

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Tereza Mühldorfová

Studium funkce fosfoglukozaminmutázy GlmM u *Streptococcus pneumoniae*

Functional analysis of phosphoglucosamine mutase GlmM in *Streptococcus pneumoniae*

Diplomová práce

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

Praha, 2019

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Aleše Ulrycha, PhD. V práci jsem použila informační zdroje uvedené v seznamu.

Praha, 29. dubna 2019

..... podpis

Na tomto místě bych chtěla nejprve poděkovat svému školiteli RNDr. Aleši Ulrychovi, Ph.D. a RNDr. Pavlu Brannymu, CSc. za odborné vedení práce a cenné rady při jejím zpracování. Dále pak Honzovi Keilovi za vytvoření 3D modelu GlnM. Poděkování patří rovněž Lindě, Denise, Karolíně, Alici, Olivě, Silvii a dalším kolegům z Mikrobiologického ústavu, rovněž za cenné rady, postřehy a přátelskou atmosféru. Také bych ráda poděkovala mé rodině za podporu a trpělivost.

Studium funkce fosfoglukozaminmutázy GlmM u *Streptococcus pneumoniae*

Fosfoglukozaminmutáza (GlmM), je enzym biosyntézy buněčné stěny, u kterého byla nedávno prokázána jeho esencialita u *Streptococcus pneumoniae*.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo definitivně dokázat esencialitu fosforylace serinových zbytků S99 a S101 enzymu GlmM v podmínkách *in vivo*, jejíž nezbytnost byla již dříve prokázána nepřímo na základě transformační účinnosti. Pro tento účel jsme vytvořili kmen, který obsahuje dvě kopie genu *glmM* – jednu s aminokyselinovými záměnami na sledovaných serinových zbytcích umístěnou v nativním lokusu a druhou ektopickou kopii divoké formy genu *glmM* pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru. U tohoto kmene jsme sledovali morfologii, růst i expresi GlmM v prostředí s induktorem i bez něho. Ve všech sledovaných parametrech bylo zřejmé, že bez přidání induktoru ektopické exprese genu *glmM* nejsou buňky životaschopné, a tedy že esenciální protein GlmM je funkční pouze ve fosforylované formě na S99 a S101. Dále jsme se pokusili lokalizovat tento enzym v buňce *S. pneumoniae*. GlmM jsme fúzovali s fluorescenční značkou GFP a pomocí fluorescenční mikroskopie jsme prokázali, že se jedná o cytoplazmatický protein.

Dalším cílem této práce bylo stanovit třetí neznámé místo fosforylace proteinu GlmM *in vitro* závislé na proteinkináze StkP. Z kinázové reakce *in vitro* a následné MS analýzy vyplývá, že kromě zbytků S99 a S101 je protein GlmM fosforylován v pozici T304, S414, T416 a T438 proteinkinázou StkP. Navíc protein GlmM je schopen také autofosforylace na serinových zbytcích v pozicích 99 a 101. Nově určená místa fosforylace budou předmětem dalšího zkoumání.

Klíčová slova:

Streptococcus pneumoniae, fosfoglukozaminmutáza GlmM, proteinkináza StkP, fosforylace, biosyntéza buněčné stěny, esencialita.

Functional analysis of phosphoglucosamine mutase GlmM in *Streptococcus pneumoniae*

Phosphoglucosamine mutase (GlmM), an enzyme taking part in biosynthesis of cell wall, has been recently proven to be essential for *Streptococcus pneumoniae*.

The main goal of this thesis was to prove *in vivo* that GlmM serine residues S99 and S101 phosphorylation is essential while the necessity of it was already proven indirectly based on transformation efficiency. For this purpose we have prepared a strain with two copies of the *glmM* gene – the first one with amino acid changes on monitored serine residues located at native locus; and the second ectopic copy of the wild allele of *glmM* gene under control of inducible zinc promoter. We have observed morphology, growth, and GlmM expression with and without the presence of an inductor. All the observed parameters show that the cells are not viable without ectopic *glmM* expression, thus the essential protein GlmM is functional only when phosphorylated on S99 and S101 residues. Further, we have attempted to localize the enzyme in the *S. pneumoniae* cell. We have fused GlmM with fluorescent marker GFP and by using the fluorescent microscopy we have proved that GlmM is cytoplasmic protein.

Another goal of this thesis was to find an unknown third phosphorylation site of the GlmM protein which is dependent on the protein kinase StkP. From *in vitro* kinase assay and subsequent MS analysis, it was evident, that apart from residues S99 and S101, GlmM protein is phosphorylated at positions T304, S414, T416, and T438 by protein kinase StkP. Moreover, GlmM protein is capable of an autophosphorylation on serine residues S99 and S101. These newly described phosphorylation sites will be the topic of the further research.

Key words:

Streptococcus pneumoniae, phosphoglucosamine mutase GlmM, protein kinase StkP, phosphorylation, cell wall biosynthesis, essentiality.

1 OBSAH

1	OBSAH	5
2	ÚVOD	8
3	SEZNAM ZKRATEK	10
4	LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
4.1	Streptococcus pneumoniae	12
4.1.1	Obecné vlastnosti, taxonomické zařazení	12
4.1.2	Historie, objevení	13
4.1.3	Patogenita	13
4.2	Genom S. pneumoniae	14
4.2.1	Genetická kompetence S. pneumoniae	14
4.3	Přenos signálu u bakterií – fosforylace	15
4.3.1	Dvoukomponentové systémy	16
4.3.2	Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu (eSTKs)	17
4.3.3	Substráty proteinkinázy StkP u Streptococcus pneumonie	18
4.4	Buněčná stěna bakterií	22
4.4.1	Syntéza peptidoglykanu	23
4.4.2	Lipid II jako signální molekula	28
4.4.3	Penicilin vázající proteiny	29
4.5	α -D-fosfohexomutázy	33
4.6	Fosfoglukozaminmutázy u bakteriálních zástupců	38
5	CÍLE PRÁCE	44
6	MATERIÁL A METODY	46
6.1	Materiál	46
6.1.1	Bakteriální kmeny	46
6.1.2	Vektory a kazety	48
6.1.3	Oligonukleotidy	51
6.1.4	Enzymy	52
6.1.5	Kultivační půdy, použitá antibiotika a induktory exprese	53
6.1.6	Roztoky, pufry a standardy	56
6.1.7	Protilátky, imunodetekce	58
6.1.8	Komerční soupravy a membrány	59
6.1.9	Laboratorní přístroje, počítačová analýza, software	59
6.1.10	Chemikálie	61
6.2	Metody	64
6.2.1	Manipulace s buňkami S. pneumoniae	64
6.2.1.1	Kultivace S. pneumoniae, měření růstu	64
6.2.1.2	Transformace DNA do S. pneumoniae	65
6.2.1.3	Izolace proteinů	65
6.2.2	Manipulace s buňkami E. coli	66

6.2.2.1	Kultivace <i>E. coli</i>	66
6.2.2.2	Příprava kompetentních buněk a transformace DNA do <i>E. coli</i>	66
6.2.2.3	Izolace plasmidů	67
6.2.2.4	Expresse proteinů pod IPTG iducibilním promotorem	67
6.2.2.5	Izolace a purifikace proteinů pomocí histidinové značky (His Tag)	67
6.2.2.6	Dialýza purifikovaných bílkovin	68
6.2.3	Manipulace s DNA	68
6.2.3.1	Polymerázová řetězová reakce	68
6.2.3.2	Místně specifická mutagenese	69
6.2.3.3	DNA elektroforéza v agarózovém gelu	69
6.2.3.4	Izolace chDNA	70
6.2.3.5	Štěpení DNA	70
6.2.4	Manipulce s proteiny	70
6.2.4.1	Stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA	70
6.2.4.2	Kinázová reakce in vitro	70
6.2.4.3	Polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti SDS (1-DE)	71
6.2.4.4	Přenos proteinů na membránu a jejich detekce	72
6.2.4.5	Detekce proteinů koloidní Coomassie Blue	72
6.2.4.6	Příprava vzorků pro analýzu hmotnostní spektrometrií	72
6.2.4.7	Kinázová reakce s in vitro radioaktivním značením	72
6.2.5	Mikroskopie	73
7	VÝSLEDKY	74
7.1	Důkaz esenciality serinových zbytků v pozici 99 a 101 fosfoglukozaminmutázy GlmM pro životaschopnost <i>S. pneumoniae</i>	74
7.1.1	Delece nativní kopie genu <i>glmM</i> v merodiploidních kmenech kódujících ektopickou alelu <i>glmM</i> s bodovými mutacemi v pozici S99 a S101	75
7.1.2	Vliv fosfoablativní záměny S99/101A genu <i>glmM</i> v nativním lokusu u merodiploidního kmene Sp369 na životaschopnost <i>S. pneumoniae</i>	77
7.1.3	Příprava konstruktů	77
7.1.4	Příprava kmenů	80
7.1.5	Charakterizace mutantního kmene Sp369	85
7.1.6	Analýza nadprodukčního fenotypu merodiploidního kmene Sp245 v C+Y médiu s různými koncentracemi ZnCl ₂	86
7.1.7	Růst kmenů Sp283 a Sp369 v tekutém médiu C+Y	87
7.1.8	Test růstu na pevném médiu	92
7.1.9	Morfologie buněk kmenů Sp283 a Sp369	92
7.1.10	Ověření exprese GlmM-Flag	97
7.1.11	Morfologie GlmM-deplečního kmene Sp261 v reálném čase	97
7.2	Lokalizace fosfoglukozaminmutázy GlmM v buňce	101
7.2.1	Příprava plasmidu pJWV25- <i>glmM</i>	101
7.2.2	Transformace plasmidu pJWV25- <i>glmM</i> do chromozomu <i>S. pneumoniae</i>	102
7.2.3	Test exprese GFP-GlmM	104

7.2.4	Test růstu kmenů exprimujících fúzní protein GFP-GlmM	104
7.2.5	Fluorescenční mikroskop	107
7.3	Stanovení místa fosforylace proteinu GlmM proteinkinázou StkP in vitro	108
7.3.1	Příprava konstruktů pro expresi GlmM S99A v E. coli	108
7.3.2	Purifikace proteinu GlmM a fosforylace in vitro proteinkinázou StkP.....	109
7.3.3	Identifikace fosforylovaných zbytků proteinu GlmM pomocí MS analýzy.....	112
7.3.4	Autofosforylace proteinu GlmM in vitro	112
8	DISKUZE	114
8.1	Esencialita fosforylace serinových zbytků v pozici 99 a 101 pro funkčnost GlmM S. pneumoniae	114
8.2	Lokalizace proteinu GlmM v buňce S. pneumoniae	119
8.3	Stanovení místa fosforylace proteinu GlmM proteinkinázou StkP in vitro	120
9	SOUHRN.....	125
10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	127

2 ÚVOD

Bakteriální buňky žijí ve velmi proměnlivém a často nepříznivém prostředí. V takovém prostředí se musí jakákoliv buňka přizpůsobovat vnějším podmínkám a rychle reagovat na změny, aby přežila, byla schopná růst a množit se. Pro životaschopnost buňky je proto důležité, aby dokázala komunikovat s okolním prostředím a byla schopná na změny rychle a adekvátně reagovat a adaptovat se na ně. Během evoluce proto bakterie vyvinuly mnoho mechanismů, které jim umožňují rozpoznat signály z okolí a přizpůsobit se prostředí. Jedním z mechanismů přenosu signálu u bakterií, jak z intracelulárního tak extracelulárního prostředí, jsou posttranslační proteinové modifikace - fosforylace a defosforylace. Tento vratný přenos fosfátové skupiny na fosforylovatelné aminokyselinové zbytky zajišťují ATP - dependentní proteinové kinázy, defosforylaci pak zprostředkovávají enzymy fosfatázy. Když bylo zjištěno, že prokaryota mají ve svých signalizačních drahách serin/threoninové proteinkinázy a proteinfosfatázy, začaly být tyto enzymy podrobně studovány. Analýzy bakteriálních genomů ukázaly přítomnost Ser/Thr a Tyr proteinkináz eukaryotního typu u mnoha prokaryot, kde se podílejí na regulaci buněčného dělení, biosyntéze buněčné stěny, reakci na stresové podmínky a tvorbě biofilmu. *Streptococcus pneumoniae* se jeví jako vhodný modelový organismus pro studium těchto signalizačních enzymů, neboť jeho genom obsahuje jen jednu kopii genu pro proteinkinázu StkP eukaryotického typu a s ní asociovanou proteinfosfatázu PhpP. Proteinkináza StkP je membránový protein, jenž je aktivován podjednotkami peptidoglykanu a je důležitý pro regulaci buněčného dělení. Neméně důležitý je také fakt, že *S. pneumoniae* je významný lidský patogen a identifikace signalizačních proteinů skýtá i možnost tyto dráhy blokovat a dané bakterii tak komplikovat adaptaci na vnější podmínky.

Pro pochopení signalizačních drah proteinkinázy StkP je důležitá identifikace a charakterizace jejích substrátových proteinů. Dosud bylo identifikováno pouze 12 substrátů, z nichž většina souvisí s buněčným dělením (DivIVA, LocZ, FtsZ, FtsA a Jag). Dále se jedná o transkripční regulátory, které ovlivňují příjem železa (RitR) a virulenci (RR06). Transkripční regulátor zodpovědný za správné oddělení dceřinné buňky při buněčném dělení (WalR) (Agaewal et al., 2011), který je sice na rozdíl od ostatních fosforylován protein kinázou StkP nepřímo, ale také s ní interaguje (Stramsås et al., 2017; Dubrac et al., 2008). Dalšími substráty protein kinázy StkP jsou anorganická fosfatáza (PapC) a proteiny související se syntézou peptidoglykanu (MurC, MacP a GlmM). Enzym fosfoglukozaminmutáza (GlmM), který katalyzuje přeměnu glukozamin-6-fosfátu na glukozamin-1-fosfát při biosyntéze buněčné

stěny, je esenciální pro životaschopnost bakterie *S. pneumoniae* a má tak dobrý předpoklad pro použití při vývoji léčiv.

Ve struktuře proteinu fosfoglukozaminmutázy byla již identifikována dvě místa fosforylace, která se zdají být pro růst a množení bakterie nepostradatelná (Kurpička 2014; Pallová, 2007). Dosavadní výsledky také naznačují existenci minimálně jednoho dalšího, dosud neidentifikovaného místa fosforylace, které by mohlo být zodpovědné za fosforylaci kinázou StkP (Pallová, 2007).

3 SEZNAM ZKRATEK

1-DE	jednorozměrná elektroforéza
Amp ^R	ampicilinová rezistence
AMK	aminokyseliny
ATP	adenosintrifosfát
pb	páry bází
c	koncentrace
CCB	Colloidal Coomassie Blue
CSP	competence stimulating peptide
dH ₂ O	deionizovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EL	eluční frakce
eSTK	Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu
FL	frakce nenavázaných proteinů (proteínů bez histidinových zbytků)
GFP	zelený fluorescenční protein
His	histidin
chDNA	chromozomální DNA
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
Kan ^R	kanamycinová rezistence
Kan ^S	kanamycinová senzitivita
kDa	kilodalton
kb	kilobáze
MS	hmotnostní spektrometrie
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
OD ₆₀₀	optická denzita při vlnové délce 600 nm
PASTA	„penicillin-binding protein and Serine/Threonine kinase associated“
PCR	polymerázová řetězcová reakce
<i>P_{czcD}, pZn</i>	inducibilní zinkový promotor
PVFD	polyvinylidendifluorid

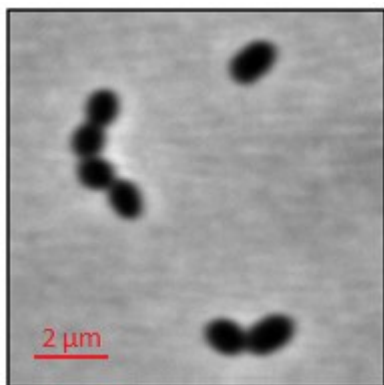
SB	vzorkový pufr
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS
Ser	serin
S99	serin v pozici 99
S101	serin v pozici 101
S99A	záměna serinu v pozici 99 za alanin
S101A	záměna serinu v pozici 101 za alanin
StkP-KD	kinázová doména proteinkinázy StkP
StrR	streptomycinová rezistence
StrS	streptomycinová senzitivita
TCSs	dvoukomponentové systémy
TetR	tetracyklinová rezistence
Thr	threonin
Tm	teplota tání
W	oplachová frakce
WT	divoký typ

4 LITERÁRNÍ PŘEHLED

4.1 *Streptococcus pneumoniae*

4.1.1 *Obecné vlastnosti, taxonomické zařazení*

Streptococcus pneumoniae známá i jako *pneumococcus* je bakterie z kmene *Firmicutes*, třídy Bacilli, řádu Lactobacillales, čeledi *Streptococcaceae*, rodu *Streptococcus*.



Obrázek 1
Mikroskopický snímek fázového kontrastu *Streptococcus pneumoniae*

Vpravo nahoře je samostatný kok. Vpravo dole je diplokok. Vlevo je dvojice diplokoků tvořící řetízek.

Zdroj: Vlastní zpracování

Jedná se o grampozitivní lidský patogen způsobující množství infekcí. Tento kok je kataláza negativní a roste jako diplokok lancetovitého tvaru (viz **Obrázek 1**). Může vytvářet pouzdro, které obklopuje celou dvojici. Dvojice pak mohou tvořit krátké řetízky. *Streptococcus pneumoniae* je alfa-hemolytický streptokok (Ruoff et al., 1999).

Z hlediska růstu jde o bakterii poměrně náročnou. Ideální podmínky růstu jsou při teplotě 37 °C a pH kolem 7. V laboratorních podmínkách se kultivuje na krevním agaru. Průmyslově se kultivuje na kyselém hydrolyzovaném kaseinu v kombinaci s vitamínovým extraktem z kvasnic.

Ve vztahu ke kyslíku jde o aerotolerantní anaerobní bakterii. Roste rychleji v prostředí se zvýšeným obsahem oxidu uhličitého. Ještě rychlejšího růstu je možné dosáhnout v atmosféře tvořené dusíkem (Gonçalves et al., 2002).

S. pneumoniae je bakterie nepohybující se a nesporulující. Při kultivaci na krevním agaru vykazuje alfa-hemolytickou aktivitu, jenž se projevuje produkcí peroxidu vodíku, což způsobuje přeměnu hemoglobinu na verdoglobín. V okolí kolonií se to projeví jako nazelenalé zbarvení tzv. viridace.

Podle vzhledu se kolonie bakterií dělí na tři formy R, S a M. R-formu tvoří kmeny bakterie, které nemají pouzdro. Jejich kolonie jsou na pohled drsné. Kmeny, které si tvoří

pouzdro, rostou v podobě hladkých kolonií označovaných jako S-forma. Některé kmeny, označované jako M-forma, tvoří velké množství pouzdrné substance. Jejich kolonie jsou proto hlenovité (Ruoff et al., 1999).

4.1.2 Historie, objevení

Streptococcus pneumoniae byl poprvé zkoumán jako původce zápalu plic a byl poprvé popsán ke konci 19. století. Nezávisle na sobě ho objevili Američan George Sternberg a Francouz Louis Pasteur. Bakterie byla dříve pojmenována jako *Diplococcus pneumoniae* (López, 2004). Svoje současné jméno získal *Streptococcus pneumoniae* v roce 1974 pro tvorbu řetízků v tekutém médiu (Deibel et al., 1974).

4.1.3 Patogenita

Bakterie *Streptococcus pneumoniae* se v přírodě hojně vyskytuje a kolonizuje určitou část populace, zejména děti. Pokud dojde k oslabení imunity, tak kolonizující kmen, nebo nový kmen zvenčí, může způsobit celou řadu infekčních onemocnění. Kmeny, které tvoří pouzdro jsou mnohem nebezpečnější, protože pouzdro brání účinné fagocytóze. Imunitní systém člověka nejčastěji reaguje na pouzdrný polysacharid. Izoláty *S. pneumoniae* se liší svými polysacharidovými pouzdry, kterých bylo identifikováno více než 90 druhů a jejich existence má zásadní vliv na závažnost způsobeného onemocnění. *S. pneumoniae* má širokou škálu substrátových transportérů. Jeho kazetové transportéry do buňky transportují uhlík a aminokyseliny a naopak čerpají adhesin, rozkladné enzymy a součásti pouzdra směrem ven z buňky. Transport adhesinu ovlivňuje virulenci *S. pneumoniae*, tím, že umožňuje přichycení bakterie k buňce hostitele. Transportéry jsou také zodpovědné za schopnost přirozené kompetence, tedy přijetí cizorodé DNA z prostředí, čímž může dojít ke změně formy bakterie z nevirulentní na virulentní (Poll van der et al., 2009).

Mezi kmeny *S. pneumoniae* se známou sekvencí DNA patří například R6 kmen, z kterého byl odstraněn úsek 7,5 kpb kódující polysacharidové pouzdro. Tento kmen je vlivem nedostatku polysacharidů v pouzdře nevirulentní a je proto celosvětově používán jako laboratorní kmen (Hoskins et al., 2001). *S. pneumoniae* obsahuje cirkulární nukleoid o velikosti 2,0 - 2,1 Mpb a je bohatý na AT páry, obsahuje jen 40 % GC párů. R6 kmen zahrnuje také čtyři popsané geny, kódující virulentní proteiny. Tyto proteiny (PspA, PsaA, CbpA a pneumolyzin) jsou studovány v souvislosti vývoje vakcíny (Hoskins et al., 2001). Dále byly objeveny virulentní proteiny BVH-3, PppA, PpmA, IgA1, SlrA (Bootsma et al., 2017).

Infekce většinou začíná v nosohltanu a hltanu a odtud se dostává na další místa v organismu. V plicích způsobuje zápal plic (pneumonia), ve vedlejších dutinách nosních způsobuje jejich zánět (sinusitida). Také způsobuje zánět středního ucha a zánět mozkových blan. Kromě lokalizovaných infekcí se *Streptococcus pneumoniae* dokáže množit i v krevním řečišti. Tady se živí krevním cukrem a produkuje kyselinu mléčnou, čímž způsobuje rozvrat metabolismu a následně i otravu krve a další komplikace (Ruoff et al., 1999).

4.2 Genom *S. pneumoniae*

Genom *Streptococcus pneumoniae* tvoří 2 až 2,1 miliony pb uspořádaných do kruhové molekuly DNA. Kromě toho jeho genetická informace často obsahuje několik menších plazmidů bez známé funkce. Genom kóduje 1553 genů, které jsou klíčové pro přežití bakterie. Dalších 154 genů přispívá k patogennímu chování. Jiných 176 genů je zodpovědných za neinvazivní chování. Geny zodpovědné za virulenci jsou lokalizovány v třinácti malých ostrůvcích diverzity. Tyto ostrůvky odlišují virulentní a nevirulentní kmeny (Hoskins et al., 2001).

Genom se u různých kmenů liší až o 10 % a obsahuje až 5 % inzerčních sekvencí, které nesou faktory virulence a rezistence na antibiotika. Značná část genofondu kóduje syntézu pouzderného polysacharidu, který je pro bakterii důležitý jako hlavní faktor její virulence (Tettelin et al., 2001).

4.2.1 Genetická kompetence *S. pneumoniae*

Důležitý fakt *S. pneumoniae* je, že jde o bakterii schopnou přijmout cizorodou DNA z okolí. Transformace DNA je jedním ze způsobů horizontálního přenosu genetické informace, která byla objevena v roce 1928 Fredericem Griffithem. V experimentu byly použity dvě formy *S. pneumoniae* R a S. Infekce S-formou měla letální efekt, zatímco infekce R-formou nikoliv. Pokud ale byla k R-formě přidána mrtvá populace S-formy, byla i R-forma letální. Tento experiment vedl k objevení přirozené transformace. Tento mechanismus příjmu DNA může vést k významným změnám genetického pozadí bakterie a vzniku nových bakteriálních subpopulací, což rychle zvyšuje odolnost proti antibiotikům (Yu et al., 2017). O tom, jestli během exponenciální fáze růstu bude kompetence umožněna, rozhoduje okolní teplota, pH, koncentrace kyslíku, koncentrace manganatých a vápenatých iontů a koncentrace fosfátu (Claverys a Håvarstein, 2002). Regulace je pak závislá na mechanismu *quorum sensing* a jako signální molekula funguje feromon CSP (competence stimulating peptid), jehož koncentrace je

závislá na počtu buněk. Prostřednictvím CSP buňka monitoruje buněčnou denzitu ve svém okolí (Claverys a Havarstein, 2002). Prekurzor alarmonu CSP je produktem genu *comC*, jenž je součástí lokusu *comCDE* (Havarstein et al., 1995; Cheng et al., 1997) a z buňky je sekretován pomocí ABC transportního mechanismu ComAB. Po dosažení prahové koncentrace CSP v okolí buňky, dochází k aktivaci dvousložkového systému ComDE. Složka ComD představuje His kinázu, která se po navázání signálu autofosforyluje a následně fosforyluje transkripční regulátor ComE (Pestova *et al.*, 1996), který zastává funkci transkripčního aktivátoru časných genů kompetence: *comAB*, *comCDE*, *comX* a *comM*. Pozdní geny kompetence, ke kterým řadíme geny pro příjem DNA, geny lytické fáze a geny pro homologní rekombinaci, jsou pak regulovány alternativním sigma faktorem ComX (Shanker a Federle, 2017). Buňky, které nejsou ve stavu kompetence, lyzují účinkem mureinové hydrolázy CbpD, která je kódována pozdními geny kompetence. Naproti tomu kompetentní buňky jsou proti lýze chráněny proteinem ComM, jehož nízké hladiny exprese činí pneumokoky imunní vůči CbpD, zatímco buňky exprimují. Vyšší koncentrace proteinu ComM jsou pro buňky toxické a dochází ke snížení rychlosti růstu a morfologickým změnám (Straume et al., 2017).

Expese operonu *comCDE* a následná schopnost transformace u bakterií byla zkoumána měřeními buněčných hladin transkriptů *comCDE* a transformantů v kulturách. Výsledky ukazovaly centrální a pozitivní kontrolu exprese ComCDE pomocí StkP. K rozvoji kompetence dochází při exponenciálním růstu v alkalickém prostředí za přítomnosti StkP, aby se zabránilo bakteriální autolýze. Nedostatek StkP dramaticky snižuje virulenci. Je tedy možné, že ochrana proti autolýze je příčinou pozitivní úlohy StkP v bakteriální virulenci (Berry et al., 1989).

Dvoukomponentový systém CiaRH, který je složen ze sensorové His kinázy CiaH a transkripčního regulátoru CiaR, reguluje negativně kompetenci. Pokud je TCS CiaRH aktivovaný, zabraňuje expresi genů *comCDE* a kompetence nenastává (Echenique et al., 2000; Guenzi et al., 1994).

4.3 Přenos signálu u bakterií – fosforylace

Fosforylace a defosforylace proteinů je jedním z nejdůležitějších mechanismů regulace buněčných procesů, které odpovídají na změny v okolním prostředí a je využíván buňkami ve všech živých organismech. Fosforylace je jednou z kovalentních posttranslačních modifikací proteinů. Je katalyzována proteinkinázami a dochází při ní k reverzibilnímu přenosu γ -

fosfátové skupiny z ATP na hydroxyskupinu aminokyseliny určitého substrátového proteinu za katalýzy enzymu proteinkinázy a vzniku ADP. Vhodné části aminokyselin k fosforylaci jsou hydroxylové skupiny serinu, threoninu a thyrosinu, imizadolový kruh histidinu a karboxylová skupina asparaginu. Navázání fosfátové skupiny na molekulu substrátu má velkou šanci změnit biochemické vlastnosti a strukturu proteinu, protože fosfátová skupina vytváří solné můstky a vodíkové vazby. Proto je fosforylace dobrým způsobem regulace funkce proteinů (Johnson et al., 1993). Protože jde o vratný proces, opakem fosforylace je defosforylace, který je katalyzován proteinfosfatázami. Při defosforylaci dojde k odštěpení fosfátu a protein je zpět v původním stavu.

U bakterie *S. pneumoniae* je přenos signálu fosforylací zajištěn hlavně dvěma systémy: dvoukomponentový systémy (TCSs) a bakteriální Ser/Thr proteinkinázou eukaryotického typu (eSTKs).

4.3.1 Dvoukomponentové systémy

Dvoukomponentové systémy signální transdukce (TCSs), jsou jedním mechanismem, který bakterie využívají k tomu, aby reagovaly na své prostředí (kontrolují genovou expresi a adaptivní buněčnou odpověď). Tyto systémy jsou pravděpodobně nejrozšířenějšími prostředky regulace vnitřních procesů v bakteriích, včetně osmoregulace, fotosyntézy, chemotaxe, sporulace, tvorby antibiotik a patogenity u řady různých bakterií. Dvousložkový systém je tvořen dvěma částmi: transmembránovou senzorem kinázou a cytoplazmatickým transkripčním regulátorem (Parkinson et al., 1992).

Streptococcus pneumoniae má 13 dvoukomponentových systémů složených z transmembránových sensorových kináz a cytoplasmatických transkripčních regulátorů. Sensorová kináza reaguje na environmentální změny autofosforylací na histidinovém zbytku. Dalším krokem je přenesení fosfátové skupiny na aspartátový zbytek příslušného regulátorového proteinu, který tak podstoupí konformační změnu a jako transkripční regulátor ovlivní odpověď buňky (Stock et al., 2000). Kromě těchto kompletních dvoukomponentových systémů má *S. pneumoniae* také jeden samostatný transkripční regulátor, ke kterému není přítomna příslušná kináza. Bakteriální regulátory odezvy lze klasifikovat podle jejich domény. Třetina proteinových regulátorů patří do skupiny OmpR. Tato skupina je charakterizována doménou okřídlených šroubovitých helixů (winged-helix-turn-helix), kterými se váže na tandemové repetice ve své cílové DNA. Druhou největší skupinou transkripčních regulátorů dvoukomponentového systému je skupina NarL. Pro tuto skupinu je

charakteristická doména s jednoduchou výstupní strukturou helix-turn-helix. Další skupinu YesN charakterizuje DNA vazebná doména, kterou tvoří dva oddělené helixy. Poslední skupinou je skupina LytR. Tato skupina obsahuje neobvyklou DNA vazající doménou bez helix-turn-helix vzoru známou jako LytTR (Nikolskaya et al., 2002; Gómez-Mejía et al., 2018).

4.3.2 *Ser/Thr* proteinkinázy eukaryotického typu (*eSTKs*)

Tyto bakteriální proteinkinázy jsou strukturou i funkcí velmi podobné proteinkinázám v eukaryotických buňkách. Proteinkinázy se liší mimo jiné tím, kterou aminokyselinu v proteinu fosforylují. Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu fosforylují svoje substráty na hydroxylových skupinách serinu, threoninu a vyjíměčně i thyrosinu. Katalytická doména je složena z 250-300 aminokyselinových zbytků uspořádaných do 12 konzervovaných subdomén oddělených méně konzervovanými oblastmi (Hanks et al., 1995; Pereira et al., 2011).

Proteinkinázy *Streptococcus pneumoniae* jsou převážně histidinové kinázy tvořící dvousložkový systém (viz výše). Kromě nich je ale přítomná v genomu i jediná Ser/Thr kináza eukaryotického typu. Tato kináza se jmenuje StkP a je kódována Ser/Thr proteinkinázovým genem *stkP*. *S. pneumoniae* s jedním párem genů kódujících proteinkinázu StkP a příslušnou fosfatázu PhpP poskytuje dobrý model pro studium serin/threoinové fosforylace eukaryotického typu u prokaryot. StkP je transmembránový protein. Její vnější senzorkou část tvoří série čtyř PASTA domén (Penicillin-binding protein And Serine/Threonine kinase Associated), které jsou nezbytné pro fosforylační aktivitu proteinkinázy StkP (Nováková et al., 2010). PASTA domény reagují na nezesíťovaný syntetický i nativní peptidoglykan, ale i β -laktamová antibiotika (Beilharz et al., 2012; Maestro et al., 2011; Mir et al., 2011). Cytoplasmatická část je tvořena kinázovou doménou. StkP reguluje expresi genů, virulenci, kompetenci, odolnost vůči nepříznivým podmínkám, syntézu buněčné stěny, syntézu pyrimidinu a koordinuje buněčné dělení jako celek (Nováková et al., 2010). StkP není pro životaschopnost bakterie esenciální, avšak morfologie buněk je odlišná od WT *S. pneumoniae*. Buňky jsou protáhlé a hůře se dělí (Nováková et al., 2005). Navíc bylo zjištěno, že Δ *stkP* mutantní kmen *S. pneumoniae* nedokáže úspěšně infikovat plíce ani krev myši (Throup et al., 2000).

4.3.3 Substráty proteinkinázy StkP u *Streptococcus pneumoniae*

Proteinkináza StkP má, podle posledních studií, u *Streptococcus pneumoniae* okolo 12 známých substrátů. Přičemž díky úsilí vědecké komunity jsou stále nacházeny nové substráty. Větší počet substrátů značí, že StkP se podílí na regulaci buněčných procesů na několika úrovních. Jejich funkce pak naznačuje, že StkP slouží k celkové koordinaci procesu buněčného dělení u *S. pneumoniae*. Mezi substráty StkP řadíme především proteiny buněčného dělení DivIVA, LocZ/MapZ (Nováková et al., 2010), FtsZ (Giefing et al., 2010), FtsA (Beilharz et al., 2012), Jag/EloR/KhpB (Ulrych et al., 2016, Stamsås et al., 2017, Sauerbier 2012, Zheng et. al., 2017); proteiny syntézy peptidoglykanu MurC (Falk a Weisblum, 2013), MacP (Fenton et al., 2018) a GlmM (Nováková et al., 2005); dva transkripční regulátory RitR (Ulijasz et al., 2009) a RR06 (Agarwal et al., 2012) a anorganickou fosfatázu PapC (Nováková et al., 2010) a regulátor časných genů kompetence ComE. Kromě substrátů proteinkinázy StkP, které jsou touto kinázou fosforylovány, lze zde uvést rovněž WalRK systém, kde je substrátem kinázy StkP kináza WalK. Přenos signálu zde není zprostředkován fosforylací, ale vzájemnou přímou protein-proteinovou interakcí StkP a WalK. V následujících odstavcích jsou popsány jednotlivé substráty StkP u *S. pneumoniae*.

V práci Nováková et al. (2010) byla u *Streptococcus pneumoniae* jako substrát kinázy StkP identifikována *in vivo* anorganická a na manganu závislá pyrofosfatáza **PpaC** (Nováková et al., 2010). Na rozdíl od *S. agalactiae*, kde je rozpustný enzym PpaC nejvíce prozkoumán a kde se podílí na schopnosti virulence (Rajagopal et al., 2003), se fosforylací *in vitro* u *S. pneumoniae* prokázat nepodařilo. S proteinem PpaC *S. pneumoniae* vykazuje 85 % sekvenční shodu. Pyrofosfatázy jsou esenciální enzymy nutné pro hydrolýzu anorganických pyrofosfátů, které vznikají při hydrolýze ATP, metabolismu sacharidů, biosyntéze nukleotidů a biosyntéze aminokyselin (Nováková et al., 2010).

Jedním z proteinů buněčného dělení, který je substrátem proteinkinázy StkP *in vivo* i v *in vitro* podmínkách je protein **DivIVA** (Nováková et al., 2010). DivIVA je protein zodpovědný za správnou separaci dělicích se buněk (Higgins et al., 1970), oddělení chromozomů, maturaci buněčných pólů (Higgins et al., 1976) a za správnou morfologii buňky (Beilharz et al., 2012). Velmi podobné proteiny jsou běžné u grampozitivních bakterií. Funkce DivIVA byla podrobně zkoumána u *Bacillus subtilis*. Společně s MinC a MinD určuje střed buňky při dělení. Komplex MinC a MinD, MinCD je kontrolován DivIVA tak, aby zůstal na buněčných pólech a zabránil dělení buňky v těchto místech (Marston et al., 1999). U *S. pneumoniae* je DivIVA lokalizován v oblasti septa a na pólech buňky (Fadda et al.,

2007). Poškození genu *divIVA* u *S. pneumoniae* vede k poruše buněčného dělení, které má za následek tvorbu řetízků s pozměněnou morfologií a špatně vyvinutým dělicím septem. Takové buňky jsou často bez nukleoidu (Fadda et al., 2004). Ve studii Straume et al. (2017) bylo zjištěno, že DivIVA se podílí na správné lokalizaci elongazomu v negativně zakřivené oblasti membrány, do které se váže a která se nachází mezi laterální a septální částí buněčné stěny.

LocZ/MapZ je protein buněčného dělení, který interaguje s FtsZ, čímž dochází k lokalizaci FtsZ prstence a tím LocZ/MapZ určuje správný úhel dělicí roviny u *Streptococcus pneumoniae* (Raaphorst et al., 2017). Za lokalizaci LocZ/MapZ do buněčné přepážky je zodpovědná jeho C-koncová extracelulární doména, zatímco pro jeho funkci jsou nezbytné obě C- i N-koncové domény (Fleurie et al., 2014). LocZ/MapZ tvoří struktury tvaru prstence ve středu buňky a posouvá se tak, jak se buňka protahuje. Označuje tedy stále místo buněčného dělení. *Streptococcus pneumoniae* s odstraněným genem *locZ/mapZ* mají defektně umístěné dělicí septum a tvoří nepravidelné shluky částečně spojených bakterií s omezenou délkou života a pomalejším dělením. LocZ/MapZ je prokazatelně fosforylován kinázou StkP jak *in vitro*, tak *in vivo* (Nováková et al., 2010; Fleurie 2014; Holečková et al., 2015).

FtsZ je esenciální protein zodpovědný za tvorbu Z-prstence a označení místa dělení u bakterií a prokaryot obecně. U *Streptococcus pneumoniae* nebyla fosforylace FtsZ pomocí StkP prokázána *in vivo*, ale doposud pouze *in vitro* (Giefing et al., 2010) a její význam není dosud známý.

FtsA je esenciální protein podílející se na dělení buňky *Streptococcus pneumoniae*, ale i mnoha dalších bakterií. Hlavní funkcí FtsA je vazba Z-kruhu k cytoplasmatické membráně a jeho stabilizace. FtsA je časný protein buněčného dělení, který se po LocZ lokalizuje v místě dělení označeném Z-prstencem a je následován dalšími pozdními proteiny buněčného dělení, např. StkP a DivIVA (Beilharz et al., 2012). Podle Mura et al. (2017) se FtsA a FtsZ proteiny podílí na koordinaci periferní i septální syntézy PG a jsou závislé na lokalizaci ve středu buňky. Částečná deplece FtsA má za následek prodloužené buňky s více FtsZ prsteny, které nedokončí buněčné dělení. Úplné vyčerpání FtsA vedlo k delokalizaci FtsZ kruhů, citónovitému tvaru buněk a nakonec k lyzi buněk. Naopak nadprodukce FtsA stimuluje buněčné dělení. Fosforylace FtsA byla dosud prokázána jak *in vitro* (Beilharz et al., 2012), tak *in vivo* (Ulrych a Fabrik, nepublikované výsledky).

Jag/EloR/KhpB je substrát StkP, jehož funkce není u *Streptococcus pneumoniae* úplně

známá. Jag (Spr1851) má schopnost navázat se na RNA a jeho fosforylace a defosforylace ovlivňuje délku bakterie (Stamsås et al., 2017). Byl testován růst kmene, kde byl deletován gen kódující protein Jag. U tohoto delečního kmene docházelo k delší lag fázi a celkově pomalejšímu růstu kultury, než u divokého kmene *S. pneumoniae*. Kultura dosahovala nižších optických denzit a morfologie buněk byla také odlišná, oproti divokému kmeni byly buňky mutantního kmene kratší (Ulrych et al., 2016; Stamsås et al., 2017; Zheng et al., 2017). Lze tedy předpokládat, že jeho funkce souvisí s buněčným dělením nebo s tvorbou buněčné stěny a napomáhá zajistit správný tvar nových buněk (Stamsås et al., 2017). Pomocí koimunoprecipitace byl identifikován protein KhpA jako interakční partner proteinu Jag (Zheng et al., 2017). Odstranění proteinu KhpA vede obdobně jako odstranění proteinu Jag ke zkrácení buněk, zpomalení růstu a indukci exprese stresového regulátoru metabolismu syntézy buněčné stěny WalRK, přičemž proteiny KhpA a Jag v buňce kolokalizují v oblasti septa. Vzhledem k tomu, že tyto dva proteiny mají z velké míry shodné spektrum molekul RNA, na které se vážou pomocí RNA vazebných domén KH a R3H a také vzhledem k tomu, že byla prokázána jejich funkce v post-transkripční regulaci exprese proteinu buněčného dělení FtsA, byla navržena hypotéza, že KhpA/B pár funguje jako RNA chaperon (Zheng et al., 2017). Dále bylo zjištěno, že odstraněním proteinu Jag na pozadí divokého kmene R6 dochází k toleranci mutací v proteinech syntézy buněčné stěny PBP2b a RodA (Stamsås et al., 2017), které jsou v přítomnosti proteinu Jag letální, zatímco odstranění proteinu Jag na pozadí *D39* divokého kmene pneumokoka vede k toleranci kromě dvou zmíněných mutací v proteinech PBP2b a RodA, ještě k toleranci mutace u dalších nezbytných proteinů syntézy buněčné stěny – MreC, MreD, RodZ a GpsB (Zheng et al., 2017). Stamsås a spol. (2017) ve své práci navrhuje, že protein Jag funguje jako regulátor elongasomu.

RitR je transkripční regulátor dvoukomponentového systému, který ale postrádá odpovídající histidinovou senzorovou kinázu v genomu *Streptococcus pneumoniae*. Protein RitR reguluje transkripci genu kódujícího Piu transportér iontů železa do buňky. *In vitro* bylo prokázáno, že proteinkináza StkP fosforylací vyřazuje protein RitR z činnosti a tím zvyšuje import iontů železa do buňky (Ulijasz et al., 2009).

Druhým zástupcem transkripčních regulátorů dvoukomponentových systémů, který byl *in vivo* a *in vitro* prokázán jako substrát proteinkinázy StkP, je protein **CbpS/RR06** (Agarwal et al., 2012). Jedná se o protein, který řídí tvorbu povrchového adhezinu CbpA. Ten je zodpovědný za uchycení bakterie na epitelu hostitele, a tedy přispívá k virulenci *S. pneumoniae* (Herbert et al., 2015; Shaun et al., 2013).

MurC, UDP-N-acetylmuramoyl:L-alanin ligáza, je enzym podílející se na postupné syntéze pentapeptidu, který je prekurzorem pro peptidoglykan tvořící buněčnou stěnu. V *in vitro* uspořádání bylo prokázáno, že StkP společně s PhpP řídí fosforylaci a defosforylaci MurC u *Streptococcus pneumoniae* (Falk a Weisblum, 2013).

Dalším identifikovaným substrátem kinázy *StkP* je **MacP** regulátor aktivity penicilin vazebného proteinu PBP2a, který se podílí na syntéze buněčné stěny *Streptococcus pneumoniae*. Aktivace MacP fosforylací za pomoci StkP umožňuje aktivaci PBP2a a syntézu buněčné stěny (Fenton et al., 2018).

Doposud posledním identifikovaným substrátem kinázy *StkP* je **ComE**, který reaguje na globální změny pH. Lyze buněk *S. pneumoniae* vyvolaná kyselým stresem a intracelulární přežití buněk během patogeneze, je regulováno fosforylací ComE na threoninu v pozici 128. Fosforylace na threoninu 128 zvyšuje afinitu ComE k DNA. U mutanty *comET128A* byla odezva na kyselé prostředí blokována a reakce na kyselou toleranci byla vyšší ve srovnání s WT kmenem. Produkce H₂O₂ byla u mutanty nižší a pravděpodobně přispívala k vyššímu počtu přeživších u mutanty *comET128A* oproti WT *S. pneumoniae* (Piñas et al., 2018).

Jako jeden z prvních substrátů proteinkinázy StkP byl v *in vivo* experimentech identifikován protein **GlmM** (Nováková et al., 2005). Fosfoglukozaminmutáza GlmM je katalyzátor vzájemné přeměny izomerů glukozamin-6-fosfátu (GlcN-6-P) a glukozamin-1-fosfátu GlcN-1-P. Ty jsou základem pro biosyntézu N-acetylglukozamin, který je dále potřebný pro stavbu buněčné stěny. Proteinu GlmM a jeho funkci je věnována samostatná sekce (viz kapitola 4.5.).

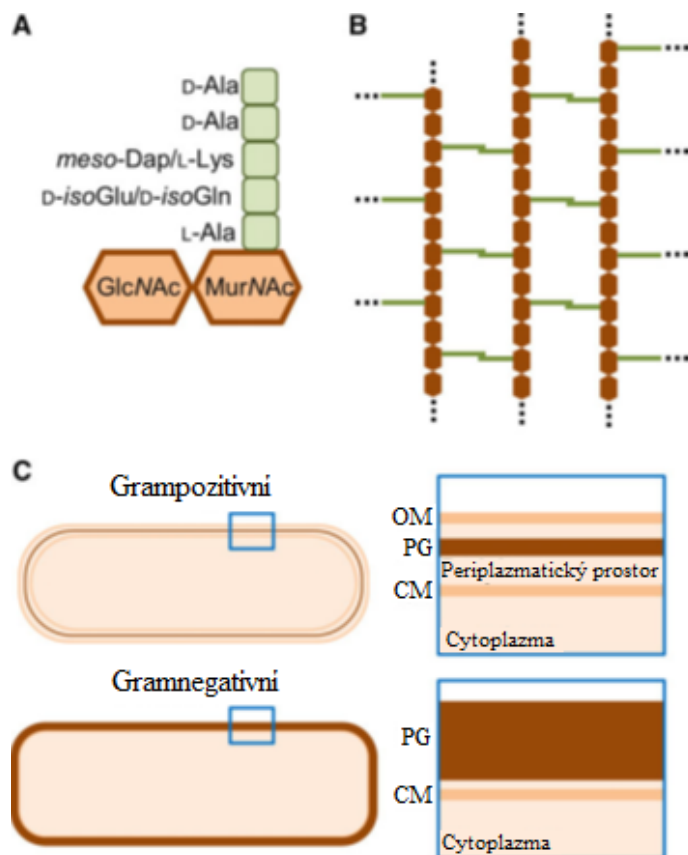
WalR je transkripční regulátor, který společně s **WalK** tvoří dvoukomponentový regulační systém. Ten je pravděpodobně zodpovědný za správné oddělení dceřiné buňky při buněčném dělení. Kináza podobná StkP fosforyluje ortholog WalR u *S. pyogenes* v *in vitro* (Agarwal et al., 2011) a u *Bacillus subtilis* v *in vivo* podmínkách (Libby et al., 2015). Přímá fosforylace transkripčního regulátoru WalR proteinkinázou StkP u *S. pneumoniae* nebyla dosud prokázána. Nicméně bylo zjištěno, že stimulační účinek StkP totiž nemusí záviset pouze na její kinázové aktivitě, ale v případě WalRK systému proteinkináza StkP moduluje aktivitu kinázy WalK prostřednictvím přímé protein-proteinové interakce, čímž se podílí nepřímo na fosforylaci transkripčního regulátoru WalR, který je substrátem WalK. Za účelem zjištění aktivity StkP byl vytvořen mutantní kmen s inaktivovanou kinázovou doménou proteinu StkP, který nebyl schopen fosforylace. Aktivita StkP u tohoto kmene byla nižší než u divokého

typu, ale mnohem vyšší než bylo pozorováno u kmene $\Delta stkP$ (Stamsås et al., 2017; Dubrac et al., 2008).

4.4 Buněčná stěna bakterií

Během svého růstu a dělení musí buňky regulovat syntézu peptidoglykanu, který je nezbytnou kontinuální síťovou vrstvou obklopující každou buňku. Buněčná stěna udržuje tvar buněk a je potřebná pro mechanickou ochranu buňky a osmotickou stabilitu. Peptidoglykan je tvořen polysacharidovými řetězci, ve kterých se střídá motiv N-acetylglukozaminu (NAG) a N-acetylmuramové kyseliny (NAM), jež jsou propojené β -(1,4)-glykosidickou vazbou. Propojení či zesíťování jednotlivých polysacharidových řetězců je zajištěno krátkými pentapeptidy obsahujícími L- i D-aminokyseliny, které vycházejí z NAM. Na tvorbě trojrozměrné struktury se podílejí teichoové kyseliny, které jednotlivé peptidoglykanové vazby trojrozměrně propojují (Siegel et al., 2016). Bakterie lze podle typu buněčné stěny rozdělit na dvě skupiny – grampozitivní a gramnegativní (Egan et al., 2017). Oba typy

buněčné stěny jsou schématicky znázorněny na **Obrázku 2**.



Obrázek 2
Peptidoglykan v buněčné stěně

Převzato Egan et al., 2017.

A
Základní podjednotka peptidoglykanu (PG), která je složena z N-acetylglukozaminu (GlcNAc) a N-acetylmuramové kyseliny (MurNAc) s navázaným pentapeptidem složeným z L- i D- aminokyselin.

B
Zjednodušená reprezentace struktury peptidoglykanu tvořené polymerizovanými glykanovými a peptidovými vlákny.

C
Zjednodušený pohled na buněčnou stěnu gramnegativní a grampozitivní bakterie. V modrém rámečku vpravo je zvětšený úsek vyznačený na celé buňce vlevo. Je zde vyznačena vnější membrána (OM), peptidoglykan (PG) a cytoplazma (CM) (Egan et al., 2017).

Buněčná stěna gramnegativních bakterií, jako je např. *E. coli*, se od grampozitivního typu výrazně liší především přítomností vnější membrány, která je tvořena fosfolipidovou dvouvrstvou. V této dvouvrstvě se nacházejí lipopolysacharidy a lipooligosacharidy, které plní úlohu endotoxinu. Vnější membrána také obsahuje transmembránové proteiny poriny, které zprostředkovávají pasivní transport nízkomolekulárních látek do bakterie. Mezi cytoplazmou (CM) a vnější membránou (OM) je vrstva peptidoglykanu (PG) o tloušťce 3-6 nm, která se nachází v periplazmatickém prostoru. Oproti tomu buněčná stěna grampozitivních bakterií, mezi které řadíme i *S. pneumoniae*, je výrazně silnější, činí 10-40 nm, a obsahuje sekundární polymery, jako např. teichoové a lipoteichoové kyseliny či povrchové polysacharidy. Vnitřní prostředí bakterie je odděleno cytoplazmatickou membránou, která se z druhé strany dotýká periplazmatického prostoru (Egan et al., 2017; Turner et al., 2014; Vollmer et al., 2010).

Buněčná stěna grampozitivních a gramnegativních bakterií se liší také sekvencí pentapeptidového můstku, který zajišťuje zesíťování peptidoglykanu. U grampozitivních bakterií je pentapeptid vycházející z NAM tvořen sekvencí NAM-O-(L-Ala)-(D-Glu)-(L-Lys)-(D-Ala)-(D-Ala)-OH, zatímco u gramnegativních bakterií se vyskytuje pentapeptid se sekvencí NAM-O-(L-Ala)-(D-Glu)-(DAP)-(D-Ala)-(D-Ala)-OH, kde DAP je kyselina mesodiaminopimelová. Na aminoskupinu kyseliny mesodiaminopimelové se váže C-konec lysinu Braunova lipoproteinu (Egan et al., 2017; Braun 1975; Schleifer 1972).

4.4.1 Syntéza peptidoglykanu

Růst peptidoglykanu je dynamický proces, který je řízen enzymy. Je nutné nově syntetizovaný peptidoglykan připojit k již existující vrstvě a umožnit vkládání nově syntetizovaného materiálu. Biosyntéza peptidoglykanu probíhá ve třech fázích probíhajících v cytoplasmatické membráně, na buněčné membráně a mimo buňku (Ghuysen et al., 1973).

První fáze probíhá v cytoplazmě bakteriální buňky a konečnými produkty jsou prekurzory UDP-N-acetylglukozamin a pentapeptid kyseliny UDP-N-acetylmuramové (**Obrázek 3**). Nejdříve se syntetizuje glukozamin-6-fosfát z fruktoza-6-fosfátu a glutaminu, který slouží jako donor aminoskupiny a mění se na glutamát. Tato reakce je katalyzována enzymem glutamin-fruktoza-6-fosfát amidotransferázou GlmS (Badet et al., 1987). Interkonverzi glukozamin-6-fosfátu na glukozamin-1-fosfát zajišťuje enzym GlmM (Mengin-Lecreulx a van Heijnoort, 1996), který nebyl u *S. pneumoniae* dosud blíže charakterizován. Další dva kroky syntézy PG jsou katalyzovány bifunkčním enzymem N-acetylglukozamin-1-fosfát

uridyltransferázou (GlmU), který má acetyltransferázovou uridyltransferázovou aktivitou. Nejprve dochází k acylaci vzniklého glukozamin-1-fosfátu na N-acetylglukozamin-1-fosfát působením acetylkoenzymu A následně pak k uridyltransferázové reakci, kdy N-acetylglukozamin-1-fosfát atakuje uridin-trifosfát a dochází tak k eliminaci jedné fosfátové skupiny z N-acetylglukozamin-1-fosfátu a jedné z uridin-trifosfátu. Tyto dvě fosfátové skupiny se uvolní jako difosfát a vznikne UDP-N-acetylglukózamin (Mengin-Lecreux a van Heijenoort, 1993, 1994). V bakteriální cytoplazmě Mur ligázy provádějí postupné přidávání aminokyselin k UDP-N-acetylmuramové kyselině, čímž se vytváří kmenový peptid. Mur ligázy vyžadují aktivitu ATP a jsou naprosto nezbytné pro přežití bakterií. Následuje reakce s fosfoenolpyruvát, katalyzována UDP-N-acetylglukozamin-3-enolpyruvyltransferasou (MurA), při které se z fosfoenolpyruvátu odštěpí fosfátová skupina a enzym MurA katalyzuje přenos enolpyruvátu na hydroxylovanou skupinu 1-uridin-difosfát-N-acetylglukozaminu za vzniku 1-uridin-difosfát-N-acetylglukozamin-enolpyruvátu (Baum et al., 2001). MurB dokončí tvorbu kyseliny muramové redukcí enolpyruvylové skupiny na laktylether za použití jednoho ekvivalentu redukovaného nikotinamidadeninukleotid fosfátu (NADPH). Redukovaný produkt, UDP-MurNAc, pak může sloužit jako místo navázání peptidové části buněčné stěny. Výsledný pentapeptid následně umožňuje zesílení, které dává buněčné stěně tuhost (Benson et al., 1996). Ligáza MurC katalyzuje reakci, při níž se na UDP-N-acetylmuramovou kyselinu naváže aminokyselinový zbytek L-alanin. Bylo zjištěno, že fosforylace enzymu MurC je závislá na proteinkináze StkP *in vitro* (Falk et al., 2013). Dále ligáza MurD katalyzuje přidání kyseliny D-glutamové k UDP-N-acetylmuramové kyselině. Téměř pro všechny bakteriální druhy k tomuto spojení poslouží dipeptidová vazba L-Ala-D-Glu (Šink et al., 2016). Přeměna UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu je katalyzována enzymem MurE, který fosforyluje glutamátový γ -karboxylát a atakuje (S)-aminoskupiny *meso*-diaminopimelovou kyselinou za vzniku tetraedrického meziprojektu. Následuje ztráta fosfátu a ke vzniklému UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap (Binqi et al., 1998) je ligázou MurF, připojen D-Ala-D-Ala (Hrast et al., 2013), který vzniká působením DdlA ligázy (Zawadzke et al., 1991). Posledním krokem v této části syntézy peptidoglykanu je enzym MurI, který má glutamátovou racemickou aktivitu (Doublet et al., 1993).

Mur ligázy provádějí postupné přidávání aminokyselin k UDP-N-acetylmuramové kyselině, (UDP-MurNAc) čímž se vytváří kmenový peptid. Mur ligázy vyžadují aktivitu ATP a jsou naprosto nezbytné pro přežití bakterií. Mechanismus účinku Mur ligáz (MurC, D, E, F) byl studován pomocí kinetických experimentů, místně řízené mutageneze a rentgenové

krystalografie. Tyto studie ukázaly, že Mur ligázy sdílejí stejný mechanismus reakce, který spočívá nejprve v aktivaci karboxylové skupiny prekurzoru nukleotidů ATP, přičemž vzniká meziprodukt acylfosfátu a ADP; acylfosfát pak podléhá nukleofilnímu napadení aminoskupinou kondenzující aminokyseliny (nebo dipeptidu), což vede k tvorbě vysokoenergetického tetraedrického meziproduktu, který se nakonec štěpí na amid nebo peptid a fosfát (Smith et al., 2006).

V dalším kroku je kyselina muramová přenesena pomocí enzymu MraY na undekaprenyl-fosfát, vázaný v membráně, za vzniku lipidu I. Ten je dále glykosylován UDP-N-acetylglukózaminem (enzym MurG) na lipid II.

Druhá fáze biosyntézy peptidoglykanu probíhá na membráně buňky. V této fázi dochází k transportu prekurzorů UDP-N-acetylmuramové kyseliny a N-acetylglukozaminu přes cytoplazmatickou membránu. K přenosu přes hydrofobní membránu je zapotřebí speciální lipofilní sloučeniny, která poslouží jako transportér. U bakterií jde o alkohol undekaprenol (C-isoprenol), který je vnořen do membrány a esterifikován na undekaprenyl fosfát (C₅₅-P), který se použije jako glykano-lipidový nosič. Délka uhlíkatého řetězce-55 vzniká u bakterií kondenzací jedenácti izoprenových jednotek. C₅₅-P pochází z defosforylace jeho prekurzorového undekaprenyl-difosfátu účinkem enzymu undekaprenyl-pyrofosfát fosfatázy UppP, který sám vzniká syntézou de novo nebo recyklací po konečném přenosu glykanu. Undekaprenyl-difosfát je de novo syntetizován cytosolickou cis-prenyltransferázovou undekaprenyl-difosfátsyntázou UppS (Manat et al., 2014).

Glykan (MurNAc-(pentapeptide)-GlcNAc) je navázán na lipidový nosič (C₅₅-P) na vnitřní straně membrány a je translokován směrem k periplazmě, kde je glukonová skupina přenesena do rostoucího polymeru peptidoglykanu. Počáteční krok přenosu glykanu tedy nastává na cytoplazmatické straně membrány (Manat et al., 2014).

Enzymy MurM a MurN, které konstruují dipeptidové větvení, přidávají první aminokyseliny k lyzinu kyseliny muramové. Tyto enzymy nejsou nezbytné, ale jejich absence výrazně snižuje odolnost mikroorganismu proti antibiotikům (Lloyd et al., 2008; Sergio et al., 2000).

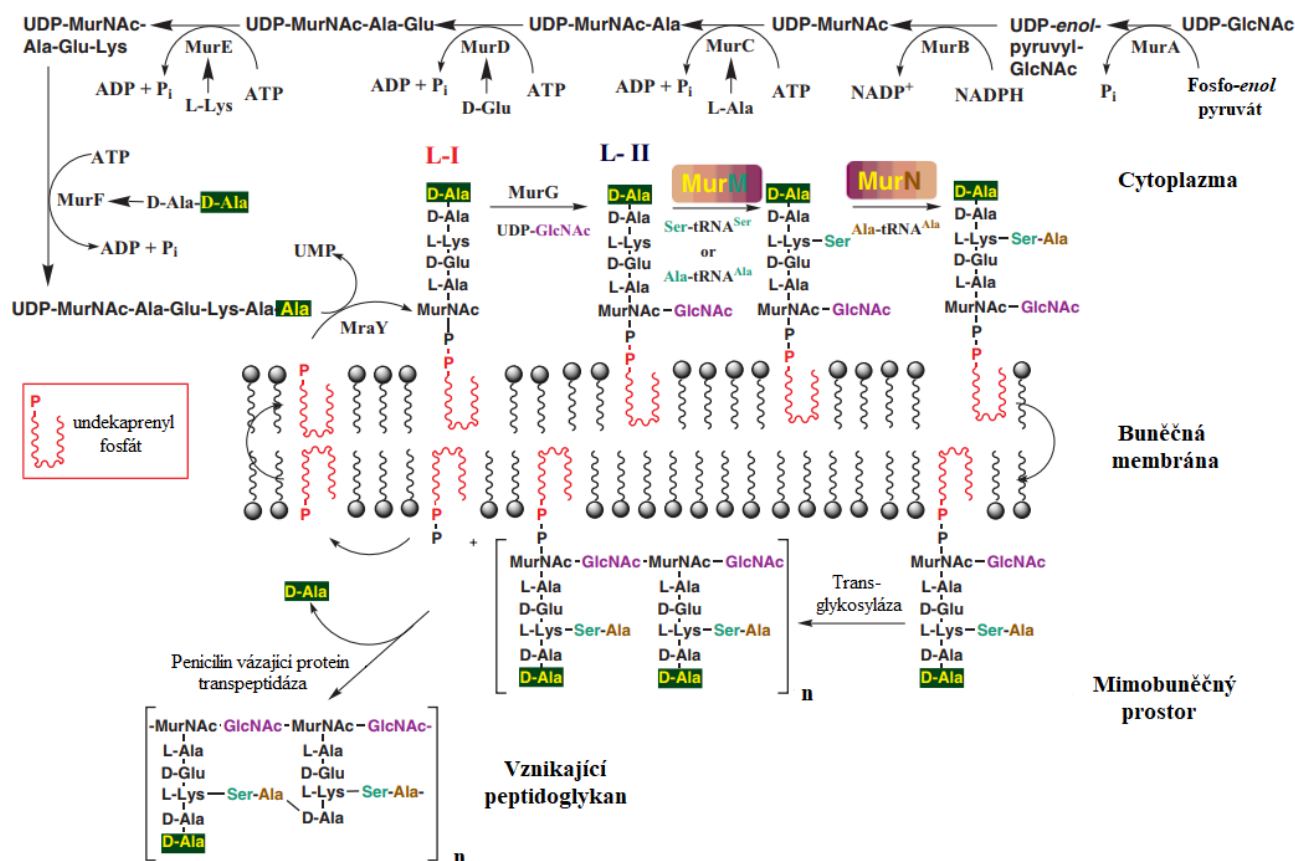
Jak již bylo zmíněno, tak po vytvoření lipidu I navázáním muramové kyseliny na undekaprenyl-fosfát a jeho následné glykosylaci vzniká lipid II. Lipid II je pomocí flipázy FtsW, RodA nebo MurJ a translokován přes cytoplazmatickou membránu. Deplece flipázy MurJ má za následek snížení syntézy PG a akumulaci jeho prekurzorů, dále pak morfologické

defekty a předčasnou lyzi buněk (Inoue et al., 2008). Pro bakterii *E. coli*, kde byl protein MurJ identifikován, je tato flipáza esenciální (Ruiz, 2008). Po transportu na vnější stranu cytoplazmatické membrány je lipid II polymerován glukosyltransferázou a transpeptidázou (PBP). Předpokládá se tedy, že potenciální transportéry lipidu II (FtsW a RodA) pracují navíc společně s proteiny PBP3 s PBP1b vázajícími se na penicilin (Mohammadi et al., 2011, Inoue et al., 2008). Protein FtsW se lokalizuje do oblasti septa v pozdních fázích tvorby buněčné přepážky a umožňuje navázání proteinu PBP3 (FtsI) (Mercer et al., 2002). Dále protein FtsW interaguje s proteinem PBP2x (Noirclerc-Savoie et al., 2013). Protein RodA umožňuje v *S. pneumoniae* správnou funkci transpeptidázy PBP2b. Deplece jednoho nebo druhého proteinu má za následek morfologické defekty buněk (ztráta sférického tvaru, buňky tvoří dlouhé řetízky). Dalšími následky deplece proteinů RodA nebo PBP2b je vyšší citlivost k hydroláze CbpD a zvýšený obsah větvených peptidů (Straume et al., 2017).

Třetí fáze se nazývá extracelulární, N-acetylmuramová kyselina a N-acetylglukozamin je začleněn do již existujícího peptidoglykanu. V této fázi se z lipidu II uvolňují glykanové řetězce a jsou postupně vkládány do již existujícího peptidoglykanu, který je za tímto účelem rozpojen působením autolysinů (Typas et al., 2012; Ghuysen et al., 1973). Průměrná délka glykanových řetězců hraje důležitou roli v morfogenezi bakterií. Vnitřní membránový enzym MltG s endolytickou transglykosylátovou aktivitou uvolňuje nově syntetizované glykanové řetězce během periferní syntézy peptidoglykanu (Tsui et al., 2016; Jacq et al., 2018). Mutanty postrádající MltG mají v peptidoglykanu delší glykany vzhledem k buňkám divokého typu (Yunck et al., 2015). Již ukotvené glykanové řetězce tvořící peptidoglykan jsou dále propojovány. Tento jev se nazývá transpeptidace. Jedná se o krátké peptidové spojky mezi zbytky muramové kyseliny v sousedních glykanových řetězcích. Tyto spojky tvoří společně s vlákny peptidoglykanu dvou dimenzionální síť. Ta je dále propojena ve třetí dimenzi teichoovou kyselinou, takže vzniká trojrozměrná provázaná struktura. Varianta teichoové kyseliny, kyselina lipoteichoová dále spojuje již prostorově propojenou vrstvu peptidoglykanu s cytoplazmatickou membránou, čím tvoří odolnou a ochrannou vrstvu na povrchu buňky (Ghuysen et al., 1973). Sled reakcí, které vedou k syntéze peptidoglykanu je znázorněn na **Obrázku 3**. Proteiny podílející se na syntéze peptidoglykanu *S. pneumoniae* jsou shrnuty v **Tabulce 1**. V buněčném dělení hrají důležitou roli také hydrolázy. Kromě již zmíněného proteinu MltG, D,D-karboxypeptidáza PBP3 (DacA) řídí zesílení peptidoglykanu odstraněním terminálního D-alaninu z pentapeptidových postranních řetězců (Morlot et al., 2004; Nemmara et al., 2011). L,D-karboxypeptidáza (DacB), která štěpí příčné vazby

v tetrapeptidovém příčném řetězci, který je produkován enzymem PBP3 a přeměňuje ho na tripeptid (Barendt et al., 2011). Pro správné místo dělení a lokalizaci LocZ/MapZ je také důležitý lysozym Pmp23 (Jacq et al., 2018). Pro rozdělení mateřské buňky na dceřinné je zapotřebí štěpení peptidové vazby endopeptidázou PcsB (Bajaj et al., 2016; Jacq et al., 2018). Konečné rozdělení dvou buněk zajišťuje hydroláza LytB (Jacq et al., 2018).

Biosyntéza peptidoglykanu se dále dělí na periferní a septální. V periferní syntéze se peptidoglykan rozšiřuje od středu dělení do dceřinných buněk za účasti enzymů: PBP2b, PBP1a (podílí se na polymeraci mureinu) (Schiffer et al., 1999), RodA (podílí se na polymeraci peptidoglykanu) (Sjodt et al., 2018), MreC a MreD (udržuje tvar buňky, je zapojen do prostorové organizace syntézy peptidoglykanu) (Heidrich et al., 2002), MltG (ukončení polymerace) (Yunck et al., 2015), DivIVA (dokončení buněčného dělení a maturace pólů) (Fadda et al., 2003, 2007), GpsB (správný tvar a dělení buněk) (Fleuire et al., 2014), Jag/EloR/KhpB (neznámá funkce) (Ulrych et al., 2016), RodZ (Tsui et al., 2016) a CozE (směrování PBP1a do buněčného septa) (Fenton et al., 2016). V septální syntéze se vytváří septum a peptidoglykan tvoří bariéru mezi dvěma dceřinnými buňkami. V septální syntéze působí enzymy: FtsZ a FtsA (vazba Z-kruhu k cytoplazmatické membráně a jeho stabilizace) (Lara et al., 2005), FtsW (přenos lipidu II přes cytoplazmatickou membránu) (Mohammadi et al., 2011), PBP2x (tvorby příčných propojení mezi peptidovými řetízky) (Morlot et al., 2004), PBP1a (polymerace mureinu) (Morlot et al., 2004), FtsQ/DivIB, FtsB/DivIC, FtsL (Noirclerc- Savoye et al., 2005), EzrA (Fadda a Massidda, nepublikováno), a GpsB (regulace septální a periferní syntézy peptidoglykanu a dělení buněk) (Rued et al., 2017).



Obrázek 3

Schéma znázorňuje sled reakcí vedoucích k syntéze peptidoglykanu a enzymy které reakce katalyzují. L-I a L-II označují lipid I a lipid II. C-terminál, který je odštěpen v transpeptidaci, je zobrazen žlutě na zeleném pozadí. N-acetylglukosaminové zbytky (GlcNAc) sacharidové kostry peptidoglykanu jsou fialové, serin nebo alanin přidány enzymem MurM je světle zelený a alanin přidán enzymem MurN je hnědý. Nosič undekaprenylfosfátu, který se cykluje mezi extracelulárním a intracelulárním povrchem cytoplazmatické membrány, je červený. Převzato z Lloyd et al., 2008.

4.4.2 Lipid II jako signální molekula

Dvou-komponentový regulační systém Walk/WalR regulující syntézu buněčné stěny pravděpodobně reaguje na přítomnost lipidu II na povrchu buňky. Děje se tak díky citlivosti sensorové kinázy Walk na D-Ala-D-Ala, jenž je součástí lipidu II (Dubrac et al., 2008).

Stejně tak je pravděpodobně lipid II i signálem pro kinázu StkP. U *S. pneumoniae* je známo, že StkP kináza je prostřednictvím PASTA domén schopna vázat syntetický i nativní PG, ale i β -laktamová antibiotika (Beilharz et al., 2012; Maestro et al., 2011; Mir et al., 2011). I když funkce lipidu II jako signální molekuly pro kinázu StkP zatím nebyla u pneumokoka popsána, tak u příbuzných bakterií se objevuje. U *Staphylococcus aureus* je lipid II signálem pro kinázu PknB, která je orthologem kinázy StkP a plní stejnou funkci jako pneumokoková proteinkináza (Hardt et al., 2017). Po navázání signální molekuly dochází prostřednictvím

transmembránové a extracelulární domény k vytvoření homodimeru proteinkinázy StkP, čímž se aktivuje autofosforylační aktivita kinázy StkP (Pallová et al., 2007). Lipid II je cílem několika antibiotik inhibujících syntézu PG jako například ristocetinu a vankomycinu (Dubrac et al., 2008)

4.4.3 Penicilin vázající proteiny

Proteiny vázající penicilin (PBP) jsou enzymy vázané na rozhraní buněčné stěny a membrány. Jsou to vazebná místa antibakteriálních látek u bakterií. Antibiotika obsahující β -lactamový kruh, např. peniciliny a cefalosporiny, blokují transpeptidázovou aktivitu PBP a tím poškozují mechanismus tvorby buněčné stěny (Hakenbeck et al., 1986). Změna těchto vazebných míst, může podmiňovat rezistenci vůči určitým antibiotikům.

PBP proteiny *S. pneumoniae* můžeme rozdělit do tři tříd podle jejich molekulové hmotnosti, struktury domén a enzymatické aktivity. Proteiny s vysokou molekulární hmotností (kolem cca 80-90 kDa) jsou řazeny do třídy A a B, zatímco třída C je prezentována pouze proteinem PBP3, který má molekulovou hmotnost jen 43 kDa.

Do třídy A jsou řazeny tři PBP proteiny PBP1a, PBP1b, PBP2a, které mají transpeptidázovou i glykosyltransferázovou aktivitu. (Land et al., 2013). PBP1a a PBP1b jsou pravděpodobně hlavní enzymy polymerující murein. Esencialita je podmíněna aktivitou alespoň jednoho z nich, neboť bylo zjištěno, že delece v obou genech je letální (Schiffer et al., 1999). Do třídy B se pak řadí dvě esenciální transpeptidázy PBP2x a PBP2b, které působí v procesu tvorby příčných propojení mezi peptidovými řetízky dvou odlišných polysacharidových vláken PG. Zatímco PBP2b se uplatňuje v periferní syntéze PG (Straume et al., 2017), tak PBP2x naopak v septální syntéze PG (Straume et al., 2017; Berg et al., 2013; Goffin et al., 1998). Dalším proteinem ze skupiny je protein PBP3. Jde o protein s D,D-karboxypeptidázovou aktivitou, který odstraňuje COOH koncový D-alanin z peptidoglykanových pentapeptidových postranních řetězců. Jeho lokalizace zajišťuje, že pentapeptidy jsou v plné délce jen v oblasti sousedící s místem budoucího dělení a budou k dispozici jako substráty pro ostatní PBP (Morlot et al., 2004).

Tabulka 1
Proteiny syntézy a regulace peptidoglykanu *S. pneumoniae*

Převzato a upraveno od Massidda et al., 2013.

PROTEIN	ESENCIÁLNÍ	FUNKCE	CITACE
PBP1a	ne	peptidoglykan transglykosyláza /transpeptidáza, periferální a septální syntéza peptidoglykanu	Kell et al., 1993; Morlot et al., 2004; Maggi et al., 2008; Zapun et al., 2008
PBP1b	bez PBP2a	transpeptidáza a glykosyltransferáza, funkce neznámá	Guilmi et al., 2003, Lovering et al., 2006
PBP2a	bez PBP1b	peptidoglykan transglykosyláza /transpeptidáza, funkce neznámá	Kell et al., 1993; Morlot et al., 2004; Maggi et al., 2008; Zapun et al., 2008
PBP2x(FtsI)	ano	peptidoglykan transpeptidáza, septální syntéza peptidoglykanu	Kell et al., 1993; Morlot et al., 2004; Maggi et al., 2008; Zapun et al., 2008, Straume et al., 2017
PBP2b	ano	peptidoglykan transpeptidáza, periferální syntéza peptidoglykanu	Kell et al., 1993; Morlot et al., 2004; Maggi et al., 2008; Zapun et al., 2008, Straume et al., 2017
PBP3(DacA)	ne	DD-carboxypeptidáza, štěpení peptidových řetězců PG	Morlot et al., 2004; Barendt et al., 2011
DacB	ne	LD-carboxypeptidáza, štěpení příčných vazeb peptidových řetězců PG	Barendt et al., 2011
GpsB	CE	regulátor syntézy periferního a septálního PG	Mura et al., 2017, Rued et al., 2017
RodA	ano	lipid II flipáza. periferní syntéza peptidoglykanu, transport a polymerace PG prekurzorů	Tsui et al., 2016, Meeske et al., 2016

PROTEIN	ESENCIÁLNÍ	FUNKCE	CITACE
RodZ	ano	kontrola PBP1a a MltG aktivity	Tsui et al., 2016
FtsQ (DivIB)	podmíněně	neznámá role v septální syntéze peptidoglykanu	Noirclerc- Savoye et al., 2005; Maggi et al., 2008; Massidda et al., 2013
FtsB (DivC)	podmíněně	neznámá role v septální syntéze peptidoglykanu	Noirclerc- Savoye et al., 2005; Maggi et al., 2008; Massidda et al., 2013
FtsL	ano	neznámá role v septální syntéze peptidoglykanu	Noirclerc- Savoye et al., 2005; Maggi et al., 2008; Massidda et al., 2013
FtsW	neznámá	lipid II flipáza, elongace glykanových řetězců PG	Morlot et al., 2004; Maggi et al., 2008
FtsZ	ano	strukturní homolog tubulinu, strukturní komponenta Z-kruhu	Lara et al., 2005
FtsA	ano	strukturní homolog aktinu, vazba FtsZ k membráně, stabilizace Z-kruhu	Lara et al., 2005
PcsB	podmíněně	hydroláza peptidoglykanu, štěpení septálního PG a oddělení buněk	Fadda et al., 2007; Giefing et al., 2008
LytB	ne	hydroláza peptidoglykanu, oddělení buněk	Fadda et al., 2007
MreC	podmíněně	kontrola v periferální syntéze peptidoglykanu, kontrola lokalizace a aktivity PBP1a	Land et al, 2011; Massidda et al., 2013
MreD	podmíněně	kontrola v periferální syntéze peptidoglykanu, kontrola lokalizace a aktivity PBP1a	Land et al, 2011; Massidda et al., 2013

PROTEIN	ESENCIÁLNÍ	FUNKCE	CITACE
SepF	ne	pozitivní regulátor Z-kruhu	Fadda et al., 2003
Pmp23	no	správné místo dělení a lokalizaci LocZ/MapZ je také důležitý lyzozym	Jacq et al., 2018
LocZ/MapZ	ne	pozitivní regulátor Z-kruhu, určuje místo jeho vzniku a správný úhel dělicí roviny	Raaphorst et al., 2017, Holečková et al., 2015
MacP	podmíněně	umožňuje aktivaci PBP2a	Fenton et al., 2018
ErzA	ano	negativní regulátor Z-kruhu	Fadda a Massidda, nepublikováno
MltG	CE	uvolnění nově syntetizovaných glykanových řetězců	Tsui et al., 2016
DivIVA	ne	vyžadován pro dokončení buněčného dělení a maturaci pólů, správná lokalizace elongasomu	Fadda et al., 2003, 2007, Straume et al., 2017
Jag/EloR/Kh pB	ne	regulace periferalní syntézy peptidoglykanu, regulace exprese na transkripční a post-transkripční úrovni	Ulrych et al., 2016
CozE	neznámá	periferální syntéza peptidoglykanu, směřování PBP1a do buněčného septa	Fenton et al., 2016

CE – v závislosti na genetickém pozadí

4.5 α -D-fosfohexomutázy

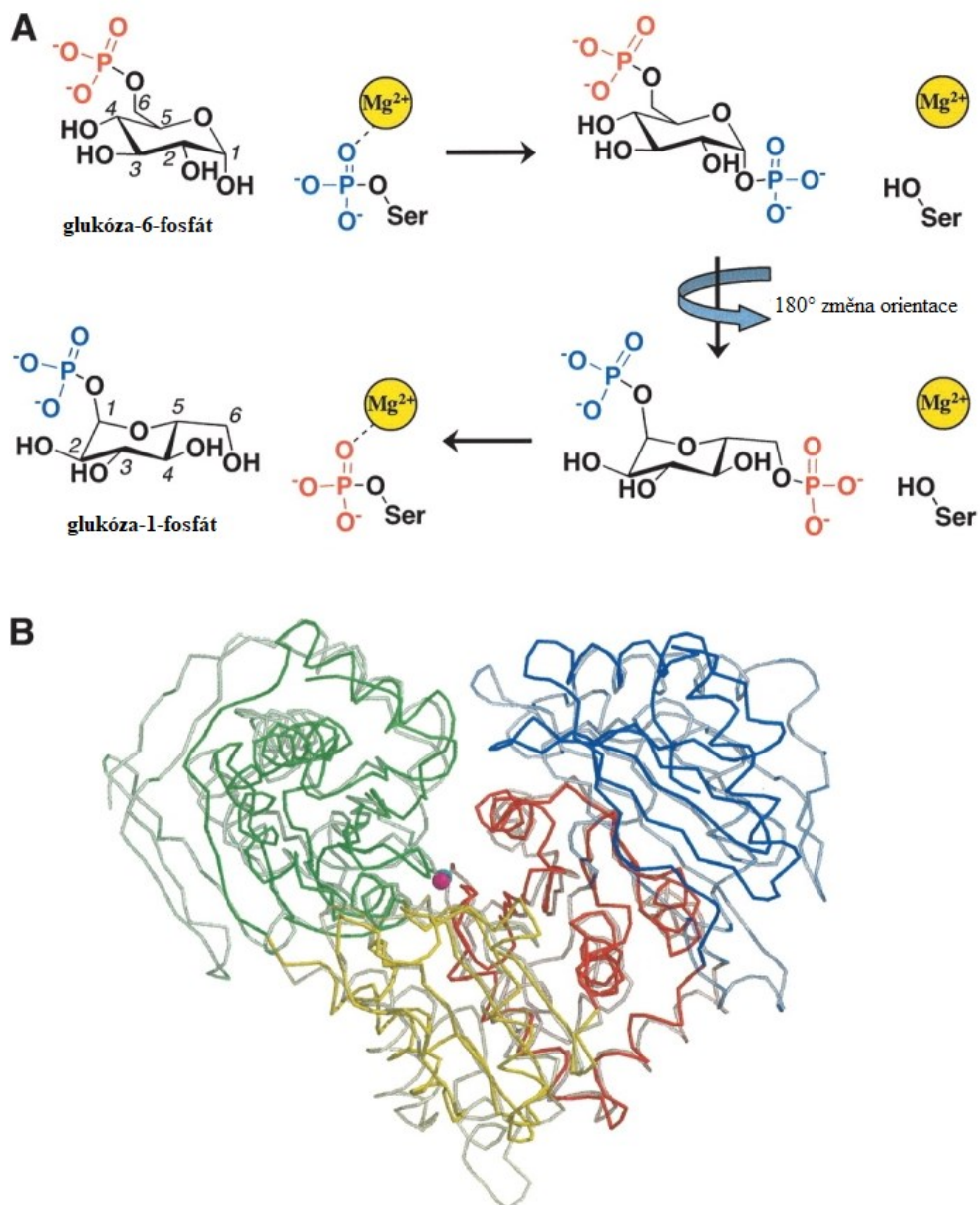
Tento ryze bakteriální protein fosfoglukozaminmutáza (Barreteau et al., 2008), zkráceně GlmM, je součástí proteinové rodiny α -D-fosfohexomutáz. Enzymy z této rodiny katalyzují reverzibilní přenos intramolekulárního fosforu na cukernatých substrátech (Shackelford et al., 2004). Do rodiny α -D-fosfohexomutáz patří čtyři příbuzné enzymy, z nichž dva – fosfoglukomutáza (PGM) a fosfomannomutáza/fosfoglukomutáza (PMM/PGM) jsou velmi časté a proto i nejvíce charakterizované. Fosfoglukomutáza je velmi specifický protein a jeho substrátem je výhradně glukóza. Druhý typ enzymu fosfomannomutasa/fosfoglukomutasa jsou méně specifické a jejich substrátem je kromě glukózy také manóza (Shankar et al., 1995; Rocchetta et al., 1999). Následující dva enzymy N-acetylglukozaminfosfátmutázy (PAGM) a fosfoglukozaminmutázy (PNGM), které patří také do rodiny α -D-fosfohexomutá, jsou zatím výrazně méně charakterizovány.

Tyto enzymy hrají důležité a rozmanité role v metabolismu sacharidů i v jiných biochemických drahách od bakterií až po člověka. PGM je nejvíce známý pro svou úlohu v poskytování substrátů, které vstupují do glykolytické dráhy. Proteiny PMM/PGM jsou primárně bakteriální a účastní se biosyntézy různých sacharidů, jako je lipoolysacharid a alginát (Shankar et al., 1995; Rocchetta et al., 1999). PNGM a PAGM se podílí na biosyntéze UDP-N-acetylglukozaminu a jsou nezbytné pro posttranslační modifikaci N-acetylglukozaminu (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996; Mio et al., 2000).

I když tyto enzymy mají odlišnou substrátovou specifitu, zdá se, že enzymy, které byly doposud charakterizovány, používají stejný mechanismus. Katalyzují reverzibilní přeměnu 1-fosfo sacharidů a 6-fosfo sacharidů přes biofosforylovaný meziprodukt cukru. Aktivní enzym je fosforylován na konzervovaném serinovém zbytku a váže jeden Mg^{2+} iont. Reakční mechanismus zahrnuje dvě reakce přenosu fosfátové skupiny: nejprve z enzymu na substrát a druhý z meziproduktu reakce zpět na enzym. Počáteční přenos fosfátové skupiny je z fosfoserinu enzymu na navázaný substrát, čímž se vytvoří bisfosforylovaný meziprodukt (např. glukóza 1,6-bisfosfát). Meziprodukt se musí přeorientovat a navázat se na alternativní pozici, což umožňuje přenos fosfátové skupiny zpět na protein a tím vytvoření produktu a regeneraci aktivní formy enzymu (viz **Obrázek 4**) (Shackelford et al., 2004).

Zástupci PMM/PGM a PGM proteinů byli charakterizováni rentgenovou krystalografií (Liu et al., 1997; Regni et al., 2002). Struktura PMM/PGM z bakterie *P. aeruginosa* s králičí PGM znázorněna na **Obrázku 4**, ukazuje, že oba proteiny jsou si v celkové terciální struktuře velmi

podobné. K vytvoření velké centrální štěrbiny aktivního místa enzymu přispívají všechny čtyři domény proteinu (Regni et al., 2002). Krystalografická analýza *P. aeruginosa* PMM/PGM v komplexu se čtyřmi substráty (glukóza-1-fosfát, glukóza-6-fosfát, manóza-1-fosfát a manóza-6-fosfát) ukázala, že každá ze čtyř domén obsahuje zbytky nezbytné pro katalýzu enzymatické reakce nebo rozpoznávání substrátu (viz **Obrázek 5**). Doména I obsahuje katalytický konzervovaný fosfoserinový zbytek, který je nezbytný pro přenos fosforu na a z bisfosforylovaného reakčního meziprojektu; slouží jako donor fosfátové skupiny v enzymatické reakci. Doména II obsahuje smyčku vázající kov, která koordinuje ionty Mg^{2+} potřebné pro aktivitu enzymu. Doména III obsahuje smyčku vázající cukr, která má klíčové zbytky, které umožňují enzymu rozpoznat dvě různé orientace vazby jeho 1-a 6-fosfo-sacharidových substrátů. Doména IV poskytuje většinu zbytků, které tvoří fosfát-vazebné místo, které určuje orientaci přicházejících fosfo-sacharidových substrátů (Shackelford et. al. 2004).



Obrázek 4

A

Schéma intramolekulárního přenosu fosfátové skupiny katalyzované skupinou enzymů z rodiny α -D-fosfohexomutáz ilustrující konverzi glukózového 6-fosfátu na glukózový 1-fosfát.

B

Značná podobnost 3D struktur *P. aeruginosa* PMM/PGM (plné barvy) a králíčí PGM (semitransparentní) demonstrována jejich vzájemným překryvem. Domény I – IV každého proteinu jsou zobrazeny zelenou (doména I), žlutou (doména II), červenou (doména III) a modrou (doména IV) a odpovídají zbytkům 1–153, 154–256, 257–368 a 369–463 PMM/PGM. Obrázek byl vytvořen s MolScript (Esnouf 1997). Převzato z publikace Shackelford et. al. 2004.

Dále bylo pomocí fylogenetické a sekvenčně strukturní analýzy rodiny enzymů α -D-fosfohexomutáz zjištěno, že existuje několik oblastí α -D-fosfohexomutáz, které jsou vysoce konzervativní a důležité pro funkci všech členů rodiny, což podporuje tvrzení, že všechny tyto

enzymy používají společný mechanismus. Zároveň bylo zjištěno, že z fylogenetického hlediska je tato enzymatická rodina tvořena dvěma hlavními větvemi: 1) eukaryotními N-acetylglukosaminfosfomutázami (PAGM) a 2) zbývajícími třemi podrodinami enzymů (PMM/PGM, PGM, PNGM). Eukaryotní PAGM jsou tedy evolučně nejvíce odlišné od ostatních enzymů rodiny α -D-fosfohexomutáz (Shackelford et al., 2004). Vysokou 3D podobnost enzymů PMM/PGM a PGM s PNGM potvrdila i v roce 2011 odhalená krystalická struktura fosfoglukozaminmutázy u *Bacillus anthracis*, která rovněž potvrzuje fakt, že katalytické centrum enzymu je tvořeno aminokyselinovými zbytky všech čtyř domén, z nichž každá má specifickou funkci (viz výše u PMM/PGM a PGM). Navíc autoři docházejí ke zjištění, že C-terminální doména (doména IV) je konformačně variabilní oproti zbytku enzymu a že fosfoglukozaminmutáza dimerizuje, což je zajištěno prostřednictvím domény I. Předpokládá se, že za interakci by mohly zodpovídat aminokyselinové zbytky M55 a A62 (Mehra-Chaudhary et al., 2011). Dimerizace byla také popsána u PGM *S. typhimurium* (Mehra-Chaudhary et al., 2011), naproti tomu PMM/PGM *P. aeruginosa* tvoří pouze monomer (Regni et al., 2002).

	I→	Tyr17	
PNGM	-----MSNRKYFGTDGIRGVGDAPITPDFVLKLGWAAGKVLARHGSR-----KIIIGKDTRISGYMLESALEAGLAAAGLSALFTG-----		PM 79
PMM/PGM	-----LPASIFRAYDIRGVVG-DTLTAETAYWIGRAIGSESLARG-----EPCVAVGRDGRLSGPPELVKLIQGLVDCGCQVSDVG-----		MV 85
PGM	-----MVKIVT---VKTKAYPDQKPGTSGLRKRKRVKVFQSSNTYAENFIQSIISTVEPAQRQE---ATLVVGGDGRFYMKEAIQLIVRIAAAANGIGRLVIG---QNGIL 94		
PAGM	-----MDLGAITKYSALHAKPNGLILQYGTAGFRTKAEHLDHVMFRMGLLAVLRSKQTK-STIGVMVTA [*] SHNPEEDNGVKLVDPDPLGEMLAPSWEEHATCLANAEE-----QDM 102		
		P-Ser	
PNGM	PTPAVAYLTRTF-----RAEAG-IVISASHNPFYDNG--IKFFSI---DGTKLPDAVEEAIEAEMEKE---ISCVDSAELGKASR-----IVDAAGRYIEFCK 163		
PMM/PGM	PTPVLYYAANVL-----EGKSG-VMLTGSHNPPDYNG--FKIVVA---GET--LANEQIQALRERIEKN---DLASG--V--GSVE-----QVDILPRYFKQIR 164		
PGM	STPAVSCIIRK-----IKAIGG-IILTASHNPGGPNG-DFGIKFN-ISNGGPAPPAITDKIFQISKITIEEYAIKPDLK---VDLGVLG-KQQFDLEN-KFKPFTVEIVDSVEAYATMLR 200		
PAGM	QRVLIDISEKEAVNLQQ---DAFVVIQRDTRPSSEKLSQSVIDGVT-VLGGQFHDYGLLTPQLHYMVY---CRNTGGRYG-----KATIEGYQKLS 188		
			II→
			Mg²⁺ vazebné místo
PNGM	ATFPNELSLS-----ELKIVVDCANGATYHIAPN---VLRELG-----ANVIAIGCEPNGVNI-----AEVGATDVRALQARVLA-----EKADLGIAFDGDGDRVIMVD--- 240		
PMM/PGM	DDI---AMAK-----PMKVVDGCGVAGVIAPQ---LIEALG-----CSVIPLYCEVDGNFNNHP---DPGKPENLKDIAKVKA-----ENADLGLAFDGDGDRVGVVVT--- 252		
PGM	NIFDFNALKELLSG---PNRLKIRIDAMHGVVGPYVKK---ILCEELGA---PANSVNCVPLEDFGGHHPDPLNTYAADLVEVTKMSEHD-----FGAAFDGDGDRNMILG--- 298		
PAGM	KAFVELTKQASCSD---EYRSLKVCANGIGALK-----LREM---EHYFSQGLSVQLFNDGSK--GKLNHLCCADFKVSHQKPPQGM-EIKS-NERCCSFDGDADRIVYYYYH--- 287		
			III→
			cukr vazebné místo
PNGM	---HEGNKVDGDQIMYIIAREGLRQQLR-----G-GAVGTLMSNMGLELALQKLGIPFARAKVGDYRVLEKMQEKGWR-----IGAENSGHVILLDKTT-TGD----- 340		
PMM/PGM	---NTGTIIYPDRLLMLFAKDVVSRN--P-----GADIIFDVKCTRRLIALISGYGGRPVMWKTGHSLIKMMKETGAL-----LAGEMSGHVFFKERWFGFDD----- 341		
PGM	---KHGFFVNPDSVAVIAAN-IFSIPYFQQTG-----VRGFARSMPTSGALDRVANATKIALYETPTGWKFFGNLMDASKLS-----LCGEESFG--TGSDHIREKD----- 390		
PAGM	DADGHFHLIDGDKIATLISSFLKELLVEIG---ESLNIQVQVQYANGSSSTRYLEEVMKVPVYCTKTGVKHLHHAQE-FDIG---VYFEANGHTALFSTAVEMKIKQSAEQLE--- 395		
			IV→
PNGM	-----GIVAGLQVLAAMARN-----HMSLHDLCSGMKMFQILVNVRYTAGSGDPLEHESVKAVT-----AEVEAALG----- 403		
PMM/PGM	-----GIYSAARLLEILSQD-----QRDSEHVFSAPPSDISTPEINITVTEDSK-FAIIEALQRDAQ--WG-----EGNITTLDG-----V 409		
PGM	-----GLWAVLAWLSILATRKQ-----SVEDILKDHWHKFRNFFTRYDYEEVEAEGATKMMKDLEALMFDRSFVGKQFSANDKVYT--VEKADNFEYHDPVDSVSKNQGL 490		
PAGM	---DKRKAAMLENIIDLNFQAAGDAISD-----MLVIEAILALKGLTVQWDALYTDLPNRQLKQVADRRIISTDAER-----QAVTPPGLQEAINDL 484		
			PO₄ vazebné místo
PNGM	----NRG-----RVLLRKSQT---EPLIRVMVEGEDEAQTVEFAHRIADAVKAV----- 445		
PMM/PGM	RVDYPKG-----WGLVRSANT---TPVLVLRFEADTEEELERIKTVFRNQLKAVDSSLVPPF----- 463		
PGM	RLIFADG-----SRIIFRLSGTGSAGATIRLYIDSYEKDNAKINQDPQVMLAPLISIAL-KVSQLQERTGRTAPTIVIT 562		
PAGM	VKKYKLS-----RAFVRPSGT---EDVVRVYAEADSQESADHLAHEVSLAVFQLAGGIGERPQPGF----- 542		

Obrázek 5
Reprezentativní sekvence ze čtyř podskupin rodiny D-fosfohexomutáz

PNGM z *E. coli* PMM/PGM z *P. aeruginosa*, PGM z králíka a lidský PAGM. Invariantní a téměř invariantní zbytky jsou zvýrazněny tučným písmem a modrým stínováním; zbytky specifické pro třídu jsou zvýrazněny růžovou barvou. Alternativní umístění katalytického fosfoserinu v PAGM je v červeném rámečku a označeno hvězdičkou. Nad sekvencemi jsou modrým textem označeny důležité oblasti aktivního místa. Čtyři domény proteinů jsou označeny I, II, III a IV. Převzato z publikace Shackelford et. al. 2004.

4.6 Fosfoglukozaminmutázy u bakteriálních zástupců

Escherichia coli byla první bakterií, u které byl enzym GlmM popsán. V této gramnegativní bakterii je GlmM polypeptid složený ze 445 aminokyselin s vypočtenou hmotností 47,5 kDa a je syntetizován v neaktivní, defosforylované formě (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996; Jolly et al., 1999). Jakým způsobem k fosforylaci a tedy i k aktivaci enzymu GlmM dochází, není zcela známo. Byly navrženy dvě možné hypotézy (Jolly et al., 1999). Podle první je fosforylace GlmM zajištěna kinázou a donorem fosfátové skupiny je ATP. Podle druhé je fosforylace zajištěna pomocí intermediátu katalyzované reakce glukozamin-1,6-difosfátem. V *in vitro* experimentálních podmínkách se ukázalo, že rekombinantní enzym GlmM se v přítomnosti radioaktivního γ -³²P-ATP autofosforyluje. Tato autofosforylace probíhá na serinovém zbytku v pozici 102. Serin 102 je pro enzymatickou aktivitu nezbytný a jeho záměna za alanin vede k ztrátě autofosforylační aktivity v *E. coli* (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996; Jolly et al., 1999, 2000). Inaktivovaná forma esenciálního genu *glmM* způsobuje snížení hladiny prekurzorů pro syntézu buněčné stěny a tedy nedostatečnou syntézu peptidoglykanu, která se projeví na tvaru buněk. Při větším nedostatku prekurzorů pro syntézu peptidoglykanu (pod 60 %) dochází až k lyzi buněk (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996).

Helicobacter pylori je grampozitivní bakterie kódující esenciální gen *ureC*, který vykazuje 43% sekvenční homologii s genem *glmM* v *E. coli* (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996). Produkt genu *ureC* je fosfoglukozaminmutáza a katalyzuje interkonverzi glukozamin-6-fosfátu (de Reuse et al., 1997). Bylo prokázáno, že produkt genu *ureC* je schopen komplementovat fenotyp podmíněně letálního *glmM* mutantního kmene u *E. coli* (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996).

Pseudomonas aeruginosa u této gramnegativní bakterie byl gen *glmM* objeven při hledání homologu pro gen *algC*, který je esenciální pro biosyntézu lipopolysacharidu a alginátu a přispívá tak k tvorbě virulentních faktorů této bakterie (Rochetta et al., 1999). Tento gen kódující protein (445 aminokyselin) s neznámou enzymatickou povahou vykazuje homologii s proteiny fosfohexomutáz, především s geny popsány jako fosfoglukozaminmutázy (Travels et al., 2000), které katalyzují první krok v biosyntéze peptidoglykanu a lipopolysacharidů (Jolly et al., 1999). Produkt tohoto genu *glmM* byl identifikován jako enzym GlmM (Travels et al., 2000).

Streptococcus gordonii patřící do skupiny *Streptococcus viridans* je bakterie významně se podílející na tvorbě biofilmu na povrchu zubů známého též jako zubní plak. Ačkoliv *S.*

S. gordonii sama o sobě nepředstavuje v dutině ústní závažnější problém, tak je to právě ona, která způsobuje ulpívání biofilmu na povrchu zubů, do kterého se později přidávají další, potencionálně škodlivé, bakterie. *S. gordonii* je pak přímo patogenní, pokud se rozšíří hlouběji do systému, což se děje zejména u pacientů s nedostatkem bílých krvinek. Pak způsobuje například zápal osrdečníku (Loo et al., 2000).

S. gordonii má ve své genetické výbavě gen *glmM* podobný *glmM* u *Escherichia coli*, který kóduje GlmM protein. Gen *glmM* není pro *S. gordonii* esenciální a jeho aktivita je srovnatelná s aktivitou *glmM* u *S. aureus*. Naopak gramnegativní bakterie, jako například *E. coli* a *P. aeruginosa*, mají typicky zhruba 10x vyšší aktivitu GlmM. Absence genu *glmM* ale způsobuje poloviční rychlost růstu bakterii ve srovnání s divokým kmenem. Dále pak kmen bez *glmM* tvoří protáhlé a zvětšené buňky s výraznými morfologickými defekty buněčného povrchu a neobvykle dlouhé řetízky, což svědčí o jeho vlivu na tvorbu buněčné stěny a mechanismus dělení *S. gordonii*. Konečně pak absence *glmM* vede k omezení tvorby biofilmu a snížené odolnosti vůči penicilinu (Shimazu et al., 2008; Shimazu et al., 2012).

Streptococcus mutans je lidský patogen vyskytující se nejčastěji v dutině ústní, kde hraje důležitou úlohu ve vzniku zubního kazu. Nezbytnou vlastností pro schopnost virulence je i u této bakterie tvorba biofilmu. Protein GlmM *S. mutans* vykazuje 69 % sekvenční homologii s GlmM u *S. pneumoniae*, ale na rozdíl od pneumokokové GlmM není esenciální, podobně jako GlmM *S. gordonii*. Kmen *Streptococcus mutans* s odstraněným genem *glmM* má asi dvojnásobnou dobu zdvojení v exponenciální fázi růstu, ale dosahuje podobné optické hustoty jako divoký kmen. Biofilm produkovaný tímto kmenem je tenčí a obsahuje spoustu děr oproti biofilmu divokého kmene, který tvoří tlusté a souvislé vrstvy bakterii. Deleční kmen $\Delta glmM$ tvoří dlouhé řetízky buněk a vykazuje zvýšenou citlivost k autolýze (Liu et al., 2009).

Mycobacterium smegmatis* a *Mycobacterium tuberculosis. U mykobakterií se buněčná stěna skládá z mykolátové a peptidoglykanové vrstvy, kterou drží vrstva arabinogalaktanu. Arabinogalaktan je k peptidoglykanu připojen přes disacharidový můstek. UDP-N-acetylglukozamin je důležitým prekurzorem pro syntézu peptidoglykanové vrstvy a také přímým donorem glykosylu pro disacharidový můstek, proto hraje důležitou roli v růstu mykobakterií. Metabolické dráhy UDP-N-acetylglukozaminu se účastní enzymy GlmS, GlmU a GlmM. GlmU je esenciální pro růst *M. smegmatis* a *M. tuberculosis* (Zhang et al., 2008). Bioinformatická analýza odhalila homolog GlmM u *M. smegmatis*, který byl označen jako MSMEG_1556, a také u *M. tuberculosis*, kde byl označen jako Rv3441c. Oba proteiny byly exprimovány v BL21 *E. coli* a byla detekována jejich aktivita fosfoaminmutáz. Bylo tedy

potvrzeno, že se jedná o funkční enzymy s fosfoglukozaminmutázovou aktivitou. Dále bylo pomocí termosenzitivního podmíněně letálního kmene s deletovaným genem *glmM* zjištěno, že tento enzym je esenciální pro *M. smegmatis*. Při zvýšené teplotě a následné nemožnosti komplementace *glmM* začaly buňky vykazovat morfologické defekty (prodloužený tvar, hrbolatý povrch buněk a jejich lyze). Pro *M. tuberculosis* se esencialita genu *glmM* bohužel nepotvrdila (Li et al., 2012). V další studii byl připraven kmen *M. smegmatis* s deletovaným genem *glmM* a mutantním genem *glmM* indukovatelným tetracyklinem pomocí technologie antisense RNA. Byla prokázána závislost růstové rychlosti na koncentraci induktoru v médiu. Snížení exprese GlmM v buňkách *M. smegmatis* vedlo ke změně morfologie buněk (větší velikost a nepravidelný tvar s hrbolatým povrchem), a ke snížení tvorby biofilmu a ke zvýšené citlivosti na isoniazidu a etambutolu. Zvýšená citlivost k antimikrobiálním látkám, snížená tvorba biofilmu a nezbytnost enzymu GlmM pro mykobakterie by mohla být použita jako potenciální cíl léku proti tuberkulóze (Kang et al., 2013).

Bacillus anthracis je grampozitivní bakterie a peptidoglykan této bakterie způsobuje zánětlivou odpověď hostitele. U této patogenní bakterie, která je původcem sněti slezinné neboli anthraxu, byla provedena první strukturní charakteristika enzymu GlmM, jenž odhalila, že protein se skládá ze čtyř domén a v roztoku se vyskytuje jako dimer. Dimerizaci proteinu podporuje i měření dynamického rozptylu světla, jenž vedlo k přibližně dvojnásobné molekulové hmotnosti oproti monomeru GlmM (Mehra-Chaudhary et al., 2011).

Monomer enzymu GlmM u *B. anthracis* je tvořen ze čtyř domén o celkové délce odpovídající 448 aminokyselinovými zbytky. Aktivní místo enzymu leží ve velké šterbině uprostřed proteinové molekuly a je tvořeno aminokyselinovými zbytky ze všech čtyř domén, z nichž každá doména má jedinečnou funkci: 1) doména I nese konzervovaný fosforylovaný serinový zbytek; 2) doména II nese vazebné místo pro kofaktor reakce, kterým jsou Mg^{2+} ionty; 3) doména III obsahuje vazebné místo pro sacharidovou složku substrátu a 4) doména IV nese vazebné místo pro fosfátovou skupinu substrátu a produktu enzymatické reakce. Dimerizace je pak zajištěna pouze aminokyselinovými zbytky domény I jednotlivých monomerů (Mehra-Chaudhary et al., 2011).

Staphylococcus aureus je významný lidský patogen, který se objevuje zejména v nemocničním prostředí. Zde se prosazuje především díky svým genetickým rysům jako je virulence, odolnost proti antibiotikům a snadná přenositelnost (Loftus et al., 2018). U *S. aureus* byl identifikován gen *femR315* (též známý jako *femD*) pomocí inzerční mutagenese, jež mimo jiné vedla k výraznému snížení rezistence na meticilin. Produktem tohoto genu je

protein, který se skládá ze 451 aminokyselin a vykazuje významnou homologii s různými fosfoglukomutázami v databázích, nejvíce však s genem *glmM* u *E. coli* (Jolly et al., 1997). Tento enzym katalyzuje tvorbu glukozamin-1-fosfátu z glukozamin-6-fosfátu, což je zapotřebí k produkci esenciálního prekurzoru peptidoglykanu UDP-N-acetylglukozaminu.

Lactococcus lacti je grampozitivní nesporeující bakterie. Jako mnoho dalších grampozitivních a některých gramnegativních bakterií obsahuje cyklický di-AMP nukleotid. Tento nukleotid funguje jako sekundární posel a reguluje celou řadu buněčných procesů včetně růstu, virulence, homeostázy buněčné stěny, transportu draslíku, oprav DNA, syntézy mastných kyselin, tvorby biofilmu, rezistenci na antibiotika, osmotoleranci, lyzi buněk, centrálního metabolismus a imunomodulaci (Zhu et al., 2016; Hengge et al., 2009). Pomocí genetického screeningu k identifikaci složek, které ovlivňují hladinu cyklického di-AMP bylo odhaleno, že bodová mutace genu *glmM I154F* vedla ke snížení hladiny cyklického di-AMP a snížení prekurzoru peptidoglykanu UDP-N-acetylglukozaminu v buňce. Tyto nálezy identifikují GlmM jako protein modulující hladinu cyklického-di-AMP prostřednictvím regulace aktivity diadenylát cyklázy (CdaA) a poskytují přímé spojení mezi syntézou cyklického-di-AMP a biosyntézou peptidoglykanu. Jak GlmM reguluje aktivitu CdaA je v současné době nejisté, zdá se však, že je to pravděpodobně prostřednictvím přímé interakce protein-protein. Je pravděpodobné, že dochází ke koordinaci aktivity CdaA a GlmM a dochází k různým fenotypovým změnám u buněk v důsledku změny hladiny cyklického di-AMP v buňkách. GlmM I154F inhibuje aktivitu CdaA a váže se na CdaA silněji než na divokou formu GlmM. Pomocí metody SWISS-MODEL se předpokládá, že pozice 154 je na povrchu GlmM mimo aktivní místo obsahující konzervovaný forylovaný serin v pozici 101. Mutace I154F proteinu GlmM aktivitu enzymu zřejmě neruší, je totiž možné, že tato oblast enzymu může být místem interakce mezi GlmM a CdaA, což bude předmětem dalšího výzkumu (Zhu et al.; 2016).

Vztah mezi *glmM* a *cda* byl prokázán také u *Bacillus subtilis*. Grampozitivní půdní bakterie *Bacillus subtilis* kóduje hned tři potenciální diadenylátové cyklázy, které mohou syntetizovat signální nukleotid cyklický di-AMP. Tyto enzymy jsou exprimovány za různých podmínek v různých buněčných kompartmentech. Bylo prokázáno, že cyklický di-AMP je nezbytný pro růst *B. subtilis*, ale že zároveň jeho přebytek je pro bakterie škodlivý. Akumulace molekul cyklického di-AMP vede ke zhoršení růstu a morfologickým změnám buněk (kudrnatost). Tento fenotyp je možné částečně potlačit zvýšenou koncentrací hořčičku.

Existuje několik důkazů, že CdaA je součástí konzervovaného esenciálního modulu *cda-glmM*, který se podílí na metabolismu buněčné stěny (Mehne et al., 2013).

U *Streptococcus pneumoniae* je gen *glmM* kódován genem *spr1417* a je tvořen 1353 pb. Gen *glmM* zodpovědný za syntézu enzymu GlmM s molekulovou hmotností cca 47,5 kDa (Nováková et al., 2005), který tvoří 450 aminokyselin. Izoelektrický bod je cca 4,7 (Krupička, 2014). Enzym GlmM nezbytný v biosyntetické dráze UDP-N-acetylglukozaminu, je pro životaschopnost *S. pneumoniae* esenciální. Esencialita genu *glmM* byla prokázána v předešlé diplomové práci Jiřího Krupičky (2014) na pozadí kmene Rx *S. pneumoniae*. Deplece proteinu GlmM vedla k předčasné lyzi buněk a k výrazným morfologickým defektům.

GlmM je zřejmě jako ostatní fosfohexomutázy u *Streptococcus pneumoniae* a dalších příbuzných bakterií syntetizován v neaktivní formě, která pro svoji aktivaci vyžaduje fosforylaci ve fosfát vazebné doméně I (Nováková et al., 2005; Jolly et al., 2000; Mehra-Chaudhary et al., 2011). Pomocí fosforylace a defosforylace je funkce GlmM a tedy i výnos celé biosyntetické dráhy vedoucí k syntéze buněčné stěny regulována. Jak probíhá fosforylace enzymu zatím není známo. Předpokládá se, že buď dochází k autofosforylaci či fosforylaci proteinkinázou a zdrojem fosfátové skupiny je ATP, nebo k fosforylaci dochází reakcí s glukozamin-1,6,-difosfátem (Jolly et al., 1999; Jolly et al., 2000). Enzym GlmM byl u *S. pneumoniae* identifikován *in vivo* jako jeden z potenciálních substrátů proteinkinázy StkP pomocí radioaktivního značení [³³P] kyselinou fosforečnou. Fosforylace GlmM proteinkinázou StkP, byla následně *in vitro* potvrzena kinázovou reakcí (Nováková et al., 2005, Pallová, 2007). Lze tedy předpokládat, že u *Streptococcus pneumoniae* je iniciální fosforylace zajišťována Ser/Thr proteinkinázou eukaryotického typu StkP (Nováková et al., 2005) a nikoliv autofosforylací, která byla *in vitro* potvrzena u *E. coli*.

Pro fosforylaci tohoto enzymu je u *S pneumoniae* klíčový serinový zbytek v pozici S101 fosforylovaný v *in vitro* podmínkách proteinkinázou StkP (Pallová, 2007), kterému odpovídá serin v pozici 102 u *E. coli* aktivovaný v *in vitro* podmínkách autofosforylací (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996; Jolly et al., 1999, 2000). Byl připraven rekombinantní protein GlmM *S. pneumoniae* s aminokyselinovou záměnou serinu v pozici 101 za alanin. Tento protein byl použit v kinázové reakci *in vitro* a bylo tak prokázáno, že mutace serinu 101 nevede k úplnému zrušení fosforylace proteinu GlmM proteinkinázou StkP (Pallová, 2007). Proteiny GlmM a GlmM S101A byly štěpeny sekvenčně specifickou proteasou thrombinem, který štěpí protein v pozici 141, za účelem identifikace fosforylovaných aminokyselinových zbytků GlmM *S. pneumoniae*. Porovnáním jejich fosforylačních profilů bylo zjištěno, že

aminokyselinové zbytky, modifikované fosforylací, jsou minimálně dva (Pallová, 2007). Z 2D elektroforetické analýzy bylo zjištěno, že GlmM putuje ve třech izoformách, což je v souladu s existencí několika potenciálních fosforylovaných izoform. U proteinu GlmM S101A jedna fosforylovaná izoforma mizí. Pomocí MS analýzy bylo zjištěno, že jedna ze dvou zbývajících izoform je fosforylována na serinu v pozici 99 (Pallová et al., 2007), což odpovídá serinu v pozici 100 proteinu GlmM *E. coli* (Jolly et al., 1999). Bylo zjištěno, že zbytek S101 je esenciální a mutantní protein GlmM S101A za nepermissivních podmínek nebyl schopný komplementace podmíněně letálního kmene *E. coli* *GPM83* s esenciálním genem *glmM* na termosenzitivním plazmidu (Mengin-Lecreulx et al., 1996, Pallová et al., 2007). Navíc GlmM S101A vykazuje nulovou fosfoglukozaminmutázovou, fosfoglukomutázovou i fosfomannomutázovou aktivitu. Byla testována i záměna proteinu GlmM S99A a ani tento protein nebyl schopný komplementace (Pallová et al., 2007). Dále bylo prokázáno, že enzymatická aktivita proteinu GlmM *in vitro* je nejvyšší, pokud dochází k fosforylaci proteinkinázou StkP (Pallová et al., 2007). Jak probíhá fosforylace enzymu GlmM *in vivo* není zatím zřejmé, neboť i mutantní kmen Δ *stkP* je životaschopný.

5 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této práce je dokázat esencialitu fosforylace klíčových serinových zbytků fosfoglukozaminmutázy na pozicích 99 a 101. Tato práce navazuje na diplomovou práci Jiřího Krupičky (Krupička, 2014), která je také zaměřena na důkaz esenciality genu *glmM*. Autor se v práci snaží objasnit, zda je esenciální fosforylace klíčových serinových zbytků fosfoglukozaminmutázy na pozicích 99 a 101. Esencialitu serinových zbytků se ale podařilo dokázat jen nepřímo, a to na základě transformační účinnosti při delecii nativního genu *glmM* v merodiploidním kmeni s aminokyselinovými záměnami. Na rozdíl od kontrolního kmene, bylo u těchto modifikovaných merodiploidních kmenů dosaženo téměř nulové transformační účinnosti. V této diplomové práci se chceme pokusit o přímý důkaz.

Kromě prokázání esenciality fosforylace S99 a S101 proteinu GlmM bychom se chtěli zaměřit na určení lokalizace GlmM v buňce.

Dále tato práce navazuje na dizertační práci Petry Pallové (Pallová, 2007), jejímž jedním z cílů je identifikace fosforylovaných aminokyselinových zbytků proteinu GlmM. Dosud se podařilo identifikovat dva aminokyselinové zbytky S99 a S101, avšak zbytková fosforylace naznačuje, že by míst fosforylace mohlo být více. Dalším hlavním cílem této práce je pokusit se identifikovat další neznámá místa fosforylace proteinu GlmM proteinkinázou StkP.

Z těchto důvodů byly stanoveny následující dílčí úkoly:

1. Prokázat *in vivo*, zda jsou serinové zbytky S99 a S101 fosfoglukozaminmutázy (GlmM) esenciální pro životaschopnost *S. pneumoniae*.
 - a. Připravit modifikované merodiploidní kmeny kódující pod zinkovým promotorem ektopickou kopii genu *glmM* s fosfoablativním a fosfomimetickými záměnami na serinech v pozici 99, nebo 101.
 - b. V modifikovaných merodiploidních kmenech provést delecii nativního genu *glmM* a tím prokázat nepřímo nezbytnost fosforylovaných zbytků S99 a S101 pro životaschopnost pneumokoka.
 - c. Připravit neznačený GlmM-depleční kmen Sp283 a kmene Sp369, který nese v nativním *glmM* dvě fosfoablativní záměny serinu v pozici 99 a 101 za alanin a pod zinkovým promotorem má vloženu divokou formu genu *glmM* fúzovanou s Flagovou kotvou.

- d. Analyzovat připravené kmeny Sp283 a Sp369 (mikroskopická analýza, imunodetekce proteinu GlmM-Flag a růstové křivky v přítomnosti $ZnCl_2$) a prokázat přímou souvislost fosforylace serinových zbytků v pozici 99 a 101 u GlmM s životaschopností *S. pneumoniae*.
 - e. Připravit revertantní kmen Sp392 a prokázat, že pozorovaný fenotyp u deplečního kmene je výsledkem ztráty genu *glmM* v nativním lokusu.
 - f. Pozorování GlmM-deplečního fenotypu v reálném čase.
2. Určit lokalizaci fosfoglukozaminmutázy v buňce *S. pneumoniae*.
 - a. Připravit kmeny Sp331 a Sp332 exprimující fúzní protein GFP-GlmM na pozadí divokých kmenů *S. pneumoniae* Rx a R6.
 - b. Ověřit funkčnost fúzního proteinu GFP-GlmM.
 - c. Fluorescenční mikroskopií určit lokalizaci GlmM v buňce.
3. *In vitro* stanovit místo fosforylace proteinu GlmM kinázou *StkP*.
 - a. Připravit kmeny exprimující v *E. coli* rekombinantní proteiny GlmM S99A a GlmM S101A a purifikovat je pomocí His-tag kotvy.
 - b. Provést *in vitro* kinázovou reakci modifikovaných forem purifikovaného GlmM v přítomnosti proteinkinázy *StkP* a pomocí MS analýzy identifikovat místa fosforylace.
 - c. Provést *in vitro* test autofosforylace purifikovaných modifikovaných proteinů GlmM.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Materiál

6.1.1 Bakteriální kmeny

Použité bakteriální kmeny jsou uvedeny v **Tabulce 2** a **3**. Kultury kmenů, sklizené v exponenciální fázi růstu ($OD_{600} = 0,3-0,4$), byly skladovány v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 15 % glycerolu.

Tabulka 2
Seznam bakteriálních kmenů *S. pneumoniae*

KMEN	GENOTYP	FENOTYP	ZDROJ
Sp1	Rx; <i>str1</i> , <i>hexA</i>	Str ^R	Morrison et al., 1984
Sp10	Rx; <i>str1</i> , <i>hexA</i> , <i>stkP::cat</i>	Str ^R , Cm ^R	P. Branny
Sp217	Rx; <i>bga::PczcD-glmM-flag</i>	Str ^R , Tet ^R	J. Krupička
Sp225	R6; <i>gen rpsL</i> z Rx	Str ^R	A. Ulrych
Sp245	R6; <i>bga::PczcD-glmM-flag</i>	Tet ^R	J. Krupička
Sp262	R6; Δ <i>glmM I::janus bga::PczcD-glmM</i>	Kan ^R , Tet ^R	J. Krupička
Sp263	R6; Δ <i>glmM I::janus bga::PczcD-glmM-flag</i>	Kan ^R , Tet ^R	J. Krupička
Sp282	R6; Δ <i>glmM II::janus bga::PczcD-glmM</i>	Kan ^R , Tet ^R	Tato práce
Sp283	R6; Δ <i>glmM bga::PczcD-glmM-flag</i>	Str ^R , Tet ^R	Tato práce
Sp331	Rx; <i>bga::PczcD-gfp-glmM</i>	Str ^R , Tet ^R	Tato práce

KMEN	GENOTYP	FENOTYP	ZDROJ
Sp332	R6; <i>bga::PczcD-gfp-glmM</i>	Str ^R , Tet ^R	Tato práce
Sp367	Rx; Δ <i>glmM::janus bga::PczcD-gfp-glmM</i>	Kan ^R , Tet ^R	Tato práce
Sp368	R6; Δ <i>glmM::janus bga::PczcD-gfp-glmM</i>	Kan ^R , Tet ^R	Tato práce
Sp369	R6; <i>glmM S99/101A bga::PczcD-glmM-flag</i>	Str ^R , Tet ^R	Tato práce
Sp391	R6; Δ <i>glmM::janus bga::PczcD-glmM-flag</i> <i>znovu vložen</i>	Kan ^R , Tet ^R	Tato práce
Sp392	R6; <i>bga::PczcD-glmM-flag; GlmM_{wt}</i> <i>znovu vložen (revertantní kmen)</i>	Str ^R , Tet ^R	Tato práce
Sp415	R6; <i>bga::PczcD-glmM-flag S99A</i>	Str ^R , Tet ^R	Tato práce
Sp416	R6; <i>bga::PczcD-glmM-flag S101A</i>	Str ^R , Tet ^R	Tato práce
Sp417	R6; <i>bga::PczcD-glmM-flag S99E</i>	Str ^R , Tet ^R	Tato práce
Sp418	R6; <i>bga::PczcD-glmM-flag S101E</i>	Str ^R , Tet ^R	Tato práce

Tabulka 3
Seznam bakteriálních kmenů *E. coli*

KMEN	GENOTYP	POUŽITÍ	ZDROJ
Ec DH5α	<i>(fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1relA1 endA1 thi-1 hsdR17)</i>	Kompetentní buňky, použity k propagaci plazmidových vektorů	Invitrogen
Ec BL21	<i>(fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS)</i>	Exprese rekombinantních bílkovin v <i>E. coli</i>	Invitrogen
Ec50	<i>BL21; pEXStk-T</i>	Exprese kinázové domény proteinu StkP	Lab.archiv
Ec255	<i>DH5α; pJWV25-glmM-flag</i>	Propagace vektoru <i>pJWV25-glmM-flag</i>	Tato práce
Ec428	<i>BL21; pET28b-glmM</i>	Exprese His-GlmM	Lab.archiv
Ec432	<i>BL21; pET28b-glmM S101A</i>	Exprese His-GlmM S101A	Lab.archiv
Ec440	<i>BL21; pET28b-glmM S99A</i>	Exprese His-GlmM S99A	Tato práce

6.1.2 Vektory a kazety

Janus kazeta

Janus kazeta je lineární, 1333 pb dlouhý konstrukt určený pro delecí genů streptomycin rezistentních kmenů *S. pneumoniae*. Tento konstrukt kóduje gen pro kanamycinovou rezistenci a dominantní alelu genu *rpsL*⁺, která, v diploidním stavu, tedy po vložení kazety do genomu, uděluje buňkám citlivost ke streptomycinu (Sung et al., 2001). Pomocí Janus kazety byl odstraněn gen *glmM* z nativního lokusu.

pJWV25

Tento vektor o velikosti 8578 pb je určený pro expresi fúzních proteinů s GFP (Green Fluorescent Protein – zelený fluorescenční protein) v pneumokokovi. Obsahuje okrajové oblasti *bga* lokusu chromozomální DNA (chDNA) *S. pneumoniae* (sekvence *gatC* a *bga A*). Lokus *bgaA* je pro *S. pneumoniae* v laboratorních podmínkách postradatelný, a tak je umožněna integrace *pJWV25* do chromozomu pomocí homologní rekombinace. *pJWV25* vektor kóduje sekvenci pro inducibilní zinkový promotor P_{zcd} a výše zmíněný gen *gfp* pro N-koncové fúze. Dále nese gen kódující rezistenci k tetracyklinu, pro selekci v *S. pneumoniae* a gen kódující rezistenci k ampicilinu pro selekci v *E. coli* (Eberhardt et al., 2009). V této práci byl plasmid *pJWV25* použit pro přípravu fluorescenčního proteinu GFP-GlmM.

pET289b

Plasmid *pET28b*, o velikosti 5369 pb, je určený pro klonování a expresi proteinů. Expese proteinů je pod kontrolou *T7lac* promotoru. Dále umožňuje fúzi N-terminálního nebo C-terminálního konce proteinu s histidinovou kotvou (6x His). Pro selekci nese tento komerční vektor (Novagen) rezistenci ke kanamycinu.

Přehled všech výchozích i vytvořených plasmidů je uveden v **Tabulce 4**.

Tabulka 4
Seznam použitých plasmidů s jejich využití

PLASMID	REZISTENCE	POUŽITÍ
<i>pZn-glmM-flag</i>	Tet ^R , Amp ^R	Příprava plasmidu <i>pZn-glmM-flag S99/101A</i>
<i>pZn-glmM-flag S99/101A</i>	Tet ^R , Amp ^R	Příprava kmene Sp369 (R6; <i>glmM S99/101A bga::PczcD-glmM-flag</i>) s aminokyselinovými záměnami
<i>pJWV25</i>	Tet ^R , Amp ^R	Příprava plasmidu <i>pJWV25-glmM</i>
<i>pJWV25-glmM</i>	Tet ^R , Amp ^R	Přípravu fluorescenčního proteinu GFP-GlmM (kmeny Sp331, Sp332, Sp367 a Sp368)
<i>pET28b</i>	Kan ^R	Příprava plasmidu <i>pET28b-glmM S99A</i>
<i>pET28b-glmM S99A</i>	Kan ^R	Příprava kmene Ec 440 (BL21; <i>pET28b-glmM S99A</i>) s aminokyselinovou záměnou
<i>pZn-GlmM S99A-flag</i>	Tet ^R	Příprava kmene Sp415 (R6; <i>bga::PczcD-glmM-flag S99A</i>)
<i>pZn-GlmM S101A-flag</i>	Tet ^R	Příprava kmene Sp416 (R6; <i>bga::PczcD-glmM-flag S101A</i>)
<i>pZn-GlmM S99E-flag</i>	Tet ^R	Příprava kmene Sp417 (R6; <i>bga::PczcD-glmM-flag S99E</i>)
<i>pZn-GlmM S101E-flag</i>	Tet ^R	Příprava kmene Sp418 (R6; <i>bga::PczcD-glmM-flag S101E</i>)

6.1.3 Oligonukleotidy

V **Tabulce 5** jsou uvedeny použité oligonukleotidy. Oligonukleotidy byly navrženy pomocí programu SeqBuilder (Lasergene), a objednány u firmy Sigma Aldrich.

Tabulka 5
Seznam oligonukleotidů a jejich využití

NÁZEV	SEKVENCE 5'→3'	VYUŽITÍ
AU61	CGGCTACAATATTATAAGCTAT	Amplifikac <i>glmM</i>
AU62	AAGCAACTAGTTCAAAAACGAA	Amplifikace <i>glmM</i>
AU64	ATAAGATTATCGCTGTCTTGC	Sekvenace <i>glmM</i>
AU65	AGGGCTGGGTTGTG <u>GGC</u> AGCAGCAATCATGACAC	Místně specifická mutageneze <i>glmM</i> -dvojtá záměna Ser99 a Ser101 za Ala
AU66	GTGTCATGATT <u>GCT</u> GCTGCCCAACCCAGCCCT	Místně specifická mutageneze <i>glmM</i> -dvojtá záměna Ser99 a Ser101 za Ala
AU94	CGCGACTAGTGGTAAATATTTT	Amplifikace <i>glmM-flag</i>
AU95	CGAAGCGGCCGCTTACTTAT	Amplifikace <i>glmM-flag</i>
AU97	ATGGGTAAATATTTTGGGACTG	Fúze konstrukt <i>glmM</i> S99/101A – okolí
AU98	TTAGTCAATCCCAATTCAGCA	Fúze konstrukt <i>glmM</i> S99/101A – okolí
AU99	CAGTCCCAAATATTTACCCAT	Fúze konstrukt <i>glmM</i> S99/101A – okolí
AU100	TGCTGAAATTGGGATTGACTAA	Fúze konstrukt <i>glmM</i> S99/101A – okolí
JG29	GGGCCCTTTCCTTATGCTT	Ověření vložení konstrukt JanusKΔ <i>glmM</i>
JK002	AAGGAGGCAAATATGGGTAAATATTTTGGGACTG	Amplifikace <i>glmM</i>

NÁZEV	SEKVENCE 5'→3'	VYUŽITÍ
JK006	AACGTATCGCTGTGACGTCT	Fúze konstruktů glmM S99/101A – okolí
JK009	TCAATTAAGCGCTTGGTGGC	Fúze konstruktů glmM S99/101A – okolí
JK12	AATGACCCGGTATTGACCTG	Ověření vložení konstruktů JanusKΔglmM
JK13	ACACAGGAGAATGTAGATGCC	Ověření vložení konstruktů JanusKΔglmM
LN142	AGGACAAGAGTTTTTCTTTGG	Ověření vložení derivátů plasmidu <i>pJWV25</i> do <i>bga</i> lokusu
LN143	GTTACGTTGATTCATCACC	Ověření klonování do <i>pJWV25</i> vektoru

6.1.4 Enzymy

Polymerázy

LA DNA polymerázový mix (Top Bio)

Phusion polymeráza (New England Biolabs - NEB)

Purple Taq polymeráza (Top Bio)

PfuUltra HF DNA polymeráza (Agilent)

Restrikční enzymy

PvuI (NEB)

DpnI (NEB)

SpeI (NEB)

NotI (NEB)

Ostatní enzymy

Benzonáza (Merck)

Proteináza K (Roche)

4 DNA ligáza (Fermentas)

6.1.5 Kultivační půdy, použitá antibiotika a induktory exprese

Množství jednotlivých složek je udáváno na 1 litr média, do celkového objemu se doplňují destilovanou vodou. Pokud není uvedeno jinak, média jsou skladována při 4 °C a sterilizována autoklávem. Do pevných půd byl přidán 1,5 % agar. Příprava selekčních půd se uskutečnila přidáním příslušného antibiotika ze zásobního roztoku. Koncentrace antibiotik v selekčních médiích je uvedena v **Tabulce 6**.

Tabulka 6
Koncentrace antibiotik v selekčním médiu

BAKTERIÁLNÍ KMEN	ANTIBIOTIKUM	KONCENTRACE V SELEKČNÍM MÉDIU [µg/ml]
<i>E. coli</i>	Ampicilin	100
<i>E. coli</i>	Kanamycin	25
<i>S. pneumoniae</i>	Tetracyklin	2,5
<i>S. pneumoniae</i>	Kanamycin	200
<i>S. pneumoniae</i>	Streptomycin	500

V případě kmenů *S. pneumoniae*, které obsahují vložené geny pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru, byl do média přidáván také induktor exprese ZnCl₂. Koncentrace přidaného induktoru se lišila v závislosti na kmeni a použitém médiu. Jako kontrolní hladina ZnCl₂ pro kmeny R6 byla používána koncentrace 0,2 mM v C+Y médiu a 0,1 mM v TSB médiu a gelóze. Na krevním agaru byla běžně používána koncentrace ZnCl₂ 0,1 mM, ale u některých konstruktů po přeočkování kolonií na krevní agar transformanty vyžadovaly vyšší koncentrace induktoru. Podmínky přípravy těchto kmenů jsou shrnuty v **Tabulce 7**.

Pro indukce exprese rekombinantního proteinu v *E. coli*, který je pod kontrolou *T7lac* promotoru bylo použito 0,5 mM IPTG.

Tabulka 7

Podmínky přípravy kmenů, které obsahují vložené geny pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru

Finální kmen byl připraven transformací konstruktů (3. sloupec) do výchozího kmene (2. sloupec).

FINÁLNÍ KMEN	VÝCHOZÍ KMEN	KONSTRUKT POUŽITÝ PRO PŘÍPRAVU FINÁLNÍHO KMENE	MÉDIUM PRO TRANSFORMACI	VÝSEV TRANSFORMANTŮ DO GELÓZY	SELEKCE TRANSFORMANTŮ NA KREVNÍM AGARU
Sp283 R6; $\Delta glmM$ <i>bga::PczcD-glmM-flag</i>	Sp263 R6; $\Delta glmM::janus$ <i>bga::PczcD-glmM-flag</i>	$\Delta Janus$	TSB; 0,1 mM ZnCl ₂	0,1 mM ZnCl ₂ ; Str ^R	0,3 mM ZnCl ₂ ; Kan ^S , Str ^R
Sp369 R6; <i>glmM S99/101A bga::PczcD-glmM-flag</i>	Sp263 R6; $\Delta glmM::janus$ <i>bga::PczcD-glmM-flag</i>	<i>glmM S99/101A</i> -okolí	TSB; 0,1 mM ZnCl ₂	0,1 mM ZnCl ₂ ; Str ^R	0,3 mM ZnCl ₂ ; Kan ^S , Str ^R
Sp391 R6; $\Delta glmM::janus$ <i>bga::PczcD-glmM-flag</i>	Sp369 R6; <i>glmM S99/101A bga::PczcD-glmM-flag</i>	JanusK $\Delta glmM$	TSB; 0,1 mM ZnCl ₂	0,1 mM ZnCl ₂ ; Kan ^R	0,3 mM ZnCl ₂ ; Kan ^R , Str ^S
Sp392 R6; <i>bga::PczcD-glmM-flag</i>	Sp391 R6; $\Delta glmM::janus$ <i>bga::PczcD-glmM-flag</i>	<i>glmM</i> -okolí	TSB; 0,1 mM ZnCl ₂	Str ^R	Kan ^S , Str ^R

Kan^R

–

kanamycinová

rezistence,

Str^R

–

streptomycinová

rezistence

Média pro kultivaci *S. pneumoniae*

Kultivace *S. pneumoniae* probíhala v tekutém i na pevném médiu, staticky při 37 °C.

C+Y médium (Lacks a Hotchkiss, 1960)

Použité roztoky:

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.

ADAMS I (objem 500 ml): biotin 75 mg; 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 v autoklávu

ADAMS II (objem 500 ml): FeSO₄.7H₂O 500 mg; CuSO₄.5H₂O 500 mg; ZnSO₄.7H₂O 500 mg; MnCl₂.4H₂O 200 mg; sterilizace 15 min varem

ADAMS III (objem 100 ml): ADAMS I 16 ml; ADAMS II 0,4 ml; L-asparagin 0,175 g; cholin 0,02 g; CaCl₂ 0,05 g; MgCl₂.6H₂O 2 g; pH 7,6, sterilizace filtrací

Příprava média C+Y:

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; 8 % BSA 10 ml pouze pro kmeny odvozené od kmene *S. pneumoniae* R6; 1M HCl 20 ml; pH 6,8.

Kromě glukózy a Pre-C se uvedené složky média sterilizují filtrací.

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 (upraveno pomocí 1M NaOH)

Gelóza

Glukóza 1 g; NaCl 5 g; 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; pokud bylo třeba, byl na krevní agar kromě selekčního antibiotika přidáván také $ZnCl_2$

Média pro kultivaci *E. coli*

Kultivace *E. coli* probíhala v tekutém i na pevném médiu, aerobně při 37 °C. Pokud bylo třeba přidat antibiotikum do pevného média, bylo přidáno do roztoku o teplotě 50 °C.

LB médium (Lauria Bertani)

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

6.1.6 Roztoky, pufrý a standardy

DNA agarózová elektroforéza:

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

Gel Loading Dye Purple 6x (NEB)

GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)

Izolace chDNA:

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

NaCl-EDTA - 150 mM NaCl; 30 mM EDTA; pH 8

SEDS-NaCl-EDTA : DCNa-SDS (24:1) - 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8

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

SDS PAGE:

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

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

STOP pufr - 0,125 M Tris, pH 6,8, 4 % SDS; 20 % glycerol;
10 % β -merkptoethanol, 0,02 % BPB

Color Prestained Protein Standard Broad Range 245-11 kDa (NEB)

Colloidal Coomassie Blue (CCB) - 0,02 % Coomassie blue G-250; 5 % $Al_2(SO_4)_3$;
10 % čistý etanol; 2 % H_3PO_4
(Dyballa a Metzger, 2009)

Izolace a přenos proteinů, imunodetekce:

Blotovací pufr	- 48 mM Tris; 39 mM glycin; 0,0375 % SDS; 20 % methanol
Blotovací pufr	- TBS -T pufr, 5 % BSA
Dezintegrační pufr	- 10 mM Tris; 100 mM NaCl; pH 7,5
Roztok TBS-T	- 20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,05% Tween-20; pH 7,6
Amidová čern	- 40 % metanol; 10 % kyselina octová; 0,1 % amidová čern
ECL Substrát	- SuperSignal WEST Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) a WesternBright ECL HRP substrate (Advansta)

Izolace bílkovin *S. pneumoniae*

Lyzační pufr	- 25 mM Tris-base; 50 mM NaCl; pH 7,5
Diluční pufr	- 0 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; pH 7,5
SEDS (A+B, 24:1)	- A: 150 mM NaCl; 30 mM EDTA, pH 8,0 B: 0,5 % DCNa; 0,25 % SDS

Izolace, purifikace, dialýza bílkovin *E. coli*

Lyzační pufr	- 50 mM NaH ₂ PO ₄ H ₂ O; 300 mM NaCl; 10 mM imidazol; pH 8,8
Omývací pufr	- 50 mM NaH ₂ PO ₄ H ₂ O; 300 mM NaCl; 20 mM imidazol; pH 8
Eluční pufr	- 50 mM NaH ₂ PO ₄ H ₂ O; 300 mM NaCl; 250 mM imidazol; pH 8
Dialyzační pufr	- 25 mM Tris-base; 100 mM NaCl; pH 7,5

Ligace

Ligační pufr	- 400 mM Tris-HCl; 100mM MgCl ₂ ; 100mM, DTT; 5mM ATP, pH 7,8
--------------	---

Kinázová reakce

Kinázový pufr	- 25 mM Tris, 25 mM NaCl, 0-5 mM MnCl ₂ , 10 μM ATP, pH 7,5
---------------	--

Příprava kompetentních buněk *E. coli*

TFB	- 7,5 ml 1 M RbCl; 3,75 ml 1 M MnCl ₂ ; 2,25 ml 1M K acetát; 0,35 ml 1 M CaCl ₂ ; 11, 25 ml glycerol
TFBII	- 2 ml 100 mM MOPS; 1,5 ml 1 M CaCl ₂ ; 3 ml glycerol

6.1.7 Protilátky, imunodetekce

Vybrané proteiny přenesené na PVDF membránu byly detekovány specifickými protilátkami. Postup použití protilátek je shrnut v **Tabulce 8**.

Anti-FLAG (Sigma F7425)

primární králičí protilátka proti proteinům značeným Flagovým epitopem.

Anti-RpoA (Apronex)

primární králičí protilátka proti α -podjednotce RNA polymerázy *S. pneumoniae*.

Anti-Rabbit IgG-POD (Sigma Aldrich)

sekundární protilátka proti králičím IgG, konjugovaná s křenovou peroxidázou.

Anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology)

myší monoklonální protilátka proti GFP, konjugovaná s křenovou peroxidázou.

Tabulka 8
Postup pro použití jednotlivých protilátek

PROTILÁTKA	Anti-RpoA	Anti-GFP	Anti-Flag
Inkubace membrány v blotovacím roztoku	30 minut	Přes noc	30 minut
Ředění primární protilátky	1:10 000 v 3 % BSA/TBS-T	1:10000 v 1 % BSA/TBS-T	1:1000 v 1 % BSA/TBS-T
Inkubace membrány s primární protilátkou	Přes noc	2 hodiny	Přes noc
Promytí membrány roztokem TBS-T 3x 10 minut			
Ředění sekundární protilátky Anti-Rabbit IgG-POD	1:10 000 v TBS/T	-	1:10 000 v TBS/T
Inkubace se sekundární protilátkou Anti-Rabbit IgG-POD	1 hodina	-	1 hodina
Promytí membrány roztokem TBS-T	3 x 10 minut	-	3 x 10 minut

6.1.8 Komerční soupravy a membrány

Následující **Tabulka 9** shrnuje použité komerční soupravy.

Tabulka 9
Komerční soupravy a kity

NÁZEV	VÝROBCE	POUŽITÍ
Min Elue™ Reaction Cleanup Kit	Qiagen	Přečištění fragmentů DNA po PCR reakci
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen	Izolace DNA z agarózového gelu
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen	Izolace plazmidové DNA
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	Měření koncentrace proteinů
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific	Vyvolání chemiluminiscenčního signálu při imunodetekci
WesternBright ECL HRP substrate	Advantisa	
QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene	Místně specifická mutagenese

6.1.9 Laboratorní přístroje, počítačová analýza, software

Centrifugy

Centrifuge 5417C (Eppendorf)

Universal 320R (Hettich)

Optima™ L-90 K Ultracentrifuge (Beckman Coulter), rotor JA-10

Cyklery

Mastercycler gradient (Eppendorf)

BIOER (GenePro)

Vortex

VX-200 Lab Vortexer Vortex Mixer (Labnet)

Vodní lázně

Julabo 7A, 5M, U3 (Julabo)

Elektroforézy

OWL EASYCAST™ B1A (ThermoScientific)

ATTO (Atto)

Spektrofotometry

Du® 730 Life Sciences UV/VIS Spectrophotometer (Beckman Coulter®)

SECOMAM PRIM (BioTech)

NanoDrop Lite (Thermo Scientific)

Evolution 201 (Thermo Scientific)

Váhy

Sartorius-handy (Sartorius)

Sartorius-laboratorz (Sartorius)

Ostatní přístroje

FastPrep (ThermoSavant)

Olympus CellR IX 81 microscope (Olympus)

Olympus FV2T Digital B/W Fireware Camera (Olympus)

Inkubátor IP30-U (LTE Scientific LTD)

GEL BOX, VERTICAL BLOTTER (Labnet)

Magnetická míchačka s ohřevem (ThermoScientific)

Třepačka Innova® 42-Incubator Shakers Series (New Brunswick Scientific)

G:Box Chemi XRQ (SynGene)

Multiphor II (AP Czech)

pH metr – PH114 (Snail Instruments)

scaner – EPSON EXPRESSION 10000 XL

Molecular Imager FX, BIO – Rad – vizualizace radioaktivně značených proteinů

Software

GeneSnap (SynGene) – snímání obrazu gelu pod UV kamerou

SeqBuilder (Lasergene) – návržení genetických map

SeqMan (Leasergene) – ověření sekvenovaných částí genomu

GeneSys (SynGene) – vyvolání imunodetekcí

Cell^R Version 2.0 software – zobrazení obrazu z kamery FV2T Digital B/W

Quantity One 4.6.6. - vizualizace radioaktivně značených proteinů

6.1.10 Chemikálie

Seznam použitých chemikálií je uveden v následující **Tabulce 10**. Všechny uvedené chemikálie dosahovaly analytické čistoty.

Tabulka 10
Seznam použitých chemikálií

NÁZEV	ZKRATKA / VZOREC	VÝROBCE
Aceton	C ₃ H ₆ O	Lach-Ner
Adenosin	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	Sigma-Aldrich
Agaróza		Sevac
Akrylamid	C ₃ H ₅ NO	
Ampicilin	Amp/C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	Sigma-Aldrich
L-Asparagin	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	
Benzonáza		Merk
Biotin	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	Sigma-Aldrich
Bromfenolová modř	BBP	Lachema
Coomassie Blue G-250		Serva
Complete, EDTA-free		Roche
2'-deoxyadenosin - 5'-trifosfát	dATP/C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₂ P ₃	Promega
2'-deoxycytosin - 5'-trifosfát	dCTP/C ₉ H ₁₆ N ₃ O ₁₃ P ₃	
2'-deoxyguanosin - 5'-trifosfát	dGTP/C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	
2'-deoxythymidin - 5'-trifosfát	dTTP/C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O ₁₄ P ₃	
Deoxycholát sodný	DCNa	Sigma-Aldrich
Dihydrogen fosforečnan sodný	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Lachema
Dithiotreitol	DTT	Serva

NÁZEV	ZKRATKA / VZOREC	VÝROBCE
D-glukóza	$C_6H_{12}O_6$	Lach-Ner
Dodecylsulfát sodný	SDS/ $C_{12}H_{25}NaO_4S$	Sigma-Aldrich
Ethanol	$EtOH/C_2H_6O$	Lach-Ner
Fenol	C_6H_6O	Lach-Ner
Gel Red Nucleic Acid Stain		Biotium
L-Glutamin	$C_{10}H_{10}N_2O_3$	Sigma-Aldrich
Glycerol	$C_3H_8O_3$	Lach-Ner
Glycin	$GlyC_2H_5NO_2$	Serva
Heptahydrát síranu zinečnatého	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Sigma-Aldrich
Heptahydrát síranu železnatého	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	
Hovězí sérový albumin, frakce V	BSA	Carl Roth
Chloramfenikol	$Cm/C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	Sigma-Aldrich
Chlorid hořečnatý, hexahydrát	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Lach-Ner
Chlorid manganatý	$MnCl_2$	Lachema
Chlorid sodný	$NaCl$	Lach-Ner
Chlorid vápenatý	$CaCl_2$	Lachema
Chlorid zinečnatý	$ZnCl_2$	Sigma-Aldrich
Chloroform	$CHCl_3$	Lach-Ner
Cholin		Sigma-Aldrich
Imidazol		
Izopropanol	$C_3H_8O_3$	Lach-Ner
Kanamycin	$C_{18}H_{36}N_4O_{11}$	Fluka
Kompetenci stimulující peptid	CSP	Biopharm
Kvasinkový extrakt		Oxoid
Kyselina ethylendiamintetraoctová	EDTA	Sigma-Aldrich

NÁZEV	ZKRATKA / VZOREC	VÝROBCE
Kyselina fosforečná	H ₃ PO ₄	Lachema
Kyselina chlorovodíková	HCl	Lach-Ner
Kyselina nikotinová	C ₆ H ₅ NO ₂	Sigma-Aldrich
Kyselina octová	CH ₃ COOH	Lach-Ner
Kyselina trichloroctová	TCA	Sigma-Aldrich
β-merkptoethanol	C ₂ H ₆ OS	
Methanol	MeOH/CH ₄ O	Lach-Ner
Neopepton		Difco
Octan sodný	NaOAc/CH ₃ COONa	Lach-Ner
Pharmalyt		Sigma-Aldrich
Pentothénát vápenatý	vit B ₅ /C ₉ H ₁₆ NO ₅ .1/2Ca	
Pentahydrát síranu měďnatého	CuSO ₄ .5H ₂ O	
Peroxodisíran amonný	APS/(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Lachema
Piperazin-N,N'-bis-2-ethansulfonová	PIPES/C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₆ S ₂	
Polyoxyetylenorbitan-monolaurat	TWEEN 20/C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Sigma-Aldrich
Pyrodoxin hydrochlorid	vit B ₆ /C ₈ H ₁₁ NO ₃ .HCl	
Pyrohroznán sodný	C ₃ H ₃ NaO ₃	
Riboflavin	vit B ₂ /C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	
Sacharosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	
Síran měďnatý, pentahydrát	CuSO ₄ .5H ₂ O	Lachema
Síran zinečnatý, heptahydrát	ZnSO ₄ .7H ₂ O	
Síran železnatý, heptahydrát	FeSO ₄ .7H ₂ O	
Streptomycin	Str	Fluka
Tetracyklin	Tet/C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	Serva
Tetrahydrát chloridu manganatého	MnCl ₂ .4H ₂ O	Sigma-Aldrich
Tetramethylethylendiamin	TEMED/C ₆ H ₁₆ N ₂	Serva

NÁZEV	ZKRATKA / VZOREC	VÝROBCE
Thyamin hydrochlorid	vit B1/C12	Sigma-Aldrich
Tris-hydroxymethyl-aminomethan	Tris-BASE	
Tris-hydroxymethyl-aminomethan	Tris-HCl	
Urea		Applchem
Uridin	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	Sigma-Aldrich
γ - ³² P-ATP		MGP

6.2 Metody

6.2.1 Manipulace s buňkami *S. pneumoniae*

6.2.1.1 Kultivace *S. pneumoniae*, měření růstu

Všechny kmeny bakterie *S. pneumoniae* byly kultivovány v tekutém médiu (TSB, C+Y), staticky ve vodní lázni bez vzdušnění při teplotě 37 °C, nebo na pevných půdách (gelóza či krevní agar) na Petriho miskách. V případě selekčních půd bylo přidáváno příslušné antibiotikum (tetracyklin – 2,5 µg/ml, streptomycin – 500 µg/ml, kanamycin – 200 µg/ml). Misky s bakteiální kulturou byly kultivovány přes noc v termostatu při teplotě 37 °C.

Kultivace v tekutém médiu probíhala do OD₆₀₀ = 0,45-0,60, kdy byl růst ukončen. V případě indukce exprese genů regulovaných zinkovým inducibilním promotorem byly kmeny kultivovány v přítomnosti různých koncentrací ZnCl₂.

Kmeny *S. pneumoniae* byly uchovávány v glycerolových konzervách, které byly připravovány z narostlé kultury do OD₆₀₀ = 0,3-0,4. Takto narostlá kultura byla rozdělena po 750 µl do mikrozkušavek s 250 µl 60 % glycerolu a skladována při teplotě -80°C. Pro zaočkování do 10ml média bylo použito 200 µl rozmrazené konzervy, což odpovídalo cca OD₆₀₀ = 0,008.

Růstové křivky byly měřeny v TSB a C+Y médiu pomocí spektrofotometru Evolution™ 201/220 UV-Visble (Thermo Scientific). Měření probíhalo automaticky v 10-ti minutových intervalech po dobu osmi hodin při vlnové délce 600 nm.

6.2.1.2 Transformace DNA do *S. pneumoniae*

Transformace buněk *S. pneumoniae* probíhala v kompetenčním TSB médiu (TSBc). K 950 μ l kompetenčního média, které podle potřeby indukce obsahovalo i příslušnou koncentraci zinečnatých iontů, bylo přidáno 50 μ l kultury z konzervy, 250 ng/ml CSP a 20-100 ng PCR produktu nebo plasmidové DNA. Transformační směs byla staticky inkubována 2,5 hodiny při teplotě 37 °C. Po inkubaci byla kultura ředěna kompetenčním médiem a ředění 0-10⁻³ byla vyseta na misky a zalita gelózou o teplotě 50 °C s příslušným selekčním antibiotikem. Ředění 10⁻⁴ a 10⁻⁵ byla vyseta na misky a zalita gelózou bez antibiotika jako kontrola životaschopnosti buněčných kultur. Všechny misky byly kultivovány přes noc při teplotě 37 °C.

V případě jednokrokové selekce byly narostlé kmeny přeočkovány na krevní misky s tetracyklinem jako selekčním antibiotikem, ke kterému požadované klony vykazovaly rezistenci a inkubovány přes noc při 37 °C.

Dvoukroková selekce byla použita výhradně při manipulaci s Janus kazetou. V případě vložení Janus kazety do genomu *S. pneumoniae*, byl použit kanamycin jako selekční antibiotikum v gelóze. Po nárůstu kolonií byly klony přeočkovány na krevní agar se kanamycinem jako selekčním antibiotikem. Proběhla kultivace přes noc při 37 °C. Následně byly klony přeočkovány na dvě krevní misky. V jedné byl do krevního agaru přidán kanamycin a klony, které na něm narostly, byly dále používány. Na druhé misce byl pro kontrolu použit krevní agar se streptomycinem, kde jsme neočekávali žádný nárůst. Mutantní kmeny obsahující Janus kazetu jsou tedy Kan^R a Str^S. V případě odstranění Janus kazety z genomu *S. pneumoniae* byla volena opačná posloupnost použití antibiotik a výsledný kmen byl Kan^S a Str^R.

Pozitivní klony byly zaočkovány z krevních misek do 2 ml TSB média a kultivovány při teplotě 37 °C do zákalu. Z této kultivace byla pak standardním způsobem připravena glycerolová konzerva – tzv. prekonzerva. Následným zaočkováním 200 μ l z prekonzervy do 10 ml TSB média, kultivací do OD₆₀₀ = 0,3-0,4 a vytvořením další glycerolové konzervy, byl kmen připraven pro další použití a dlouhodobou archivaci.

6.2.1.3 Izolace proteinů

Buňky *S. pneumoniae* byly buď mechanicky rozbity (pro použití na purifikaci proteinů), anebo byla použita chemická desintegrace pomocí SEDS roztoku (v případě použití na analýzu celkového lyzátu). Tento roztok obsahuje deoxcholát sodný, který destabilizuje buňky.

Z exponenciálně rostoucí kultury byl při $OD_{600} = 0,4$ odebrán 1 ml kultury. Tato kultura byla uchovávána při teplotě 4 °C, aby nedocházelo k dalšímu růstu. Kultura byla centrifugována (17950x g, 2 min) a médium (supernatant) odstraněno. Pelet byl resuspendován ve 20 μ l roztoku SEDS a vzniklá suspenze byla inkubována při 37 °C, dokud nedošlo k lyzi buněk. Následně bylo k roztoku přidáno 20 μ l 2x vzorkového pufry (SB) a vše bylo povařeno 5 minut. Vzorky byly nanášeny na 1-DE (jednorozměrná elektroforéza v přítomnosti SDS) nebo uchovány pro pozdější použití v -20 °C.

V případě mechanického rozbití buněk byl použit přístroj FastPrep. Kultivace *S. pneumoniae* proběhla v 50 ml média a byla ukončena při $OD_{600} = 0,6$. Následně bylo centrifugací (8600x g, 4 °C, 5 minut) odstraněno médium a peleta s buňkami byla resuspendována v 3,5 ml lyzačního pufry s inhibitorem proteáz Complete® a 1,5 μ l benzonázy. Buňky byly následně rozbíjeny na přístroji FastPrep pomocí skleněných kuliček 4x při rychlosti 4,5 po dobu 20 s. Mezi jednotlivými cykly byly vzorky zchlazeny po dobu 2 minut na ledu. Takto připravený lyzát byl stočen centrifugací (2700x g, 10 minut, 4 °C). Celkové proteiny z buněk (HE) jsou obsaženy v takto vzniklém supernatantu.

6.2.2 Manipulace s buňkami *E. coli*

6.2.2.1 Kultivace *E. coli*

Kultury *E. coli* byly kultivovány v tekutém LB médiu přes noc, při teplotě 37 °C za stálého třepání (200 rpm). Pro kultivaci na pevném médiu bylo použito LB médium s přídavkem 1,5 % agaru a kultivováno v termostatu při teplotě 37 °C přes noc. Jako selekční antibiotikum byl používán ampicilin (100 μ g/ml) případně kanamycin (25 μ g/ml).

Z narostlé kultury v tekutém médiu bylo odebráno 750 μ l do mikrozkušavky s 250 μ l 60 % glycerolu a takto připravené konzervy byly uchovávány při -80 °C pro další použití.

6.2.2.2 Příprava kompetentních buněk a transformace DNA do *E. coli*

Do 20 ml tekutého LB média byly zaočkovány kmeny buněk *E. coli* (DH5 α). Kultivace probíhala za stálého třepání (200 rpm) při teplotě 37 °C přes noc. Druhý den ráno byla kultura přeočkována do 100 ml LB média, $OD_{600} = 0,008-0,01$. Následně byla kultura kultivována při 37 °C na třepačce (200 rpm) až do dosažení exponenciální fáze a poté zchlazena na ledu (v 50ml falkonkách po dobu 10 minut). Následovala centrifugace (v 50 ml falkonce; 1000x g). Supernatant byl odstraněn a peleta byla opatrně resuspendována v 25 ml TFB pufry. Vzniklá suspenze buněk byla centrifugována (1000x g, 10 min, 4 °C) a pelet byl opět opatrně resuspendován v 8 ml TFB II

pufri. Poté byla buněčná suspenze pipetována po 100 µl do mikrozkušavek při teplotě 4 °C a zamrazena do -80 °C v tekutém dusíku.

6.2.2.3 Izolace plasmidů

Pro izolaci plasmidu byly kultury zaočkovány do 10 ml tekutého média s příslušným antibiotikem. Kultivace probíhala na třepačce do druhého dne, při teplotě 37 °C. Izolace plasmidu byla provedena pomocí komerční sady QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen).

Koncentrace izolované DNA byla určena pomocí spektrofotometru za použití přístroje NanoDrop Lite (Thermo Scientific) při vlnové délce 260nm a DNA rozdělena v agarozovém gelu.

6.2.2.4 Expres proteinů pod IPTG inducibilním promotorem

Pro expresi proteinů pod IPTG inducibilním promotorem, byly kmeny *E. coli* kultivovány přes noc za stálého třepání (200 rpm) při teplotě 37 °C v 10 ml LB média s příslušným antibiotikem. Z této kultury bylo druhý den zaočkováno 2,5 ml do 50 ml čistého LB média s antibiotikem. Dále probíhala kultivace za snížené teploty 30 °C aby nedocházelo k ukládání nadprodukovaného rekombinantního proteinu do inkluzních tělísek buňky. Takto byla kultura kultivována až do dosažení $OD_{600} = 0,6$, kdy byl odebrán 1 ml vzorku před indukcí exprese. Bezprostředně po odebrání prvního vzorku, byl ke kultuře přidán induktor exprese 0,5 mM IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), v tomto čase začala exprese proteinu kódovaného na plasmidu pod IPTG inducibilním promotorem. Kultivace pokračovala s induktorem další 3 hodiny, kdy byl odebrán druhý kontrolní vzorek (1 ml). Zbytek kultury byl stočen (6000 x g, 10 minut, 4 °C) a použit dále pro purifikaci proteinů.

Oba odebrané vzorky, před indukcí a po indukci IPTG, byly stočeny (18000 x g, 3 minuty) a pelety resuspendovány v 1x SB (první vzorek v 50 µl, druhý v 100 µl pufri). Vzorky byly povařeny 10 minut a na 1-DE gel bylo vždy nanášeno 20 µl vzorku. Gel s rozdělenými proteiny byl obarven pomocí CCB barvení.

6.2.2.5 Izolace a purifikace proteinů pomocí histidinové značky (His Tag)

Pelet ze zbytku kultury po expresi proteinů pod IPTG inducibilním promotorem byl resuspendován v lyzačním pufri (50 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 300 mM NaCl, 10 mM imidazol; pH 8,8) s inhibítorem proteáz Complete® a lyzozymem (1 mg/ml). Tato směs byla uchovávána na ledu a buňky byly dezintegrovány na přístroji French Press. Následně byla centrifugací (10000x g, 20 minut, 4 °C) oddělena rozpustná frakce s bílkovinami v nativním stavu – hrubý extrakt (HE) od

nerozpustné frakce s inkluzními tělísky. Z obou frakcí bylo odebráno 5 µl a přidáno 5 µl 2x SB pro kontrolní 1-DE gel.

Hrubý extrakt byl dále použit pro purifikaci proteinů označených histidinovou značkou. Pro tento účel byla použita kolonka s NiNTa resinem (Qiagen), dle pokynů výrobce. Byl jímán fluát (FL) – frakce nenavázaných proteinů bez histidinových zbytků. Dále byl resinový komplex 2x propláchnut promývacím pufrem (50 mM NaH₂PO₄ H₂O; 300 mM NaCl; 20 mM imidazol; pH 8), čímž vznikly dvě oplachové frakce (W). A na závěr byly bílkoviny značené histidinovou kotvou uvolněny z kolonky do 5-ti frakcí po 500 µl elučním pufrem (50 mM NaH₂PO₄ H₂O; 300 mM NaCl; 250 mM imidazol; pH 8) (eluční frakce EL).

Z každé frakce (fluát, oplachová frakce a eluční frakce) byl připraven vzorek na kontrolní 1-DE gel. Vzorky byly smíchány s 2x SB v poměru 1:1, kromě oplachové frakce, která byla ředěna s 5x SB v poměru 4:1.

6.2.2.6 Dialýza purifikovaných bílkovin

Pro dialýzu bílkovin byly použity dialyzační kazety (Thermo Scientific, kat. č.: 1060), které byly použity dle pokynů výrobce. Dialýza probíhala v dialyzačním pufru o objemu 1 l za stálého míchání, při teplotě 4 °C. Dialyzační pufr (25 mM Tris, 100mM NaCl, výsledné pH 7,5) byl vyměněn po jedné hodině za čistý. Dále probíhala dialýza přes noc. Ráno byl pufr opět vyměněn za čistý a po jedné hodině byla dialýza ukončena. Po odebrání proteinového vzorku z dialyzační kazety byl přidán glycerol tak, aby výsledná koncentrace glycerolu v roztoku dosahovala 5 %. Pomocí BCA stanovení byla změřena koncentrace proteinů, vzorek rozdělen po 100 µl a uskladněn při teplotě -80°C

6.2.3 Manipulace s DNA

6.2.3.1 Polymerázová řetězová reakce

Metoda polymerázové řetězové reakce je používána k rychlému syntetizování daného úseku DNA. Je využito cyklické replikace (denaturace, hybridizace oligonukleotidů a elongace požadovaného úseku DNA), kdy v každém dalším cyklu jsou využívána stará i nově syntetizovaná vlákna.

Pro požadovaný úsek DNA jsou navrženy dva oligonukleotidy, ze kterých amplifikace probíhá. Teplota hybridizace oligonukleotidů (T_m) se odhaduje na základě jejich sekvence dle vzorce: $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$.

Časy a teploty jednotlivých částí reakce jsou závislé na délce amplifikovaného fragmentu a na typu použité polymerázy. Byla tedy zvolena dle pokynů výrobce.

V případě klonování, amplifikace a fúze DNA byla použita termostabilní Phusion DNA polymeráza (NEB), která je pro svoji nízkou chybovost vhodná k takovýmto účelům. Pro kontrolní účely (koloniová PCR) byla používána Taq-Purple DNA polymeráza (TOP-BIO). Použití této polymerázy je ekonomicky výhodnější a amplifikace rychlejší. Nevýhoda tohoto enzymu spočívá v tom, že polymeráza Taq-Purple postrádá 3'→5' exonukleázovou aktivitu a není schopna opravovat vzniklé chyby.

Metoda PCR byla využita i jako fúzní PCR v případě přípravy konstruktů glmM-okolí či glmM S99/101A-okolí. Nejdříve byly amplifikovány jednotlivé úseky konstruktů, které byly poté spojeny. Pro amplifikaci bylo využito oligonukleotidů, které obsahovaly překryvné sekvence a které následně dovolily jednotlivé úseky spojit dohromady.

6.2.3.2 Místně specifická mutagenese

Cílená mutagenese je PCR metoda, která se používá k *in vitro* mutagenese úseku DNA. Delecí, inzercí nebo záměnou sekvence dochází k výměně jedné aminokyseliny za jinou. V této práci byla cílená mutagenese použita pro záměnu serinu 99 a 101 v *glmM* za alanin.

K vytvoření této záměny byla použita komerční souprava QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) dle pokynů výrobce a speciálně navržené oligonukleotidy pro požadovanou změnu. Produkt PCR byl štěpen restriční endonukleázou *DpnI* (NEB), která štěpí pouze původní již methylovaná vlákna DNA, zatímco nově syntetizovaná vlákna, která nejsou methylovaná a nesou požadovanou mutaci, neštěpí. Tento produkt byl ověřen sekvenací a použit pro přípravu konstruktů glmM S99/101A-okolí (viz kap. 7.1.2.2.).

6.2.3.3 DNA elektroforéza v agarózovém gelu

K analýze a izolaci plasmidů a jednotlivých PCR fragmentů bylo využito elektroforetické rozdělení v agarózovém gelu. Vzorky pro DNA elektroforézu byly připraveny smícháním produktu PCR s 6x koncentrovaným Loading Dye (Thermo Scientific) pufrům. Pro určení velikosti jednotlivých fragmentů byl na gel nanášen také DNA standart GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Koncentrace agarózy (SIGMA) v gelu byla 0,8 % a pro zviditelnění pod UV zářením bylo přidáno barvivo GelRed (Biotium). Elektroforéza probíhala v TAE pufru při napětí 90 V po dobu 1 hodinu na přístroji OWL EASYCAST™ BIA (Thermo Scientific).

Pro izolaci jednotlivých fragmentů z gelu byl požadovaný fragment z gelu vyříznut a použita komerční souprava QIAquick® Gel extraction Ki (Qiagen) dle pokynů výrobce. Případně byly PCR fragmenty přímo přečištěny komerční soupravou MinElute® Reaction Cleanup Kit (Qiagen) dle pokynů výrobce.

6.2.3.4 Izolace chDNA

Kultura *S. pneumoniae* byla kultivována standardním způsobem v TSB médiu a objemu 10 ml do OD₆₀₀ = 0,6. Následně byly buňky zbaveny média centrifugací (2760 x g, 10 minut) a resuspendovány ve 250 µl roztoku SEDS. Takto připravený vzorek byl inkubován 10 minut při teplotě 37 °C. Když došlo k lyzy buněk, byla přidána proteinkináza K (10 µg). Následovala další inkubace 15 minut při 56°C. Po degradaci proteinů bylo ke vzorku přidáno 250 µl TE pufru a 500 µl směsi fenol/chloroform. Vzorek byl v mikrozkuhavce několikrát překlopen a následovala centrifugace (1749 x g, 10 minut). Po centrifugaci byla odebrána vodná fáze, která obsahuje DNA a smíchána s 500 µl chloroformu. Vzorek byl opět stočen a k vodné fázi bylo přidáno 50 µl 3 M NaOAc a 500 µl izopropanolu. Po následném překlápní došlo k vysrážení chromozomální DNA (chDNA). Vysrážená chDNA byla stočena, supernatant odstraněn, pelet byl opláchnut 500 µl 80 % EtOH a rezpuštěn ve 100 µl vody. Koncentrace chDNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific).

6.2.3.5 Štěpení DNA

Restrikční endonukleázy jsou enzymy, které dokáží rozštěpit dvouvláknovou DNA na určitých (restrikčních) místech. V této práci byly použity enzymy *PvuI* a *DpnI* (NEB) dle pokynů výrobce. Po ukončení štěpení byla velikost fragmentů zkontrolována DNA elektroforézou v agarózovém gelu. Dále byly fragmenty přečištěny pomocí komerční soupravy MinElute™ Reaction Cleanup Kit (Qiagen) dle pokynů výrobce. Takto přečištěný fragment byl uchován při teplotě -20°C.

6.2.4 Manipulce s proteiny

6.2.4.1 Stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA

Koncentrace proteinů ve vzorku byla stanovena pomocí komerční soupravy Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) dle pokynů výrobce.

6.2.4.2 Kinázová reakce in vitro

Kinázová reakce je založena na přenosu fosfátových skupin z donoru, kterým je ATP, na substrát, kterým je protein GlmM, GlmM S99A či GlmM S101A. Kinázová doména StkP-KD

funguje jako katalyzátor reakce. Reakce probíhaly 20 min při teplotě 37 °C v kinázovém pufru (25 mM Tris, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0-5 mM MnCl₂, 10 μM ATP, pH 7,5) s přidavkem 2 μg purifikovaného proteinu GlmM a 2 μg purifikované kinázové domény. Celkový objem reakce byl 20 μl. Reakce byla spuštěna přidavkem ATP a zastavena přidavkem 5x SB pufru. Následně byly vzorky povařeny a uchovány v -20 °C.

6.2.4.3 Polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti SDS (1-DE)

K separaci bílkovin byla použita polyakrylamidová gelová elektroforéza. Tato separační metoda je založena na elektroforetické pohyblivosti proteinů, která je závislá pouze na jejich molekulové hmotnosti. Pomocí dodecylsulfátu sodného (SDS) je dosaženo u všech proteinů shodného záporného náboje.

Proteinové vzorky byly před nanesením smíchány se vzorkovým pufrům (SB) a denaturovány varem. Takto připravené vzorky byly nanášeny na dráhy polyakrylamidového gelu nebo uchovány pro další použití při teplotě -20 °C. Elektroforéza probíhala v elektroforetickém pufru při napětí 15 V/cm². Byly používány 10 % a 12 % separační gely a 4 % zaostřovací gel. V následující **Tabulce 11** je uvedeno složení jednotlivých gelů.

Tabulka 11
Složení polyakrylamidových gelů na 1-DE

KONCENTRACE	4 %	10 %	12 %
30 % akrylamid	800 μl	6,7 ml	8 ml
0,5 M Tris/base; pH 8,8	1,5 ml	-	-
1,5 M Tris/base; pH 8,8	-	5 ml	5 ml
10% SDS	60 μl	200 μl	200 μl
10% APS	60 μl	200 μl	200 μl
TEMED	7,5 μl	20 μl	20 μl
H ₂ O	3,6 ml	7,9 ml	6,6 ml
Celkový objem	6 ml	20 ml	20 ml

6.2.4.4 Přenos proteinů na membránu a jejich detekce

Pro detekci rozdělených proteinů specifickou protilátkou, bylo nutné přenést tyto proteiny na PVDF (polyvinylidendifluorid) membránu Immobilon®-P (Millipore). Tato hydrofobní membrána byla před použitím smočena v methanolu a opláchnuta 1x blotovacím pufrům (48 mM Tris, 39 mM glycin, 0,0375 % SDS, 20 % methanol). Přenos proteinů probíhal v mokřém elektroblotovacím přístroji (GEL OX VERTICAL BLOTTER, Labnet). Gel s membránou byl vložen do blotovacího sendviče a ponořen do blotovacího pufru. Samotný přenos trval 30 minut při 360 mA.

6.2.4.5 Detekce proteinů koloidní Coomassie Blue

K barvení 1-DE gelů byla použita barva Colloidal Coomassie Blue G-250 (CCB). Po vyjmutí gelu z 1-DE elektroforézy byl gel opláchnut 3 x 10 minut v deionizované vodě a poté vložen do barvy. Barvení probíhalo přes noc za stálého kývání a pokojové teplotě. Druhý den byla barva vyměněna za deionizovanou vodu a za stálého kývání bylo odbarveno pozadí gelu.

6.2.4.6 Příprava vzorků pro analýzu hmotnostní spektrometrií

Na 12 % proteinový gel jsme nanесли produkt kinázové reakce, který odpovídá 2 a 4 μg proteinu a nechali jsme proběhnout 1-DE za standartních podmínek. Následně jsme gel obarvili pomocí Coomassie Blue G-250 a vyřezané proteinové proužky jsme odeslali k analýze hmotnostní spektrometrií (MS) do Biocevu.

6.2.4.7 Kinázová reakce s *in vitro* radioaktivním značením

Kinázová reakce s radioaktivním značením probíhala v kinázovém pufru, ke kterému bylo přidáno 1-10 μg purifikovaného proteinu a 1 μg purifikované kinázové domény. K nosičovému ATP o výsledné koncentraci 10 μM bylo přidáno 1 μCi γ - ^{32}P -ATP. Přidáním ATP k reakční směsi byla spuštěna kinázová reakce, která probíhala při 37 °C a po 20-ti minutách byla ukončena přidáním 5 μl 5x SB pufru. Vzorky byly povařeny 3 minuty při 100 °C a elektroforeticky rozděleny. Proteiny v gelu byly obarveny pomocí Coomassie Blue G-250 a gel usušen. Dále byl gel nechán exponovat na citlivou fólii (Fuji). Radioaktivní proteiny byly vizualizovány na přístroji Molecular Imager FX, Bio-Rad a analyzovány pomocí programu Quantity One 4.6.6.

Autofosforylační aktivita byla testována také v kinázovém pufru na samotné kinázové doméně StkP-KD bez přídavku substrátu či na samotném substrátu GlmM bez přídavku StkP-KD.

6.2.5 Mikroskopie

Bakterie *S. pneumoniae* byly pozorovány pod mikroskopem Olympus CellR IX 81 (Olympus) s imerzním objektivem 100x O2PH-UPLFLN/1.3 N.A. Oil a fluorescenčními filtry. Obraz byl zachycen kamerou Olympus FV2T Digital B/W Fireware (Olympus) a zpracován v programu CellR verze 2.0.

Preparáty na mikroskopii byly připraveny nanesením 3 μ l exponenciální kultury na krycí sklíčko a překryty agarózovým bločkem.

Pro přípravu vzorku pro timelapse byla kultura pěstována v 10 ml C+Y média. Z exponenciální fáze růstu byl odebrán vzorek kultury a naředěn na $OD_{600} = 0,05$. Na čisté podložní sklíčko byla nalepena komůrka naplněná 500 μ l média C+Y s agarosou. Na agarózu byly nanесeny 2 μ l naředěné kultury. Dále probíhá inkubace 30 minut přímo v mikroskopu Olympus CellR IX 81 (Olympus) při 37 °C. Následuje pořizování mikroskopických snímků v intervalu 10 minut.

7 VÝSLEDKY

V diplomové práci Jiřího Krupičky (Krupička, 2014), byly pro nepřímý důkaz esenciality serinových zbytků genu *glmM* u *S. pneumoniae* použity kmeny Sp268-271 (Rx; *bgaA::PczcD-glmM S99A/S101A/S99E/S101E-flag*). V těchto kmenech, které kódují nativní gen *glmM* a jeho ektopickou kopii pod kontrolou zinkového indukibilního promotoru s aminokyselinovými záměnami, byl proveden pokus o delecii nativní alely *glmM* pomocí konstruktů JanusKΔ*glmM*. Na základě výsledků z těchto transformačních experimentů, kdy transformační účinnost, bez ohledu na přidání induktoru exprese, byla téměř nulová u všech modifikovaných kmenů Sp268-Sp271, bylo nepřímo dokázáno, že serinové zbytky S99 a S101 v genu *glmM* jsou esenciální pro životaschopnost bakterie. Hlavním cílem této práce je přímým způsobem dokázat esencialitu fosforylace serinových zbytků fosfoglukozaminmutázy v pozicích 99 a 101.

Druhým cílem této práce je určit lokalizaci proteinu GlmM v buňce. Přestože je obecně předpokládáno, že se jedná o cytoplasmatický protein, nedávno byla u *Lactococcus lacti* potvrzena interakce GlmM s proteinem diadenylát cyklázou, která je vázána na membránu (Zhu et al., 2016). Je tedy možné, že pneumokoková GlmM nebude vykazovat ryze cytoplasmatickou lokalizaci.

V roce 2005 byl protein GlmM u *S. pneumoniae* identifikován jako substrát proteinkinázy StkP (Nováková et al., 2005). Pallová ve své práci dále zjistila, že protein GlmM je v *in vitro* podmínkách fosforylován na serinu v pozici S101 a pravděpodobně také na serinu v pozici 99. Ovšem kromě těchto dvou serinových zbytků je protein stále silně fosforylován kinázou StkP na dalším neznámém místě či místech (Pallová, 2007). Třetím cílem této práce tedy je pokusit se identifikovat další dosud neznámá místa fosforylace fosfoglukozaminmutázy GlmM proteinkinázou StkP.

7.1 Důkaz esenciality serinových zbytků v pozici 99 a 101 fosfoglukozaminmutázy GlmM pro životaschopnost *S. pneumoniae*.

Pro studium esenciality fosforylovaných serinových zbytků S99 a S101 v genu *glmM* jsme připravili dva druhy merodiploidních kmenů: 1) merodiploidní kmeny s modifikovanými alelami v genu *glmM*, jejichž ektopická exprese je řízena indukibilním promotorem a 2) merodiploidní kmen, který nese dvojnásobnou fosfoablativní formu S99/101A genu *glmM* v nativním lokusu, která není schopna fosforylace na těchto zbytcích.

7.1.1 Delece nativní kopie genu *glmM* v merodiploidních kmenech kódujích ektopickou alelu *glmM* s bodovými mutacemi v pozici S99 a S101

Abychom prokázali, že fosforylace na serinových zbytcích S99 a S101 je esenciální pro funkčnost proteinu GlmM, připravili jsme 4 různé kmeny nesoucí pod inducibilním zinkovým promotorem bodové mutace v genu *glmM-flag*, které způsobují záměny serinových zbytků v pozici 99 a 101 za alanin či kyselinu glutamovou. Bodová mutace serinu za alanin představuje aminokyselinovou záměnu, která neumožňuje fosforylaci, tzv. fosfoablativní záměnu. Naproti tomu bodová mutace serinu za kyselinu glutamovou představuje aminokyselinovou záměnu, která by měla napodobovat fosforylovaný stav proteinu, tzv. fosfomimetickou záměnu.

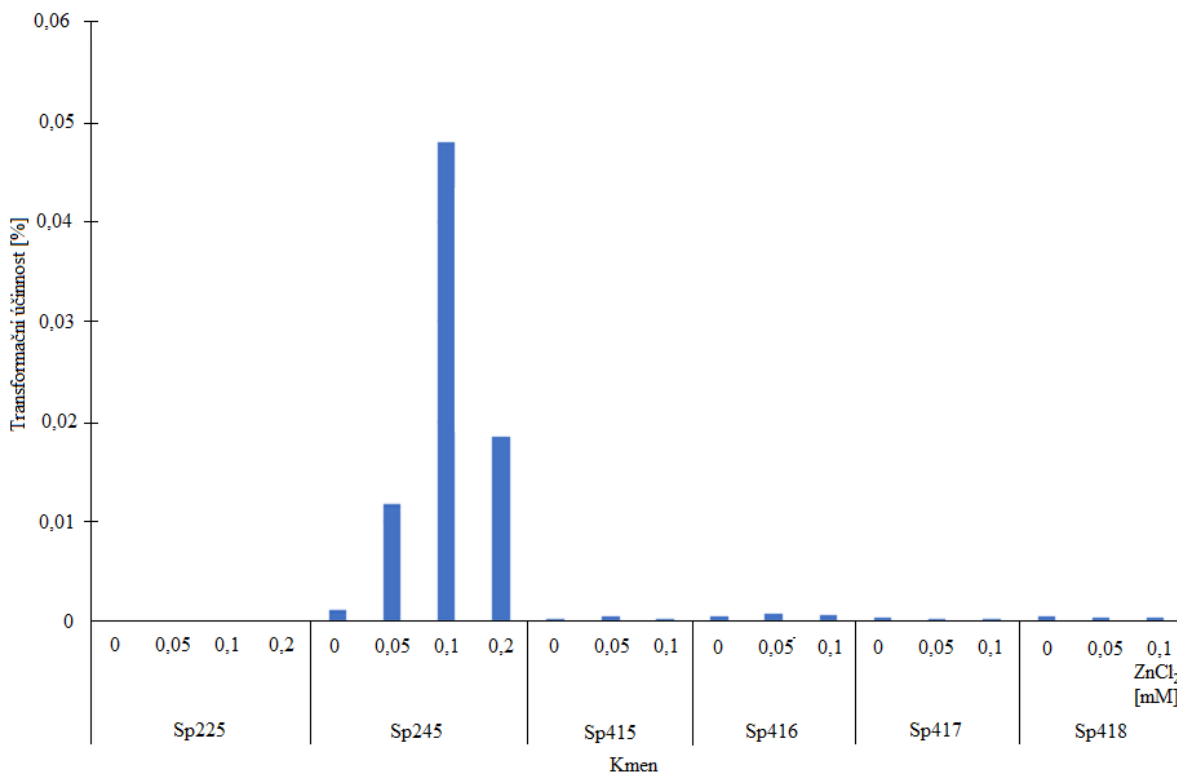
Plasmidy *pZn-GlmM S99A-flag*, *pZn-GlmM S101A-flag*, *pZn-GlmM S99E-flag* a *pZn-GlmM S101E-flag* jsme transformovali do kmene Sp225 v TSB médiu a seletovali na rezistenci k tetracyklinu za vzniku merodiploidních kmenů Sp415-418. Genotypy těchto kmenů jsou uvedeny v následující **Tabulce 12**.

Tabulka 12
Přehled vytvořených modifikovaných merodiploidních kmenů

KMEN	GENOTYP
Sp415	R6; <i>bga::PczcD-glmM-flag S99A</i>
Sp416	R6; <i>bga::PczcD-glmM-flag S101A</i>
Sp417	R6; <i>bga::PczcD-glmM-flag S99E</i>
Sp418	R6; <i>bga::PczcD-glmM-flag S101E</i>

Ověření správné integrace všech čtyř konstruktů *pZn-GlmM S99A/S101A/S99E/S101E-flag* do chromozomu *S. pneumoniae* bylo provedeno pomocí PCR za použití oligonukleotidů JK002 a LN142. Oligonukleotid JK002 je komplementární k části sekvence *glmM* a LN142 k části sekvence na chromozomu, mimo rekombinovanou oblast. V těchto kmenech jsme následně provedli pokus o delecí nativní alely *glmM* pomocí konstruktů JanusKΔ*glmM*. Transformace konstruktů JanusKΔ*glmM* do kmenů Sp415-418 proběhla v TSB médiu a transformační směs byla vyseta do gelózy s různým přídatkem ZnCl₂ (0; 0,05; 0,1 a 0,2 mM), induktoru ektopické exprese genu

glmM. Nakonec byla spočítána transformační účinnost všech použitých kmenů a vynesena do grafu (**Graf 1**). Jako pozitivní kontrolu jsme použili kmen Sp245, jako negativní kontrolu kmen Sp225.



Graf 1

Transformační účinnost u kmenů Sp415-418 (Sp1; *bgaA::PczcD-glmM-S99A/S101A/S99E/S101E-Flag*) po transformaci konstruktem JanusKΔglmM

Kmeny Sp225 a Sp245 byly použity jako negativní a pozitivní kontrola.

Transformace probíhala v přítomnosti různé koncentrace ZnCl₂: 0; 0,5; 0,1 a 0,2 mM.

Zatímco transformační účinnost byla u WT kmene (Sp225) nulová, transformační účinnost merodiploidního kmene Sp245 byla závislá na koncentraci ZnCl₂ v gelóze. Nejvyšší účinnosti 0,048 % bylo dosaženo při koncentraci 0,1 mM ZnCl₂, kdežto při koncentraci 0 mM byla účinnost transformace téměř nulová. Transformační účinnost u mutovaných merodiploidních kmenů Sp415-418 byla téměř nulová a koncentrace induktoru ZnCl₂ nemá na výsledek transformační účinnosti žádný vliv. Výsledky tohoto experimentu naznačují, že fosforylace GlmM na obou serinových zbytcích S99 a S101 je nezbytně nutná pro funkčnost tohoto enzymu, a tedy i pro životaschopnost pneumokoka. K podobným závěrům došel rovněž Jiří Krupička ve své diplomové práci (Krupička, 2014), který provedl obdobnou analýzu ovšem na pozadí Rx divokého typu *S. pneumoniae*.

7.1.2 Vliv fosfoablativní záměny S99/101A genu *glmM* v nativním lokusu u merodiploidního kmene Sp369 na životaschopnost *S. pneumoniae*

Za účelem prokázat, zda jsou aminokyselinové zbytky serinu v pozici 99 a 101 genu *glmM* esenciální u *S. pneumoniae*, jsme připravili GlmM-depleční kmen Sp283 (R6; $\Delta glmM$ *bga::PczcD-glmM-flag*) a kmen Sp369 (R6; *glmM S99/101A bga::PczcD-glmM-flag*), který obsahuje v nativním *glmM* dvě aminokyselinové záměny serinu 99 a 101 za alanin. Oba kmeny kódují ještě ektopickou kopii *glmM-flag*, pod kontrolou inducibilního promotoru.

U těchto kmenů jsme sledovali v kontrolních a limitních (tzv. deplečních) koncentracích induktoru růst v tekutém a na pevném médiu, morfologii buněk a expresi proteinu GlmM-Flag.

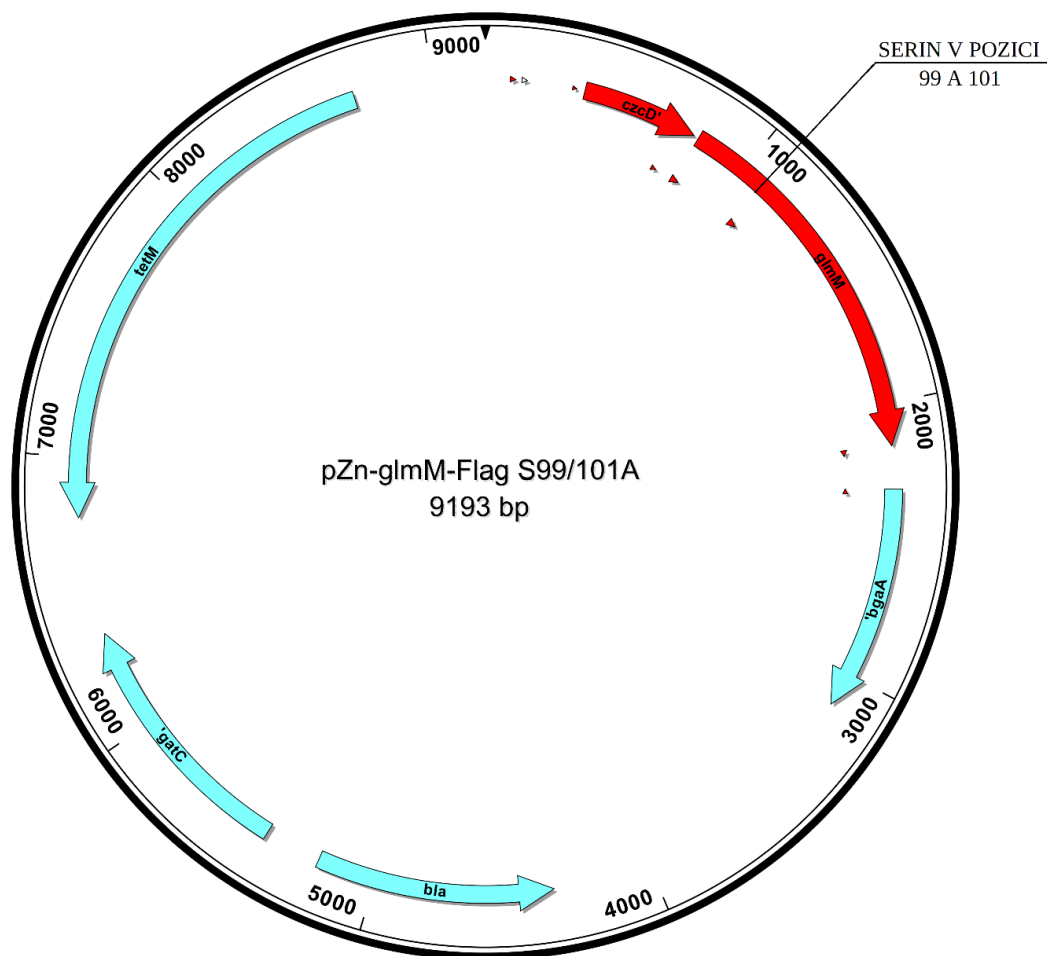
7.1.3 Příprava konstruktů

glmM S99/101A-okolí

Konstrukt *glmM S99/101A-okolí*, který byl použit pro přípravu kmene Sp369 (viz kap. 7.1.4.) byl připraven jako fúzní PCR produkt genu *glmM* s okolními oblastmi. Pro tento účel jsme použili již existující plasmid *pZn-GlmM-S99A-flag*, který kóduje aminokyselinovou záměnu serinu v pozici 99 za alanin (Krupička, 2014). V tomto plasmidu jsme pomocí soupravy QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit a oligonukleotidů AU65 a AU66 vytvořili druhou aminokyselinovou záměnu serinu 101 za alanin. Výsledný plasmid jsme nazvali *pZn-glmM-flag-S99/101A* (viz **Obrázek 7**).

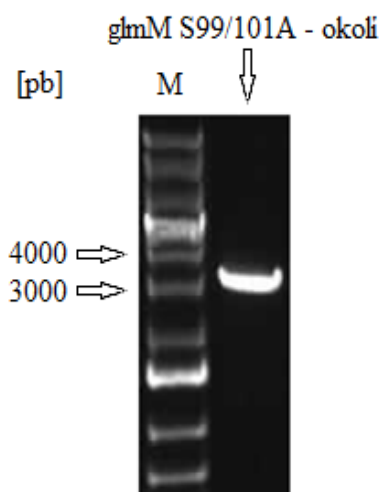
Za účelem vytvoření fúzního konstruktů *glmM S99/101A-okolí*, jsme amplifikovali tři PCR produkty. Část před genem ve směru transkripce (fragment 1), vznikla amplifikací templátu chDNA z Sp1 kmene pomocí oligonukleotidů JK006 a AU99. Velikost tohoto fragmentu je 1107 pb. Dále jsme amplifikovali *pZn-glmM-flag-S99/101A* pomocí oligonukleotidů AU97 a AU98, vznikl tak PCR produkt *glmM S99/101A* (fragment 2) o velikosti 1357 pb. Poslední část fúzního proteinu je část za genem *glmM* ve směru transkripce (fragment 3). Jako templát jsme opět použili chDNA z Sp1 kmene, který jsme namnožili pomocí JK009 a AU100. Velikost fragmentu 3 je 1118 pb.

Následně jsme všechny amplifikované fragmenty spojili fúzní PCR pomocí oligonukleotidů JK006 a JK009 za vzniku fúzního konstruktů *glmM S99/101A-okolí* o velikosti 3582 pb. Pro kontrolu, zda fúzní PCR proběhla správně, jsme velikost konstruktů ověřili separací DNA v agarózovém gelu (viz **Obrázek 8**) a podrobili sekvenaci. Schéma konstruktů *glmM S99/101A-okolí* je znázorněno na **Obrázku 9**.



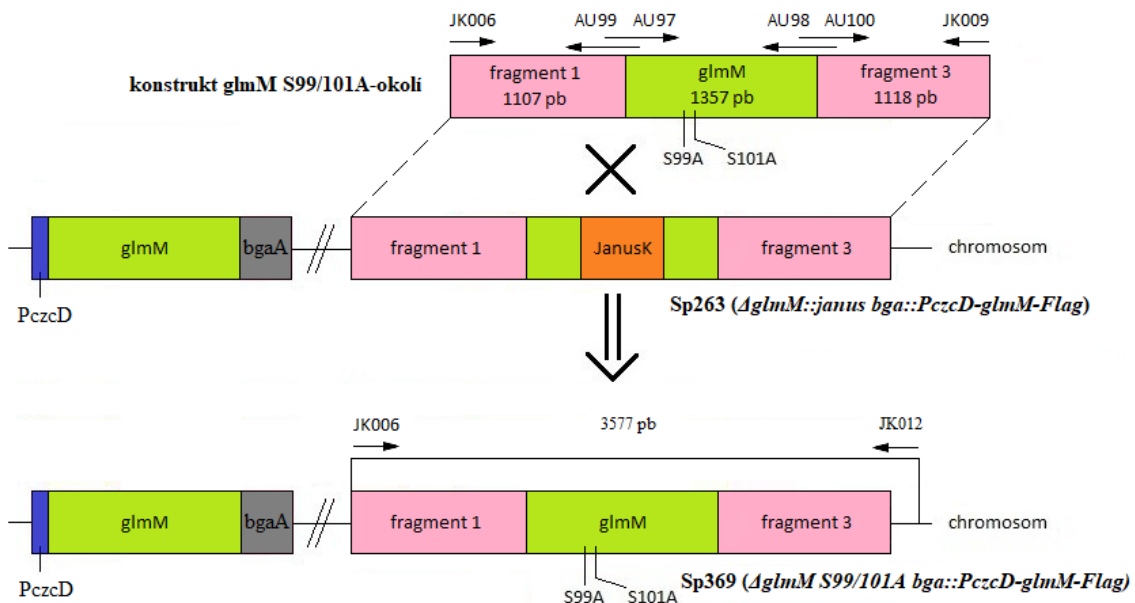
Obrázek 7
Schéma plasmidu *pZn-glmM-flag S99/101A*

czeD: inducibilní zinkový promotor; *glmM*: gen kódující enzym GlmM; *bgaA* a *gatC*: oblasti umožňující homologní rekombinaci vektoru do chromozomu *S. pneumoniae*; *tetM*: gen pro rezistenci k tetracyklinu; *bla*: gen pro rezistenci k ampicilinu.



Obrázek 8
Kontrolní DNA elektroforéza v agarózovém gelu - kontrola velikosti konstruktů *glmM S99/101A*– okolí získaného fúzní PCR amplifikací pomocí oligonukleotidů JK006 a JK009

Vlevo (M) standard molekulových hmotností GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Vpravo fúzní PCR produkt *glmM S99/101A*-okolí o velikosti 3582 pb amplifikovaný oligonukleotidy JK006 a JK009.



Obrázek 9
Schéma výměny Janus kazety za konstrukt glmM S99/101A-okolí během přípravy kmene Sp369

V horní části obrázku je znázorněn konstrukt glmM S99/101A-okolí (použité PCR fragmenty i oligonukleotidy). Uprostřed obrázku je znázorněno schéma kmene Sp263 (*ΔglmM::janus bga::PczcD-glmM-Flag*), kde je převážná část genu *glmM* nahrazena Janus kazetou (JanusK). V dolní části obrázku je schéma výsledného kmene Sp369 (*ΔglmM S99/101A bga::PczcD-glmM-Flag*), kde je JanusK vložená do nativního *glmM* lokusu nahrazena za *glmM* S99/101A-okolí a obsahuje tak dvě aminokyselinové záměny na S99A a S101A. Vyznačeny jsou velikosti PCR produktů a oligonukleotidy JK006 a JK012, které byly použity pro ověření správnosti přípravy kmene Sp369. Modře označen je zinkový promotor, zeleně je označen gen *glmM*, růžově je označeno okolí genu *glmM* a lokus *bgaA* je označen šedivou barvou. Oranžovou barvou je vyznačena Janus kazeta, která nahrazuje část genu *glmM*, který je tak deaktivován.

glmM-okolí

Konstrukt glmM-okolí, který byl použit pro konstrukci revertantního kmene Sp392 (viz. kap. 7.1.4.), byl připraven amplifikací nativní alely *glmM* s okolím podle templátu chDNA z divokého kmene R6 (Sp208) za pomoci oligonukleotidů JK006 a JK009 (viz **Obrázek 10**).

JanusKΔglmM

Pro delecí nativního genu *glmM* *S. pneumoniae* jsme použili již připravený konstrukt JanusKΔglmM. Tento lineární konstrukt o velikosti 3619 pb obsahuje Janus kazetu a dvě oblasti homologní k oblastem obklopujícím nativní gen *glmM*, které umožňují jeho integraci do chromozomu pomocí homologní rekombinace (Krupička, 2014).

ΔJanus

Pro odstranění Janus kazety z místa, kde se původně nacházel gen *glmM* v nativním lokusu *S. pneumoniae* jsme použili již připravený konstrukt ΔJanus. Tento lineární konstrukt obsahuje

spojené dvě oblasti homologní k oblastem obklopujícím nativní gen *glmM*, které umožňují jeho integraci do chromozomu pomocí homologní rekombinace (Krupička, 2014).

7.1.4 Příprava kmenů

GlmM-depleční kmen Sp283 (R6; $\Delta glmM$ *bga::PczcD-glmM-flag*), který má odstraněný nativní gen *glmM* a obsahuje jen jeho kopii *glmM-flag* pod kontrolou *PczcD* promotoru, jsme připravili z kmene Sp263 (R6; $\Delta glmM::janus$ *bga::PczcD-glmM-flag*). V TSB médiu a v přítomnosti induktoru exprese 0,1 mM ZnCl₂ jsme do kmene Sp263 vložili transformací konstrukt $\Delta Janus$, který byl určen k odstranění Janus kazety. Získané transformanty byly Kan^S a Str^R. Kromě příslušných antibiotik byl pro selekci transformantů v gelóze a v krevním agaru přítomen induktor exprese ZnCl₂ v koncentraci 0,1 mM.

Na rozdíl od GlmM-deplečního kmene Sp263 (Krupička, 2014), neobsahuje neznačený GlmM-depleční kmen Sp283 ani Janus kazetu, ani koncové oblasti genu *glmM* (viz kap. 6.1.2.), což jsou faktory, které by mohly ovlivnit fyziologii připraveného kmene.

Dále jsme připravili kmen Sp369 (R6; *glmM S99/101A bga::PczcD-glmM-flag*), který nese v nativním *glmM* dvě záměny serinu 99 a 101 za alanin a pod zinkovým promotorem má vloženu divokou formu genu *glmM* fúzovanou s Flagovou kotvou. Tento kmen jsme připravili z kmene Sp263 (R6; $\Delta glmM::janus$ *bga::PczcD-glmM-flag*) vložением konstrukt *glmM S99/101A-okolí* (viz **Obrázek 9**). Transformace proběhla v TSB médiu s koncentrací ZnCl₂ 0,1 mM. Získané transformanty byly Kan^S a Str^R. Kromě příslušných antibiotik byl pro selekci transformantů v gelóze přítomen induktor exprese ZnCl₂ v koncentraci 0,1 mM.

Při přeočkování transformantů na krevní agar byla použita koncentrace induktoru 0,3 mM, neboť při nižších koncentracích ZnCl₂ transformanty na krevním agaru nerostly.

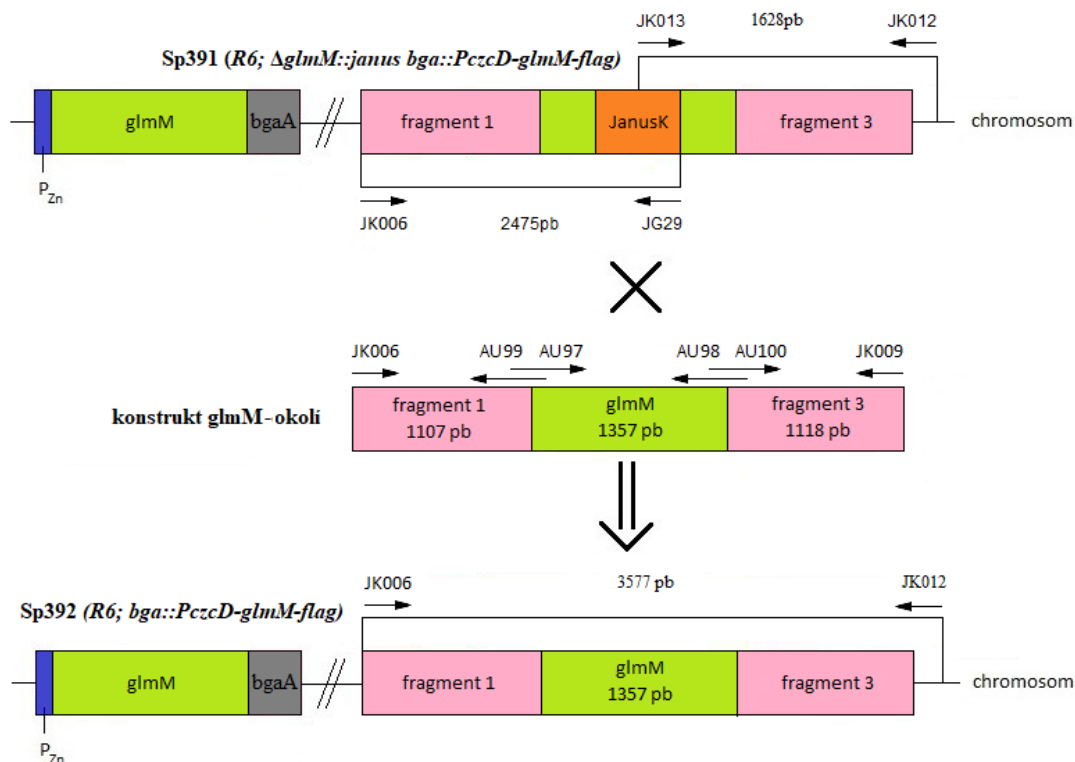
Jako kontrolu jsme v předkládané diplomové práci použili merodiploidní kmen Sp245 (R6; *bga::PczcD-glmM-flag*), který obsahuje nativní *glmM* a zároveň druhou kopii genu *glmM* fúzovanou s Flagovou kotvou pod kontrolou *PczcD* promotoru (Krupička, 2014).

Pro kontrolu skutečnosti, že fenotyp, který pozorujeme u kmene Sp369, je výsledkem bodové záměny serinů v pozici 99 a 101 za alanin, jsme připravili revertantní kmen Sp392, který má stejný genotyp jako výchozí kontrolní kmen Sp245, ale byl připraven zpětnou postupnou rekombinací divoké formy genu *glmM* do kmene Sp369. Za tímto účelem jsme vložili deleční konstrukt *JanusK Δ glmM* do kmene Sp369 (R6; *glmM S99/101A bga::PczcD-glmM-flag*). Transformace proběhla v médiu TSB s přidavkem induktoru exprese o koncentraci 0,1 mM. Získané

transformanty byly Kan^R a Str^S a jejich selekce probíhala rovněž za přítomnosti 0,1 mM ZnCl₂ v gelóze. V krevním agaru byla použita koncentrace induktoru exprese 0,3 mM. Tento získaný kmen jsme označili Sp391 (*R6; ΔglmM::janus bga::PzcD-glmM-flag*) (viz **Obrázek 10**). Následně jsme do kmene Sp391 transformací vložili PCR fragment *glmM-okolí* (viz kap. 7.1.3.) kódující nativní *glmM* a získaný kmen označili jako Sp392 (*R6; bga::PzcD-glmM-flag*). Transformace proběhla opět v TSB médiu s přidavkem induktoru exprese, neboť bez přidavku ZnCl₂ by nebyl výchozí kmen životaschopný. Pro výsev transformantů jsme použili gelózu se selekčním antibiotikem; výsledný kmen Sp392 je Kan^S a Str^R. Induktor exprese nebylo nutné do gelózy přidávat. Stejně tak do krevního agaru bylo při dvoukrokové selekci transformantů přidáno pouze antibiotikum.

Nově vzniklé kmeny jsme ověřili pomocí PCR (viz níže) a následnou sekvenací.

Následující čtyři odstavce dokumentují verifikaci připravených kmenů Sp283, Sp369, Sp391 a Sp392 pomocí PCR a následné elektroforézy v agarózovém gelu. Na **Obrázcích 9 a 10** jsou schematicky znázorněny použité oligonukleotidy.

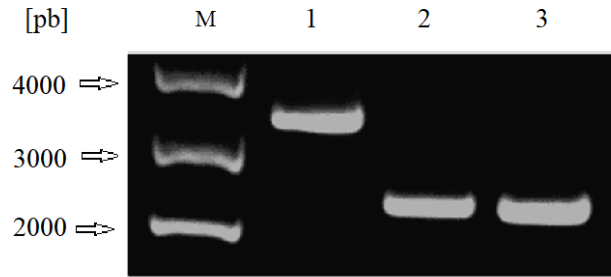


Obrázek 10

Schéma výměny Janus kazety za konstrukt glmM-okolí během přípravy kmene Sp392

V horní části obrázku je znázorněno schéma kmene Sp391 (*R6; ΔglmM::janus bga::PczcD-glmM-flag*), kde je převážná část genu *glmM* nahrazena Janus kazetou (JanusK). Zároveň jsou zde vyznačeny velikosti PCR produktů a oligonukleotidy, které byly použity pro ověření správnosti vložení delečního konstrukt JanusKΔ*glmM* do nativního lokusu genu *glmM* u kmene Sp391. Uprostřed obrázku je znázorněn konstrukt glmM-okolí (použité PCR fragmenty i oligonukleotidy). V dolní části obrázku je schéma výsledného kmene Sp392 (*R6; bga::PczcD-glmM-flag*), kde je JanusK nahrazena nativním genem *glmM*, tedy konstruktem glmM-okolí. Vyznačeny jsou velikosti PCR produktů a oligonukleotidy JK006 a JK012, které byly použity pro ověření správnosti přípravy kmene Sp392. Modře označen je zinkový promotor, zeleně je označen gen *glmM*, růžově je označeno okolí genu *glmM* a lokus *bgaA* je označen šedivou barvou. Oranžovou barvou je vyznačena Janus kazeta, která nahrazuje část genu *glmM*, který je tak deaktivován.

Chromozomální DNA GlmM-deplečního kmene Sp283 jsme amplifikovali oligonukleotidy JK006 a JK0012 a získali PCR fragment o předpokládané velikosti 2224 pb. Jako kontrolu jsme použili produkt PCR amplifikace podle templátové chDNA z kmene Sp263, kde je vložena Janus kazeta, a tedy PCR fragment koresponduje s proužkem na elektroforetogramu o velikosti 3663 pb (**Obrázek 11**).



Obrázek 11

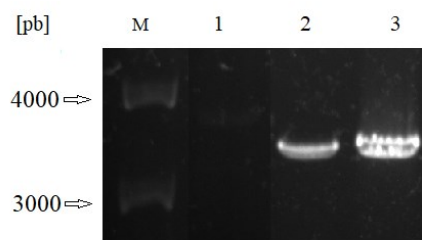
Elektroforetogram kontrolních PCR fragmentů u kmene Sp283 - ověření integrace konstruktů Δ Janus do kmene Sp263 (odstranění Janus kazety) s použitím oligonukleotidů JK006 a JK012.

Vlevo (M) standard molekulových hmotností GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

1. PCR produkt kontrolního kmene Sp263 odpovídá velikosti 3662 pb,

2.-3. Testované PCR produkty klonů číslo 1 a 2 u kmene Sp283 korespondují s očekávanou velikostí 2224 pb.

Chromozomální DNA kmene Sp369 jsme amplifikovali oligonukleotidy JK006 a JK012 (**Obrázek 9**). Jako pozitivní kontrolu jsme použili chDNA z kmene Sp208. Očekávaná velikost obou fragmentů byla 3577 pb. Jako negativní kontrola posloužila PCR amplifikace pomocí oligonukleotidů JK012 a JK013 podle templátu chDNA z kmene Sp369. Oligonukleotid JK013 je komplementární k sekvenci ležící v Janus kazetě, takže u správně připraveného kmene Sp369, který Janus kazetu během transformace ztratil, nedojde k amplifikaci. Výsledky amplifikace shrnuje **Obrázek 12**.



Obrázek 12

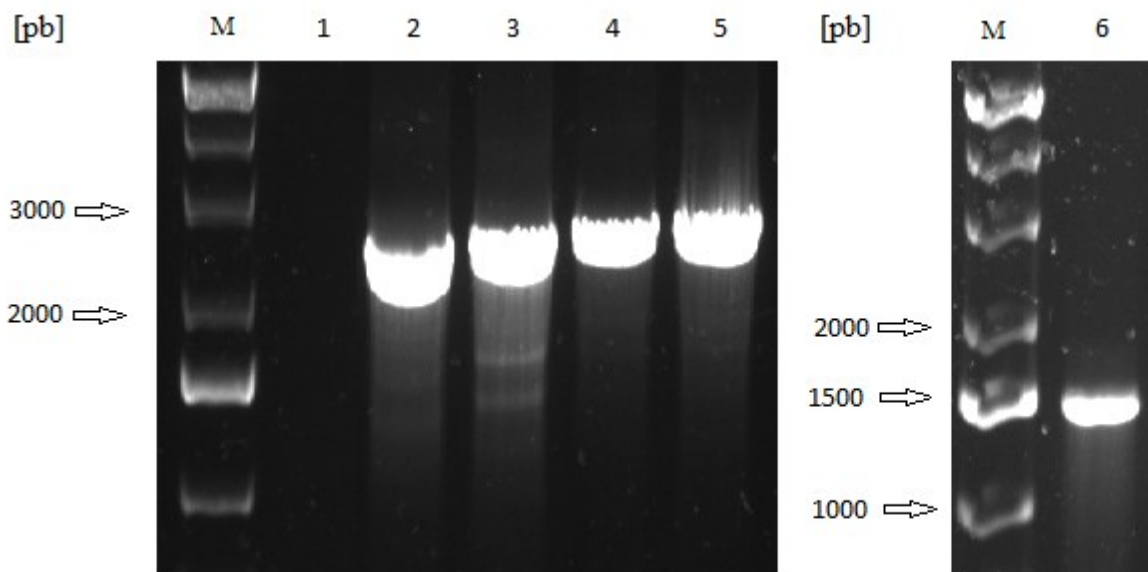
Elektroforetogram kontrolních PCR fragmentů u kmene Sp369 – ověření integrace konstruktů glmM S99/101A-okolí do kmene Sp263. PCR produkty amplifikovány pomocí oligonukleotidů JK006 a JK012.

Vlevo (M) standard molekulových hmotností GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

1. Negativní kontrola Sp369 amplifikace JK012 a JK013 nevznikne žádný produkt.

2. Pozitivní kontrola – chDNA kmene Sp208 amplifikace JK006 a JK012 o velikosti 3577 pb.

2. Sp369 klon č.57 – PCR produkt amplifikace JK006 a JK012 o předpokládané velikosti 3577 pb.



Obrázek 13

Elektroforetogram kontrolních PCR fragmentů u kmene Sp391 - ověření integrace JanusKΔglmM do Sp369 pomocí oligonukleotidů JK006 a JG29 a ověření správné polohy konstruktů na chromosomu pomocí oligonukleotidů JK012 a JK013.

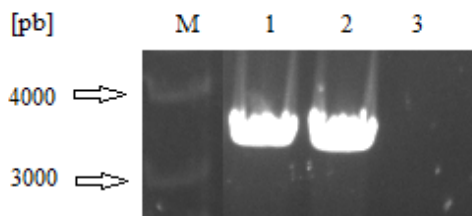
Vlevo (M) standard molekulových hmotností GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

1. Negativní kontrola Sp245 (oligonukleotidy JK006 a JG29) – nevznikl žádný PCR produkt
- 2.-5. Sp391 klony č.1-4 (oligonukleotidy JK006 a JG29) - PCR produkt o předpokládané velikosti 2475 pb.
6. Ověření polohy na chromozomu u kmene Sp391 klon č.1 pomocí oligonukleotidů JK013 a JK012 – PCR produkt o předpokládané velikosti 1628 pb.

Zpětné vložení konstruktů JanusKΔglmM do kmene Sp369 jsme ověřili amplifikací templátové chDNA z kmene Sp391 pomocí oligonukleotidů JK006 a JG29 (**Obrázek 10**), kde vznikl produkt očekávané velikosti 2475 pb. Jako negativní kontrolu jsme pro PCR reakci použili chDNA z kmene Sp245, kde nebyl očekáván žádný produkt amplifikace. Následně jsme ještě ověřili, zda je konstrukt JanusKΔglmM v chromozomu Sp391 na správném místě, čili v originálním lokusu genu *glmM*. Pro tento účel jsme použili oligonukleotidy JK013 a JK012 (**Obrázek 10**). JK013 je komplementární k části sekvence uvnitř Janus kazety a JK012 je komplementární k části sekvence ležící na chromozomu *S. pneumoniae* mimo rekombinovanou oblast. Vznikl PCR produkt o očekávané velikosti 1628 pb (**Obrázek 13**).

K ověření správného vložení konstruktů glmM-okolí, kódující nativní gen *glmM*, do kmene Sp391 za vzniku kmene Sp392 jsme aplikovali PCR s oligonukleotidy JK006 a JK012 (**Obrázek 10**). Vznikl produkt o velikosti 3577 pb. Jako pozitivní kontrola byla použita chDNA kmene Sp208

(3577 pb) a jako negativní kontrola chDNA kmene Sp391. Kontrolní DNA elektroforézy produktů PCR jsou znázorněny v **Obrázku 14**.



Obrázek 14

Elektroforetogram kontrolních PCR fragmentů u kmene Sp392 - ověření správného vložení konstruktů *glmM*-okolí do kmene Sp391 pomocí oligonukleotidů JK006 a JK012.

Vlevo (M) standart GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

1. Amplifikace chDNA kmene Sp392 oligonukleotidy JK006 a JK012 za vzniku produktu o očekávané velikosti 3577 pb.
2. Pozitivní kontrola – amplifikace chDNA kmene Sp208 s použitím oligonukleotidů JK006 a JK012 s očekávaným produktem o velikosti 3577 pb.
3. Negativní kontrola – amplifikace chDNA kmene Sp391 s použitím oligonukleotidů JK006 a JK012. Nevznikl žádný produkt.

7.1.5 Charakterizace mutantního kmene Sp369

V rámci této diplomové práce jsme charakterizovali kmen Sp369 (R6; *glmM S99/101A bga::PczcD-glmM-flag*). Testovali jsme jeho schopnost růstu na pevném médiu při různých koncentracích $ZnCl_2$, induktoru exprese ektopické kopie genu *glmM*. Dále jsme testovali růst v tekutém C+Y médiu za stejných podmínek. Kromě testů růstu jsme monitorovali expresi fúzního proteinu GlmM-Flag v gradientu $ZnCl_2$ a analyzovali morfologii buněk.

Růst kmene Sp369, bez přídavku induktoru exprese ektopické formy proteinu GlmM, je klíčový pro důkaz esenciality serinových zbytků v pozici 99 a 101 fosfoglukozaminmutázy. Při kultivaci s induktorem jsme u tohoto kmene předpokládali růst srovnatelný s kontrolním kmenem Sp245. V případě kultivace bez induktoru jsme očekávali buď podobné růstové vlastnosti jako s induktorem, což by naznačovalo, že tyto dva serinové zbytky esenciální nejsou, anebo by kmen nebyl životaschopný, což by znamenalo, že tyto dva serinové zbytky jsou esenciální pro životaschopnost bakterie *S. pneumoniae*.

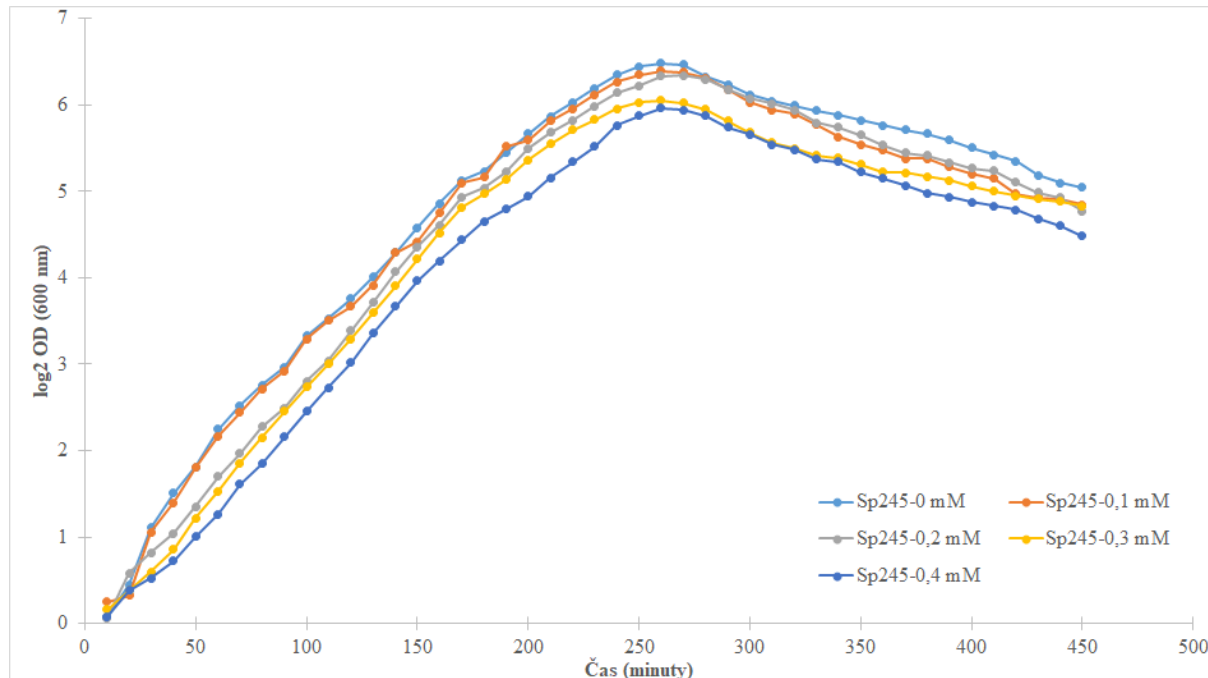
Růst kmene Sp369 byl porovnáván s GlmM-deplečním kmenem Sp283, který má odstraněný nativní gen *glmM* a kóduje rovněž ektopickou alelu genu *glmM-flag* pod inducibilním promotorem *PczcD* a jeho životaschopnost je striktně závislá na přítomnosti induktoru exprese $ZnCl_2$ v médiu.

Pokud je fosforylace serinových zbytků v pozici 99 a 101 nezbytná pro funkčnost GlmM, tak oba tyto kmeny Sp283 a Sp369 se budou chovat podobně.

Ve všech testech jsme jako kontrolu používali merodiploidní kmen Sp245 (R6; *bga::PczcD-glmM-flag*). Tento kmen obsahuje dvě kopie genu *glmM* na chromozomu – nativní, jehož exprese probíhá konstitutivně a ektopickou, která je pod kontrolou indukibilního promotoru.

7.1.6 Analýza nadprodukčního fenotypu merodiploidního kmene Sp245 v C+Y médiu s různými koncentracemi $ZnCl_2$

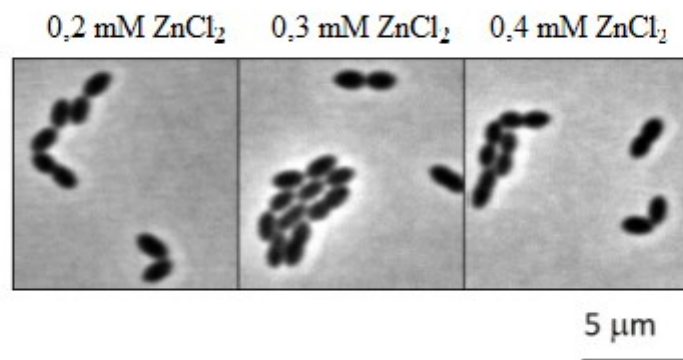
U merodiploidního kmene Sp245 (R6; *bga::PczcD-glmM-flag*) jsme provedli test nadprodukce GlmM při různých koncentracích $ZnCl_2$. Jako kontrolní hladinu jsme použili koncentraci $ZnCl_2$ 0,2 mM, neboť při této koncentraci induktoru dosahuje kultura nejvyšších optických denzit a růst je velmi podobný divokému typu *S. pneumoniae*. Jako nadprodukční hladiny jsme použili koncentrace 0,3 a 0,4 mM, neboť při vyšších koncentracích dochází k inhibici růstu Zn^{2+} ionty, kultura roste velmi pomalu a nedosahuje tak vysokých optických denzit (data nejsou uvedena), jako při kontrolní hladině induktoru. Výsledky jsou znázorněny v **Grafu 2**.



Graf 2

Logaritmické vynesení reprezentativního grafu růstu kmene Sp245 v médiu C+Y v různé koncentraci $ZnCl_2$ (0 - 0,4 mM).

Když kultury dosáhly optické denzity 0,3, odebrali jsme vzorky na mikroskopickou analýzu morfologie v režimu fázového kontrastu. Z mikroskopických snímků, znázorněných na **Obrázku 15**, je vidět, že vyšší hladina induktoru nemá na morfologii buněk pozorovatelný vliv.



Obrázek 15

Morfologie merodiploidního kmene Sp245 při nadprodukcích hladinách induktoru exprese genu *glmM*

Na prvním obrázku je mikroskopický snímek merodiploidního kmene s kontrolní hladinou induktoru ZnCl₂, kde buňky nevykazují žádné defekty. Ani zvýšená hladina induktoru na dvojnásobnou koncentraci v médiu nezpůsobila žádnou změnu v morfologii buněk.

7.1.7 Růst kmenů *Sp283* a *Sp369* v tekutém médiu C+Y

Abychom prokázali esencialitu fosforylace na serinových zbytcích v pozici 99 a 101 proteinu GlmM u *S. pneumoniae*, bylo třeba zmonitorovat růst kmenů *Sp283* a *Sp369* (viz **Graf 3** a **4**, **Obrázek 16**). Kromě růstu jsme sledovali také morfologii buněk pomocí mikroskopie (kap. 7.1.9.) a hladinu exprese proteinu GlmM-Flag pomocí imunodetekce (viz kap. 7.1.10.).

Kultivace kmenů bez přidavku ZnCl₂ a v přítomnosti kontrolní hladiny 0,2 mM ZnCl₂ v médiu probíhala tak, že jsme z rozmrazené glycerolové konzervy zaočkovali 200 µl bakteriální suspenze do 10 ml temperovaného C+Y média na teplotu 37 °C s příslušnou koncentrací induktoru. Následně jsme odebrali 3,3 ml kultury do uzavíratelné kyvety, ve které jsme prováděli automatické měření při vlnové délce 600 nm v pravidelných 10-ti minutových intervalech. V následujících grafech jsou uvedeny zprůměrované hodnoty ze třech měření, z nichž nejvyšší směrodatná odchylka dosahuje 0,09.

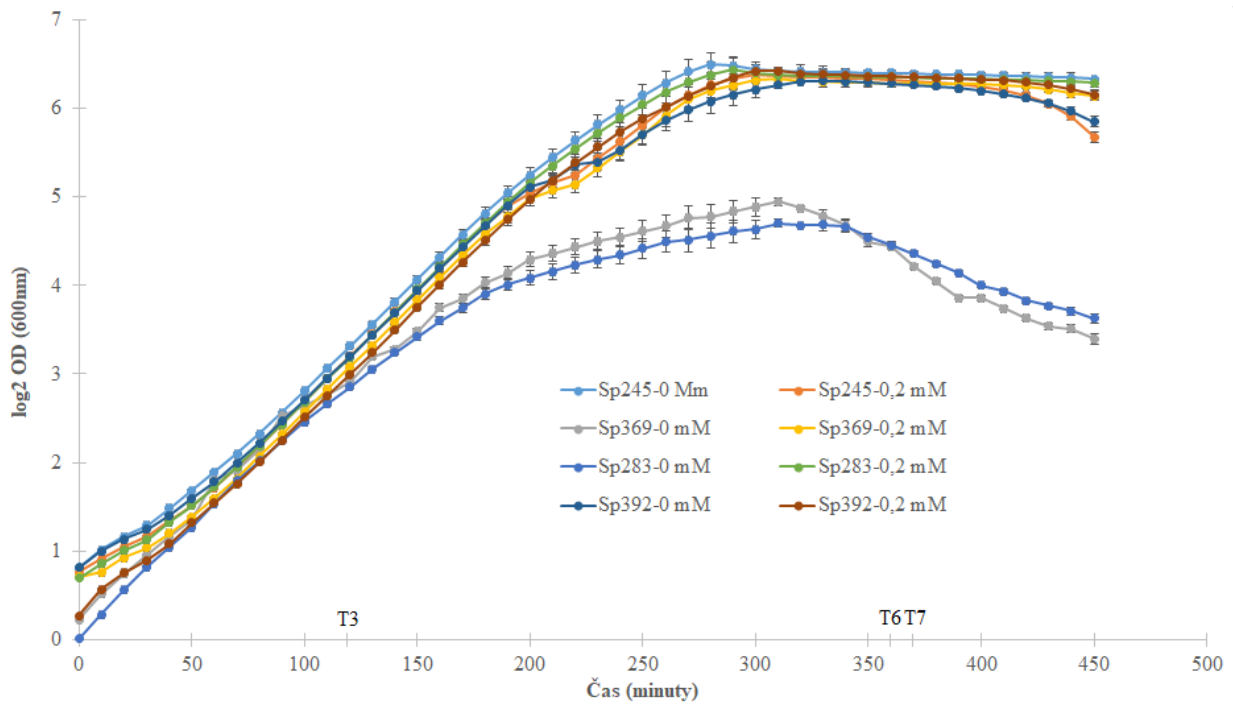
Jak již bylo popsáno v diplomové práci Jiřího Krupičky (2014), GlmM-depleční kmen *Sp263* je životaschopný pouze v médiu s přidaným induktorem exprese ZnCl₂. V těchto podmínkách dosahuje kultura vysokých optických denzit a růst je srovnatelný s růstem WT. Bez přidaného

induktoru dochází k lyzi buněk. Stejně chování v deplečních hladinách induktoru exprese jsme předpokládali a bylo to potvrzeno i u nově vytvořeného neznačeného *GlmM*-deplečního kmene Sp283 (**Graf 3**). To znamená, že Janus kazeta přítomná u kmene Sp263 nemá vliv na pozorovaný fenotyp. Rovněž kmen Sp369 vykazoval stejné vlastnosti jako kmen Sp283, a tedy jeho schopnost růstu byla striktně závislá na přítomnosti $ZnCl_2$ v médiu (**Graf 3**). Z tohoto pozorování lze konstatovat, že exprese genu *glmM* s dvojnásobnou fosfoablativní záměnou S99/101A není pro přežití pneumokoka dostatečná. Jinými slovy lze tvrdit, že fosforylace proteinu *GlmM* na serinových zbytcích v pozici 99 a 101 je nezbytná pro funkčnost tohoto esenciálního enzymu. Jako kontrola růstových vlastností byl použit merodiploidní kmen Sp245, jehož růst není závislý na přítomnosti $ZnCl_2$ v médiu. Také revertantní kmen Sp392 připravený zpětným vložením nativního genu *glmM* do kmene Sp369 vykazuje růst nezávislý na $ZnCl_2$ v médiu (**Graf 3**), což znamená, že pozorovaný defekt v růstu kmene Sp369 bez přídavku $ZnCl_2$ je způsoben úbytkem hladiny funkčního proteinu *GlmM* v buňce.

Abychom potvrdili, že u deplečního kmene Sp283 a mutantního kmene Sp369 s aminokyselinovými záměnami dojde ke komplementaci deplece *GlmM* (obnovení růstu, původní morfologie a hladiny exprese ektopické kopie *glmM*), provedli jsme experiment s následným přidáním induktoru ke kultuře kultivované původně bez zinečnatých iontů v médiu. *GlmM*-depleční (Sp283) a fosfoablativní kmen (Sp369) s aminokyselinovými záměnami v nativním lokusu genu *glmM* jsme zaočkovali v duplikátech v médiu bez zinečnatých iontů a v 5. hodině kultivace jsme v jedné kultuře z duplikátů zvýšili koncentraci induktoru na kontrolní hladinu 0,2 mM $ZnCl_2$. Kromě monitorování růstu, jsme opět průběžně sledovali morfologii všech kmenů (Sp245, Sp283, Sp369 a Sp392) pomocí mikroskopie (viz kap. 7.1.9.) a rovněž hladinu exprese proteinu *GlmM*-Flag (viz kap. 7.1.10.), a to v časech 3, 6, 7 a 11 h. Růstové křivky jsou znázorněny v **Grafu 4**.

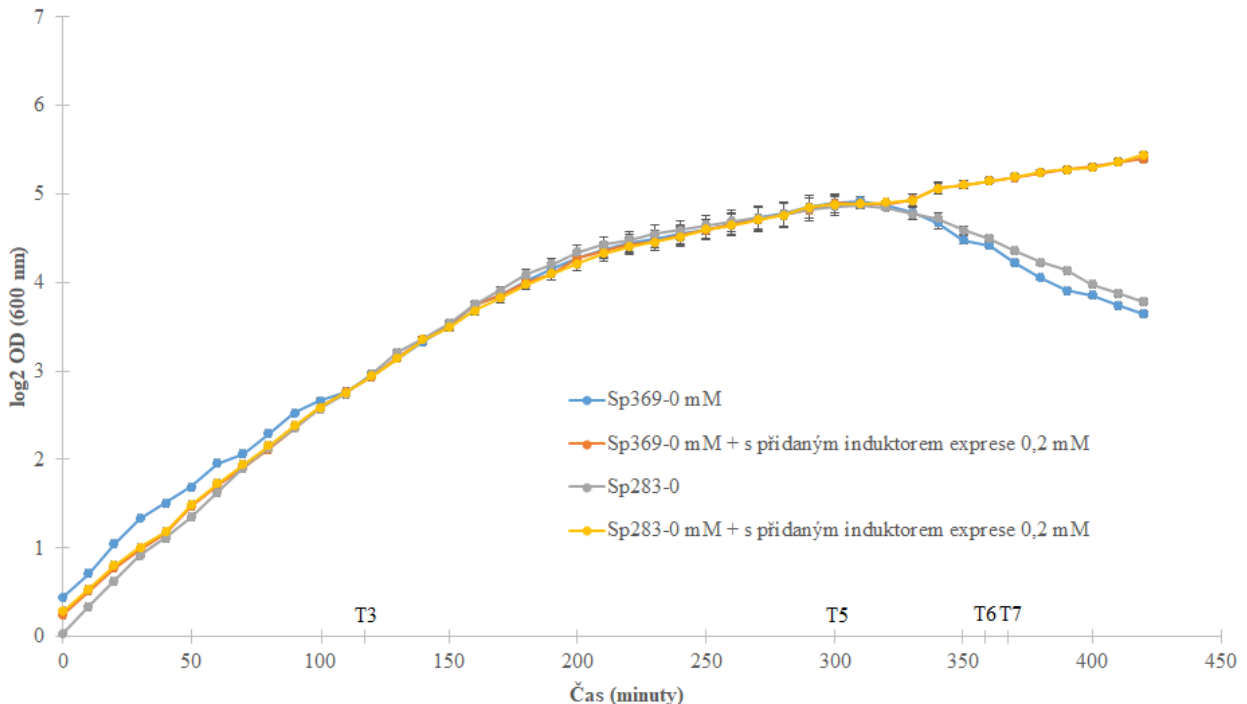
U obou kmeňů Sp283 a Sp369 došlo v kultuře s dodatečně přidaným induktorem k obnovení růstu, ale doba zdvojení byla delší než u kontrolního kmene (shodně u obou kmenů 67 minut). Oba kmeny, které zůstaly bez dodatečného přídavku $ZnCl_2$ zlyzovaly a již dále nerostly. Když kultury s dorovnanou hladinou induktoru dosáhly optické denzity 0,4, převedli jsme kulturu do konzervy s 15 % glycerolem a zamrazili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následující den jsme stejně jako u prvního pokusu zaočkovali depleční kmen Sp283 s kontrolní hladinou induktoru a Sp283, u níž byla koncentrace induktoru vyrovnána v čase 5 h z 0 mM na 0,2 mM $ZnCl_2$, do média s kontrolní hladinou 0,2 mM $ZnCl_2$. Stejným způsobem jsme zaočkovali i fosfoablativní kmen Sp369. U obou kmenů jsme zaznamenali během prodloužené kultivace časový posun v průběhu růstu oproti kontrolnímu kmeni, kde byla od začátku kultivace hladina zinečnatých iontů 0,2 mM, avšak doba zdvojení je u obou kultur téměř

stejná. V případě kultur, které nebyly exponovány deplecí zinečnatých iontů, je doba zdvojení u kmene Sp283 41 minut a u kmene Sp369 40 minut. U zmrazených kultur těchto kmenů, které byly vystaveny depleci zinečnatých iontů, je doba zdvojení shodně 42 minut u obou kmenů. Růstové křivky jsou znázorněny v **Grafu 5** a **6**. Tento fakt ukazuje, že po přidání zinečnatých iontů k deplečnímu kmeni Sp283 (R6; *ΔglmM bga::PzcD-glmM-flag*) a mutantnímu kmeni s aminokyselinovými záměnami v nativním *glmM* Sp369 (R6; *glmM S99/101A bga::PzcD-glmM-flag*) dochází k úplnému obnovení růstu v porovnání s kmeny s kontrolní hladinou induktoru a tedy, že pozorovaný defekt v růstu je způsoben úbytkem GlmM v buňce.



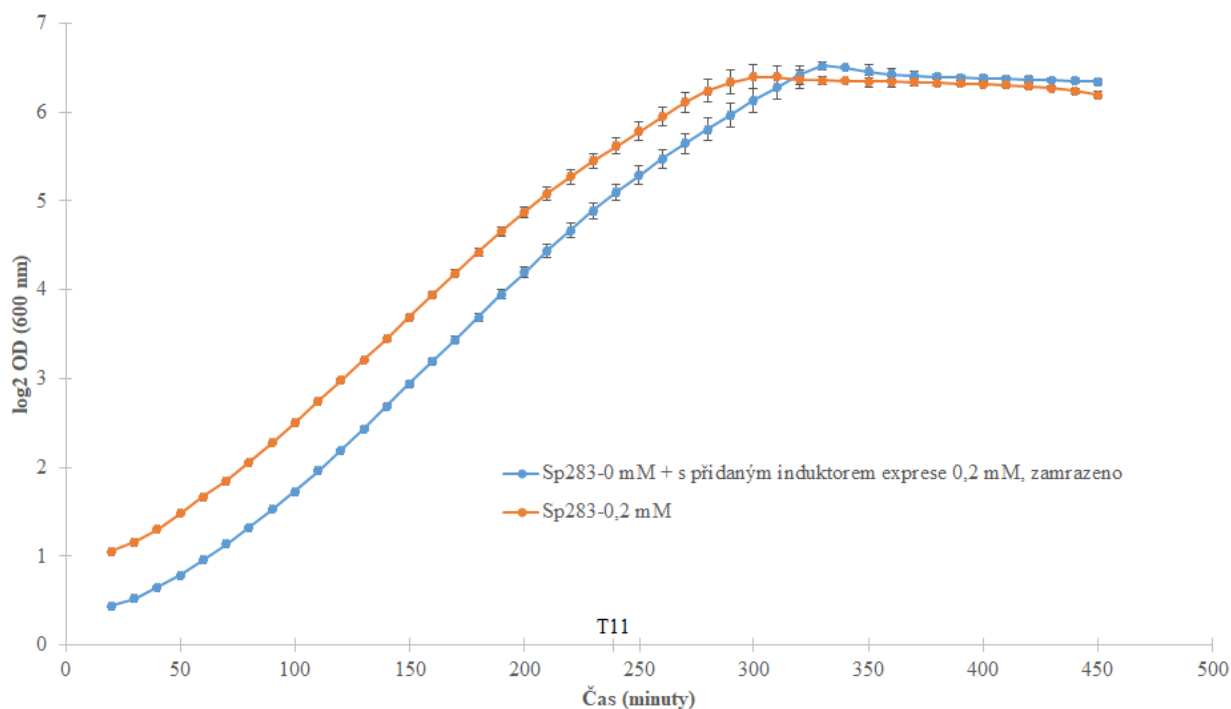
Graf 3

Logaritmické vynesení růstu kmenů Sp 245, 369, 283, 392 v médiu C+Y bez přidavku induktoru exprese a s kontrolní hladinou 0,2 mM ZnCl₂. Graf představuje průměrné hodnoty získané ze tří nezávislých experimentů měřených v duplikátu. T3, T6 a T7 jsou časy odběru vzorků na mikroskopickou analýzu a imunodetekci. Chybové úsečky reprezentují střední chybu průměru.



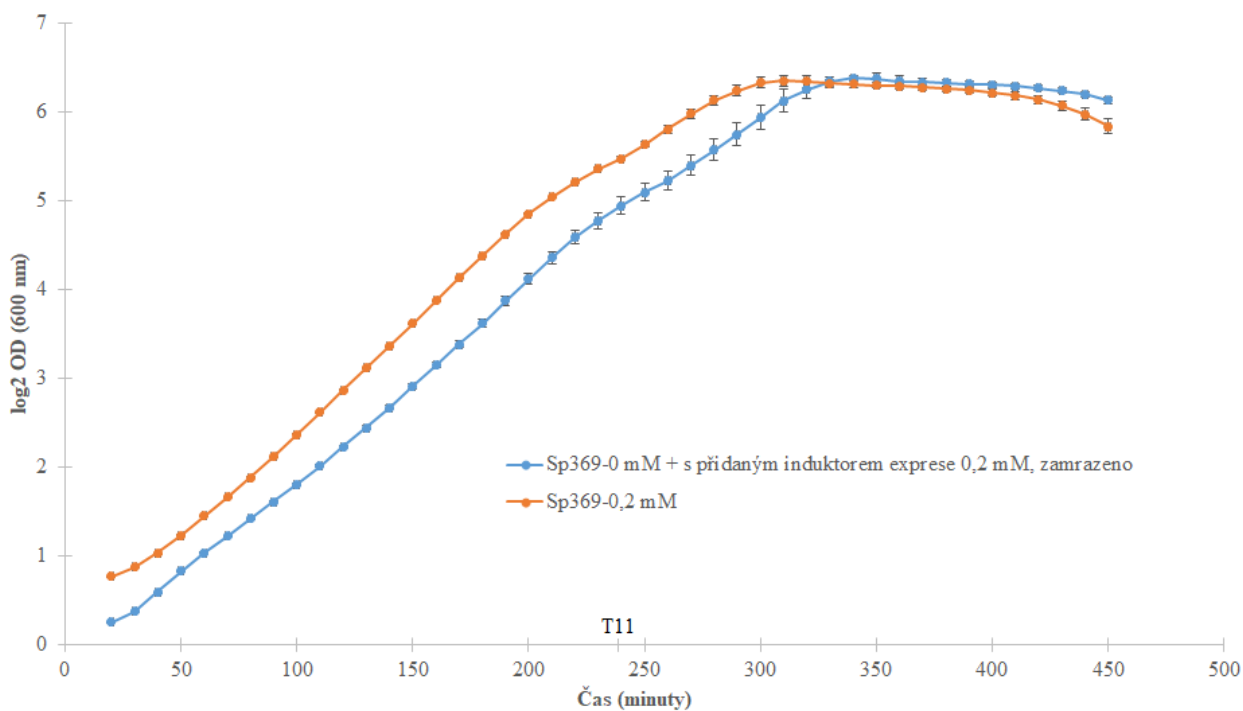
Graf 4

Logaritmické vynesení růstu kmenů Sp283 a 369 v médiu C+Y s dodatečným přidáním 0,2 mM ZnCl₂ do média. Graf představuje průměrné hodnoty získané ze tří nezávislých experimentů. V čase T5 byl do kultur přidán induktor exprese. T3, T6 a T7 jsou časy odběru vzorků na mikroskopickou analýzu a imunodetekci. Chybové úsečky reprezentují střední chybu průměru.



Graf 5

Logaritmické vynesení obnoveného růstu kmene Sp283 po přidání induktoru exprese a po prodloužené kultivaci v médiu C+Y. T11 je čas odběru vzorků na mikroskopickou analýzu a imunodetekci. Graf představuje průměrné hodnoty získané ze tří nezávislých experimentů. Chybové úsečky reprezentují střední chybu průměru.

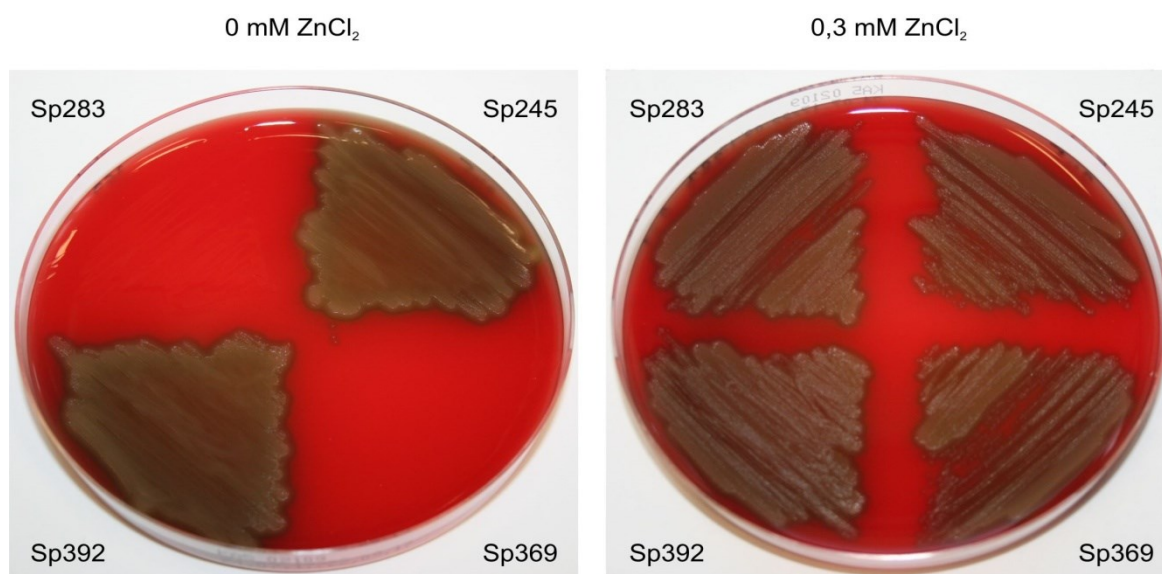


Graf 6

Logaritmické vynesení obnoveného růstu kmene Sp369 po přidání induktoru exprese a po prodloužené kultivaci v médiu C+Y. T11 je čas odběru vzorků na mikroskopickou analýzu a imunodetekci. Graf představuje průměrné hodnoty získané ze tří nezávislých experimentů. Chybové úsečky reprezentují střední chybu průměru.

7.1.8 Test růstu na pevném médiu

Dále byl proveden test růstu kmenů Sp245, Sp283, Sp369 a Sp392 na krevních miskách bez přídavku ZnCl_2 iontů a s kontrolní hladinou 0,3 mM ZnCl_2 (viz **Obrázek 16**). Z výsledků testů vyplývá, že GlmM-depleční kmen Sp283, stejně jako fosfoablativní kmen Sp369 bez přídavku induktoru exprese ZnCl_2 na krevních miskách, podobně jako v tekutém médiu (viz kap. 7.1.7.), neroste. Jako kontrolní kmen byl použit merodiploidní kmen Sp245 a revertantní kmen Sp392, jejichž růst není na přítomnosti ZnCl_2 v médiu závislý.



Obrázek 16

Test růstu kmenů Sp283, Sp245, Sp392, Sp369 na pevném krevním médiu s 0 a 0,3mM koncentrací ZnCl_2

7.1.9 Morfologie buněk kmenů Sp283 a Sp369

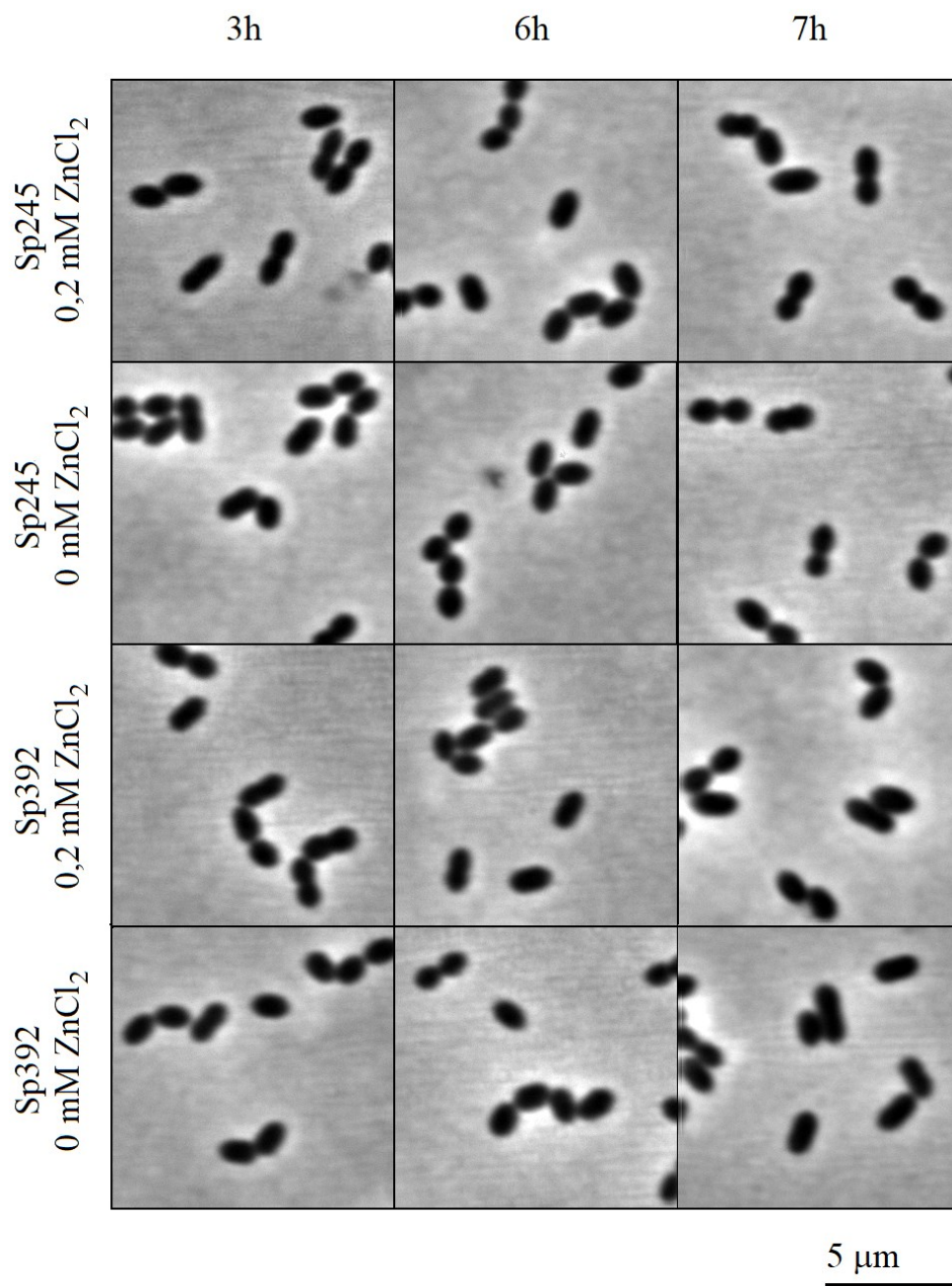
Abychom ověřili, jestli buňky kmenů Sp283 a Sp369 po přidání ZnCl_2 komplementují defektní fenotyp nedostatečné hladiny funkčního proteinu GlmM, provedli jsme mikroskopickou analýzu před a po přidání induktoru exprese proteinu GlmM.

Během kultivace jsme průběžně odebírali vzorky na mikroskopickou analýzu morfologie buněk. Vzorky jsme odebrali v čase 3, 6, 7 a 11 hodin (viz **Grafy 3-6**). V páté hodině kultivace jsme u části vzorků Sp283 a Sp369 dodatečně vyrovnali koncentraci induktoru na kontrolní hladinu a v čase 6, 7 a 11 hodin jsme sledovali, jestli tyto buňky obnoví svoji původní morfologii.

Mikroskopické snímky (**Obrázky 18 a 19**) ukazují, že v čase 3 hodiny buňky Sp283 a Sp369 kultivované bez induktoru vykazují morfologické defekty. Jsou protáhlé, mají citrónovitý tvar a

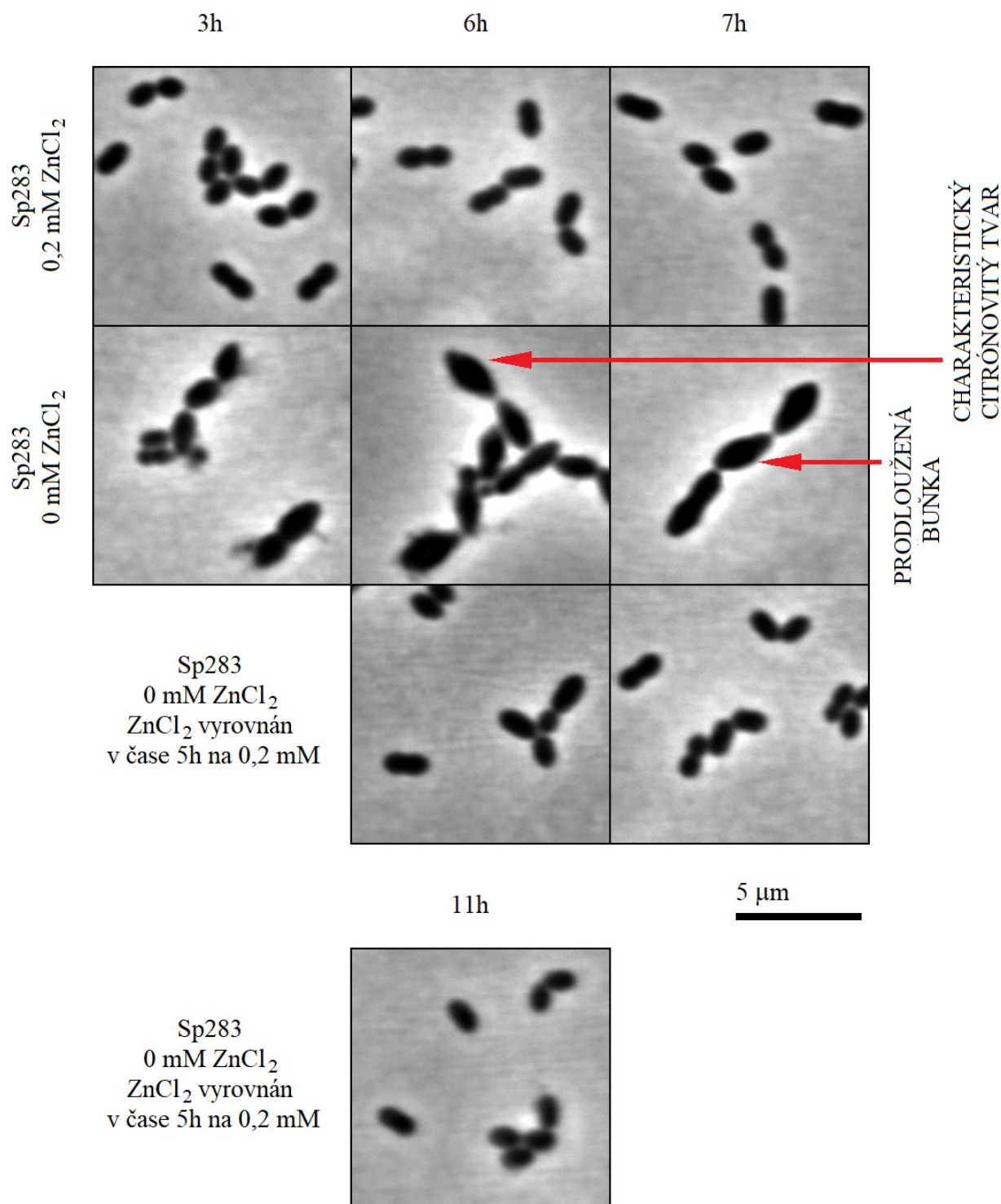
sklon k předčasné lyzi. Je zřejmé, že v nepřítomnosti zinečnatých iontů nedochází k expresi proteinu GlmM a buňky mají problém se syntézou buňčné stěny a s dělením. U vzorků Sp283 a Sp369 s dodatečně zvýšenou koncentrací $ZnCl_2$ na kontrolní hladinu jsou po 6-ti hodinách kultivace ještě stále vidět pozůstatky defektů buněk, avšak po 7-mi hodinách kultivace, tedy 2 hodiny po zvýšení hladiny $ZnCl_2$, už mají tyto buňky obnovenou svoji původní morfologii a vypadají stejně jako kmeny Sp283 a Sp369, u kterých byl induktor $ZnCl_2$ přidán od začátku kultivace nebo jako kontrolní kmen Sp245 či revertantní kmen Sp392 (**Obrázek 17**).

Výsledky z mikroskopické analýzy tak potvrzují fakt, že fosforylace serinových zbytků v pozici 99 a 101 proteinu GlmM je nezbytně nutná pro jeho aktivitu a přežití bakterie *S. pneumoniae*.



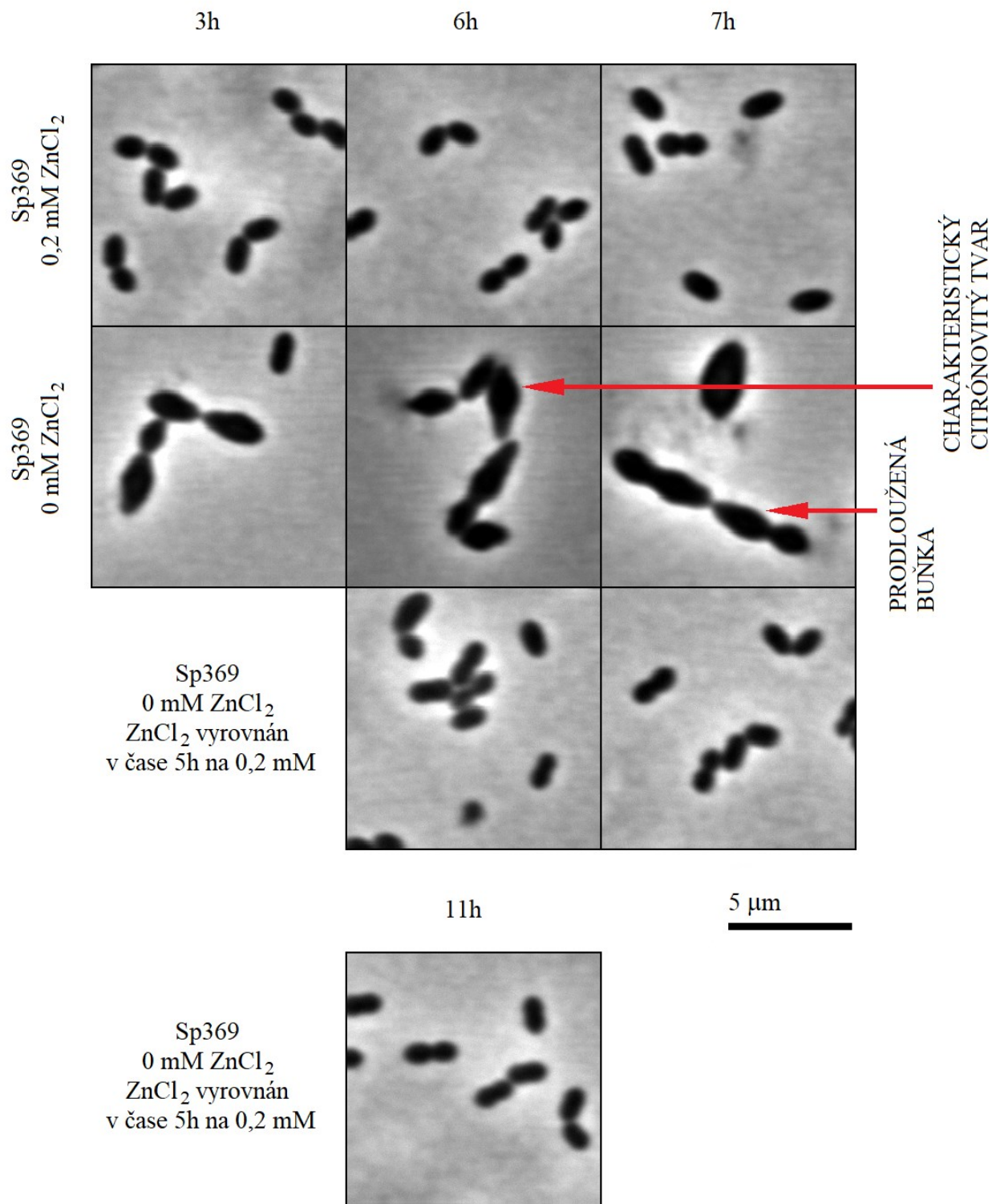
Obrázek 17

Morfologie kmenů Sp245 a Sp392 v C+Y médiu bez induktoru a s kontrolní hladinou induktoru (0,2 mM ZnCl₂).
Mikroskopické snímky byly pořízeny po 3, 6, a 7 h kultivace.



Obrázek18

Morfologie GlmM-deplečního kmene Sp283 v C+Y médiu bez induktoru a s kontrolní hladinou induktoru (0,2 mM ZnCl₂). U kmene Sp283 kultivovaného bez ZnCl₂ byla hladina ZnCl₂ dodatečně dorovnána v čase 5 h. Mikroskopické snímky byly pořízeny po 3, 6, 7 a 11 h kultivace.



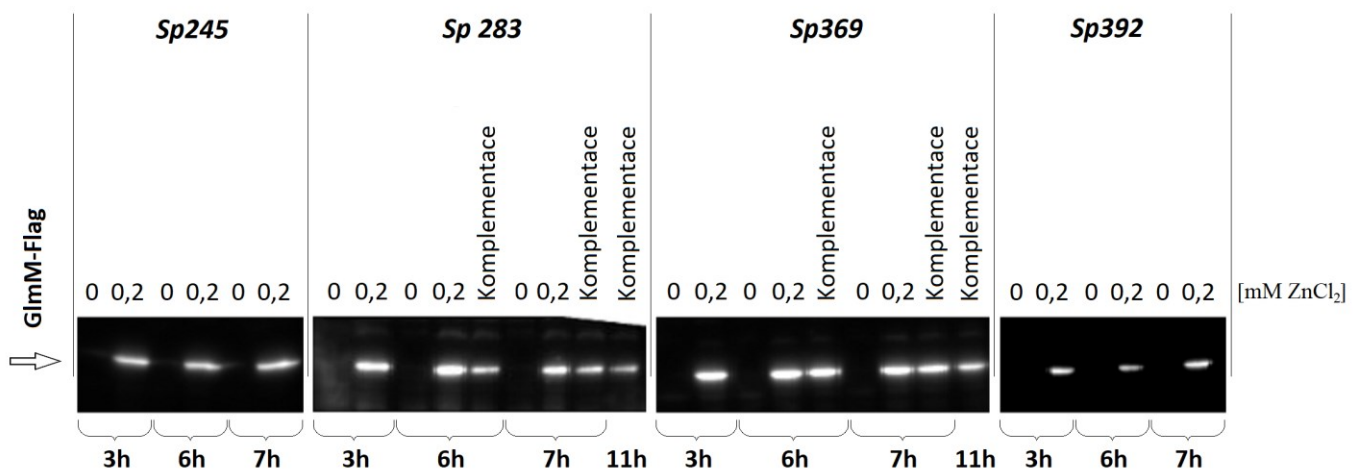
Obrázek19

Morfologie kmene Sp369 v C+Y médiu bez induktoru a s kontrolní hladinou induktoru (0,2 mM ZnCl₂).

U kmene Sp369 kultivovaného bez ZnCl₂ byla hladina ZnCl₂ dodatečně dorovnána v čase 5 h. Mikroskopické snímky byly pořízeny po 3, 6, 7 a 11 h kultivace.

7.1.10 Ověření exprese *GlmM-Flag*

Abychom ověřili expresi proteinu *GlmM-Flag*, provedli jsme imunodetekci protilátkou Anti-Flag proti fúznímu proteinu *GlmM-Flag*. Vzorčky pro imunodetekci jsme odebrali v čase 3h, 6h, 7h a v kmenech s dodatečně přidaným induktorem, což bylo provedeno po 5-ti hodinách kultivace, i v čase 11h. Z imunodetekce je zřejmé, že exprese *GlmM-Flag* je závislá na přítomnosti $ZnCl_2$ v médiu. Intenzita signálu na **Obrázku 20** ukazuje, že již hodinu po přidání induktoru, u vzorků kultivovaných původně bez $ZnCl_2$, byla obnovena exprese *GlmM-Flag*. Toto pozorování je v souladu s mikroskopickou analýzou, kde k částečnému obnovení morfologie divokého typu dochází také během jedné hodiny po přidání $ZnCl_2$ ke kulturám kmenů *Sp283* a *Sp369*. Úplná morfologická komplementace je pozorována dvě hodiny po přidavku $ZnCl_2$ (viz **Obrázek 18 a 19**).



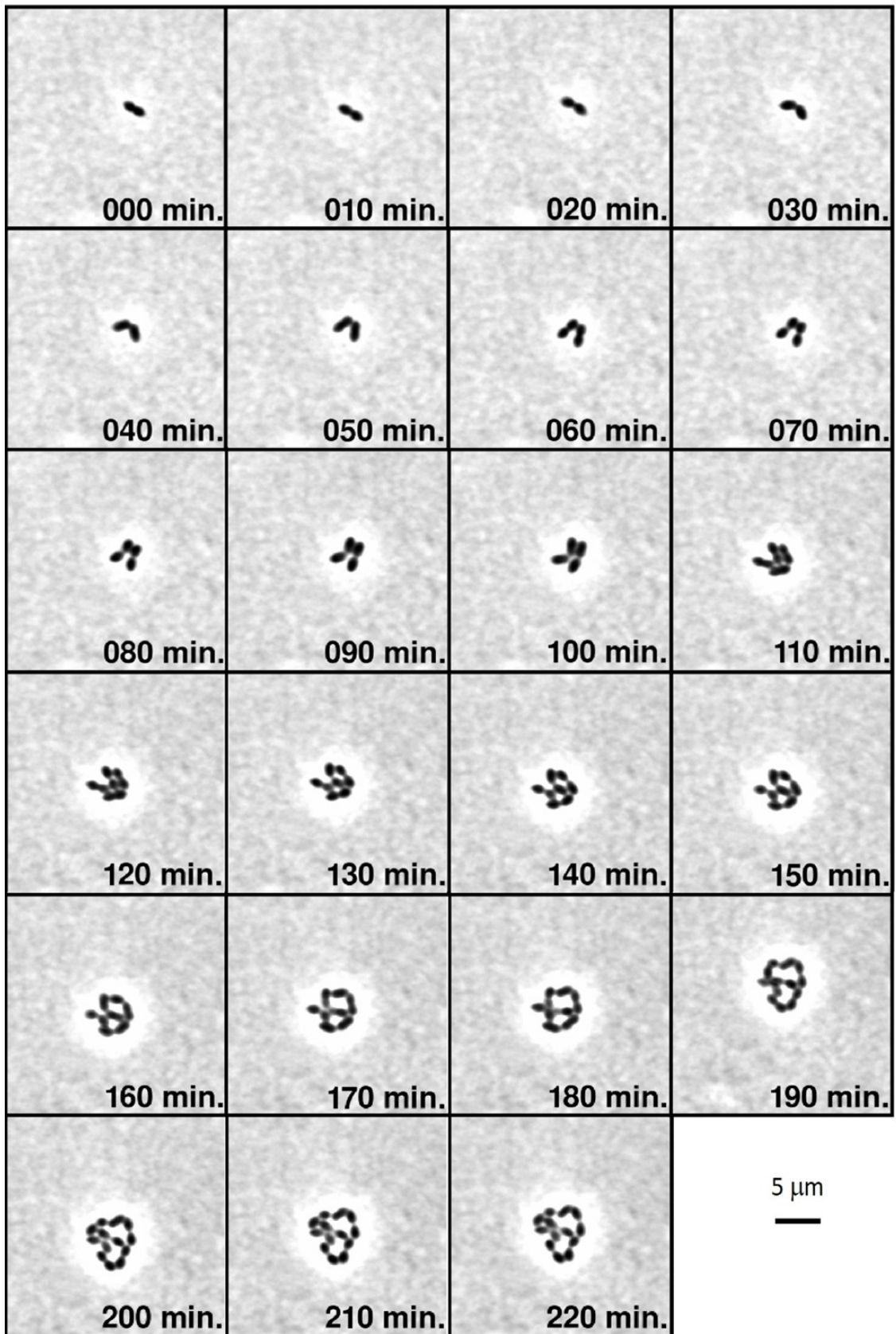
Obrázek 20
Expres proteinu *GlmM-Flag*

Kultivace probíhala v médiu C+Y v přítomnosti 0,2 mM $ZnCl_2$ a bez něj. Byly použity dva kontrolní kmeny (merodiploidní kmen *Sp245* a revertantní kmen *Sp392*), dále depleční kmen *Sp283* a mutantní kmen *Sp369*. V čase 3h byly odebrány vzorky pro imunodetekci, před dodatečným přidáním induktoru exprese do média. V kultivacích bez $ZnCl_2$ nebyl detekován žádný signál exprese *GlmM*. V čase 5 h byl do kultivačního média kmene *Sp283* a *Sp369* bez $ZnCl_2$ doplněn induktor exprese na kontrolní hladinu 0,2 mM (v obrázku označeno jako komplementace). V čase 6, 7 a 11 hodin byly odebrány další vzorky pro imunodetekci a u kmenů kultivaných s dodatečně přidaným induktorem exprese byl již 1 hodinu po přidání detekován signál exprese *GlmM* v buňkách. Imunodetekce proteinu *GlmM-Flag* byla provedena pomocí Anti-Flag protilátky.

7.1.11 Morfologie *GlmM*-deplečního kmene *Sp261* v reálném čase

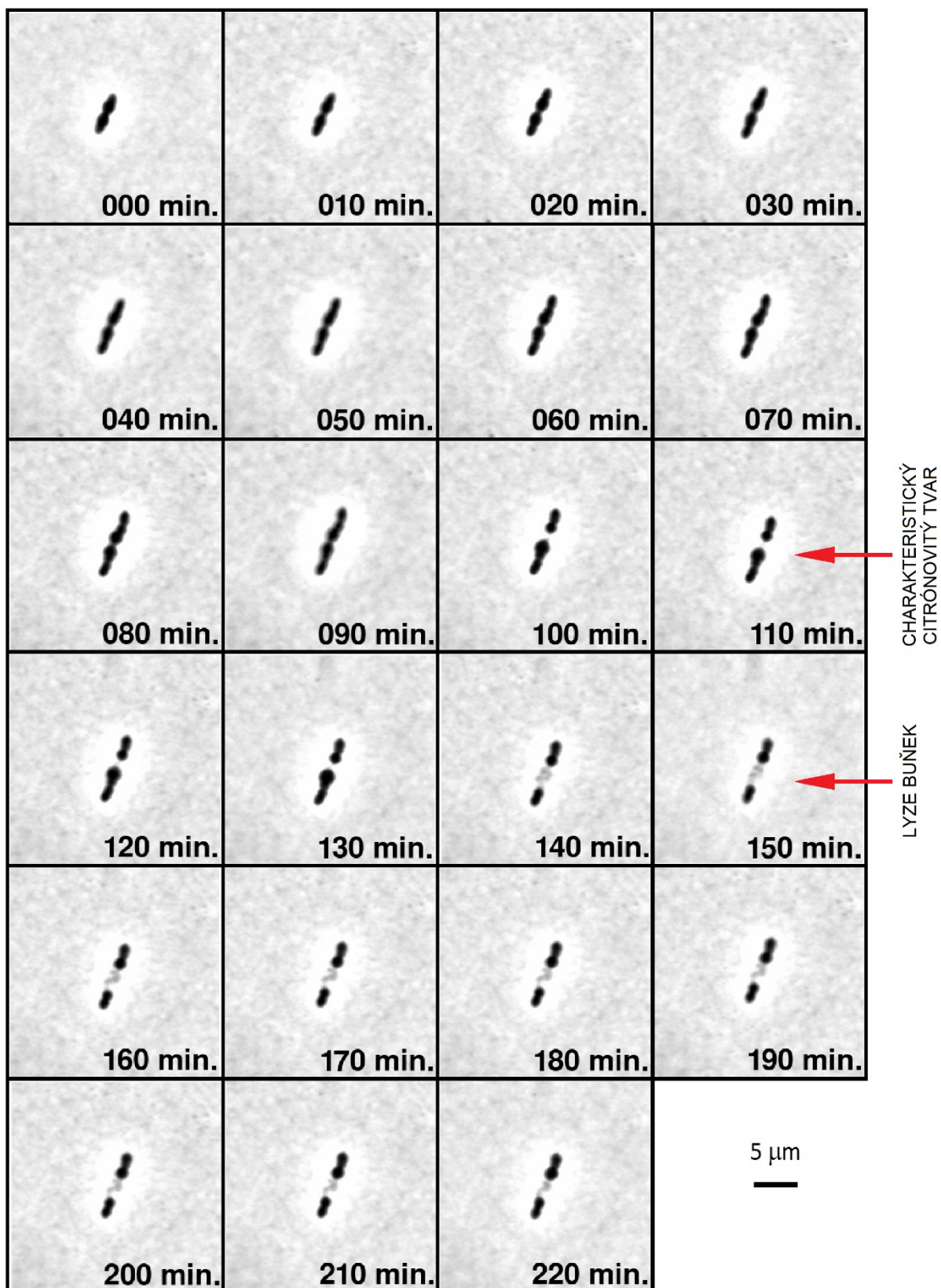
K pozorování morfologických defektů v reálném čase u *GlmM*-deplečního kmene *Sp261* (Rx; $\Delta glmM::janus bga::PczcD-glmM-flag$) jsme využili metodu časosběrné mikroskopie neboli time-lapse microscopy. Kmen *Sp261* byl kultivován v médiu C+Y v přítomnosti kontrolní (0,2 mM)

hladiny induktoru $ZnCl_2$ a při depleční hladině induktoru (0,1 mM), sklizen v exponenciální fázi růstu a podroben mikroskopické analýze. Buňky Sp261 kultivované při kontrolní hladině $ZnCl_2$ se dělí standardním způsobem bez jakýchkoliv morfologických defektů, ale buňky kultivované v médiu při depleční koncentraci $ZnCl_2$ vykazují různé morfologické aberace. Buňky se dělí pomaleji, jsou protáhlejšího tvaru a tvoří nápadné defekty citrónovitého tvaru, které následně rychle lyzují (**Obrázky 21 a 22**). Z časových důvodů byla časosběrná mikroskopie provedena pouze na kmeni Sp261. V budoucnu je však plánováno experiment zopakovat na neznačeném GlmM-deplečním kmeni Sp283 (R6; $\Delta glmM bga::PczcD-glmM-flag$).



Obrázek 21

Morfologie buněk GlmM-deplečního kmene Sp261 (Rx; $\Delta glmM::janus bga::PczcD-glmM-flag$) v médiu C+Y s kontrolní hladinou induktoru 0,2 mM. Sekvence mikroskopických snímků pořízena metodou časosběrné mikroskopie.



Obrázek 22

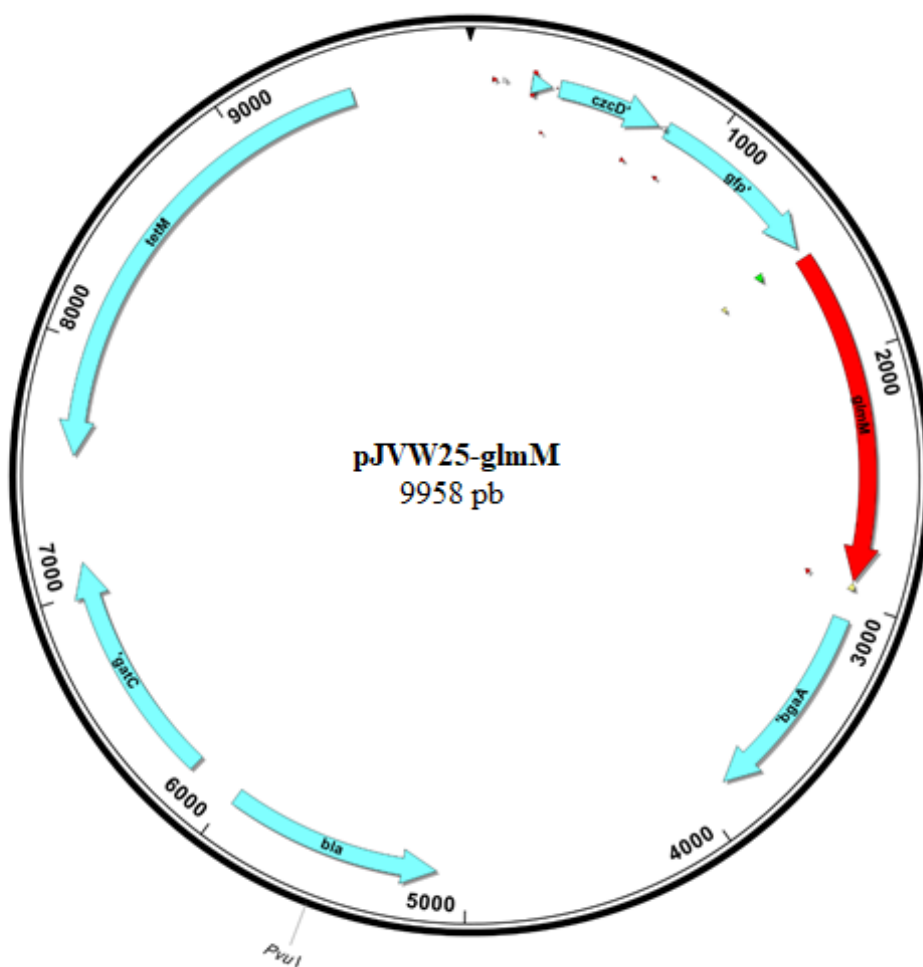
Morfologie buněk *GlmM*-deplečního kmene Sp261 (Rx; $\Delta glmM::janus bga::PzcD-glmM-flag$) v médiu C+Y s depleční hladinou induktoru 0,1 mM. Sekvence mikroskopických snímků pořízena metodou časosběrné mikroskopie.

7.2 Lokalizace fosfoglukozaminmutázy *GlmM* v buňce

Abychom mohli určit lokalizaci proteinu *GlmM* v buňce, připravili jsme merodiploidní kmeny Sp331 a Sp332 kódující dvě kopie genu *glmM*: nativní *gen* exprimovaný konstitutivně a jeho ektopickou kopii fúzovanou s GFP fluorescenční značkou, jejíž exprese je pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru.

7.2.1 Příprava plasmidu *pJWV25-glmM*

Pro přípravu konstruktů *pJWV25-glmM* jsme použili vektor *pJWV25*, který jsme naštěpili restričními endonukleázami *SpeI* a *NotI*. Dále jsme amplifikovali *glmM-flag* podle templátu chromozomální DNA kmene Sp217 (Rx; *bga::PczcD-glmM-flag*; laboratorní archiv) pomocí oligonukleotidů AU94 a AU95 a amplifikovaný fragment rovněž štěpili restriktázami *SpeI* a *NotI*. Následně proběhla ligace obou fragmentů a transformace do buněk *E. coli* DH5 α . Tento kmen byl označen Ec255. Správnost připraveného plasmidu *pJWV25-glmM* byla ověřena sekvenací. Mapa vektoru je znázorněna na **Obrázku 23**.



Obrázek 23
Plasmid *pJVW25-glmM*

czcD: inducibilní zinkový promotor; *gfp*: gen kódující GFP; *glmM*: gen kódující enzym GlmM; *bgaA* a *gatC*: oblasti umožňující homologní rekombinaci vektoru do chromozomu *S. pneumoniae*; *tetM*: gen pro rezistenci k tetracyklinu; *bla*: gen pro rezistenci k ampicilinu; **GFP-kotva**: sekvence kódující GFP-kotvu, *PvuI*: použitá restriční endonukleáza.

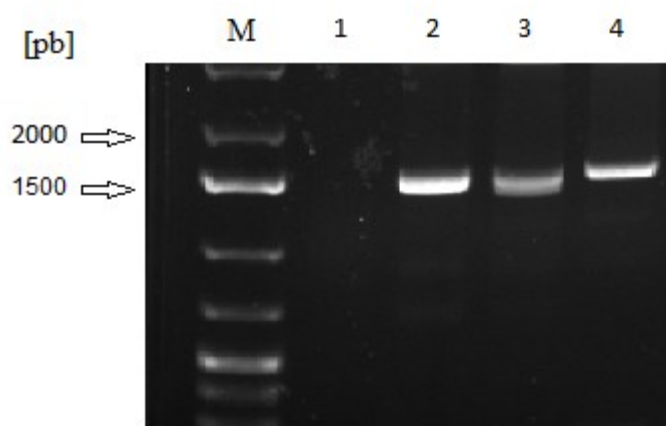
7.2.2 Transformace plasmidu *pJVW25-glmM* do chromozomu *S. pneumoniae*

Připravený vektor *pJVW25-glmM* jsme linearizovali pomocí restriční endonukleázy *PvuI* a poté použili pro transformaci do divokého typu Rx (Sp1) a R6 (Sp225) za vzniku Tet^R merodiploidních kmenů s ektopickou kopií fúzního proteinu GFP-GlmM, jehož exprese podléhá kontrole inducibilního zinkového promotoru *P_{czcD}*. Tyto kmeny jsme označili Sp331 (*Rx; bgaA::P_{czcD}-gfp-glmM*) a Sp332 (*R6; bgaA::P_{czcD}-gfp-glmM*). Správnost inserce fúze *P_{czcD}-gfp-glmM* do lokusu *bgaA* získaných kmenů jsme ověřili koloniovou PCR (data nejsou uvedena).

Abychom ověřili, že fúzní protein GFP-GlmM je v buňkách *S. pneumoniae* funkční, odstranili jsme z kmenů Sp331 a Sp332 gen *glmM* z nativního lokusu pomocí konstruktů JanusKΔ*glmM*.

Transformace konstruktů JanusK Δ glmM do Sp331 či Sp332 proběhla v médiu TSB s přidavkem 0,1 mM ZnCl₂, a výsledné kmeny, které byly Kan^R a Str^S, jsme označili Sp367 (*Rx; Δ glmM::janus bga::PczcD_{czc}-gfp-glmM*) a Sp368 (*R6; Δ glmM::janus bga::PczcD_{czc}-gfp-glmM*). Předpokládali jsme, že jestliže bude růst kmenů Sp367 a Sp368 zcela závislý na přítomnosti ZnCl₂ v médiu, bude to znamenat, že fúzní protein GFP-GlmM je funkční a jeho exprese je postačující pro přežití mikroorganismu.

Správné vložení konstruktů JanusK Δ glmM v kmenech Sp367 a Sp368 bylo ověřeno pomocí koloniové PCR. Byly použity oligonukleotidy JK013 a JK012 z nichž jeden je komplementární k sekvenci ležící v Janus kazetě a druhý k sekvenci na chromozomu, která leží mimo rekombinovanou oblast. Vznikl produkt očekávané velikosti je 1628 pb. Jako negativní kontrola byla použita chromozomální DNA kmene Sp1, jako pozitivní kontrola byla použita chromozomální DNA kmene Sp261, který také obsahuje Janus kazetu. Ověření vložení JanusK Δ glmM v kmenech Sp367 a Sp368 je názorně na **Obrázku 24**.



Obrázek 24

Elektroforetogram kontrolních PCR fragmentů u kmenů Sp367 a Sp368 - ověření správného vložení konstruktů JanusK Δ glmM do kmenů Sp331 a Sp332 pomocí PCR a oligonukleotidů JK013 a JK012

Vlevo (M) standard molekulových hmotností GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

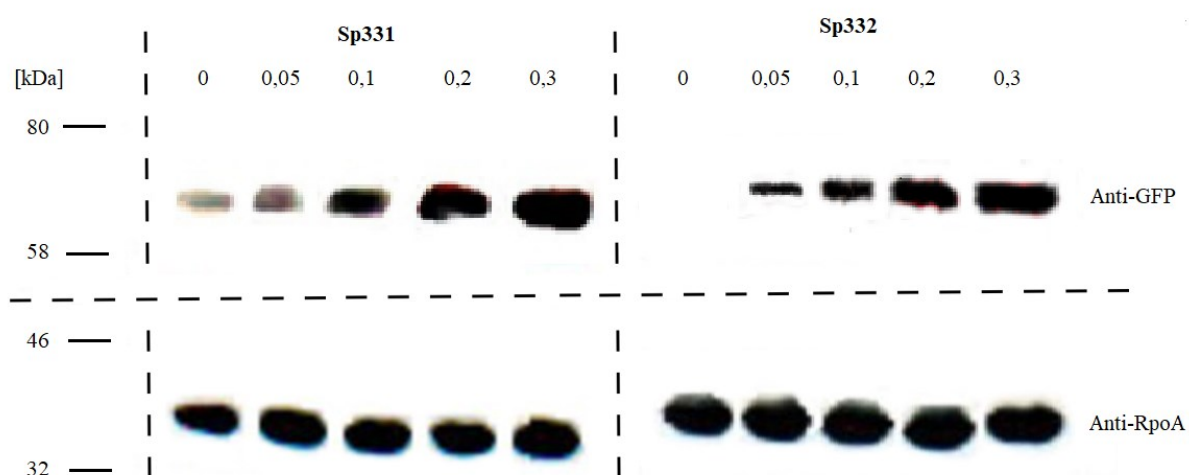
1. Negativní kontrola chromozomální DNA Sp1 – nevznikl žádný produkt.
2. Pozitivní kontrola chromozomální DNA kmene Sp261 – vznikl produkt o velikosti 1628 pb.
3. Ověření správného vložení konstruktů JanusK Δ glmM v kmeni Sp367 za vzniku produktu o očekávané velikosti 1628 pb.
4. Ověření správného vložení konstruktů JanusK Δ glmM v kmeni Sp368 za vzniku produktu o očekávané velikosti 1628 pb.

7.2.3 Test exprese GFP-GlmM

Pro stanovení optimální hladiny exprese fúzního proteinu GFP-GlmM jsme na proteinových lyzátech kmenů Sp331, resp. Sp332 kultivovaných v TSB médiu provedli imunodetekci s použitím konjugované protilátky anti-GFP a detekovali jsme protein, který velikostně odpovídal GFP-GlmM (74,4 kDa). U obou kmenů se signál s rostoucí koncentrací induktoru exprese v médiu zvětšoval. Jako negativní kontrolu jsme použili proteinový lyzát kultur s nulovou koncentrací induktoru ZnCl₂ (viz **Obrázek 25**).

Abychom ověřili, zda není rozdílný signál exprese proteinu GFP-GlmM způsoben rozdílnou nanáškou proteinového lyzátu, ověřili jsme rovnoměrnost nanášky proteinů na 1D SDS-PAGE gel prostřednictvím imunodetekce proti proteinu RpoA (α -podjednotka RNA polymerázy).

Pro následující růstové experimenty byla jako optimální hladina induktoru exprese zvolena 0,2 mM koncentrace ZnCl₂ v médiu, kdy je již exprese GFP-GlmM srovnatelná s hladinou proteinu detekovanou při 0,3 mM koncentraci ZnCl₂.



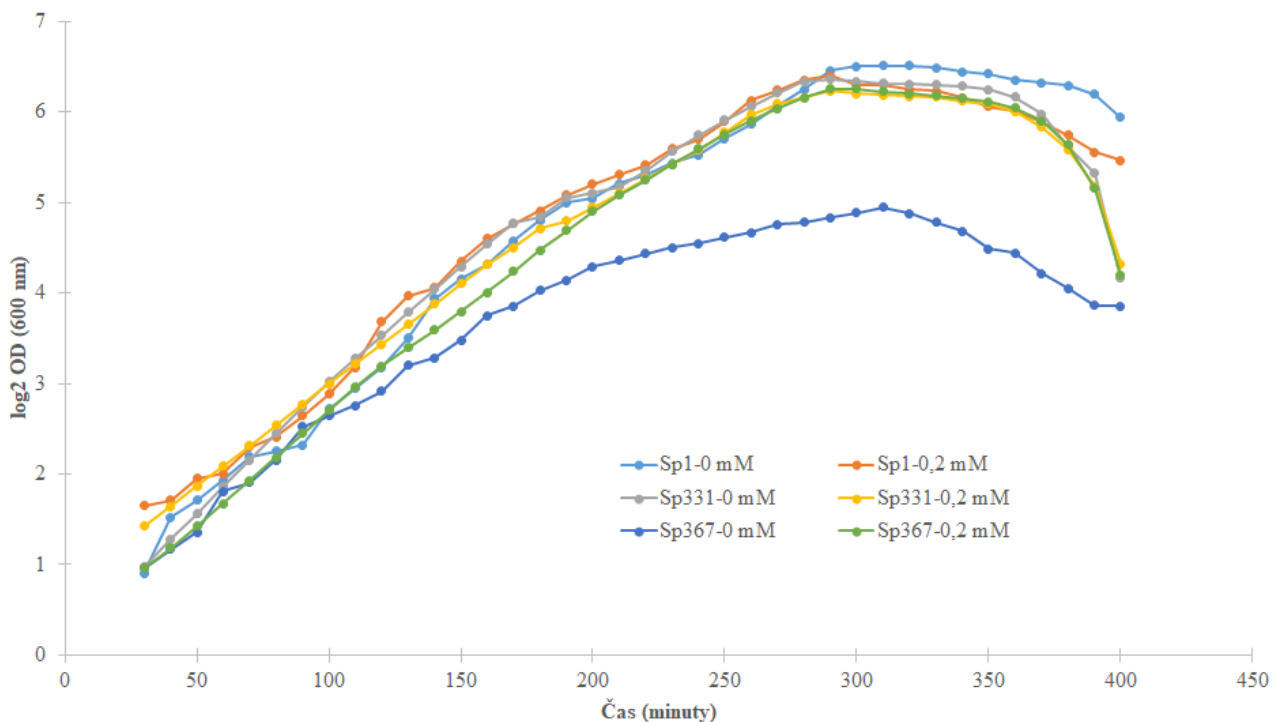
Obrázek 25
Imunodetekce GFP-GlmM protilátkou anti-GFP a anti-RpoA.

Expresa proteinu GFP-GlmM byla stanovena v přítomnosti různé koncentrace ZnCl₂ (0-0,3 mM) v médiu u kmene Sp331 (vlevo) a Sp332 (vpravo). Expresa Gfp-GlmM byla vizualizována imunodetekcí pomocí protilátky anti-GFP. Jako kontrola stejné nanášky proteinů na gel posloužila imunodetekce pomocí protilátky Anti-RpoA. Velikost fúzního proteinu GFP-GlmM je 74,4 kDa, zatímco RpoA putuje kolem 35 kDa.

7.2.4 Test růstu kmenů exprimujících fúzní protein GFP-GlmM

Abychom vyloučili pochybnosti, že fúzní protein GFP-GlmM je nefunkční a zároveň výrazně neovlivňuje fyziologii *S. pneumoniae*, změřili jsme růstové křivky kmenů Sp367, resp. Sp368 a porovnali s kmeny Sp331, resp. Sp332. Jako kontrolu jsme použili kmeny Sp1, resp. Sp225.

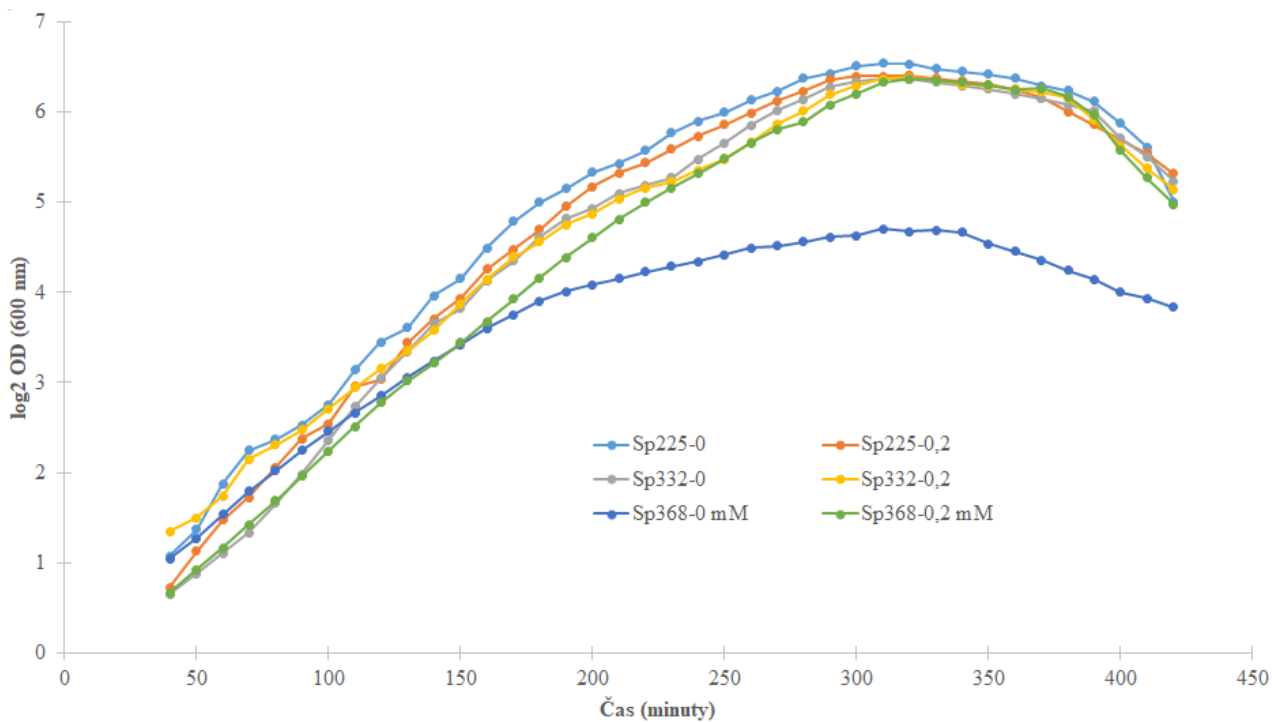
Hladinu zinečnatých iontů jsme použili u všech kmenů stejnou - 0,2 mM. Z grafu vyplývá, že kmeny Sp331 a Sp332 rostou srovnatelně rychle v porovnání s přílušnými kontrolními kmeny a tedy se zdá, že GFP fluorescenční značka nemá na bakteriální fyziologii zásadní vliv. Kmeny Sp367 a Sp368 jsou závislé na přítomnosti $ZnCl_2$ v kultivačním médiu. Z toho vyplývá, že fúzní protein GFP-GlmM je funkční a v přítomnosti induktoru exprese zcela nahradí nativní GlmM. Naměřené hodnoty optických denzit jsou znázorněny v **Grafech 7 a 8**.



Graf 7

Reprezentativní růstová křivka kmene Sp367 ve srovnání s kmeny Sp1 a Sp331

Kmeny byly kultivovány v TSB médiu bez a s přidavkem 0,2 mM ZnCl₂.
 Jako kontrolní kmeny byly použity kmeny Sp1 a Sp331.



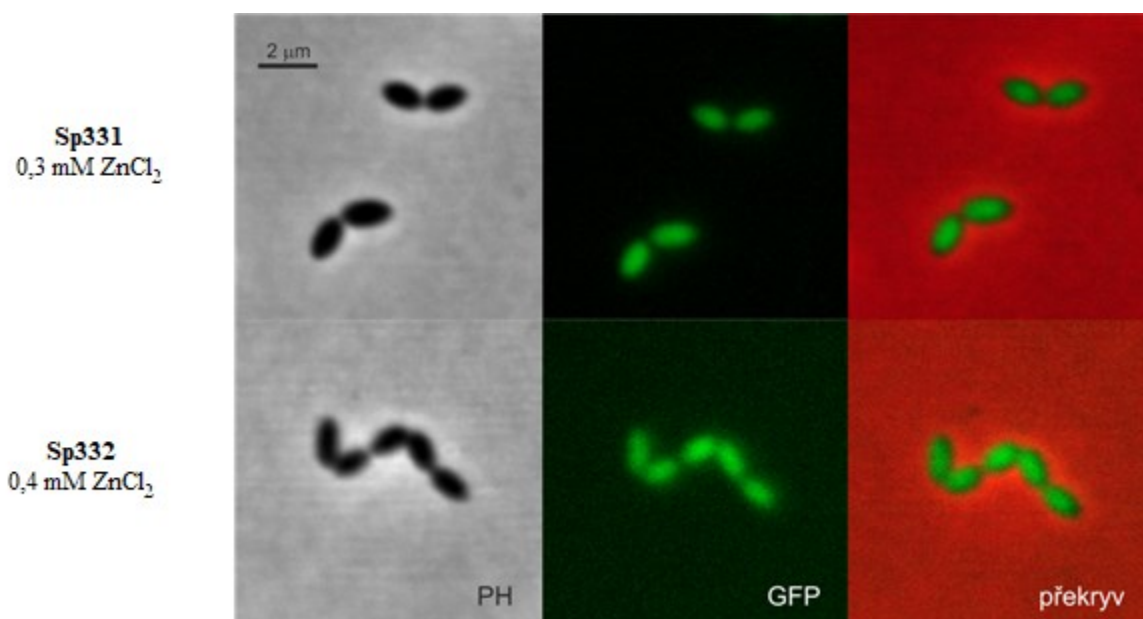
Graf 8

Reprezentativní růstová křivka kmene Sp368 ve srovnání s kmeny Sp225 a Sp332

Kmeny byly kultivovány v TSB médiu bez a s přidavkem 0,2 mM ZnCl₂.
 Jako kontrolní kmeny byly použity kmeny Sp225 a Sp332.

7.2.5 Fluorescenční mikroskop

Za účelem určení lokalizace proteinu GlmM v buňce *S. pneumoniae* jsme provedli mikroskopickou analýzu kmenů Sp331 (Rx; *bgaA::PczcD_{czc}-gfp-glmM*) a Sp332 (R6; *bgaA::PczcD_{czc}-gfp-glmM*). Kmeny jsme kultivovali v médiu TSB v přítomnosti 0,3 a 0,4 mM ZnCl₂. Při těchto koncentracích zinečnatých iontů bylo dosaženo nejintenzivnějšího fluorescenčního signálu. Z **Obrázku 26** je zřejmé, že protein GFP-GlmM je lokalizován v cytoplazmě *S. pneumoniae*.



Obrázek 26

Lokalizace GlmM v buňce - fluorescenční mikroskopii. Kmeny Sp331 (Rx; *bgaA::PczcD_{czc}-gfp-glmM*) a Sp332 (R6; *bgaA::PczcD_{czc}-gfp-glmM*) byly kultivovány v TSB médiu při koncentracích 0,3 a 0,4 mM ZnCl₂.

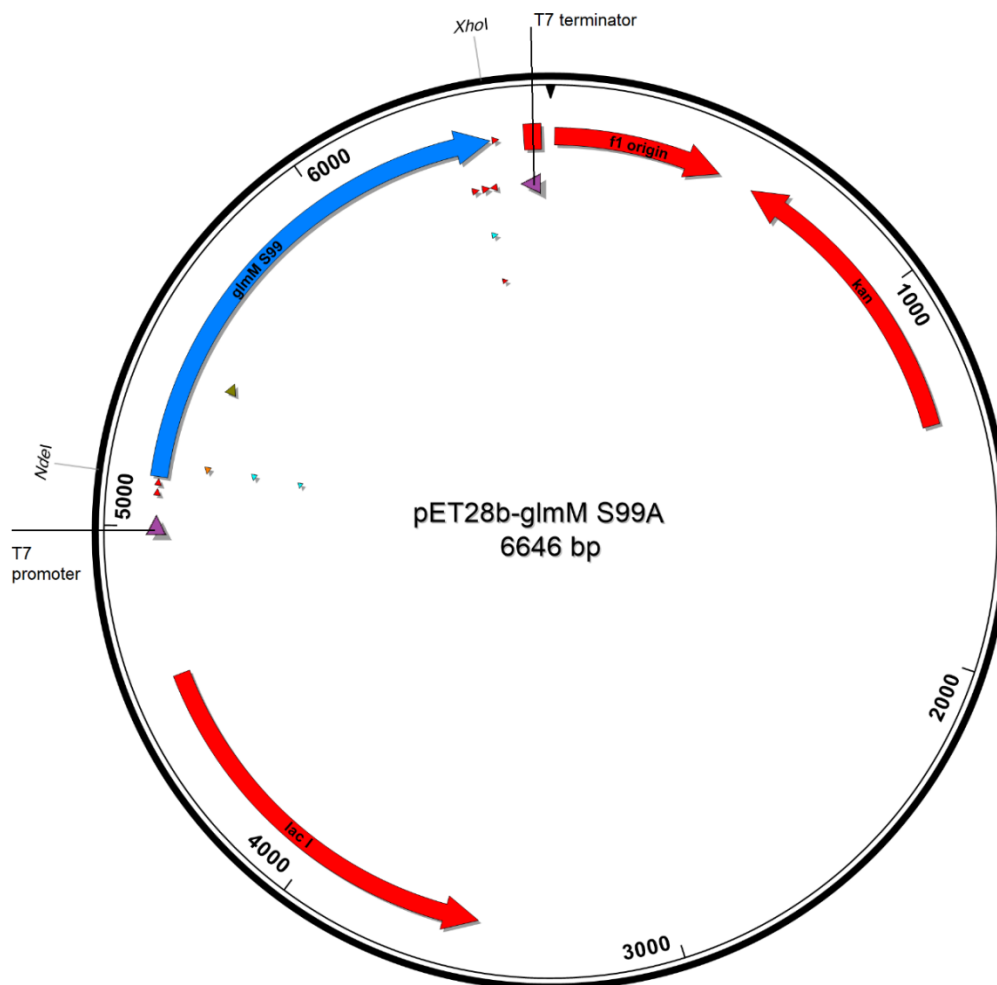
Zkratky u mikroskopických snímků: PH – fázový kontrast, GFP – GFP filtr, překryv – překryv fázového kontrastu a GFP filtru.

7.3 Stanovení místa fosforylace proteinu *GlmM* proteinkinázou *StkP* *in vitro*

Za účelem určení místa fosforylace proteinu *GlmM* proteinkinázou *StkP* *in vitro* jsme vytvořili kmen *E. coli*, který exprimoval *GlmM* s aminokyselinovou záměnou S99A a rovněž jsme použili kmen *E. coli*, který exprimoval *GlmM* se záměnou S101A (laboratorní archiv). Tyto proteiny jsme exprimovali, purifikovali a dále podrobili kinázové reakci *in vitro*. Jako kontrola byla použita WT forma proteinu. Dále jsme *in vitro* kinázovou reakci *GlmM* WT rozdělili na 1D SDS-PAGE a odeslali k MS analýze za účelem identifikace míst fosforylace *GlmM* proteinkinázou *StkP*. Také jsme se pokusili zjistit, zda je protein *GlmM* schopen autofosforylace *in vitro*.

7.3.1 Příprava konstruktů pro expresi *GlmM* S99A v *E. coli*

Pro přípravu konstruktů exprimujících *GlmM* S99A jsme použili vektor *pET28b-glmM* (Pallová, 2007), který jsme izolovali z *E. coli* z kmene Ec428 (*BL21*; *pET28b-glmM*). Pomocí soupravy QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit a oligonukleotidů AU65 a AU66 jsme vytvořili bodovou záměnu v *glmM* (serin v pozici 99 za alanin). Produkt PCR jsme transformovali do *E. coli* DH5 a posléze po izolaci plasmidu a ověření sekvence také do kompetentních buněk *E. coli* BL21.. Nově vzniklý kmen jsme označili Ec440 (*BL21*; *pET28b-glmM S99A*). Mapa vektoru je znázorněna na **Obrázku 27**.

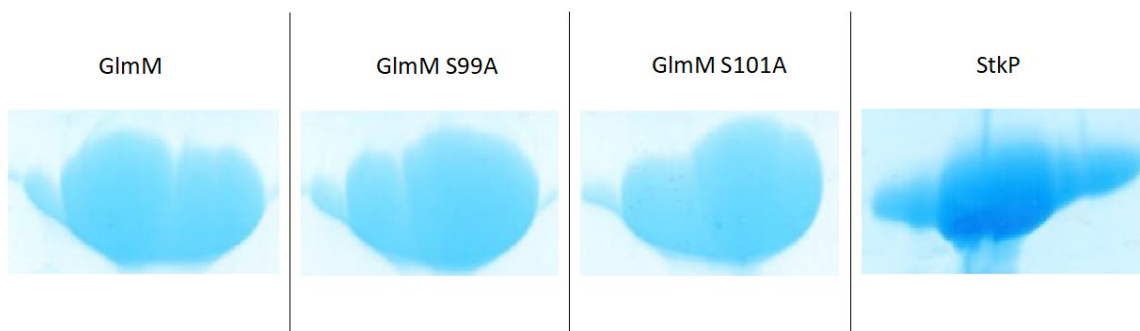


Obrázek 27
Vektor pET28b-glmM S99A

glmM S99A: gen kódující enzym GlmM s aminokyselinovou záměnou S99A; *kan*: gen pro rezistenci ke kanamycinu; *XhoI*, *NdeI*: použité restrikční endonukleázy, *lacI*: laktosa-indukovatelný lac operonový transkripční represor; *flori* origin: místo počátku replikace, **T7 promóter** a **T7 terminator** – oligonukleotidy,

7.3.2 Purifikace proteinu *GlmM* a fosforylace *in vitro* proteinkinázou *StkP*

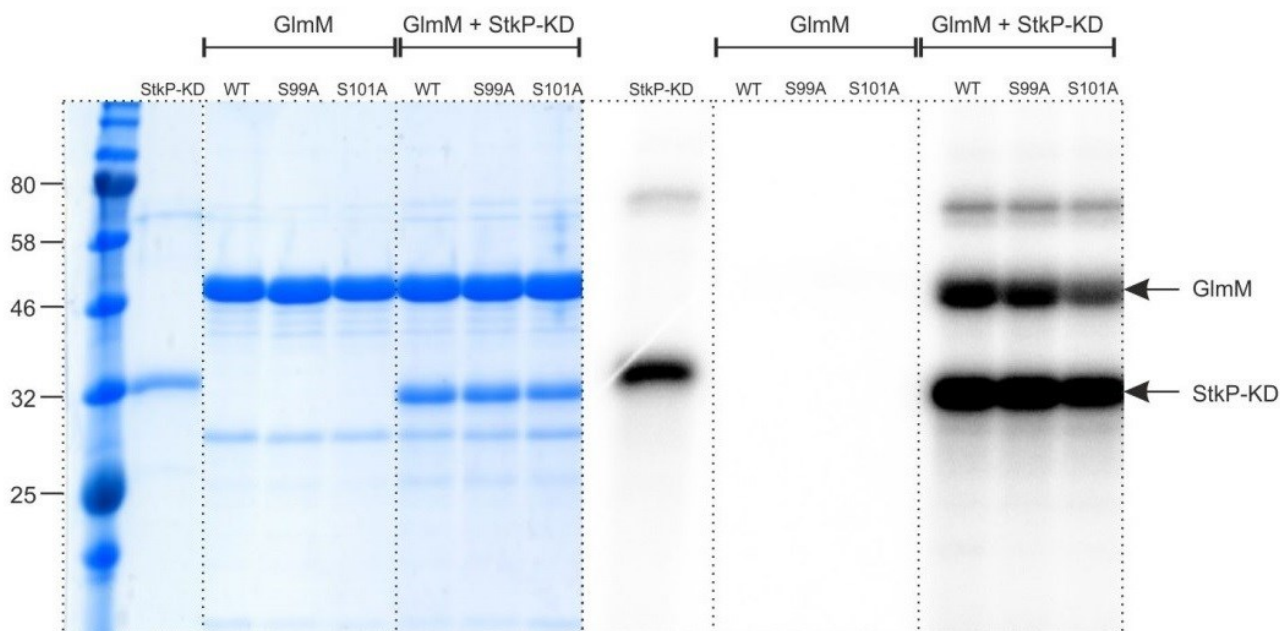
Abychom mohli provést kinázovou reakci *in vitro* potřebovali jsme připravit proteiny His-GlmM S99A a His-GlmM S101A, jako pozitivní kontrolu jsme použili divokou formu proteinu His-GlmM. Všechny proteiny jsme purifikovali pomocí afinitní chromatografie přes histidinovou kotvu. Samotnou kinázovou doménu z proteinkinázy *StkP* jsme purifikovali z kmene Ec50 (*BL21 pEXStk-T*). Výsledek purifikace ilustruje **Obrázek 28**.



Obrázek 28

Purifikace proteinů s histidinovou kotvou pomocí afinitní chromatografie na NiNTa resinu - eluáty proteinů GlmM WT, GlmM S99A, GlmM S101A a StkP-KD. 1D SDS-PAGE gel purifikovaných proteinů eluovaných ve frakcích 1-3.

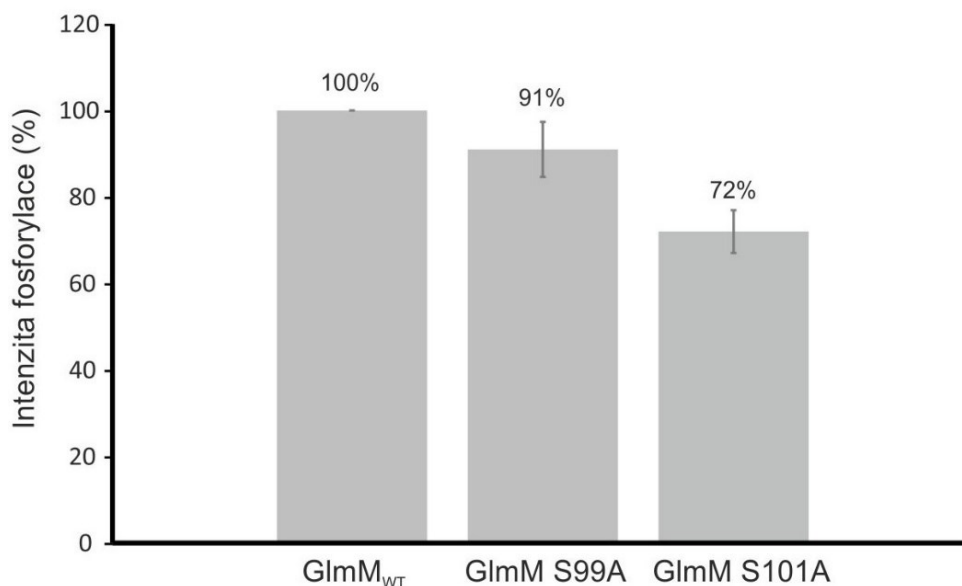
Abychom ověřili, že seriny v pozici 99 a 101 v proteinu GlmM nejsou jedinými místy fosforylace, provedli jsme kinázovou reakci *in vitro* s použitím radioaktivně značeného γ - ^{32}P -ATP na purifikovaných proteinech GlmM S99A a S101A a jejich fosforylační profil porovnali s fosforylačním profilem divoké formy GlmM. Všechny reakce byly provedeny jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti proteinkinázové domény StkP-KD a autofosforylační aktivita proteinkinázové domény StkP-KD byla ověřena v kinázové reakci *in vitro* bez přidání substrátu GlmM. Jako kofaktor kinázové reakce byl použit MnCl_2 . Pro kontrolu stejné nanášky proteinů jsme akrylamidový gel obarvili Coomassie Blue G-250. Výsledek analýzy je znázorněn na **Obrázku 29**. Kvantifikace fosforylačního signálu byla provedena pomocí programu Quantity One 4.6.6. a je znázorněna v **Grafu 9**.



Obrázek 29

Autoradiogram kinázových reakcí *in vitro* jednotlivých forem GlmM v přítomnosti StkP-KD a MnCl₂

Zleva: standard molekulových hmotností, samotná autofosforylace kinázové domény StkP (Stkp-KD), GlmM WT, GlmM S99A, GlmM S101A bez přidané kinázové domény StkP-KD a GlmM WT, GlmM S99A, GlmM S101A s přidanou kinázovou doménou StkP-KD. Na reakci byly použity 2 µg purifikovaného proteinu. Jako kontrola stejné nanášky všech vzorků posloužil barvený gel pomocí Coomassie Blue G-250 (vlevo). Obarvený gel byl exponován na citlivou fólii 2 dny a vizualizován pomocí přístroje Molecular Imager FX, Bio-Rad (autoradiogram vpravo).



Graf 9

Kvantifikace transfosforylace jednotlivých forem GlmM proteinkinázou StkP

Graf znázorňuje intenzitu fosforylačního signálu u jednotlivých mutovaných variant proteinu GlmM s aminokyselinovými záměnami vůči divokému typu proteinu GlmM *S. pneumoniae*.

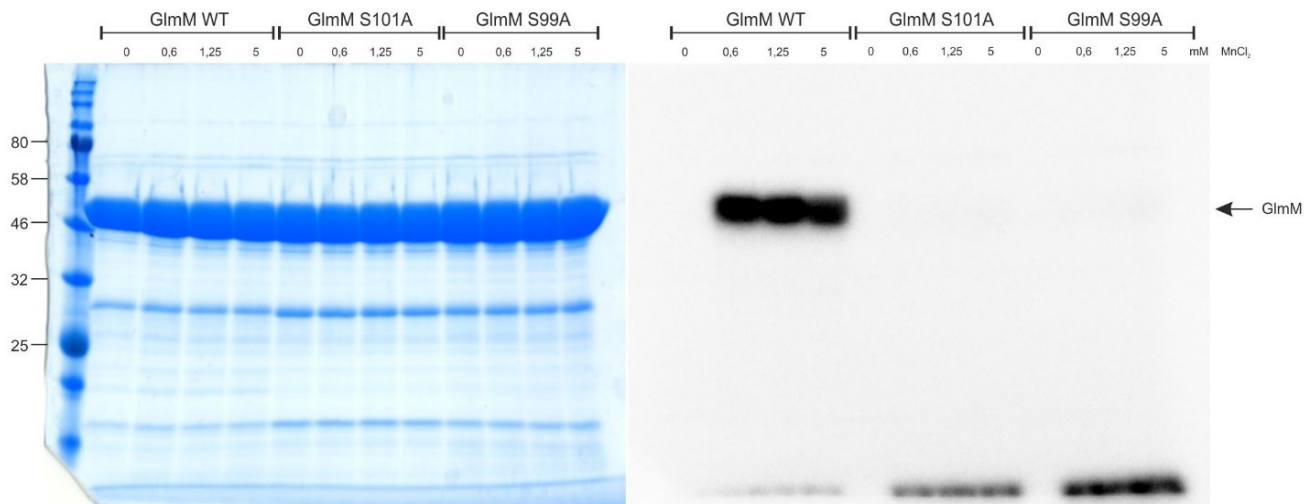
7.3.3 Identifikace fosforylovaných zbytků proteinu GlmM pomocí MS analýzy

Za účelem identifikace dalších míst fosforylace proteinu GlmM jsme provedli kinázovou reakci *in vitro* na divoké formě proteinu GlmM v přítomnosti StkP-KD. Jako donor fosfátové skupiny bylo použito neznačené (studené) ATP. Vzorky byly rozděleny na 1D SDS-PAGE a obarveny pomocí Coomassie Blue G-250. Následně byly proužky proteinu GlmM vyříznuty z gelu a odeslány k MS analýze (Biocev).

Z výsledků identifikace fosforylačních míst u GlmM v *in vitro* podmínkách vyplývá, že kromě detekované fosforylace na serinových zbytcích v pozici 99 a 101 je protein GlmM fosforylován na dalších 4 místech. Jedná se o zbytky T304, S414, T416 a T438. Tyto nově identifikované zbytky budou předmětem dalšího studia.

7.3.4 Autofosforylace proteinu GlmM *in vitro*

U *E. coli* bylo prokázáno, že protein GlmM je schopen autofosforylace na serinu v pozici 102 (Mengin-Lecreulx et al., 1996; Jolly et al., 1999). Protože serinový zbytek v pozici 102 u *E. coli* odpovídá podle sekvenční homologie serinu v pozici 101 u pneumokoka, zajímalo nás, jestli je rovněž protein GlmM z *S. pneumoniae* schopen autofosforylace v podmínkách *in vitro*. Dle výsledku autofosforylační reakce znázorněné na **Obrázku 29** se zdá, že k autofosforylaci nedochází. Abychom vyloučili možnost, že reakce nebyla provedena za optimálních podmínek nebo že je intenzita autofosforylační reakce velmi slabá, použili jsme pro následnou reakci v přítomnosti radioaktivně značeného $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP větší množství proteinu (10 μg oproti běžně používaným 2 μg , viz **Obrázek 29**) a expozici prodloužili ze 2 na 7 dní. Výsledek je znázorněn na **Obrázku 30**. K autofosforylaci dochází u divoké formy proteinu GlmM, zatímco u GlmM S101A k autofosforylaci nedochází. Kromě mutantního proteinu GlmM S101A jsme autofosforylační reakci *in vitro* podrobili rovněž mutantní protein GlmM S99A. Ukázalo se, že protein GlmM S99A také ztrácí schopnost autofosforylace podobně jako GlmM S101A (**Obrázek 30**).



Obrázek 30

Autoradiogram *in vitro* autofosforylační reakce proteinu GlmM WT, GlmM S99A a GlmM S101A

Zleva: standard molekulových hmotností, autofosforylace GlmM WT, GlmM S101A, GlmM S99A v přítomnosti různé koncentrace MnCl_2 (0 – 5 mM). Autofosforylační reakce probíhala v přítomnosti radioaktivně značeného $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$. Na reakci bylo použito 10 μg purifikovaného proteinu. Jako kontrola stejné nanášky všech vzorků posloužil barvený gel pomocí Coomassie Blue G-250 (vlevo). Obarvený gel byl exponován na citlivou fólii 7 dní a vizualizován pomocí přístroje Molecular Imager FX, Bio-Rad (autoradiogram vpravo).

8 DISKUZE

8.1 Esencialita fosforylace serinových zbytků v pozici 99 a 101 pro funkčnost GlmM *S. pneumoniae*

S. pneumoniae, významný lidský patogen, obsahuje jediný gen kódující jedinou Ser/Thr proteinkinázu eukaryotického typu (eSTK) nazvanou StkP. Tento transmembránový protein není pro životaschopnost *S. pneumoniae* esenciální (Echenique et al., 2004), ačkoliv se účastní regulace mnoha procesů v buňce (Sasková et al., 2007) a jeho absence způsobuje poruchu buněčného dělení, jež se projevuje v morfologii buněk (prodloužený tvar s mnohočetnými přepážkami) (Beilharz et al., 2012). Jako jeden ze substrátů eSTK StkP se podařilo, v podmínkách *in vivo* a také *in vitro*, identifikovat fosfoglukozaminmutáza GlmM (Nováková et al., 2005). Dosud se však nezdařilo určit místo fosforylace GlmM *in vivo*. Funkčnost enzymu GlmM je závislá na fosforylaci dvou serinových zbytků, S99 a S101, která je v *in vitro* podmínkách zajišťována kinázou StkP (Pallová, 2007).

Fosfoglukozaminmutáza GlmM je enzym katalyzující přeměnu glukozamin-6-fosfátu na glukozamin-1-fosfát, což je důležitý krok při syntéze UDP-N-acetylglukozaminu. UDP-N-acetylglukozamin je prekurzorem syntézy komponent buněčné stěny, jmenovitě peptidoglykanu, lipopolisacharidů a teichoových kyselin (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996; Jolly et al., 2000). Tento enzym je řazen do rodiny α -D-fosfohexomutáz (Shackelford et al., 2004) a dosud byl nejpodrobněji popsán u gramnegativní bakterie *Escherichia coli*, pro kterou je esenciální (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996; Jolly et al., 1999, 2000). Esencialita enzymu byla rovněž potvrzena pro pneumokoka (Krupička, 2014).

Hlavním z cílů této diplomové práce bylo definitivně prokázat v podmínkách *in vivo*, zda fosforylace serinových zbytků v pozici 99 a 101 je skutečně esenciální pro funkčnost enzymu GlmM, a tedy nezbytná pro životaschopnost bakterie *Streptococcus pneumoniae*. Pro tento účel jsme vybrali klonovací systém založený na integračním vektoru *pJWV25* (Eberhardt et al., 2009), který umožňuje fúzi genu *glmM* s inducibilním zinkem řízeným promotorem a jeho inzerci do postradatelného lokusu *bgaA* na chromozomu *S. pneumoniae* pomocí homologní rekombinace. Stejný systém je běžně používán při studiu esenciálních genů *S. pneumoniae*, například byl použit pro analýzu esenciality proteinu PBP2x v buněčném dělení (Peters et al., 2014) a rovněž jej použil Krupička (2014) ve své diplomové práci pro studium esenciality GlmM.

Jak již bylo zmíněno výše, v diplomové práci Jiřího Krupičky (2014) bylo dokázáno, že gen *glmM* je u bakterie *S. pneumoniae* esenciální. Bylo prokázáno, že GlmM-depleční kmen Sp261 (*Rx*;

ΔglmM::janus/bgaA::PczcD-glmM-flag) na pozadí divokého kmene Rx, s vloženým genem *glmM* pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru, je životaschopný pouze v přítomnosti induktoru exprese enzymu GlmM. Bez přítomnosti induktoru exprese buňky vykazovaly výrazné morfologické defekty a docházelo k předčasné lyzi buněk (Krupička, 2014). Protože se často stává, že se mutantní kmeny chovají odlišně v závislosti na genetickém pozadí, což může být např. dáno i přítomností pouzdra, které může maskovat některé fenotypové projevy, anebo přítomností supresorových mutací (viz níže), je nezbytné provádět studium esenciality genu *glmM* u *S. pneumoniae* na různých genetických pozadích (Massidda et al., 2013). V rámci této diplomové práce se nám nejdříve podařilo připravit GlmM-depleční kmen Sp283 (*R6; ΔglmM bga::PczcD-glmM-flag*) na genetickém pozadí divokého kmene R6. Sp283 neobsahuje na rozdíl od Sp261 (*Rx; ΔglmM::janus/bgaA::PczcD-glmM-flag*) koncové sekvence genu *glmM* ani Janus kazetu, elementy, které by mohly ovlivnit výsledný fenotypový projev GlmM-deplečního kmene. Přítomná Janus kazeta by mohla způsobovat falešný fenotypový projev - např. pomalejší růst s nižší dosaženou optickou denzitou. Podobný efekt Janus kazety byl pozorován u disrupce genu *jag* (Ulrych, nepublikovaná data), což je jeden z nedávno popsaných substrátů proteinkinázy StkP (Ulrych et al., 2016). Ovšem kmen Sp283 na pozadí divokého kmene R6 se v nepřítomnosti $ZnCl_2$ choval stejně jako depleční kmen s Janus kazetou a okrajovými částmi genu *glmM* připravený na pozadí divokého kmene Rx (Sp261), který ve své práci popisuje Krupička (2014). Lze tedy konstatovat, že ani přítomnost Janus kazety či přítomnost koncových sekvencí genu *glmM*, ani odlišné genetické pozadí nemají vliv na pozorovaný defektní fenotyp u kmenů *S. pneumoniae* se sníženou hladinou funkčního proteinu GlmM. Je tedy zřejmé, že gen *glmM* je esenciální nejen u divokého kmene Rx (Krupička, 2014), ale také u R6. Potvrzená esencialita GlmM je v souladu také s globálními studiemi zabývajícími se esencialitou genů *S. pneumoniae* (Thanassi et al.; 2002; Liu et al., 2017) a stejně tak se studií podobného charakteru u *S. sanguinis* (Xu et al., 2011). Na druhou stranu existují práce, které tvrdí, že gen *glmM* není esenciální. U *S. gordonii* a *S. mutans* se podařilo autorům připravit deleční kmeny *ΔglmM*, které vykazují sníženou růstovou rychlost, sníženou schopnost tvořit biofilm a tvoří dlouhé řetězky buněk (Shimazu et al., 2008; Liu et al., 2009). Je známo, že *S. pneumoniae* je geneticky velmi flexibilní, je schopen přirozené kompetence a snadno akumuluje supresorové mutace (Massidda et al., 2013), což se pak může projevit tím, že je možné získat pozitivní transformanty i při deleci esenciálních genů. Není tedy vyloučeno, že podobnou schopnost mají i jiné rody *streptokoků* a tedy, že defektní fenotyp pozorovaný u delečních kmenů *ΔglmM S. mutans* či *S. gordonii* je výsledkem nejen delece samotného enzymu GlmM, ale také výsledkem získané supresorové mutace, která umožní bakterii přežít, za normálních okolností, i bez

esenciálního genu. Druhým možným vysvětlím je existence paralogního proteinu k proteinu GlmM, který v nepřítomnosti GlmM plní jeho funkci.

Na tomto místě je třeba zmínit, že přestože je gen *glmM* nezbytně nutný pro přežití pneumokoka, podařilo se nám při transformaci delečního konstruktů JanusK Δ glmM (viz kap. 7.1.1.) do divokých kmenů Rx a R6 připravit několik málo pozitivních kolonií. Kolonie byly rezistentní na kanamycin a podle výsledků z koloniové PCR došlo skutečně k zaměnění delečního konstruktů za nativní gen *glmM* v originálním lokusu. Ovšem sekvence nativního *glmM* zůstala na chromozomu zachována na neznámém místě (Ulrych, nepublikované výsledky). To je další z důkazů, že gen *glmM* je esenciální a nelze jej z genomu pneumokoka odstranit.

Vzhledem k tomu, že tato práce navazuje na diplomovou práci Krupička, 2014 a dizertační práci Pallová, 2007, předpokládali jsme již, že fosforylace serinových zbytků v pozici 99 a 101 v proteinu GlmM je pro tuto bakterii nezbytná. Pomocí experimentu založeného na transformační účinnosti bylo *in vivo* nepřímo dokázáno, že pro funkčnost proteinu GlmM je potřebná právě fosforylace na dvou klíčových aminokyselinových zbytcích serinu v pozici 99 a 101 (Krupička, 2014). Za tímto účelem byly připraveny čtyři kmene, které pod zinkem řízeným promotorem nesly v genu *glmM* mutace na těchto aminokyselinových zbytcích. Serin 99 a 101 byl zaměněn za alanin nebo za kyselinu glutamovou. Důkaz esenciality fosforylace na serinových zbytcích proteinu GlmM byl proveden pokusem o delecii nativního genu *glmM*, v přítomnosti induktoru, v těchto mutovaných kmenech. Ani po prodloužené kultivaci na 48 h nebyly po transformaci konstruktů JanusK Δ glmM za účelem delecce nativního genu *glmM* získány žádné transformanty (Krupička, 2014). Stejný experiment jsme provedli na kmenech odvozených od R6 divokého kmene s obdobným výsledkem. Tento důkaz však považujeme za nepřímý, neboť je založen na téměř nulové transformační účinnosti. Protože u takto navrženého experimentu nelze jednoznačně vyloučit, že zavedení fosfoablativní a fosfomimetické mutace neovlivňuje samotnou transformační účinnost příslušných kmenů, pokusili jsme se esencialitu fosforylace na aminokyselinových zbytcích S99 a S101 prokázat alternativním způsobem. Za účelem ověření esenciality serinových zbytků S99 a S101 v GlmM, jsme potřebovali připravit kmen, jehož nativní *glmM* bude mít na obou klíčových serinových zbytcích aminokyselinovou záměnu. Serin v pozici 99 a 101 byl proto nahrazen alaninem, který neumožňuje fosforylacii a napodobuje tak nefosforylovaný stav proteinu GlmM. Pro tento záměr jsme pomocí soupravy QuikChangeII Site Directed Mutagenesis Kit připravili plasmid *pZn-glmM-flag S99/101A*, který byl použit pro přípravu konstruktů *glmM S99/101A*-okolí. Po transformaci tohoto konstruktů do GlmM-delečního kmene Sp283 (*R6; Δ glmM bga::PczcD-glmM-flag*), jsme získali nový mutantní kmen Sp369 (*R6; glmM S99/101A bga::PczcD-glmM-flag*).

Výsledky testů kmene Sp369 byly porovnávány s *GlmM*-deplečním kmenem Sp283, který má odstraněný nativní gen *glmM* a kóduje rovněž jeho ektopickou kopii *glmM-flag* řízenou inducibilním promotorem *PczcD*, která je tedy bez přídavku induktoru $ZnCl_2$ nefunkční. Předpokládali jsme, že pokud je fosforylace serinových zbytku S99 a S101 nezbytná pro funkčnost esenciálního enzymu *GlmM*, tak se oba tyto kmeny Sp283 a Sp369 budou chovat stejně. Jako kontrolu jsme použili merodiploidní kmen Sp245 (*R6; bga::PczcD-glmM-flag*), který obsahuje nativní *glmM* a zároveň *glmM-flag* pod kontrolou *PczcD* promotoru (Krupička, 2014). Posledním z testovaných kmenů, byl revertantní kmen Sp392 (*R6; bga::PczcD-glmM-flag*), který sloužil jako komplementační kontrola (viz níže).

U těchto čtyř kmenů jsme sledovali růst kultury v tekutém C+Y médiu při koncentracích 0 a 0,2 mM $ZnCl_2$ a růst na pevném krevním agaru při koncentracích 0 a 0,3 mM $ZnCl_2$, neboť na krevním agaru je kulturou vyžadován vyšší přídavek zinečnatých iontů, což bylo předem testováno (data neuvedena). Výsledky potvrzují, že *GlmM*-depleční kmen Sp283 a fosfoablativní mutantní kmen Sp369 bez přidání induktoru, mají sklon k předčasné lyzi a kultury proto dosahují jen nízkých optických denzit ($OD_{600} = 0,3$), zatímco s přídavkem induktoru dosahovaly srovnatelných optických hodnot jako kontrolní kmen Sp245 ($OD_{600} = 0,8$). Nenulový růst deplečního a fosfoablativního mutantního kmene bez přídavku induktoru může být způsoben zásobou zinečnatých iontů, kterou s sebou přináší inokulum. Samozřejmě i použité kultivační médium C+Y obsahuje malé množství zinečnatých iontů v podobě $ZnSO_4$, což může v počátcích kultivace přispět k růstu těchto kmenů. Po třech hodinách kultivace bez induktoru již není protein *GlmM* v buňkách deplečního a mutantního kmene detekován. Na pevném médiu depleční kmen Sp283 a mutantní kmen Sp369 bez přídavku induktoru nevykazovaly žádný růst, zatímco s přídavkem induktoru byl nárůst buněk srovnatelný s kontrolním kmenem Sp245. Také nás zajímalo, jak se budou chovat kmeny kultivované bez přídavku induktoru $ZnCl_2$, ke kterým budou zinečnaté ionty v průběhu kultivace, těsně před začátkem buněčné lyze, doplněny na kontrolní hladinu. Proto jsme kmeny kultivovali s kontrolní hladinou induktoru a zároveň v podmínkách s nulovou koncentrací induktoru. V průběhu kultivace jsme kromě monitorování růstu zjišťovali, zda se exprimuje protein *GlmM-Flag* a sledovali jsme morfologii buněk. V páté hodině kultivace jsme ke kultuře kmenů Sp283 a Sp369 kultivovaných bez $ZnCl_2$ doplnili zinečnaté ionty na kontrolní hladinu. V průběhu kultivace jsme v časech 3., 6., 7. a 11. hodin odebrali vzorky na imunodetekci, která byla provedena protilátkou Anti-Flag proti *GlmM-Flag* a ve stejných časech jsme provedli i mikroskopickou analýzu. Snímky z mikroskopu ukazují, že buňky *GlmM*-deplečního kmene Sp283 a fosfoablativního kmene Sp369, které jsou kultivovány bez přídavku induktoru, vykazují morfologické defekty a mají sklon k

předčasné lyzi. Podobné morfologické defekty byly pozorovány při odstranění genů *ftsZ* a *ftsA*, esenciálních pro *S. pneumoniae* (Mura et al., 2017). Po další hodině od dorovnání koncentrace $ZnCl_2$ v kultivačním médiu na kontrolní hladinu 0,2 mM, u takto „postižených“ kultur GlmM-deplečního kmene Sp283 a fosfoablativního kmene Sp369, je zřejmé, že buňky jsou ve výrazně lepší kondici. Po dvou hodinách od přidání induktoru exprese byla morfologie buněk již zcela srovnatelná s morfologií buněk kontrolního kmene Sp245. Exprese proteinu GlmM u deplečního kmene Sp283 a fosfoablativního kmene Sp369 byla obnovena již po hodině od přidání induktoru. Po prodloužené kultivaci (cca 11 hodin) kmenů Sp283 a Sp369 s dodatečně vyrovnanou hladinou induktoru exprese $ZnCl_2$ lze konstatovat, že dochází i k obnově doby zdvojení (42 minut), která je srovnatelná s dobou zdvojení kmene Sp283 (41 minut) či Sp369 (40 minut) kultivovaného v přítomnosti kontrolní hladiny zinečnatých iontů od začátku kultivace. Z naměřených dat tedy vyplývá, že fosforylace aminokyselinových serinových zbytků v pozici 99 a 101 je skutečně nepostradatelná pro správnou funkčnost enzymu GlmM u *S. pneumoniae* a je tedy pro mikroorganismus esenciální. U *B. subtilis* bylo rovněž pozorováno, že protein GlmM je esenciální a že fosforylace na serinovém zbytku v pozici 100, který koresponduje s pneumokokovým serinovým zbytkem v pozici 101, je esenciální pro funkčnost enzymu a tak i pro přežití bakterie (Schmidl et al., 2010). Posledním z testovaných kmenů, byl revertantní kmen Sp392 (*R6; bga::PczcD-glmM-flag*), který sloužil jako komplementační kontrola. Tento kmen má stejný genotyp jako kontrolní merodiploidní kmen Sp245 a byl připraven zpětným vložením konstruktů JanusK Δ glmM do kmene Sp369 a následným vyměněním Janus kazety za nativní *glmM* v originálním lokusu. Sp392 vykazoval ve všech provedených testech stejné výsledky jako kontrolní kmen Sp245, což naznačuje, že pozorovaný defektní fenotyp u kmene Sp369 je skutečně výsledkem bodových změn S99A a S101A v nativním genu *glmM*, a tedy úbytkem hladiny funkční formy proteinu GlmM v buňce. Stejná strategie přípravy komplementačního kmene u genu *phpP* kódující fosfatázu byla použita v práci Ulrych et al. (2016).

Dalším z dílčích úkolů této práce, bylo zachytit v reálném čase morfologii buněk GlmM-deplečního kmene použitého v diplomové práci Jiřího Krupičky (2014) a to jak při deplečních hladinách induktoru, tak při kontrolní hladině zinečnatých iontů. Tento depleční kmen Sp261 (*Rx; Δ glmM::janus bga::PczcD-glmM-flag*) připravený na pozadí divokého kmene Rx, má stejně jako kmen Sp283 deletovaný nativní gen *glmM*, ale na rozdíl od kmene Sp283 obsahuje celou Janus kazetu a okrajové zbytky genu *glmM*. Zatímco kmen Sp283 je připraven na pozadí divokého kmene R6 a neobsahuje koncové sekvence genu *glmM* ani Janus kazetu. Mikroskopická analýza v reálném čase jasně potvrzuje morfologické defekty pozorované na jednotlivých snímcích pořízených v

režimu fázového kontrastu. Především je na snímcích z časosběrné mikroskopie zcela jednoznačně doložena lyze buněk Sp261 v kultuře s depleční hladinou induktoru ZnCl_2 , která byla predikována na samostatných mikroskopických snímcích. Z časových důvodů nebylo možné experiment časosběrné mikroskopie provést rovněž na neznačeném GlmM-deplečním kmeni Sp283. Z jednotlivých mikroskopických snímků pořízených v režimu fázového kontrastu lze ovšem usoudit, že oba kmeny Sp261 a Sp283 se chovají v přítomnosti limitních koncentrací induktoru exprese ZnCl_2 velice podobně.

Dále nás zajímalo, jak reagují buňky na nadprodukční hladiny induktoru exprese v médiu. Pro tento účel jsme použili merodiploidní kmen Sp245 (*R6; bga::PczcD-glmM-flag*). Jako kontrolu jsme použili námi používanou kontrolní hladinu induktoru v C+Y médiu, tj. 0,2 mM ZnCl_2 . Dále jsme testovali 0,3 a 0,4 mM koncentraci induktoru v médiu. Při vyšších hladinách ZnCl_2 dosahovaly kultury nižší OD (600 nm), ale změnu v morfologii buněk ani nižší dobu zdvojení jsme nepozorovali. Nižší nárůst kultury je dán skutečností, že zinečnaté ionty jsou pro bakterii *S. pneumoniae* toxické, což se projevuje hlavně při vyšších koncentracích (Jacobsen et al., 2011). Zdá se tedy, že zvýšená exprese enzymu GlmM nemá na morfologii žádný vliv. Podobný výsledek u kmene Sp217 (*Rx; bga::PczcD-glmM-flag*) popisuje rovněž Krupička (2014).

8.2 Lokalizace proteinu GlmM v buňce *S. pneumoniae*

Dalším cílem této práce bylo určit lokalizaci proteinu GlmM v buňkách *Streptococcus pneumoniae*, za použití fluorescenčního proteinu GFP. Protože v sekvenci genu *glmM* není predikována žádná transmembránová doména (Shackelford et al., 2004), a zároveň je tento enzym součástí cytoplazmatické syntézy peptidoglykanu (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996), dá se předpokládat, že se jedná o cytoplazmatický protein. Na druhou stranu u *Lactococcus lacti* enzym GlmM interaguje s proteinem diadenylát cyklázou, která je vázána na membránu (Zhu et al., 2016), a proto bylo na místě otestovat lokalizaci GlmM v buňce. Za účelem lokalizace proteinu GlmM byl tedy připraven plasmid *pJVW25-glmM*, který byl transformován do dvou různých divokých kmenů R6 a Rx *S. pneumoniae* za vzniku merodiploidních kmenů Sp331 (*Rx; bgaA::PczcD_{czc}-gfp-glmM*) a Sp332 (*R6; bgaA::PczcD_{czc}-gfp-glmM*) s fluorescenčně značenou kopií genu *gfp-glmM* pod kontrolou inducibilního promotoru. U těchto kmenů je nativní gen *glmM* exprimovaný konstitutivně, zatímco exprese jeho ektopické GFP-značené kopie je závislá na přítomnosti ZnCl_2 v médiu. Z hlediska velikosti použité fluorescenční značky (velikost GFP je 26,9 kDa), která sama o sobě může ovlivnit konformaci celého fúzního proteinu, a tedy i vlastnosti proteinu GlmM, bylo nutné ověřit funkčnost značeného GlmM v buňce. Toho bylo dosaženo úspěšnou delecí nativního genu *glmM* z merodiploidních kmenů Sp331 a Sp332 a následným potvrzením, že, kmeny Sp367

(*Rx*; $\Delta glmM::janus bga::PczcD_{ccc}-gfp-glmM$) a Sp368 (*R6*; $\Delta glmM::janus bga::PczcD_{ccc}-gfp-glmM$) exprimující pouze ektopickou kopii genu *gfp-glmM* jsou životaschopné pouze v médiu s induktorem exprese $ZnCl_2$, neboť jak již víme, gen *glmM* je pro bakterii *S. pneumoniae* esenciální (Krupička, 2014; tato práce). Podle imunodetekce s anti-GFP se zdá, že GFP-GlmM je v těchto kmenech stabilní a jeho hladina se se vzrůstající koncentrací $ZnCl_2$ zvyšuje. Protože tyto kmeny rostou srovnatelně rychle s WT *S. pneumoniae* a podle snímků získaných v režimu fázového kontrastu vykazují morfologii divokého typu, lze usuzovat, že GFP fluorescenční značka nemá vliv na fyziologii a ani na morfologii *S. pneumoniae*. K samotnému určení místa, kde se enzym GlmM v buňkách nachází, byla použita fluorescenční mikroskopie. Prokázali jsme, že enzym GlmM je cytoplazmatickým proteinem. Signál GFP je lokalizován v celé buňce. V budoucnu se chystáme použít tento kmen k purifikaci afinitní chromatografií pomocí GFP-trap soupravy a získaný protein GFP-GlmM následně použít pro MS identifikaci místa fosforylace proteinkinázou StkP v podmínkách *in vivo*.

8.3 Stanovení místa fosforylace proteinu GlmM proteinkinázou StkP *in vitro*

V dizertační práci Pallová (2007), bylo zjištěno, že protein GlmM s aminokyselinovou záměnou S101A je v přítomnosti proteinkinázy StkP nadále fosforylován, jelikož na 2D gelu putuje v podobě několika radioaktivně značených izoform. Jedna z nich byla následně identifikována jako fosforylace GlmM v pozici S99. Posledním z cílů této diplomové práce tedy bylo identifikovat další neznámá místa fosforylace GlmM proteinkinázou StkP v podmínkách *in vitro*.

Pro stanovení dalšího či dalších míst fosforylace fosfoglukozaminmutázy u *S. pneumoniae* proteinkinázou StkP *in vitro* jsme pomocí soupravy QuikChange II-E Site-Directed Mutagenesis Kit vytvořili fosfoablativní bodovou záměnu *glmM S99A* ve vektoru *pET28b-glmM*. Tento vektor jsme vložili do expresních kompetentních buněk *E. coli* a připravili jsme kmen Ec440 (*BL21*; *pET28b-glmM S99A*). K porovnání fosforylačního profilu jsme kromě pozitivní kontroly, kmene Ec428 (*BL21*; *pET28b-glmM*), použili dále kmen Ec432 (*BL21*; *pET28b-glmM S101A*) z laboratorního archivu. Purifikované proteiny GlmM jsme spolu s kinázovou doménou z kmene Ec50 (*BL21 pEXStk-T*) použili pro kinázovou reakci *in vitro* s radioaktivně značeným γ - ^{32}P -ATP. Kinázová doména proteinu StkP disponuje enzymatickou aktivitou a je postačující pro fosforylaci substrátu v *in vitro* experimentech (Nováková et al., 2005). Porovnáním fosforylačního profilu divoké formy s mutovanými formami GlmM v přítomnosti StkP v kinázové reakci *in vitro* jsme potvrdili, že kromě fosforylace S99 a S101 je GlmM fosforylována proteinkinázou StkP minimálně na jednom dalším zbytku. Tento výsledek je v souladu s dizertační prací Petry Pallové (2007). Z následné MS analýzy kinázové reakce *in vitro* vyplývá, že protein GlmM je kromě

aminokyselinových zbytků S99 a S101 fosforylován proteinkinázou StkP na aminokyselinových zbytcích v pozici T304, S414, T416 a T438.

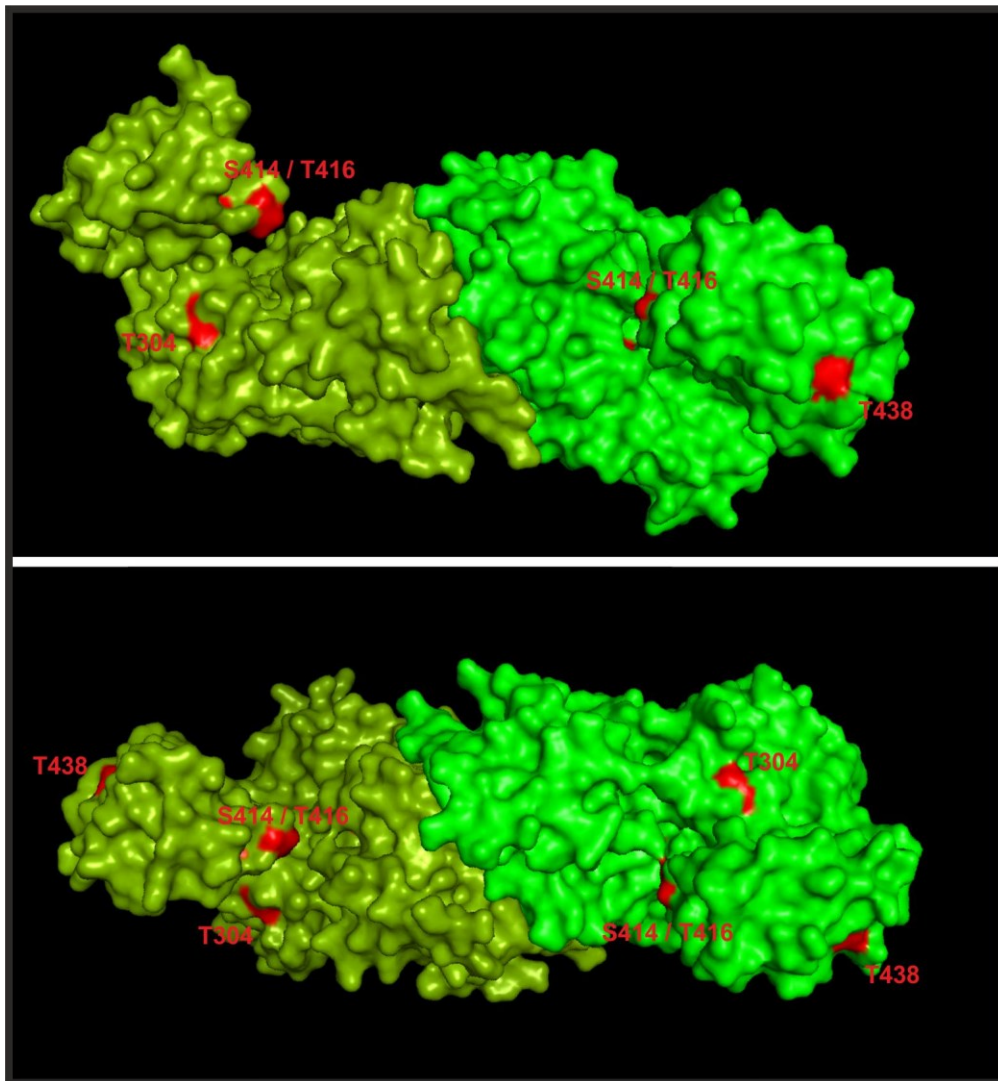
Z 3D modelu struktury dimerní molekuly GlmM *S. pneumoniae* (**Obrázek 31 a 32**) je patrné, že kromě aminokyselinových zbytků umístěných na povrchu molekuly T304 a T438, zbývající fosforylované zbytky S99, S101, S414 a T416 leží v katalytickém centru enzymu. Zdá se, že serinové zbytky v pozici 99 a 101 jsou těžko přístupné z vnějšku, a jejich lokalizace je viditelná pouze na modelu sekundárních struktur (**Obrázek 32**), zatímco aminokyselinové zbytky S414 a T416 jsou přeci jen lépe přístupné pro potenciální fosforylaci proteinkinázou StkP.

Aminokyselinovým zbytkům S414, T416 a T438 proteinu GlmM u *S. pneumoniae* odpovídají aminokyselinové zbytky S412, T414 a T439 u *B. subtilis*, jehož 3D struktura proteinu GlmM je známa. (Mehra-Chaudhary et al., 2011). Všechny 3 zbytky leží v IV. doméně, která je zodpovědná za navázání fosfátové skupiny substrátu glukozamin-6-fosfátu a jsou konzervované ve streptokokích (data nejsou uvedena). Zatímco S414 a T416 jsou konzervované jak u grampozitivních, tak gramnegativních bakterií, T438 se podle naší předběžné analýzy sekvenčního srovnávání zdá, že se vyskytuje unikátně pouze u streptokoků. U dalších zástupců bakteriální říše jako je *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptomyces coelicolor* a *B. subtilis* se ve stejné pozici nachází arginin. Zdá se, že právě tento zbytek T438, který leží na povrchu molekuly GlmM a je tedy dobře dostupný pro fosforylaci proteinkinázou StkP, by mohl hrát důležitou roli v modulaci aktivity GlmM prostřednictvím StkP.

Aminokyselinové zbytky S414 a T416 jsou součástí konzervované oblasti domény IV, která se podílí na tvorbě katalytického centra enzymu. Reálná fosforylace těchto zbytků proteinkinázou StkP je málo pravděpodobná. Vzhledem k tomu, že S412 u *B. subtilis*, odpovídající S414 *S. pneumoniae*, je v přímém kontaktu s fosfátovou skupinou substrátu (glukozamin-6-fosfátu) či produktu (glukozamin-1-fosfátu) (Mehra-Chaudhary et al., 2011), lze předpokládat, že pozorovaná fosforylace S414 a T416 v podmínkách *in vitro* proteinkinázou StkP je pravděpodobně artefakt a nemá žádný biologický význam.

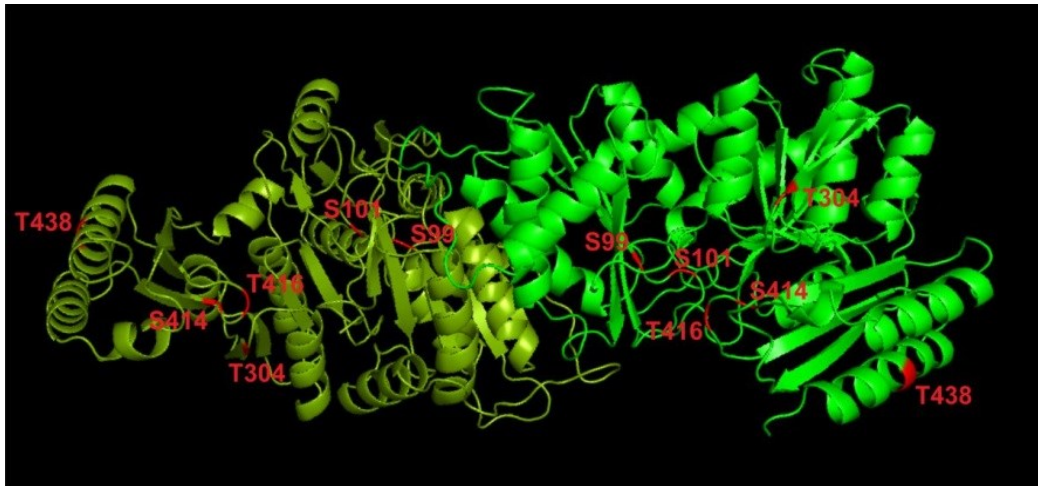
Aminokyselinový zbytek T304 leží ve III. doméně proteinu GlmM, která obsahuje smyčku vázající cukr zodpovědnou rozpoznat dvě různé orientace vazby jeho 1- a 6-fosfo-sacharidových substrátů (Mehra-Chaudhary et al., 2011). Podobně jako T438 je také T304 konzervovaný ve streptokokích (data neuvedena) a je lokalizován na povrchu GlmM a tedy dobře přístupný pro potenciální regulaci prostřednictvím fosforylace proteinkinázou StkP.

Zdali je fosforylace detekovaná na některém z nově identifikovaných míst, která jsou fosforylována *in vitro* proteinkinázou StkP, relevantní, není zatím jasné a bude předmětem dalšího studia.



Obrázek 31
3D model povrchu dimerní molekuly GlmM u *S. pneumoniae*

Na snímku je zobrazen 3D model GlmM *S. pneumoniae* ve dvou orientacích, který je odvozen ze známe 3D krystalové struktury *B. anthracis*. Jednotlivé monomerní podjednotky enzymu GlmM jsou označeny tmavě a světle zelenou barvou. Červeně jsou vyznačeny aminokyselinové zbytky T304, S414, T416 a T438 fosforylované proteinkinázou StkP v podmínkách *in vitro*. Modelováno v programu PyMOL 2.2.



Obrázek 32
3D model sekundárních struktur dimerní molekuly GlmM u *S. pneumoniae*

3D model GlmM *S. pneumoniae* je odvozen ze známe 3D krystalové struktury *B. anthracis*. Jednotlivé monomerní podjednotky enzymu GlmM jsou označeny tmavě a světle zelenou barvou. Červeně jsou vyznačena aminokyselinové zbytky S99, S101, T304, S414, T416 a T438 fosforylované proteinkinázou StkP v podmínkách *in vitro*. Modelováno v programu PyMOL 2.2.

Z provedených autofosforylačních testů je patrné, že pneumokokový protein GlmM je v *in vitro* podmínkách autofosforylován na obou testovaných serinových zbytcích v pozici 99 a 101. V obou případech je však autofosforylace velice slabá a byla detekována až při vyšší nanáše testovaného enzymu a po delší expozici. U *E. coli* byly rovněž testovány *in vitro* oba příslušné serinové zbytky v pozici 100 a 102. Serinový zbytek v pozici 102, který odpovídá pneumokokovému zbytku v pozici 101 byl potvrzen jako jediné místo autofosforylace u *E. coli* v experimentech *in vitro* provedených jak na buněčných lyzátech, tak na purifikovaných proteinech. Serin 102 je tedy pro správnou funkci enzymu nezbytný (Mengin-Lecreulx et al., 1996; Jolly et al., 1999). Pokud dojde k záměně serinu za alanin v pozici 102, autofosforylace neprobíhá a protein neplní svoji funkci. Autofosforylace u serinového zbytku 100 u *E. coli*, který odpovídá pneumokokovému serinovému zbytku 99, nebyla jednoznačně prokázána (Jolly et al., 2000), jelikož byla pozorována pouze u purifikovaných proteinů a nikoliv u celobuněčných lyzátů, což autor vysvětluje domněnkou, že purifikovaný protein GlmM S100A by mohl být nestabilní. Není vyloučeno, že i protein GlmM S99A u pneumokoka se chová stejně. Navíc se zdá, že konzervovaný aminokyselinový zbytek serinu či threoninu v pozici 100 u hexofosfomutáz určuje specifitu těchto enzymů vůči substrátům jako je buď fosfo-cukr a nebo fosfo-aminocukr. Fosfoglukozaminmutázy u bakterií kódují v pozici 100 serinový zbytek, zatímco fosfoglukomutázy threonin. U *E. coli* záměna serinu v pozici 100 za threonin 20x zvyšuje fosfoglukomutázovou aktivitu GlmM (Jolly, 1999). U *B. subtilis* byla autofosforylace *in vitro* pozorována na serinu v pozici 100, který odpovídá threoninu v pozici 101 u

S. pneumoniae 102 u *E. coli* (Schmidl et al., 2010). U stejného mikroorganismu Ravikumar et al. (2018) identifikoval *in vivo* fosforylované serinové zbytky v pozici 98 a 100 proteinu GlmM, které korespondují se serinovými zbytky v pozici 99 a 101 u pneumokoka. Z této práce však není zcela jasné, jestli je fosforylace těchto zbytků způsobena autofosforylací a nebo fosforylací proteinkinázou PtkA. U *S. agalactiae* byl S101 také identifikován jako fosforylovaný v *in vivo* experimentu, ovšem jeho fosforylace nebyla závislá na proteinkináze Stk1, orthologu proteinkinázy StkP. Zdali se jedná o autofosforylací ovšem testováno nebylo (Silvestroni et al., 2009).

Enzym GlmM je syntetizován v neaktivní, nefosforylované formě (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996). Jakým způsobem je enzym aktivován *in vivo* zatím není známo. Pro vysvětlení procesu iniciální fosforylace existují dvě hypotézy. Podle první je fosforylace (autofosforylace) proteinu GlmM závislá na proteinkináze, která využívá jako donor fosfátové skupiny ATP. Podle druhé je fosforylace zajišťována intermediátem reakce glukozamin-1,6-difosfátem. Tato hypotéza však předpokládá existenci enzymu katalyzujícího produkci glukozamin-1,6-difosfátu v buňce (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996), jehož identita není známá.

Vzhledem k tomu, že kmen *S. pneumoniae* s odstraněnou proteinkinázou StkP, který není schopen fosforylace svých substrátů a tedy ani proteinu GlmM, je životaschopný (Nováková et al., 2005), lze usuzovat, že esenciální fosforylace proteinu GlmM na serinových zbytcích v pozici 99 a 101 není závislá pouze na proteinkináze StkP. Je možné, že bazální fosforylace proteinu GlmM nezbytná pro jeho funkčnost je zajišťována buď autofosforylační aktivitou samotného enzymu, přičemž jako donor fosfátové skupiny je využíváno ATP, anebo je GlmM fosforylována prostřednictvím glukózo-1,6-bisfosfátu. Fosforylace zajišťovaná proteinkinázou StkP může mít pak modulační funkci, kterou je regulována aktivita GlmM, a tedy i syntéza peptidoglykanu u *S. pneumoniae*. Pallová (2007) ve své disertační práci prokázala zvýšenou enzymatickou aktivitu GlmM v přítomnosti StkP v podmínkách *in vitro*. Zdali kináza StkP fosforyluje *in vivo* přímo serinový zbytek S101, případně S99 a tím aktivuje GlmM anebo fosforylací některého dalšího zbytku (např. T304, S414, T416 či T438) stimuluje autofosforylací S101 či S99 u GlmM a tím jej aktivuje, není dosud známo.

Závěrem lze tedy říct, že enzym GlmM je cytoplazmatický protein a fosforylace jeho serinových zbytků S99 a S101 je v kmeni R6 *S. pneumoniae* esenciální. Zatímco růst GlmM-deplečního kmene vykazuje výrazné morfologické defekty vedoucí až k buněčné lyzi, nadprodukce enzymu nemá na buňku žádný negativní vliv. Aminokyselinové zbytky GlmM S99 a S101 jsou v podmínkách *in vitro* slabě autofosforylované, a protein GlmM je kromě aminokyselinových zbytků S99 a S101 fosforylován proteinkinázou StkP na dalších čtyřech místech - T304, S414, T416 a T438.

9 SOUHRN

Výsledky této diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

Zjistili jsme, že fosforylace serinových zbytků v pozicích 99 a 101 proteinu GlmM v kmeni R6 *S. pneumoniae* je esenciální pro životaschopnost bakterie. Buňky kmenů, ve kterých je deletován protein GlmM, nebo kódují fosfoablativní formu proteinu GlmM S99/101A vykazují pomalejší růst, a vyznačují se morfologickými deformitami a mají sklon k předčasné lyzi.

Esencialitu fosforylace serinových zbytků v pozici 99 a 101 proteinu GlmM u kmene R6 *S. pneumoniae* jsme ověřili také nepřímo pomocí transformace delečního konstruktů Janus Δ glmM do modifikovaných merodiploidních kmenů Sp415-418 (Sp1; *bgaA::PczcD-glmM-S99A/S101A/S99E/S101E-Flag*). Dosáhli jsme nulové transformační účinnosti, což podporuje tvrzení, že fosforylace GlmM je na zmíněných aminokyselinových zbytcích esenciální.

V návaznosti na diplomovou práci Jiřího Krupičky (2014) jsme monitorovali morfologii buněk GlmM-delečního kmene Sp261 při deplečních koncentracích induktoru v reálném čase pomocí časosběrné mikroskopie. Získané snímky potvrdily morfologické defekty pozorované dříve na jednotlivých snímcích – protáhlé buňky, citrónovitý tvar a sklon k předčasné lyzi.

Testovali jsme merodiploidní kmen Sp245 (R6; *bgaA::PczcD-glmM-flag*) při zvýšených koncentracích induktoru exprese v médiu. Kromě toho, že kultura dosahovala nižších optických denzit, jenž je způsobena toxicitou induktoru při vyšších koncentracích, jsme nepozorovali žádné morfologické defekty buněk.

Za účelem lokalizace proteinu GlmM v buňkách *S. pneumoniae* jsme vytvořili merodiploidní kmeny Sp331 (*Rx; bgaA::PczcD_{czc}-gfp-glmM*) a Sp332 (*R6; bgaA::PczcD_{czc}-gfp-glmM*) s fúzí genů *gfp-glmM* pod kontrolou inducibilního promotoru. Prokázali jsme, že fúzní protein GFP-GlmM je funkční a že protein GlmM je lokalizován v cytoplazmě.

Za účelem identifikovat v podmínkách *in vitro* neznámé či neznámá místa fosforylace proteinkinázou StkP, jsme k expresi a purifikaci mutantních variant GlmM použili kmeny Ec440

(*BL21; pET28b-glmM S99A*) a *Ec432 (BL21; pET28b-glmM S101A)*. Z kinázové reakce *in vitro* a následné MS analýzy vyplývá, že kromě zbytků S99 a S101 je protein GlmM fosforylován proteinkinázou StkP v pozici T304, S414, T416 a T438.

Také jsme prokázali, že GlmM je slabě autofosforylován *in vitro* na serinových zbytcích v pozicích 99 a 101. Toto zjištění současně se skutečností, že proteinkináza StkP není pro životaschopnost *S. pneumoniae* esenciální (Nováková et al., 2005), posiluje argumentaci hypotézy, že fosforylace nutná pro aktivaci proteinu GlmM je zajišťována autofosforylací.

10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Agarwal, S.; et al. Role of Serine/Threonine Phosphatase (SP-STP) in *Streptococcus pyogenes* Physiology and Virulence*. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (48), 41368–41380.

Agarwal, S.; et al. Strain-Specific Regulatory Role of Eukaryote-Like Serine/Threonine Phosphatase in Pneumococcal Adherence. *Infect. Immun.* **2012**, *80*, 1361–1372. DOI: 10.1128/IAI.06311-11.

Badet, B.; et al. Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: purification, properties, and glutamine-utilizing site location. *Biochemistry* **1987**, *26* (7), 1940–1948.

Bajaj, R.; et al. Biochemical characterization of essential cell division proteins FtsX and FtsE that mediate peptidoglycan hydrolysis by PcsB in *Streptococcus pneumoniae*. *MicrobiologyOpen* **2016**, *5* (5), 738–735.

Barendt, S.; et al. Characterization of Mutants Deficient in the L,D-Carboxypeptidase (DacB) and WalRK (VicRK) Regulon, Involved in Peptidoglycan Maturation of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 2 Strain D39. *J. Bacteriol.* **2011**, *193* (9), 2290–2300.

Barreteau, H.; et al. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32* (2), 168–207.

Baum, E.; et al. Identification and Characterization of New Inhibitors of the *Escherichia coli* MurA Enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45* (11), 3182–3188.

Benson, T.; et al. The structure of the substrate-free form of MurB, an essential enzyme for the synthesis of bacterial cell walls. *Structure* **1996**, *4* (1), 47–54.

Berg, K.; et al. Effects of low PBP2b levels on cell morphology and peptidoglycan composition in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **2013**, *195*, 4342–4354.

Berry, A.; et al. Contribution of autolysis to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **1989**, *57*, 2324–2330.

Beilharz, K.; et al. Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109* (15), 905–913. DOI: 10.1073/pnas.1119172109.

Binqi, Z.; et al. A Phosphinate Inhibitor of the meso-Diaminopimelic Acid-Adding Enzyme (MurE) of Peptidoglycan Biosynthesis. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 10081–10086.

Bootsma, H. J.; Burghout, P. J.; Hermans, P. W. M.; Bijlsma, J. J. E.; Kuipers, O. P.; Kloosterman, T. G. Patent Application Publication US 2017/0065698 A1, May 09, 2017.

Boyle, D.; et al. ftsW is an essential celldivision gene in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **1997**, *24*, 1263–1273.

Braun, V. Covalent lipoprotein from the outer membrane of Escherichia coli. *Biochim Biophys Acta* **1975**, *415*, 335–377.

Claverys, J.; et al. Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Biosci* **2002**, *7*, 1798–1814.

Deibel, R.; et al. Streptococcaceae fam. nov. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed.; Williams and Wilkins: Baltimore, 1974.

Doublet, P. The murI Gene of Escherichia coli Is an Essential Gene That Encodes a Glutamate Racemase Activity. *J. Bacteriol.* **1993**, *175* (10), 2970

Dubrac, S.; et al. A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalkR (YycGF) essential signal transduction pathway. *Mol. Microbiol.* **2008**, *70* (6), 1307–1322. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06483.x.

de Reuse, H.; et al. The Helicobacter pylori ureC Gene Codes for a Phosphoglucosamine Mutase. *J. Bacteriol.* **1997**, *179* (11), 3488–3493.

Eberhardt, A.; et al. Cellular Localization of Choline-Utilization Proteins in *Streptococcus pneumoniae* Using Novel Fluorescent Reporter Systems. *Mol. Microbiol.* **2009**, *74*, 395–408.

Egan, A.; et al. Regulation of bacterial cell wall growth. *The FEBS Journal* **2017**, *284*, 851–867. DOI: doi:10.1111/febs.13959.

Echenique, J.; et al. Protein Serine/Threonine Kinase StkP Positively Controls Virulence and Competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **2004**, *72* (4), 2434–2437. DOI: 10.1128/IAI.72.4.2434–2437.2004.

Fadda, D.; et al. Characterization of divIVA and Other Genes Located in the Chromosomal Region Downstream of the dcw Cluster in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 6209–6214

Fadda, D. *Streptococcus pneumoniae* DivIVA: localization and interactions in a MinCD-free context. *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (4), 1288–1298.

Falk, S. P.; et al. Phosphorylation of the *Streptococcus pneumoniae* cell wall biosynthesis enzyme MurC by a eukaryotic-like Ser/Thr kinase. *FEMS Microbiol. Lett.* **2013**, *340*, 19–23. DOI: 10.1111/1574-6968.12067.

Fenton, A.; et al. CozE is a Member of the MreCD Complex that Directs Cell Elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Microbiol.* **2016**, *2*, 16237.

Fenton, A.K.; et al. Phosphorylation-dependent activation of the cell wall synthase PBP2a in *Streptococcus pneumoniae* by MacP.. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2018**, *115*(11), 2812–2817. DOI: 10.1073/pnas.1715218115.

Fleurie, A. MapZ beacons the division sites and positions FtsZ-rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* **2014**, *516* (7530), 259–262. DOI: 10.1038/nature13966.

- Fleurie, A.; et al. Interplay of the Serine/Threonine-Kinase StkP and the Paralogs DivIVA and GpsB in Pneumococcal Cell Elongation and Division. *Plos genetics* **2014**, *10* (4), 100425
- Fraipont, C.; et al. The integral membrane FtsW protein and peptidoglycan synthase PBP3 form a subcomplex in Escherichia coli. *Microbiology* **2011**, *157*, 251–259.
- Fujihashi, M.; et al. Crystal structure of cis-prenyl chain elongating enzyme, undecaprenyl diphosphate synthase. *PNAs* **2001**, *98* (8), 4337–4342.
- Gamba, P.; et al. Two-step assembly dynamics of the Bacillus subtilis divisome. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 486–494.
- Gérard, P.; et al. Membrane topology of the Streptococcus pneumoniae FtsW division protein. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 1925–1931.
- Ghachi, M.; et al. The bacA Gene of Escherichia coli Encodes an Undecaprenyl Pyrophosphate Phosphatase Activity. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (29), 30106–30113.
- Ghuysen, J.; et al. Biosynthesis of peptidoglycan. *The Bacterial Membranes and Walls* **1973**, *1*, 37–130.
- Gieffing, C.; et al. The pneumococcal eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP co-localizes with the cell division apparatus and interacts with FtsZ in vitro. *Mikrobiologie* **2010**, *156*, 1697–1707. DOI: 10.1099/mic.0.036335-0.
- Goffin, C.; et al. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev.* **1998**, *62* (4), 1079–1093.
- Gonçalves, V.; et al. Optimization of medium and cultivation conditions for capsular polysaccharide production by Streptococcus pneumoniae serotype 23F. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *59*, 713–717. DOI: 10.1007/s00253-002-1075-8.
- Gómez-Mejía, A.; et al. Streptococcus pneumoniae two-component regulatory systems: The interplay of the pneumococcus with its environment. *International Journal of Medical Microbiology* **2018**, *308* (6), 722–737.
- Guenzi, E.; et al. A two component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of Streptococcus pneumoniae. *Mol. Microbiol.* **1994**, *12*, 505–515.
- Guilmi, A.; et al. Functional Characterization of Penicillin-Binding Protein 1b from Streptococcus pneumoniae. *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 1650–1658.
- Hakenbeck, R.; et al. Antibodies against the benzylpenicilloyl moiety as a probe for penicillin-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* **1986**, *157* (1), 101–106.
- Hanks, S.; et al. The eukaryotic Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **1995**, *9*, 576–596.

- Hardt, P.; et al. The cell wall precursor lipid II acts as a molecular signal for the Ser/Thr kinase PknB of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* **2017**, *307* (1), 1–10. DOI: 10.1016/j.ijmm.2016.12.001.
- Håvarstein, L.; et al. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 11140–11144.
- Hrast, M.; et al. Structure–activity relationships of new cyanothiophene inhibitors of the essential peptidoglycan biosynthesis enzyme MurF. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *66*, 32–45.
- Heidrich, C.; et al. Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 6093–6099.
- Hengge, R.; et al. Principles of c-di-GMP signaling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 263–273.
- Herbert, J. A.; et al. A Serine-Threonine Kinase (StkP) Regulates Expression of the Pneumococcal Pilus and Modulates Bacterial Adherence to Human Epithelial and Endothelial Cells In Vitro. *PLoS ONE* **2015**, *10* (6), DOI: 10.1371/journal.pone.0127212.
- Higgins, M.; et al. Model for Cell Wall Growth of *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **1970**, *101* (2), 643–648.
- Higgins, M.; et al. Study of cycle of cell wall assembly in *Streptococcus faecalis* by three-dimensional reconstructions of thin sections of cells. *J. Bacteriol.* **1976**, *127* (3), 1346–1358.
- Holečková, N.; et al. LocZ Is a New Cell Division Protein Involved in Proper Septum Placement in *Streptococcus pneumoniae*. *mBio* **2015**, *6* (1), DOI: doi:10.1128/mBio.01700-14
- Hoskins, J.; et al. Genome of the Bacterium *Streptococcus pneumoniae* Strain R6. *J. Bacteriol.* **2001**, *183* (19), 5709–5717.
- Cheng, Q.; et al. The com locus controls genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **1997**, *23* (4), 683–692.
- Inoue, A.; et al. Involvement of an essential gene, mviN, in murein synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 7298–7301.
- Jacobsen, F.; et al. Interplay between manganese and zinc homeostasis in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Metallomics* **2011**, *3* (1), 38–41.
- Jacq, M.; et al. The cell wall hydrolase Pmp23 is important for assembly and stability of the division ring in *Streptococcus pneumoniae*. *Scientific Reports* **2018**, *8* (1)
- Johnson, L.; et al. The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, *22*, 199–232.

- Jolly, L.; et al. The femR315 Gene from *Staphylococcus aureus*, the Interruption of Which Results in Reduced Methicillin Resistance, Encodes a Phosphoglucosamine Mutase. *J. Bacteriol.* **1997**, *179* (17), 5321–5325.
- Jolly, L.; et al. Reaction mechanism of phosphoglucosamine mutase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *262* (1), 202–210. DOI: doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00373.x.
- Jolly, L.; et al. Autophosphorylation of Phosphoglucosamine Mutase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **2000**, *182* (5), 1280–1285.
- Kang, J.; et al. Effect of Phosphoglucosamine Mutase on Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibilities in *M. smegmatis* glmM Gene Knockdown Strain. *PLoS ONE* **2013**, *8* (4), e61589.
- Karimova, G.; et al. Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial twohybrid analysis. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 2233–2243.
- Kell, C.; et al. Deletion Analysis of the Essentiality of Penicillin-Binding Proteins 1A, 2B and 2X of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1993**, *106*, 171–175.
- Krupička, J. Studium esenciality genu glmM kódujícího fosfoglukozaminmutázu *Streptococcus pneumoniae*. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, 2014.
- Krzyściak, W.; et al. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *33* (4), 499–515.
- Land, A.; et al. The Requirement for Pneumococcal MreC and MreD Is Relieved by Inactivation of the Gene Encoding PBP1a. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*,
- Land, A.; et al. Requirement of essential Pbp2x and GpsB for septal ring closure in *Streptococcus pneumoniae* D39.. *Mol. Microbiol.* **2013**, *90* (5), 939–955. DOI: 10.1111/mmi.12408.
- Lara, B.; et al. Cell Division in Cocci: Localization and Properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA Protein. *Mol. Microbiol.* **2005**, *55*, 699–711.
- Leclercq, S.; et al. Interplay between Penicillin-binding proteins and SEDS proteins promotes bacterial cell wall synthesis. *Scientific Reports* **2017**, 43306.
- Li, S.; et al. Identification of *M. tuberculosis* Rv3441c and *M. smegmatis* MSMEG_1556 and Essentiality of *M. smegmatis* MSMEG_1556. *PLoS ONE* **2012**, *7* (8), e42769.
- Libby, E.; et al. The Eukaryotic-Like Ser/Thr Kinase PrkC Regulates the Essential WalRK Two-Component System in *Bacillus subtilis*.. *PLoS Genet.* **2015**, *11* (6)
- Liu, L.; et al. Structure of rabbit muscle phosphoglucomutase refined at 2.4 Å resolution. *Acta Crystallogr.* **1997**, *53*, 392–405.
- Liu, X.; et al. Role of phosphoglucosamine mutase on virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol.* **2009**, *24* (4), 272–277.

- Liu, X.; et al. High-throughput CRISPRi phenotyping identifies new essential genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Syst Biol.* **2017**, *13* (5), 931.
- Loftus, R.; et al. High-risk *Staphylococcus aureus* transmission in the operating room: A call for widespread improvements in perioperative hand hygiene and patient decolonization practices. *American Journal of Infection Control* **2018**, *46* (10), 1134–1141.
- Lloyd, A.; et al. Characterization of tRNA-dependent Peptide Bond Formation by MurM in the Synthesis of *Streptococcus pneumoniae* Peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (10), 6402–6417.
- Loo, C.; et al. *Streptococcus gordonii* Biofilm Formation: Identification of Genes that Code for Biofilm Phenotypes. *J. Bacteriol.* **2000**, *182* (5), 1374–1382.
- López, R. *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages: one long argument. *Int Microbiol.* **2004**, *7* (3), 163–171.
- Lovering, A.; et al. Structural Analysis of an “Open” Form of PBP1B from *Streptococcus pneumoniae*. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **2006**, *15*, 1701–1709.
- Maggi, S.; et al. Division Protein Interaction Web: Identification of a Phylogenetically Conserved Common Interactome between *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Microbiology* **2008**, *154*, 3042–3052.
- Manat, G.; et al. Deciphering the Metabolism of Undecaprenyl-Phosphate: The Bacterial Cell-Wall Unit Carrier at the Membrane Frontier. *Microbial Drug Resistance* **2014**, *20* (3).
- Marston, A.; et al. Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. *Mol. Microbiol.* **199**, *33* (1), 84–96.
- Massidda, O.; et al. From models to pathogens: how much have we learned about *Streptococcus pneumoniae* cell division? *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *15* (12), 3133–3157. DOI: 10.1111/1462-2920.12189.
- Mehne, F.; et al. Cyclic Di-AMP Homeostasis in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 2004–2017.
- Mehra-Chaudhary, R.; et al. Crystal Structure of *Bacillus anthracis* Phosphoglucosamine Mutase, an Enzyme in the Peptidoglycan Biosynthetic Pathway. *J. Bacteriol.* **2011**, *193* (16), 4081–4087.
- Mehra-Chaudhary, R.; et al. Crystal structure of a bacterial phosphoglucomutase, an enzyme involved in the virulence of multiple human pathogens.. *Proteins* **2011**, *79*, 1215–1229.
- Mengin-Lecreulx, D.; et al. Identification of the glmU gene encoding N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1993**, *175* (19), 6150–6157.
- Mengin-Lecreulx, D.; et al. Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase activities of *Escherichia coli*: characterization of

the glmU gene product as a bifunctional enzyme catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-N-acetylglucosamine synthesis.. *J. Bacteriol.* **1993**, 176(18), 5788–5795.

Mengin-Lecreulx, D.; et al. Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase activities of Escherichia coli: characterization of the glmU gene product as a bifunctional enzyme catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-N-acetylglucosamine synthesis. *J. Bacteriol.* **1994**, 176 (18), 5788–5795.

Mengin-Lecreulx, D.; et al. Characterization of the Essential Gene glmM Encoding Phosphoglucosamine Mutase in Escherichia coli. *Journal of biological chemistry* **1996**, 271 (1), 32–39.

Meeske, A.; et al. SEDS Proteins Are a Widespread Family of Bacterial Cell Wall Polymerases. *Nature* **2016**, 537, 634–638.

Mercer, K.; et al. The Escherichia coli Cell Division Protein FtsW Is Required To Recruit Its Cognate Transpeptidase, FtsI (PBP3), to the Division Site. *J. Bacteriol.* **2002**, 184 (4), 904–912.

Mio, T.; et al. Functional cloning and mutational analysis of the human cDNA for phosphoacetylglucosamine mutase: Identification of the amino acid residues essential for the catalysis. *Acta Biochim. Biophys.* **2000**, 1492, 369–376.

Mohammadi, T.; et al. Identification of FtsW as a transporter of lipid- linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J.* **2011**, 30, 1425–1432.

Morlot, C.; et al. The d,d-carboxypeptidase PBP3 Organizes the Division Process of Streptococcus pneumoniae. *Mol. Microbiol.* **2004**, 51, 1641–1648.

Morlot, C.; et al. Crystal Structure of a Peptidoglycan Synthesis Regulatory Factor (PBP3) from Streptococcus pneumoniae. *J. Biol. Chem.* **2004**, 280 (16), 15984–15991.

Mura, A.; et al. Roles of the Essential Protein FtsA in Cell Growth and Division in Streptococcus pneumoniae. *J. Bacteriol.* **2017**, 199 (3), 1–20. DOI: 10.1128/JB.00608-16.

Nikolskaya, A.; et al. A novel type of conserved DNA-binding domain in the transcriptional regulators of the AlgR/AgrA/LytR family. *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 2453–2459.

Noirclerc-Savoie, M.; et al. Reconstitution of membrane protein complexes involved in pneumococcal septal cell wall assembly. *PLoS One* **2013**, 8, e7552.

Noirclerc-Savoie, M.; et al. In Vitro Reconstitution of a Trimeric Complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their Transient Co-Localization at the Division Site in Streptococcus pneumoniae. *Mol. Microbiol.* **2005**, 55, 413–424.

Nováková, L.; et al. Characterization of a Eukaryotic Type Serine/Threonine Protein Kinase and Protein Phosphatase of Streptococcus pneumoniae and Identification of Kinase Substrates. *FEBS Lett.* **2005**, 272, 1243–1254. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04560.x.

Nováková, L.; et al. Identification of Multiple Substrates of the StkP Ser/Thr Protein Kinase in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **2010**, *192* (14), 3629–3638. DOI: 10.1128/JB.01564-09.

Pallová, P. Dimerizace Ser/Thr proteinkinasy eukaryotního typu *Streptococcus pneumoniae* a charakterizace jejího substrátu, fosfoglukosaminmutasy GlmM. Dizertační práce, Univerzita Karlova v Praze, 2007.

Parkinson, J.; et al. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **1992**, *26*, 71–112.

Pastoret, S.; et al. Functional analysis of the cell division protein FtsW of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 8370–8379.

Pereira, S.; et al. Eukaryote-Like Serine/Threonine Kinases and Phosphatases in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2011**, *75* (1), 192–212.

Pestova, E.; et al. Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system.. *Mol. Microbiol.* **1996**, *21*, 853–862.

Peters, K.; et al. *Streptococcus pneumoniae* PBP2x mid-cell localization requires the C-terminal PASTA domains and is essential for cell shape maintenance.. *Mol. Microbiol.* **2014**, *92* (4), 733–755.

Piñas, G.; et al. Crosstalk between the serine/threonine kinase StkP and the response regulator ComE controls the stress response and intracellular survival of *Streptococcus pneumoniae*. *PLOS Pathogens* **2018**, *14* (6)

Poll van der, T.; et al. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* **2009**, *374*, 1543–1556.

Ravikuma, V.; et al. In-depth analysis of *Bacillus subtilis* proteome identifies new ORFs and traces the evolutionary history of modified proteins. *Scientific reports* **2018**, *8*, 17246.

Regni, C.; et al. Crystal structure of PMM/PGM: An enzyme in the biosynthetic pathway of *P. aeruginosa* virulence factors. *Structure* *10*, 269–279.

Rocchetta, H.; et al. Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63*, 523–553.

Rued, B.; et al. Suppression and Synthetic-Lethal Genetic Relationships of Δ gpsB Mutations Indicate that GpsB Mediates Protein Phosphorylation and Penicillin-Binding Protein Interactions in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol. Microbiol.* **2017**, *103*, 931–957.

Ruiz, N.; et al. Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in *Escherichia coli*. *PANS* **2008**, *105* (40), 15553–15557.

Ruoff, K.; et al. *Manual of clinical microbiology*, 7th ed.; ASM Pres: Washington, D.C, 1999.

- Sasková, L.; et al. Eukaryotic-Type Serine/Threonine Protein Kinase StkP Is a Global Regulator of Gene Expression in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (11), 4168–4179. DOI: 10.1128/JB.01616-06.
- Sauerbier, J. Horizontaler Gentransfer zwischen *Streptococcus mitis* und *Streptococcus pneumoniae* – Analyse der Resistenzentwicklung. Dissertation, der Technischen Universität Kaiserslautern, 29.03.2012.
- Sauvage, E.; et al. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **2008**, *32*, 234–258.
- Sergio, F.; et al. Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall muropeptide branching genes. *PNAS* **2000**, *97* (9), 4891–4896.
- Shackelford, G.; et al. Evolutionary trace analysis of the alpha-D-phosphohexomutase superfamily. *Protein Sci.* **2004**, *13* (8), 2130–2138.
- Shankar, S.; et al. Exopolysaccharide alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Enzymology and regulation of gene expression. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1995**, *70*, 221–255.
- Shaun, P. F.; et al. Phosphorylation of the *Streptococcus pneumoniae* cell wall biosynthesis enzyme MurC by a eukaryotic-like Ser/Thr kinase. *FEMS Microbiol. Lett.* **2013**, *340*, 19–23. DOI: 10.1111/1574-6968.12067.
- Shimazu, K.; et al. Identification of the *Streptococcus gordonii* glmM gene encoding phosphoglucosamine mutase and its role in bacterial cell morphology, biofilm formation, and sensitivity to antibiotics. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2008**, *53* (2), 166–177.
- Shimazu, K.; et al. Contribution of phosphoglucosamine mutase to determination of bacterial cell morphology in *Streptococcus gordonii*. *Odontology* **2012**, *100* (1), 28–33.
- Shulman, S. T.; et al. Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician?. *Clin. Infect. Dis.* **2007**, *45* (8), 1025–1029.
- Schiffer, G.; et al. Cloning and Characterization of PBP 1C, a Third Member of the Multimodular Class A Penicillin-binding Proteins of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (45), 32031–32039.
- Schleifer, K.; et al. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **1972**, *36*, 407–477.
- Schmidl, S.; et al. The Phosphoproteome of the Minimal Bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Cell Proteomics* **2010**, *9*, 1228–1242.
- Siegel, S. D.; et al. Biogenesis of the Gram-positive bacterial cell envelope. *Current Opinion in Microbiology* **2016**, *34*, 31–37.

- Silvestroni, A.; et al. Identification of Serine/Threonine Kinase Substrates in the Human Pathogen Group B Streptococcus. *J Proteome Res* **2009**, *8* (5), 2563–2574. DOI: 10.1021/pr900069n.
- Sjodt, M.; et al. Structure of the peptidoglycan polymerase RodA resolved by evolutionary coupling analysis. *Nature* **2018**, *556*, 118–121.
- Smith, C.; et al. Structure, function and dynamics in the Mur family of bacterial cell wall ligases. *J Mol Biol.* **2006**, *362*, 640–655.
- Stamsås, G. A.; et al. Evidence that pneumococcal WalK is regulated by StkP through protein–protein interaction. *Microbiology* **2017**, *163*, 383–399. DOI: 10.1099/mic.0.000404.
- Stamsås, G. A.; et al. Identification of EloR (Spr1851) as a regulator of cell elongation in Streptococcus pneumoniae. *Molecular biology* **2017**, *105* (6), 954–967. DOI: 10.1111/mmi.13748.
- Stock, A.; et al. Two-component signal transduction.. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 183–215.
- Stock, J.; et al. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **1989**, *53* (4), 450–490.
- Straume, D.; et al. Identification of pneumococcal proteins that are functionally linked to penicillin-binding protein 2b (PBP2b).. *Mol. Microbiol.* **2017**, *103* (1), 99–116.
- Straume, D.; et al. Overexpression of the fratricide immunity protein ComM leads to growth inhibition and morphological abnormalities in Streptococcus pneumoniae. *Microbiology* **2017**, *163* (1), 9–21.
- Sung, C.; et al. An rpsL Cassette, Janus, for Gene Replacement through Negative Selection in Streptococcus pneumoniae. *Appl Environ Microbio* **2001**, *65* (11), 5190–5196.
- Sutcliffe, C.; et al. The lipoteichoic acids and lipoglycans of Gram-positive bacteria: a chemotaxonomic perspective. *Syst. Appl. Microbiol.* **1994**
- Šink, R.; et al. Crystallographic Study of Peptidoglycan Biosynthesis Enzyme MurD: Domain Movement Revisited. *PLoS ONE* **2016**, *11* (3), 0152075.
- Tettelin, H.; et al. Complete genome sequence of a virulent isolate of Streptococcus pneumoniae. *Science* **2001**, *293* (5529), 498–506.
- Thanassi, J.; et al. Identification of 113 conserved essential genes using a high- throughput gene disruption system in Streptococcus pneumoniae. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *14*, 3152–3162.
- Throup, J.; et al. A genomic analysis of two-component signal transduction in Streptococcus pneumoniae. *Mol. Microbiol.* **2000**, *35* (3), 566–576.
- Tsui, H.; et al. Suppression of a Deletion Mutation in the Gene Encoding Essential PBP2b Reveals a New Lytic Transglycosylase Involved in Peripheral Peptidoglycan Synthesis in Streptococcus pneumoniae D39. *Mol. Microbiol.* **2016**, *100*, 1039–1065.

- Turner, R.; et al. Different walls for rods and balls: the diversity of peptidoglycan. *Mol. Microbiol.* **2014**, *91*, 862–874.
- Typas, A.; et al. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Microbiology* **2013**, *10*, 123–136.
- Ulijasz, A.; et al. Phosphorylation of the RitR DNA- binding domain by a Ser–Thr phosphokinase: implications for global gene regulation in the streptococci. *Mol. Microbiol.* **2009**, *71* (2), 382–390. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06532.x.
- Ulrych, A.; et al. Characterization of pneumococcal Ser/Thr protein phosphatase phpP mutant and identification of a novel PhpP substrate, putative RNA binding protein Jag. *BCM Mikrobiol.* **2016**, *16* (1), 247. DOI: 10.1186/s12866-016-0865-6.
- Vollmer, W.; et al. Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends Microbiol* **2010**, *18*, 59–66.
- Xu, P.; et al. Genome-wide essential gene identification in *Streptococcus sanguinis*. *Sci Rep.* **2011**, *1* (125)
- Yajima, A.; et al. Contribution of phosphoglucosamine mutase to the resistance of *Streptococcus gordonii* DL1 to polymorphonuclear leukocyte killing. *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *297* (2), 196–202.
- Yu, Y.; et al. The virulence of *Streptococcus pneumoniae* partially depends on dprA. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2017**, *48*, 225–231.
- Yunck, R.; et al. Identification of MltG as a potential terminase for peptidoglycan polymerization in bacteria. *Molecular Mikrobiology* **2016**, *99* (4), 700–718.
- Zapun, A.; et al. The Different Shapes of Cocci. *FEMS Microbiol.* **2008**, *32*, 345–360.
- Zawadzke, L.; et al. Existence of two D-alanine:D-alanine ligases in *Escherichia coli*: cloning and sequencing of the *ddlA* gene and purification and characterization of the DdlA and DdlB enzymes. *Biochemistry* **1991**, *30* (6), 1673–1682.
- Zhang, W.; et al. Expression, essentiality, and a microtiter plate assay for mycobacterial GlmU, the bifunctional glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase. *Int. J. Biochem.* **2008**, *40* (11), 2560–2571.
- Zheng, J.; et al. Absence of the KhpA and KhpB (JAG/EloR) RNA- binding proteins suppresses the requirement for PBP2b by overproduction of FtsA in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Molecular biology* **2017**, *106* (5), 793–814.
- Zhu, Y.; et al. Cyclic-di-AMP synthesis by the diadenylate cyclase CdaA is modulated by the peptidoglycan biosynthesis enzyme GlmMin *Lactococcus lactis*. *Molecular Mikrobiology* **2016**, *9* (6), 1015–1027.