištěno, že růst nadprodukčního kmene Sp152 nebyl inhibován ani při nejvyšší použité koncentraci 5-FdU (5 μM) a 5-BrdU (10 μM) a byl srovnatelný s divokým kmenem Sp1. Inhibován nebyl při těchto koncentracích modifikovaných nukleotidů ani růst kmene Sp176 (ΔstkP pZn-*spr1057*-FLAG) (data nejsou uvedena). Vzhledem k tomuto zjištění a pro přehlednější interpretaci výsledků nejsou růstové křivky těchto dvou kmenů (Sp152, Sp176) v následujících experimentech uvedeny a v dalších pokusech již tyto kmeny nebyly používány.

5.5.1 Růstové vlastnosti kmenů v přítomnosti 5-FdU

5-fluoro-2'-deoxyuridin (5-FdU)

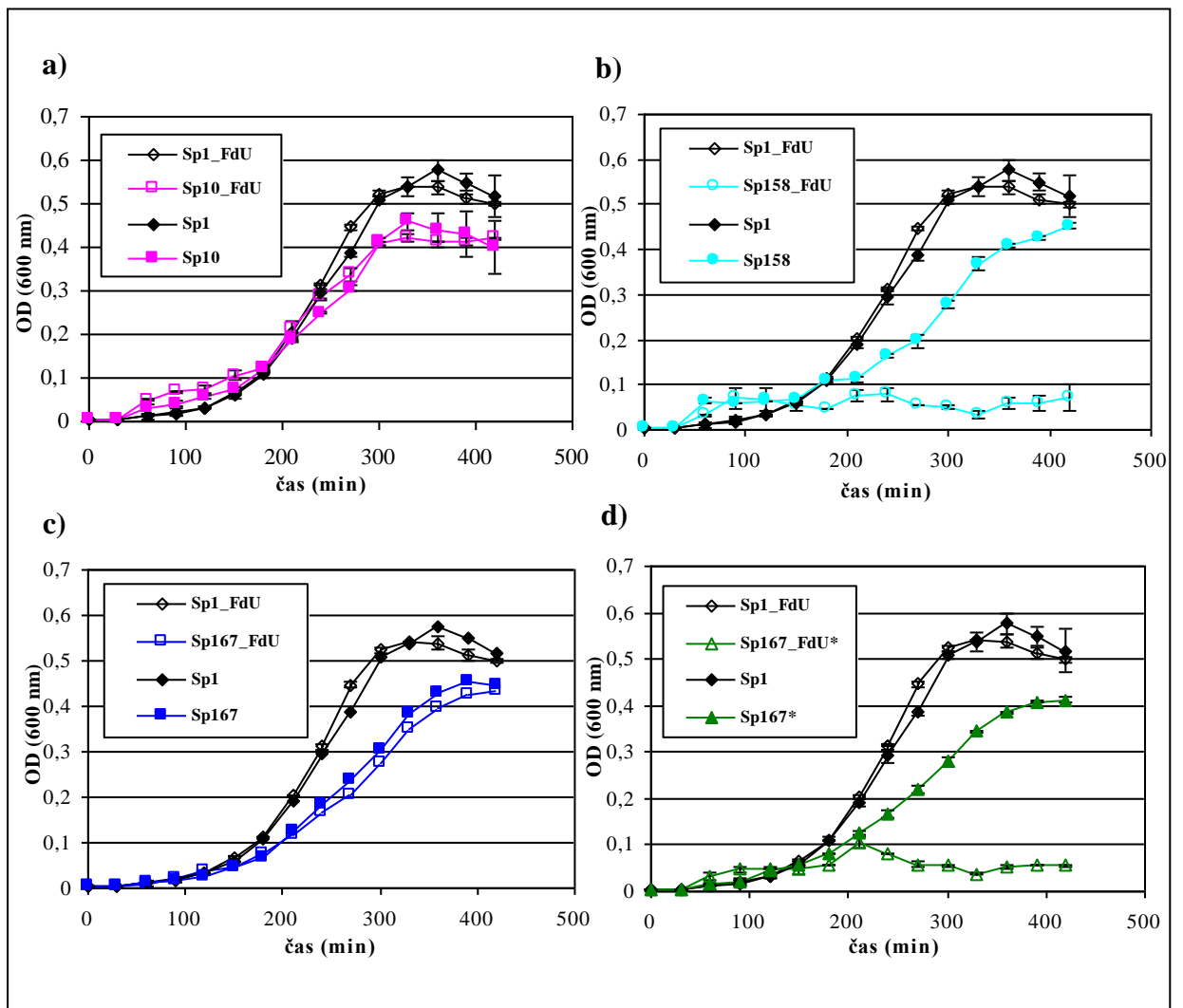
Jedná se o pyrimidinový derivát (obrázek 5.12), který v buňkách působí jako cytostatikum. Pomocí thymidinkinázy může být přeměněn na 5'-fluoro-dUMP (O'Donovan a Neuhard, 1970). 5'-fluoro-dUMP inhibuje DNA syntézu v buňkách tím, že blokuje thymidylát syntetázu, nezbytnou pro syntézu thymidinu, což vyústí v hladovění buněk na thymin a následný úhyn buněčné kultury (Cohen *et al.*, 1958).



Obr. 5.12. Strukturní vzorec 5-FdU. (Zdroj: www.sigmaaldrich.com)

Kultivace v přítomnosti 5-FdU

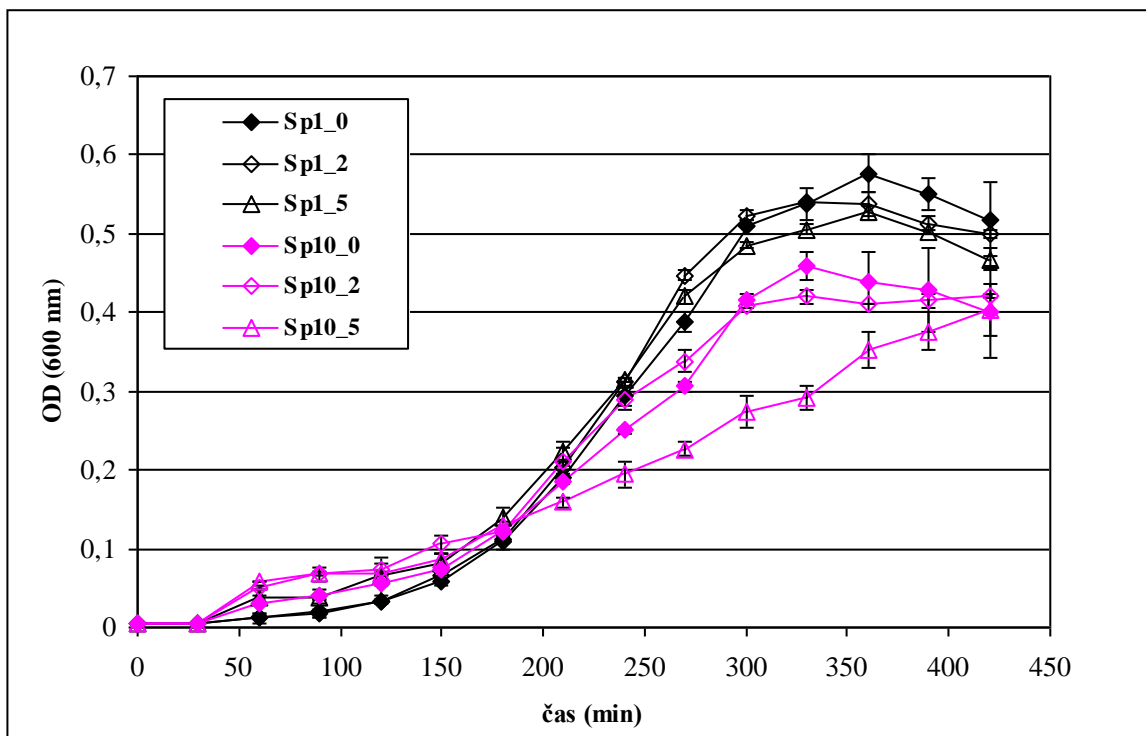
Pro kultivaci kmenů v přítomnosti modifikovaného nukleotidu 5-FdU byly zvoleny koncentrace 0 μM , 2 μM a 5 μM 5-FdU (obrázky 5.13 a 5.14). Pro indukci exprese genu *spr1057* ze zinkového promotoru byl do média přidán 0,1 mM ZnCl_2 . Data růstových křivek byla získána z měření v duplikátech.



Obr. 5.13. Porovnání růstu kmenů *Sp1*, *Sp10*, *Sp158* a *Sp167* *S. pneumoniae* v C+Y médiu s 0,1 mM $ZnCl_2$ (značeno plnými symboly) a v C+Y médiu s 0,1 mM $ZnCl_2$ a přidavkem 2 μM 5-FdU (značeno prázdnými symboly). **a)** *Sp1*: divoký typ (wt); *Sp10*: $\Delta stkP$. **b)** *Sp1*: divoký typ (wt); *Sp158*: $\Delta spr1057$. **c)** *Sp1*: divoký typ (wt); *Sp167*: $\Delta spr1057$ pZn-*spr1057*-FLAG. **d)** *Sp1*: divoký typ (wt); *Sp167*: $\Delta spr1057$ pZn-*spr1057*-FLAG; * kmen *Sp167* bez přidavku $ZnCl_2$ a $MnCl_2$ (0,1 mM) v médiu.

Při sledování vlivu 5-FdU na růstové vlastnosti kmenů *Sp1*, *Sp10*, *Sp158* a *Sp167* se ukázalo, že kmeny s delecí genu *spr1057* (*Sp158* a *Sp167*) měly již v přítomnosti 2 μM této toxické látky značně sníženou životaschopnost. Naopak po přidání $ZnCl_2$ do média došlo u kmene *Sp167* k indukci exprese *spr1057* ze zinkového promotoru a ke komplementaci růstu tohoto kmene na úroveň růstu kmene bez přidaného 5-FdU (obrázek 5.13).

Kmen *Sp10* reagoval na toxický 5-FdU výrazněji až při vyšších koncentracích této látky v médiu (5 μM), jak je patrné z obrázku 5.14.

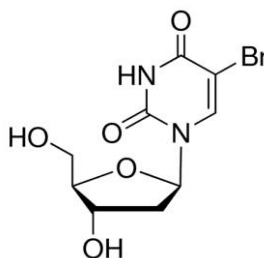


Obr. 5.14. Porovnání růstu kmenů Sp1 a Sp10 v C+Y médiu. Sp1_0: růst Sp1 v médiu bez 5-FdU. **Sp1_2:** růst Sp1 v médiu s přidavkem 2 μ M 5-FdU. **Sp1_5:** růst Sp1 v médiu s přidavkem 5 μ M 5-FdU. **Sp10_0:** růst Sp10 v médiu bez 5-FdU. **Sp10_2:** růst Sp10 v médiu s přidavkem 2 μ M 5-FdU. **Sp10_5:** růst Sp10 v médiu s přidavkem 5 μ M 5-FdU.

5.5.2 Růstové vlastnosti kmenů v přítomnosti 5-BrdU

5-bromo-2'-deoxyuridin (5-BrdU)

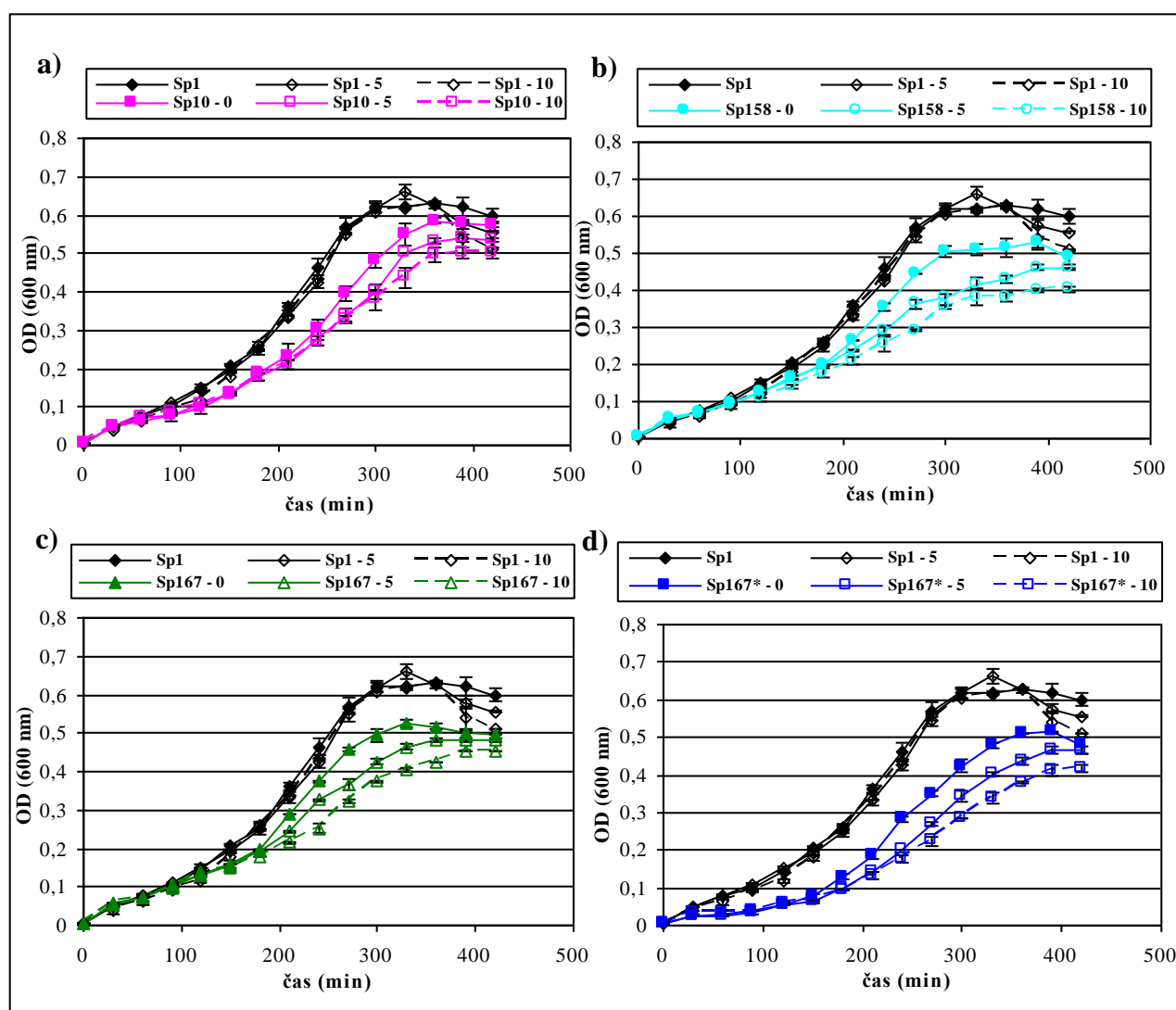
5-BrdU je analog thymidinu, pyrimidinový derivát (obrázek 5.15). Je schopen inkorporovat se do DNA během její syntézy a způsobit vážná poškození genetického materiálu, například chybné párování bazí.



Obr. 5.15. Strukturní vzorec 5-BrdU. (Zdroj: www.sigmaaldrich.com)

Kultivace v přítomnosti 5-BrdU

Pro kultivaci kmenů v přítomnosti modifikovaného nukleotidu 5-BrdU byly zvoleny koncentrace 0 μM , 2 μM , 5 μM a 10 μM 5-BrdU. Při koncentraci 2 μM 5-BrdU byly růstové rozdíly jednotlivých kmenů minimální, proto jsou uvedeny jen růstové křivky získané kultivací kmenů při vyšších koncentracích 5-BrdU v porovnání s růstovými křivkami těchto kmenů bez přídavku 5-BrdU (obrázek 5.16). Pro indukcí exprese genu *spr1057* ze zinkového promotoru byl do média přidán 0,1 mM ZnCl_2 . Data růstových křivek byla získána z měření v duplikátech.



Obr. 5.16. Porovnání růstu kmenů Sp1, Sp10, Sp158 a Sp167 *S. pneumoniae* v C+Y médiu s 0,1 mM ZnCl_2 (značeno plnými symboly) a v C+Y médiu s 0,1 mM ZnCl_2 (značeno prázdnými symboly) s přídavkem 5 μM a 10 μM 5-BrdU. a) Sp1 a Sp10 (ΔstkP) b) Sp1 a Sp158 ($\Delta\text{spr1057}$) c) Sp1 a Sp167 ($\Delta\text{spr1057 pZn-spr1057-FLAG}$) d) Sp1 a Sp167 ($\Delta\text{spr1057 pZn-spr1057-FLAG}$); * růstová křivka kmene Sp167 bez přídavku ZnCl_2 v kultivačním médiu.

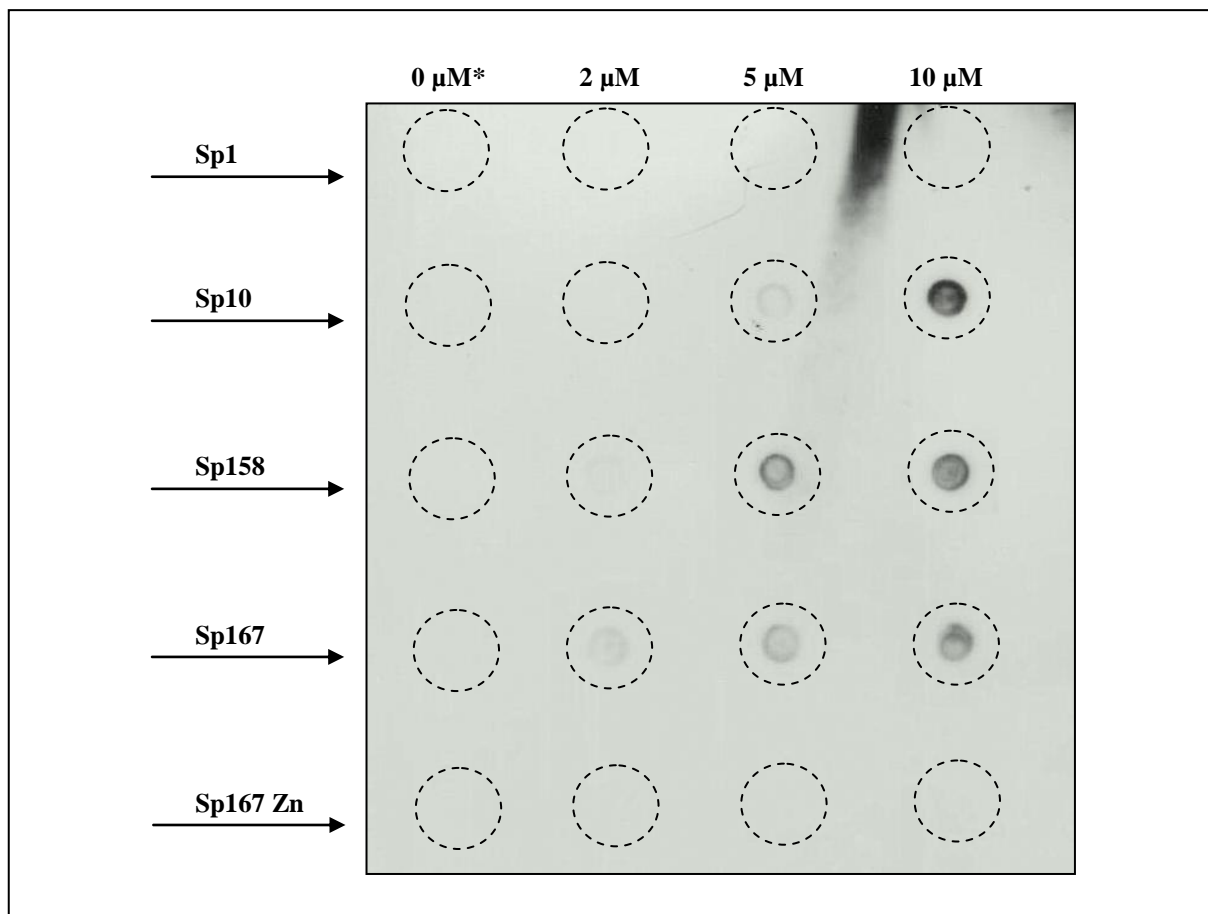
Z uvedených grafů růstových křivek na obrázku 5.16 jsou zřetelně vidět účinky toxického 5-BrdU především na kmeny s delecí genu *spr1057* (Sp158 a Sp167*), kdy zvyšující se koncentrace této látky v médiu snižuje životaschopnost buněčných kultur. V porovnání s účinky 5-FdU na buněčnou kulturu je ale účinek 5-BrdU mnohem méně toxický.

Po přidání $ZnCl_2$ do média dochází sice u kmene Sp167 k indukované expresi genu *spr1057* (obrázek 5.10), na komplementaci růstu tato exprese ovšem vliv nemá a růst je srovnatelný s delečním kmenem Sp158. U kmene Sp167 dochází po přidání $ZnCl_2$ do média k mírnému zvýšení růstové rychlosti v porovnání s růstem tohoto kmene bez přídavku induktoru. Nicméně, jak vyplývá z porovnání růstu bez a s přídavkem $ZnCl_2$ (obrázek 5.11), jedná se pouze o vliv $ZnCl_2$, nikoli o vliv exprese genu *spr1057*.

Kmen Sp10 dosahuje v přítomnosti 5-BrdU v médiu nižších optických denzit při přechodu do stacionární fáze růstu v porovnání s růstem bez 5-BrdU, zejména pak při nejvyšší koncentraci tohoto toxického nukleotidu ($10 \mu M$), zatímco divoký kmen Sp1 nereaguje snížením růstové rychlosti ani při $10 \mu M$ 5-BrdU v médiu.

5.5.3 Inkorporace 5-BrdU do chromozomální DNA *S. pneumoniae*

Přestože citlivost testovaných kmenů k 5-BrdU nebyla příliš vysoká, zajímalo nás, zda u těchto kmenů dochází k inkorporaci 5-BrdU do DNA. Míra inkorporace tohoto mutagenního nukleotidu do chromozomální DNA *S. pneumoniae* byla porovnáována u kmenů Sp1, Sp10, Sp158 a Sp167 (obrázek 5.17). Koncentrace použitého 5-BrdU byly $0 \mu M$, $2 \mu M$, $5 \mu M$ a $10 \mu M$. Na Hybond- N^+ membránu byly naneseny $3 \mu g$ izolované chromozomální DNA *S. pneumoniae* a pro detekci inkorporace mutagenního nukleotidu byla použita protilátka Anti-bromodeoxyuridin-POD.



Obr. 5.17. Inkorporace 5-BrdU do chromozomální DNA kmenů Sp1, Sp10, Sp158 a Sp167.

* koncentrace použitého 5-BrdU; **kroužky** vyznačují místa nanesení DNA na membránu. Kmen Sp167 (komplementační kmen) byl kultivován jak s 0,1 mM ZnCl₂ (**Sp167 Zn**), tak také bez přídavku tohoto induktoru.

Získané výsledky experimentu jednoznačně dokazují zvýšenou inkorporaci mutagenního nukleotidu 5-BrdU do chromozomální DNA u kmenů s delecí genu *spr1057* (Sp158 a Sp167 bez ZnCl₂). Inkorporace byla prokázána rovněž u kmene s delecí genu pro StkP (Sp10). Opět bylo potvrzeno, že po přidání ZnCl₂ do média dochází ke komplementaci delece genu *spr1057* (vzorek Sp167 Zn), což se projevuje nulovou inkorporací mutagenního nukleotidu 5-BrdU do chromozomální DNA komplementačního kmene, stejně jako u divokého typu Sp1.

6 DISKUZE

6.1 Spr1057 *S. pneumoniae* jako homolog YjjG *E. coli*

V genomu *Streptococcus pneumoniae* se nachází jediná kopie genu kódující Ser/Thr proteinkinázu eukaryotního typu, StkP. Při studiu vlivu StkP na buněčné procesy *S. pneumoniae* byl v naší laboratoři identifikován gen *spr1057*, jehož exprese byla v mutantním kmeni Δ *stkP*, v porovnání s divokým kmenem Sp1, významně snížena (500x, stanoveno metodou qPCR) (Sasková *et al.* 2007).

Produkt tohoto genu, protein Spr1057, se dostal do popředí našeho zájmu zejména proto, že ačkoliv není substrátem StkP, hladina exprese příslušného genu byla v kmeni Δ *stkP* ovlivněna nejvíce ze všech.

Funkčním homologem proteinu Spr1057 u *E. coli* je protein YjjG (Vacková, 2010). Ačkoliv při porovnání aminokyselinových sekvencí byla odhalena relativně nízká podobnost (32%), na základě přítomnosti konzervovaných aminokyselin v katalytických doménách bylo možné protein zařadit mezi „*house-cleaning*“ nukleotidázy nadčeledi HAD. Toto zařazení bylo dále potvrzeno určením substrátové specifity proteinu (Vacková, 2010).

Protein YjjG je „*house-cleaning*“ nukleotidáza s vysokou afinitou k atypickým pyrimidinovým derivátům (Proudfoot *et al.*, 2004). Podrobnějším studiem tohoto proteinu se zabývali Titz *et al.* (2007). Bylo zjištěno, že protein YjjG brání inkorporaci mutagenních nukleotidů do DNA a byla vyslovena hypotéza, že by tento protein mohl chránit bakterie před pyrimidinovými deriváty jak z okolního prostředí, tak před těmi, které vznikají jako vedlejší produkty bakteriálního metabolismu. Nejbližším homologem proteinu YjjG *E. coli* u člověka byl identifikován protein HDHD4 (NANP, fosfatáza N-acetylneuraminové kyseliny), který ovšem nevykazuje protektivní účinek vůči atypickým nukleotidům, nevyjímaje atypické nukleotidy užívané při léčbě rakoviny (Furguhar *et al.*, 1995; Titz *et al.*, 2007).

Zmíněná studie německých kolegů pro nás byla inspirací k sestavení experimentů vedoucích k objasnění funkce proteinu Spr1057. Důležitým podkladem ale byla také diplomová práce Zuzany Vackové, vypracovaná v předchozích letech v naší laboratoři, která pojednávala o charakterizaci proteinu Spr1057 *in vitro*. Hlavním cílem mé diplomové práce bylo pomoci objasnit funkci proteinu Spr1057 v podmínkách *in vivo*.

6.2 Příprava mutantních kmenů a vyloučení polárního efektu delece genu *spr1057*

Za účelem studia funkce proteinu Spr1057 *S. pneumoniae in vivo* byl připraven deleční kmen $\Delta spr1057$ (**Sp158**), komplementační kmen exprimující gen *spr1057*-FLAG pod inducibilním zinkovým promotorem z lokusu *bgaA* na chromozomu *S. pneumoniae* (**Sp167**) a dále nadprodukční kmen exprimující nativní *spr1057* a také *spr1057*-FLAG pod inducibilním zinkovým promotorem, opět z lokusu *bgaA* na chromozomu *S. pneumoniae* (**Sp152**). Pro studium vlivu proteinu Spr1057 na fyziologii kmene $\Delta stkP$ byl připraven kmen $\Delta stkP$ exprimující *spr1057*-FLAG pod inducibilním zinkovým promotorem z lokusu *bgaA* na chromozomu *S. pneumoniae* (**Sp176**).

Pro vyloučení vzniku polárního efektu v delečním kmeni $\Delta spr1057$ bylo provedeno porovnání hladin exprese genů v nejbližším okolí genu *spr1057* (*spr1058*, *spr1057*, *spr1056* a *spr1055*) v kmenech Sp158 ($\Delta spr1057$) a Sp167 ($\Delta spr1057$ pZn-*spr1057*-FLAG). Tato analýza byla provedena pomocí RNA izolované z kultur pěstovaných v CAT médiu. Kmen Sp167 byl kultivován jak v médiu bez induktoru, tak v médiu s přidaným $ZnCl_2$ z důvodu indukce exprese ektopicky kódovaného genu *spr1057*. Ze získaných hodnot tohoto experimentu bylo prokázáno, že delece genu *spr1057* u kmenů Sp158 a Sp167 nemá vliv na expresi okolních genů *spr1058*, *spr1056* a *spr1055*. Hladina exprese těchto genů byla v kmenech Sp158 a Sp167 srovnatelná s divokým typem Sp1.

Dále bylo potvrzeno, že v kmeni Sp158 ($\Delta spr1057$) byl gen *spr1057* skutečně deletován, neboť u něj nebyla exprese genu *spr1057* detekována. Stejný výsledek byl očekáván také u komplementačního kmene Sp167, který byl pěstován bez přídavku $ZnCl_2$. V tomto kmeni byla exprese sice výrazně potlačena (-203x), dosažený výsledek nicméně nebyl ve shodě s výsledkem získaným u kmene Sp158, což by pravděpodobně mohlo být způsobeno slabou expresí genu *spr1057* z inducibilního promotoru i bez cíleného přidání induktoru $ZnCl_2$ do média. V tomto případě se zřejmě jednalo o důsledek použití komplexního nedefinovaného CAT média, které bylo pro tuto analýzu zvoleno z důvodu porovnatelnosti výsledků s dříve provedenými experimenty (Sasková *et al.*, 2007). CAT médium obsahuje blíže neidentifikované množství Zn^{2+} , které je pravděpodobně postačující pro indukci bazální exprese *spr1057*. Po přidání $ZnCl_2$ do média byla v kmeni Sp167 hladina exprese *spr1057* srovnatelná s divokým kmenem Sp1.

Při testování genové exprese v kmeni Sp10 ($\Delta stkP$) bylo dosaženo podobných výsledků jako u Sasková *et al.* (2007) a bylo znovu ověřeno, že v $\Delta stkP$ kmeni je exprese genu *spr1057* výrazně reprimována (-357x tato práce; -502x Sasková *et al.* (2007)). U kmene Sp10 byla v této práci pozorována také snížená exprese genu *spr1056* (-311x) a slabě snížená exprese genu *spr1055* (-5,8x).

6.3 Kotranskripční analýza předpokládaného operonu

Na základě dostupných údajů o funkci genů účastnících se metabolismu nukleotidů, které se nacházejí v blízkosti genu *spr1057* (<http://www.genome.jp/kegg/>) jsme předpokládali, že by geny *spr1057* – *spr1052* mohly být součástí jednoho operonu. Kotranskripční analýzou těchto genů se nám ale nepodařilo stanovit konec operonu a proto jsme se rozhodli stejnou metodou otestovat další geny nacházející se ve směru transkripce, jmenovitě *spr1051*, *spr1050*, *spr1049*, *spr1048*, *spr1047* a *spr1046*. Gen *spr1046* se nacházel na opačném vlákně a v opačné orientaci vůči ostatním testovaným genům a tudíž jsme nepředpokládali, že by mohl být součástí stejné mRNA.

Provedením této analýzy byl určen gen *spr1057* jako první gen operonu. Pomocí použité RT-PCR metody se opět nepodařilo stanovit konec operonu a nemůžeme tak tedy vyloučit, že jsou geny *spr1057* – *spr1047* součástí jedné polycistronní mRNA a tudíž součástí jednoho velkého operonu. Není také vyloučeno, že se v této genové sekvenci vyskytují navíc interní promotory a že jsou geny testované sekvence součástí ještě jiných kratších transkriptů. Přítomnost PCR produktu korespondujícího s koexpresí genů *spr1047* - *spr1046* byla pravděpodobně důsledkem nevhodného navržení oligonukleotidu pro gen *spr1046*. Pro případné vyloučení použití nevhodného oligonukleotidu je třeba navrhnout oligonukleotid nový, který bude umožňovat amplifikaci delší sekvence, v ideálním případě celý gen *spr1046* spolu s částí genu *spr1047* a ještě další oligonukleotid, který by umožnil amplifikovat celý gen *spr1047* spolu s částí genu *spr1046*. Předpokladem proto zůstává, že součástí operonu jsou pouze geny *spr1057* – *spr1052*, tato hypotéza bude však do budoucna vyžadovat další ověření. Vhodnou metodou by mohl být tzv. „Northern blotting“ v kombinaci s připravenými hybridizačními sondami vůči jednotlivým testovaným genům.

6.4 Růstové charakteristiky mutantních kmenů *S. pneumoniae*

Pro kultivaci kmenů byla nejprve používána komplexní nedefinovaná média BHI, TSB a CAT. Na základě imunodetekcí proteinu Spr1057-FLAG pomocí Anti-FLAG protilátky v celkových lyzátech testovaných kmenů bylo však zjištěno, že k expresi genu *spr1057* z inducibilního zinkového promotoru dochází i v podmínkách bez dodatečně přidaných Zn^{2+} iontů do média. Tento výsledek byl navíc potvrzen pomocí qPCR analýzy genové exprese genu *spr1057* v komplementačním kmeni Sp167, který byl kultivován bez přidání $ZnCl_2$ v CAT médiu. Jedním z možných důvodů by mohlo být právě nedefinované složení použitých médií, která pravděpodobně obsahují blíže neurčené koncentrace zinečnatých iontů, takže i bez přidání induktoru do média dochází ke slabé expresi genu umístěného pod inducibilní zinkový promotor. Tato skutečnost by mohla v dalších fázích experimentů způsobit falešně pozitivní výsledky, proto bylo od používání těchto médií ustoupeno a všechny experimenty byly provedeny v definovaném C+Y médiu.

Při porovnání růstových vlastností připravených mutantních kmenů s divokým kmenem *S. pneumoniae* v C+Y médiu bylo zjištěno, že delece genu *spr1057* významným způsobem ovlivňuje životaschopnost kmenů. Deleční kmen Sp158 ($\Delta spr1057$) a komplementační kmen Sp167 ($\Delta spr1057$ pZn-*spr1057*-FLAG) dosahovaly ve stacionární fázi růstu výrazně nižších hodnot optických denzit v porovnání s divokým kmenem *S. pneumoniae*. Tyto kmeny měly ze všech testovaných kmenů nejdélší dobu zdvojení. Oproti našemu zjištění, Titz *et al.* (2007) pozorovali velmi malý rozdíl v rychlosti růstu kmene Δyjg oproti divokému kmeni *E. coli*, nezaznamenali tedy vliv delece genu *yjg* na životaschopnost této bakterie. Přestože ani protein Spr1057 není pro *S. pneumoniae* esenciální, jeho růst byl ztrátou genu *spr1057* významným způsobem ovlivněn. Nadprodukční kmen Sp152 (Sp1 pZn-*spr1057*-FLAG) vykazoval růstové charakteristiky velmi podobné divokému kmeni Sp1. Kmeny Sp10 ($\Delta stkP$) a Sp176 ($\Delta stkP$ pZn-*spr1057*-FLAG) měly v médiu bez přítomnosti $ZnCl_2$ srovnatelné doby zdvojení, které byly v porovnání s divokým typem Sp1 o 16 minut delší, ale v porovnání s kmeny s delecí genu *spr1057* (Sp158 a Sp167) byly doby zdvojení kmenů Sp10 a Sp176 o 4 minuty kratší.

Po přidání 0,1 mM $ZnCl_2$ do média došlo u kmenů Sp158 ($\Delta spr1057$) a Sp167 ($\Delta spr1057$ pZn-*spr1057*-FLAG) ke zvýšení růstové rychlosti (doba zdvojení byla oproti C+Y médiu bez induktoru u obou kmenů shodně o 10 minut kratší).

Přítomností Zn^{2+} iontů v médiu sice došlo k indukci exprese genu *spr1057* v kmeni Sp167, zvýšení růstové rychlosti tohoto kmene však nebylo důsledkem komplementace, ale efektem přidaných Zn^{2+} iontů, což bylo patrné právě při porovnání shodných růstových profilů kmenů Sp158 a Sp167 v C+Y médiu a v C+Y médiu s přidavkem $ZnCl_2$. Růstové vlastnosti nadprodukčního kmene Sp152 byly opět srovnatelné s divokým kmenem Sp1. U kmenů Sp10 ($\Delta stkP$) a Sp176 ($\Delta stkP$ pZn-*spr1057*-FLAG) nebyly přidáním 0,1 mM $ZnCl_2$ pozorovány žádné rozdíly ve změnách růstových rychlostí těchto kmenů oproti médiu bez přidaného induktoru exprese.

Z výsledků experimentů s vyššími koncentracemi $ZnCl_2$ v médiu (data neuvedena) se ukázalo, že ani zvýšená koncentrace induktoru nevede ke komplementaci růstu u kmene Sp167 a ke zlepšení růstových vlastností kmene Sp176, přestože bylo po přidání 0,1 mM $ZnCl_2$ pomocí qPCR (u kmene Sp167) a pomocí imunodetekce Anti-FLAG protilátkou (u obou kmenů) zaznamenáno obnovení ektopické exprese genu *spr1057* téměř až na hladinu divokého kmene. Naopak, zvyšující se koncentrace Zn^{2+} iontů v médiu vede ke značnému stresu buněčné kultury, pravděpodobně kvůli současnému snižování cytoplazmatické koncentrace Mn^{2+} . Příčinou toxicity Zn^{2+} iontů je zřejmě kompetice o Mn^{2+} transportní protein PsaA (Jacobsen *et al.*, 2011). Aby se tomuto efektu Zn^{2+} předešlo, byl do kultury přidán $MnCl_2$ v koncentraci odpovídající přidanému $ZnCl_2$ (0,1 mM). Z dosažených výsledků (data neuvedena) bylo ale zřejmé, že také zvyšování koncentrace obou těchto iontů současně mělo negativní vliv na růstové vlastnosti všech testovaných kmenů.

V přítomnosti vyšších koncentrací $ZnCl_2$ v médiu došlo u kmenů exprimujících *spr1057*-FLAG ze zinkového promotoru k výrazné inhibici růstu (data neuvedena). Příčinou by ale nemusela být pouze toxicita Zn^{2+} iontů, vezmeme-li v úvahu studii Titz *et al.* (2007), kde u homologního proteinu YjjG *E. coli* zjistili, že vysoká nadprodukce tohoto proteinu je pro buňky toxická. Důvodem toxicity je zřejmě obecná afinita k pyrimidinovým nukleotidům (Proudfoot *et al.*, 2004).

6.5 Citlivost *S. pneumoniae* k modifikovaným nukleotidům

Pro zjištění vlivu proteinu Spr1057 na životaschopnost *S. pneumoniae* a ověření jeho funkce v buňce v přítomnosti modifikovaných nukleotidů *in vivo* byly testované kmeny kultivovány s přidavkem různých koncentrací modifikovaných nukleotidů 5-FdU a 5-BrdU.

Tyto modifikované báze byly zvoleny v návaznosti na dřívější experimenty Titz *et al.* (2007), kde byla tímto způsobem objasněna funkce proteinu YjjG *E. coli in vivo* a dále v návaznosti na Vacková (2010), kde bylo poukázáno na citlivost kmene Δ stkP (Sp10) již na nízké koncentrace těchto atypických nukleotidů v médiu a kde byly tyto modifikované báze použity za účelem objasnění funkce proteinu Spr1057 *S. pneumoniae*.

Kromě růstových charakteristik byla u kmenů Sp10 (Δ stkP), Sp158 (Δ spr1057) a Sp167 (Δ spr1057 pZn-spr1057-FLAG) testována také míra inkorporace 5-BrdU do chromozomální DNA v porovnání s divokým typem Sp1.

Při kultivaci v přítomnosti **5-FdU** byla u kmenů s delecí genu *spr1057* (Sp158, Sp167 bez ZnCl₂) pozorována výrazně snížená životaschopnost, a to již při nejnižší použité koncentraci tohoto modifikovaného nukleotidu (2 μ M). Tento výsledek je v souladu se studií Titz *et al.* (2007) provedenou v *E. coli*. Dále bylo potvrzeno, že po přidání ZnCl₂ do média dochází k indukci exprese genu *spr1057*, jehož produkt chrání buňku před toxickým účinkem modifikovaných nukleotidů, čímž se zvyšuje životaschopnost bakteriální populace.

Inhibice růstu kmene Sp10 (Δ stkP) byla zaznamenána až při zvýšené koncentraci 5-FdU (5 μ M) v médiu. Tento výsledek se liší od výsledku uvedeného v diplomové práci Vacková (2010), kde byla pozorována citlivost kmene Sp10 již ke koncentraci 1 μ M 5-FdU. Dle našeho předpokladu by mohl být rozdíl způsoben použitím odlišného média (CAT médium (Vacková, 2010); C+Y médium (tato práce)).

Při kultivaci kmenů v přítomnosti **5-BrdU** byl růst kultur mutantních kmenů inhibován až při vyšších koncentracích této látky v médiu (5 a 10 μ M). U kmenů s delecí genu *spr1057* (kmen Sp158 a kmen Sp167 bez ZnCl₂) byla při těchto koncentracích zaznamenána zhoršená životaschopnost, nikoli však tak markantně, jako tomu bylo v případě kultivace těchto kmenů s 5-FdU. Také zde byla naše pozorování ve shodě s výsledky Titz *et al.* (2007), kde byl vliv 5-BrdU na životaschopnost mutantního kmene výrazně menší, než vliv 5-FdU. Indukce exprese *spr1057*-FLAG ze zinkového promotoru komplementačního kmene Sp167 nevedla v přítomnosti 5-BrdU ke komplementaci růstového defektu delečního kmene. U kmene Sp10 byla pozorována nižší citlivost na zvyšující se koncentraci 5-BrdU v porovnání s kmeny s delecí genu *spr1057* (Sp158, Sp167). U kmene Sp10 se naše výsledky lišily od výsledků uvedených v diplomové práci Vacková (2010), domníváme se ale, že tento rozdíl byl způsoben použitím odlišného kultivačního média (CAT médium (Vacková, 2010); C+Y médium (tato práce)).

Toxičtější účinky 5-FdU na buňku jsou přisuzovány tomu, že přeměna 5-FdU na 5-FdUMP způsobuje výrazný deficit thyminu v buňce a tudíž významnou inhibici růstu kultury (Cohen *et al.*, 1958). Přestože byla u 5-BrdU popsána schopnost inkorporovat se do DNA a způsobit vážná poškození genetického materiálu (Rosner a Yagil, 1970), důvodem jeho menší toxicity pro buněčnou kulturu by mohla být například přítomnost dalších reparačních mechanismů buňky.

Jako citlivější uspořádání experimentu pro odhalení účinku 5-BrdU na životaschopnost buněk *S. pneumoniae* bylo zvoleno testování míry inkorporace 5-BrdU do chromozomální DNA. Inkorporace 5-BrdU do DNA byla porovnávána u kmenů **Sp1** (divoký typ), **Sp10** (Δ *stkP*), **Sp158** (Δ *spr1057*) a **Sp167** (Δ *spr1057* pZn-*spr1057*-FLAG). V kmeni Sp167 byla inkorporace 5-BrdU sledována jak v přítomnosti ZnCl₂ v médiu, tak bez přídavku induktoru exprese genu *spr1057*. U kmenů s delecí genu *spr1057* (Sp158, Sp167 bez ZnCl₂) byla detekována inkorporace 5-BrdU již při nejnižší zvolené koncentraci (2 μ M). Bylo potvrzeno, že po indukované expresi genu *spr1057* v kmeni Sp167 dochází ke zvýšení ochrany buňky před modifikovanými nukleotidy ve stejné míře jako u divokého kmene Sp1. Dosažené výsledky byly ve shodě s výsledky Titz *et al.* (2007), kde byla zaznamenána inkorporace 5-BrdU do chromozomální DNA mutantního kmene již při nejnižší zvolené koncentraci této látky v médiu a kde byl u komplementačního kmene po indukci exprese genu pozorován návrat k fenotypu divokého kmene. U kmene Sp10 (Δ *stkP*) byla inkorporace 5-BrdU detekována až při zvýšené koncentraci tohoto modifikovaného nukleotidu v médiu (5 μ M).

Na závěr lze na základě dosažených výsledků konstatovat, že delece genu *spr1057* vede k nižší životaschopnosti kmenů *S. pneumoniae*. V porovnání s kmenem s delecí genu *stkP* (Sp10) vykazují kmeny s delecí genu *spr1057* vyšší citlivost na přítomnost modifikovaných bazí a vyšší míru jejich inkorporace do DNA. Přítomnost proteinu Spr1057 a míra jeho exprese má tedy zásadní vliv na degradaci toxických modifikovaných bazí v buňkách *S. pneumoniae*. Delece genu *stkP* však pravděpodobně ovlivňuje obranné mechanismy buňky komplexněji a proto pouhé zvýšení exprese genu *spr1057* nevede k obnovení odolnosti kmene Sp10 k těmto toxickým látkám.

7 SOUHRN

Výsledky této diplomové práce je možné shrnout do následujících bodů:

- Byly vytvořeny mutantní kmeny *S. pneumoniae*. Kromě delečního kmene ($\Delta spr1057$) byly dále připraveny kmeny exprimující *spr1057* z indukibilního zinkového či z nativního promotoru na různém genetickém pozadí.
- Pomocí qPCR analýzy bylo zjištěno, že u kmenů s delecí genu *spr1057* (Sp158, Sp167) nedochází ke změně exprese genů nacházejících se v okolí tohoto genu a tedy že delece genu *spr1057* nemá na přilehlé geny žádný polární efekt.
- Kotranskripční analýzou provedenou pomocí RT-PCR byl stanoven gen *spr1057* jako první gen v předpokládaném operonu *spr1057 - spr1052*. Touto metodou se nám však nepodařilo určit konec operonu.
- U vytvořených mutantních kmenů byly charakterizovány jejich růstové vlastnosti kultivací v C+Y médiu a v C+Y médiu s přídavkem 0,1 mM $ZnCl_2$ jako induktoru exprese ektopicky uloženého genu *spr1057*.
- Pro potvrzení nukleotidázové funkce proteinu Spr1057 byl sledován růst vytvořených mutantních kmenů v přítomnosti 5-FdU a 5-BrdU a byla porovnávána míra inkorporace 5-BrdU do chromozomální DNA mutantních kmenů oproti divokému kmeni *S. pneumoniae*.
- U mutantního kmene $\Delta spr1057$ (Sp158) byla v přítomnosti modifikovaných nukleotidů zaznamenána výrazná inhibice růstu a téměř okamžitá inkorporace 5-BrdU do DNA, zatímco u divokého kmene k inhibici růstu ani k inkorporaci 5-BrdU do DNA nedošlo. Expese ektopické kopie genu *spr1057* z indukibilního promotoru vedla ke komplementaci deficience proteinu Spr1057 a k obnovení fenotypu na úroveň kmene bez přidaného toxického nukleotidu.
- Protein Spr1057 je nukleotidáza s „house cleaning“ funkcí, jejíž přítomnost má zásadní vliv na degradaci toxických modifikovaných bazí v buňkách *S. pneumoniae*.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alonso de Velasco E, Verheul AFM, Verhoef J, Snippe H (1995)** *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev* **59**: 591 – 603.
- Alloing G, Martin B, Granadel CH, Claverys J-P (1998)** Development of competence in *Streptococcus pneumoniae*: pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease. *Mol Microbiol* **29**: 75 – 83.
- Appleby JL, Parkinson JS, Bourret RB (1996)** Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* **86**: 845 – 848.
- Avery OT, MacLeod CM, 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. *J Exp Med* **79**: 137 – 158.
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: E905 – 913.
- Blue CE, Mitchell TJ (2003)** Contribution of a response regulator to the virulence of *Streptococcus pneumoniae* is strain dependent. *Infect Immun* **71**: 4405 – 4413.
- Bogaert D, de Groot R, Hermans PWM (2004)** *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* **4**: 144 – 154.
- Brown S, Santa Maria Jr JP, Walker S (2013)** Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **67**: 313 – 336.
- Brugger SD, Hathaway LJ, Mühlemann (2009)** Detection of *Streptococcus pneumoniae* strain cocolonization in the nasopharynx. *J Clin Microbiol* **47**: 1750 – 1756.
- Cohen SS, Flaks JG, Barner HD, Loeb MR, Lichtenstein J (1958)** The mode of action of 5-fluorouracil and its derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* **44**: 1004 – 1012.
- Dawid s, Roche AM, Weiser JN (2007)** The blp bacteriocins of *Streptococcus pneumoniae* mediate intraspecies competition both in vitro and in vivo. *Infect Immun* **75**: 443 – 451.
- De Jong RM, Dijkstra BW (2003)** Structure and mechanism of bacterial dehalogenases: different ways to cleave a carbon-halogen bond. *Curr Opin Struct Biol* **13**: 722 – 730.

De Jong RM, Tiesinga JJW, Rozeboom HJ, Kalk KH, Tang L, Janssen DB, Dijkstra BW (2003) Structure and mechanism of a bacterial haloalcohol dehalogenase: a new variation of the short-chain dehydrogenase/reductase fold without an NAD(P)H binding site. *EMBO J* **22**: 4933 – 4944.

Echenique JR, Kadioglu A, Romao S, Andrew PW, Trombe M-C (2004) Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **72**: 2434 – 2437.

Echenique JR, Trombe M-C (2001) Competence repression under oxygen limitation through the two-component MicAB signal transducing system in *Streptococcus pneumoniae* and involvement of the PAS domain of MicB. *J Bacteriol* **183**: 4599 – 4608.

Faden H, Duffy L, Wasialewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y (1997) Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *J Infect Dis* **175**: 1440 – 1445.

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

Fischer W, Behr T, Hartmann R, Peter-Katalinić J, Egge H (1993) Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structure. A reinvestigation of teichoid acid (C polysaccharide). *Eur J Biochem* **215**: 851 – 857.

Fleurie A, Cluzel C, Guiral S, Freton C, Galisson F, Zanella-Cleon I, Di Guilmi AM, Grangeasse C (2012) Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **83**: 746 – 758.

Fleurie A, Manuse S, Zhao C, Campo N, Cluzel C, Lavergne JP, Freton C, Combet C, Guiral S, Soufi B et al. (2014) Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the paralogs DivIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division. *PLoS Genet* **10**: e1004275.

Foussard M, Cabantous S, Pédelacq J-D, Guillet V, Tranier S, Mourey L, Birck C, Samama J-P (2001) The molecular puzzle of two-component signaling cascades. *Microbes Infect* **3**: 417 – 424.

Furguhar D, Chen R, Khan S (1995) 5'-[4-(Pivaloyloxy)-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-yl]-2'-deoxy-5-fluorouridine: a membrane-permeating prodrug of 5-fluoro-2'-deoxyuridylic acid (FdUMP). *J Med Chem* **38**: 488 – 495.

Furukawa K (2006) Oxygenases and dehalogenases: molecular approaches to efficient degradation of chlorinated environmental pollutants. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**: 2335 – 2348.

- Galperin MY, Moroz OV, Wilson KS, Murzin AG (2006)** House cleaning, a part of good housekeeping. *Mol Microbiol* **59**: 5 – 19.
- Galyov EE, Håkansson S, Forsberg A, Wolf-Watz H (1993)** A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**: 730 – 732.
- Garnak M, Reeves HC (1979)** Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Science* **203**: 1111 – 1112.
- Gerdes SY, Scholle MD, Campbell JW, Balázsi G, Ravasz E, Daugherty MD, Somera AL, Kyrpides NC, Anderson I, Gelfand MS, Bhattacharya A *et al.* (2003)** Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *J Bacteriol* **185**: 5673 – 5684.
- Giefing C, Jelencsics KE, Gelbmann D, Senn BM, Nagy E (2010)** The pneumococcal eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP co-localizes with the cell division apparatus and interacts with FtsZ *in vitro*. *Microbiol* **156**: 1697 – 1707.
- Giefing C, Meinke AL, Hanner M, Henics T, Bui MD, Gelbmann D, Lundberg U, Senn BM, Schunn M, Habel A *et al.* (2008)** Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *J Exp Med* **205**: 117 – 131.
- Gillespie SH, Balakrishnan I (2000)** Pathogenesis of pneumococcal infection. *J Med Microbiol* **49**: 1057 – 1067.
- Griffith F (1928)** The significance of pneumococcal types. *J Hyg (Lond)* **27**: 113 – 159.
- Hakenbeck R (2000)** Transformation in *Streptococcus pneumoniae*: mosaic genes and the regulation of competence. *Res Microbiol* **151**: 453 – 456.
- Halfmann A, Schnorpfeil A, Müller M, Marx P, Günzler U, Hakenbeck R, Brückner R (2011)** Activity of two-component regulatory system CiaRH in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Mol Microbiol Biotechnol* **20**: 96 – 104.
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988)** The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**: 42 – 52.
- Hirst RA, Kadioglu A, O'Callaghan C, Andrew PW (2004)** The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol* **138**: 195 – 201.

- Hoskins J, Alborn WE Jr., Arnold J, Blaszcak LC, Burgett S, DeHoff BS, Estrem ST, Fritz L, Fu DJ, Fuller W et al. (2001)** Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol* **183**: 5709 – 5717.
- Hunsucker SA, Mitchell BS, Spychala J (2005)** The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol Ther* **107**: 1 –30.
- Hussain H, Branny P, Allan E (2006)** A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase is required for biofilm formation, genetic competence, and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **188**: 1628 – 1632.
- Cheng Q, Campbell EA, Naughton AM, Johnson S, Masure HR (1997)** The *com* locus controls genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **23**: 683 – 692.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23 - 28.
- Jacobsen FE, Kazmierczak KM, Lisher JP, Winkler MP, Giedroc DP (2011)** Interplay between manganese and zinc homeostasis in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Metalomics* **3**: 38 – 41.
- Janssen DB, Dinkla IJT, Poelarends GJ, Terpstra P (2005)** Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. *Environ Microbiol* **7**: 1868 – 1882.
- Jedrzejak MJ (2001)** Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 187 – 207.
- Johnsborg O, Eldholm V, Håvarstein LV (2007)** Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol* **158**: 767 – 778.
- Kamiya H (2003)** Mutagenic potential of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides. *Nucleic Acids Res* **31**: 517 – 531.
- Kelly R, Greiff D (1970)** Toxicity of pneumococcal neuraminidase. *Infect Immun* **2**: 115 – 117.
- Keseler IM, Collado-Vides J, Gama-Castro S, Ingraham J, Paley S, Paulsen IT, Peralta-Gil M, Karp PD (2005)** EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **33**: D334 – 337.
- Kharat AS, Tomasz A (2006)** Drastic reduction in the virulence of *Streptococcus pneumoniae* expressing type 2 capsular polysaccharide but lacking choline residues in the cell wall. *Mol Microbiol* **60**: 93 – 107.

- Koonin EV, Tatusov RL (1994)** Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. *J Mol Biol* **244**: 125 – 132.
- Kurihara T, Esaki N (2008)** Bacterial hydrolytic dehalogenases and related enzymes: occurrences, reaction mechanisms, and applications. *Chem Rec* **8**: 67 – 74.
- Kuznetsova E, Proudfoot M, Gonzales CF, Brown G, Omelchenko MV, Borozan I, Carmel L, Wolf YI, Mori H, Savchenko AV et al. (2006)** Genome-wide analysis of substrate specificities of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family. *J Biol Chem* **281**: 36149 – 36161.
- Lacks S, Hotchkiss RD (1960)** A study of the genetic material determining an enzyme activity in pneumococcus. *Biochem Biophys Acta* **39**: 508 – 517.
- Lanie JA, Ng W-L, Kazmierczak KM, Andrzejewski TM, Davidsen TM, Wayne KJ, Tettelin H, Glass JI, Winkler ME (2007)** Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J Bacteriol* **189**: 38 – 51.
- Lovečková Y, Kolář M, Reitinger J, Smolka V, Wiedermann J (2002)** Význam *Streptococcus pneumoniae* v patogenezi dětských bakteriálních infekcí. *Pediatric pro praxi* **1**: 22 – 26.
- López R (2006)** Pneumococcus: the sugar-coated bacteria. *Int Microbiol* **9**: 179 – 190.
- Luo P, Li H, Morrison DA (2003)** ComX is a unique link between multiple quorum sensing outputs and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **50**: 623 – 633.
- Luo P, Li H, Morrison DA (2004)** Identification of ComW as a new component in the regulation of genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **54**: 172 – 183.
- Madec E, Laszkiewicz A, Iwanicki A, Obuchowski M, Séror S (2002)** Characterization of membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. *Mol Microbiol* **2**: 571 – 586.
- Maki H, Sekiguchi M (1992)** MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* **355**: 273 – 275.
- McCluskey J, Hinds J, Husain S, Witney A, Mitchell TJ (2004)** A two-component system that controls the expression of pneumococcal surface antigen A (PsaA) and regulates virulence and resistance to oxidative stress in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **51**: 1661 – 1675.

Morona JK, Morona R, Paton JC (2006) Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae* type 2 is required for invasive disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 8505 – 8510.

Morona JK, Paton JC, Miller DC, Morona R (2000) Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **35**: 1431 – 1432.

Morrison DA, Trombe MC, Hayden MK, Waszak GA, Chen JD (1984) Isolation of transformation-deficient *Streptococcus pneumoniae* mutants defective in control of competence, using insertion-duplication mutagenesis with the erythromycin resistance determinant of pAM beta 1. *J Bacteriol* **159**: 870 – 876.

Nardi-Dei V, Kurihara T, Park Ch, Esaki N, Soda K (1997) Bacterial DL-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. strain 113: gene cloning and structural comparison with D- and L-2-haloacid dehalogenases. *J Bacteriol* **179**: 4232 – 4238.

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

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*. *J Bacteriol* **192**: 3629 – 3638.

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

O'Donovan GA, Neuhard J (1970) Pyrimidine metabolism in microorganisms. *Bacteriol Rev* **34**: 278 – 343.

Paterson GK, Blue CE, Mitchell TJ (2006) Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J med Microbiol* **55**: 355 – 363.

Pestova EV, Håvarstein LS, Morrison DA (1996) Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol* **21**: 853 – 862.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.

Ponnuraj K, Jedrzejewski MJ (2000) Mechanism of hyaluronan binding and degradation: structure of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase in complex with hyaluronic acid disaccharide at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol* **299**: 885 – 895.

- Proudfoot M, Kuznetsova E, Brown G, Rao NN, Kitagawa N, Mori H, Savchenko A, Yakunin AF (2004)** General enzymatic screens identify three new nucleotidases in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**: 54687 – 54694.
- Quon KC, Marczyński GT, Shapiro L (1996)** Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* **84**: 83 – 89.
- Rajam G, Anderton JM, Carlone GM, Sampson JS, Ades EW (2008)** Pneumococcal surface adhesin A (PsaA): a review. *Crit Rev Microbiol* **34**: 131 – 142.
- Rane L, Subbarow Y (1940)** Nutritional requirements of the Pneumococcus: 1. Growth factors for types I, II, V, VII, VIII. *J Bacteriol* **40**: 695 – 704.
- Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI (1998)** Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* **102**: 347 – 360.
- Ronda C, García JL, García E, Sánchez-Puelles JM, López R (1987)** Biological role of the pneumococcal amidase. Cloning of the *lytA* gene in *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Biochem* **164**: 621 – 624.
- Rosenow C, Ryan P, Weiser JN, Johnson S, Fontan P, Ortqvist A, Masure HR (1997)** Contribution of novel cholin-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **25**: 819 – 829.
- Rosner A, Yagil E (1970)** Incorporation of 5-bromodeoxyuridine into DNA of wild type *Escherichia coli* and its use for the enrichment of auxotrophic mutants. *Mol Gen Genet* **106**: 254 – 262.
- Sasková L, Nováková L, Basler M, Branny P (2007)** Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **189**: 4168 – 4179.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985)** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76 – 85.
- Standish AJ, Stroehner UH, Paton JC (2005)** The two-component signal transduction system RR06/HK06 regulates expression of *cbpA* in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 7701 – 7706.
- Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN (2000)** Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183 – 215.
- Sung CK, Li H, Claverys JP, Morrison DA (2001)** An *rpsL* cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5190-5196.

- Swoboda JG, Campbell J, Meredith TC, Walker S (2010)** Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. *Chembiochem* **11**: 35 – 45.
- Štekerová N (2012)** Spr0334, nový protein buněčného dělení u *Streptococcus pneumoniae*. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Praha
- Tettelin H, Nelson KE, Paulsen IA, Eisen JA, Read TD, Peterson S, Heidelberg J, DeBoy RT, Haft DH, Dodson RJ et al. (2001)** Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**: 498 – 506.
- Titz B, Häuser R, Engelbrecher A, Uetz P (2007)** The *Escherichia coli* protein YjjG is a house-cleaning nucleotidase *in vivo*. *FEMS Microbiol Lett* **270**: 49 – 57.
- Throup JP, Koretke KK, Bryant AP, Ingraham KA, Chalker AF, Ge Y, Marra A, Wallis NG, Brown JR, Holmes DJ, Rosenberg M, Burnham MK (2000)** A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **35**: 566 – 576.
- Tomasz A (1967)** Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in Pneumococcus. *Science* **157**: 694 – 697.
- Ulijasz, AT, Andes DR, Glasner JD, Weisblum B (2004)** Regulation of iron transport in *Streptococcus pneumoniae* by RitR, an orphan response regulator. *J Bacteriol* **186**: 8123-8136.
- Ulijasz AT, Falk SP, Weisblum B (2009)** Phosphorylation of the RitR DNA-binding domain by a Ser–Thr phosphokinase: implications for global gene regulation in the streptococci. *Mol Microbiol* **71**: 382 – 390.
- Umeyama T, Lee P-C, Horinouchi S (2002)** Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 419 – 425.
- Vacková Z (2010)** Funkční studie potenciální nukleotidasy kódované genem *spr1057* *Streptococcus pneumoniae*, homologa proteinu YjjG *Escherichia coli*. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Praha
- Vialle S, Sepulcri P, Dubayle J, Talaga P (2005)** The teichoic acid (C-polysaccharide) synthesized by *Streptococcus pneumoniae* serotype 5 has a specific structure. *Carbohydr Res* **340**: 91 – 96.
- Walburger A, Koul A, Ferrari G, Nguyen L, Prescianotto-Baschong C, Huygen K, Klebl B, Thompson Ch, Bacher G, Pieters J (2004)** Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* **304**: 1800 – 1804.
- Waters CM, Bassler BL (2005)** Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319 – 346.

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

Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6578 – 6583.

Yeast C, Finn RD, Bateman A (2002) The PASTA domain: a β -lactam-binding domain. *Trends Biochem Sci* **27**: 438 – 440.

Yother J, White JM (1994) Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. *J Bacteriol* **176**: 2976 – 2985.

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

Zhou P, Long Q, Zhou Y, Wang H, Xie J (2012) *Mycobacterium tuberculosis* two-component systems implications in novel vaccines and drugs. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **22**: 37 – 52.