

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

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE**



**Role proteinkinázy StkP v regulaci buněčného dělení  
*Streptococcus pneumoniae***

Eliška Malíková

**Praha 2011**

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

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Lindy Novákové, Ph.D. s použitím pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

Práce vznikla v letech 2009-2011 v rámci grantových projektů 204/07/082 a 204/08/0783 za podpory Grantové agentury České republiky.

### **Děkuji:**

Lindě Novákové, vedoucí mé diplomové práce, za trpělivost, péči a cenné rady, které mi vždy ochotně věnovala.

Pavlu Brannymu a celému kolektivu Laboratoře buněčné signalizace za vytvoření přátelského pracovního prostředí a všestrannou pomoc.

Rodičům, Štěpánce a Petrovi za jejich lásku, podporu a optimizmus.

# The role of protein kinase StkP in regulation of the cell division in *Streptococcus pneumoniae*

Protein phosphorylation by protein kinases is a key mechanism that enables both eukaryotic and prokaryotic organisms sense and read environmental signals and convert these signals into changes in gene expression and thus proper biological response. One of the main phosphorylation systems in bacteria consists of eukaryotic-like Ser/ Thr protein kinases.

The genome of human pathogen *Streptococcus pneumoniae* contains single Ser/ Thr protein kinase StkP. StkP regulates virulence, competence, stress resistance, gene expression and plays an important role in the regulation of cell division cycle. Analysis of phosphoproteome maps of both wild type and  $\Delta$ stkP mutant strain of *S. pneumoniae* showed that *in vivo* StkP phosphorylates several putative substrates including the cell division protein DivIVA (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010). DivIVA in *S. pneumoniae* is localized at midcell and at the cell poles. It was proposed to be primarily involved in the formation and maturation of the cell poles (FADDA *et al.*, 2007).

The aim of this thesis was to investigate phosphorylation of the cell division protein DivIVA in *S. pneumoniae*. Gene *divIVA* was cloned, expressed in *E. coli* and protein was purified via affinity chromatography. Phosphorylation of DivIVA by StkP was examined in a kinase assay. We confirmed that DivIVA is a direct substrate of StkP *in vitro*. Further we prepared a set of mutants in *divIVA* gene. We replaced two presumable phosphoaminoacids Thr15 and Thr201, identified by mass-spectrometry with inert aminoacid Ala, thus producing phosphoablative mutants. Phosphoablative proteins contain no phospho-accepting amino acid residues and cannot be phosphorylated. Using these mutants we confirmed that DivIVA is phosphorylated by protein kinase StkP at Thr201 and with lower efficiency at Thr15.

We prepared a construct for complementation of *divIVA* deletion in *S. pneumoniae*. We constructed strains of *S. pneumoniae* expressing phosphoablative and phosphomimetic mutants of *divIVA* under inducible zinc-promoter. Phosphomimetic DivIVA's carry mutation Thr15Glu and/or Thr201Glu. Presence of negatively charged Glu mimics phosphorylated state of protein. We studied expression and phosphorylation of DivIVA mutated proteins in *S. pneumoniae* and we confirmed that Thr15 and Thr201 are phosphorylated *in vivo*. Our phenotypic study showed that phosphorylation of DivIVA is

not essential for its function. On the other hand our data suggest that hyperphosphorylation inhibits DivIVA activity.

**Keywords:** DivIVA, cell division, *Streptococcus pneumoniae*, phosphorylation, Ser/ Thr protein kinases, oligomerization

**Klíčová slova:** DivIVA, buněčné dělení, *Streptococcus pneumoniae*, fosforylace, Ser/ Thr proteinkinázy, oligomerizace

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Streptococcus pneumoniae</i></b>	<b>10</b>
2.1.1	Historický význam	11
2.1.2	Patogeneze	11
2.1.3	Pneumokokové vakcíny	17
<b>2.2</b>	<b>Buněčné dělení</b>	<b>18</b>
2.2.1	Výběr dělicího místa	19
<b>2.3</b>	<b>Z-kruh – jeho tvorba, stabilizace a destabilizace</b>	<b>29</b>
2.3.1	FtsZ polymerace a dynamické vlastnosti Z-kruhu	29
2.3.2	Membránová kotva	31
2.3.3	Proteiny stabilizující Z-kruh	33
2.3.4	Proteiny negativně ovlivňující stabilitu Z-kruhu	36
<b>2.4</b>	<b>Syntéza buněčné stěny a peptidoglykanu</b>	<b>39</b>
2.4.1	Penicilin vazebné proteiny	40
2.4.2	Peptidoglykanové hydrolázy	41
2.4.3	Komponenty pozdního dělicího komplexu	42
<b>2.5</b>	<b>Úloha proteinkináz v regulaci buněčného dělení</b>	<b>47</b>
2.5.1	Proteinkinázy s PASTA doménami	48
<b>2.6</b>	<b>Proteinkináza StkP u <i>S. pneumoniae</i></b>	<b>51</b>
2.6.1	Substráty proteinkinázy StkP	53
<b>3</b>	<b>CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiál</b>	<b>57</b>
4.1.1	Bakteriální kmeny	57
4.1.2	Plazmidy	57
4.1.3	Půdy a média	58
4.1.4	Pufry a roztoky	59
4.1.5	Chemikálie	60
4.1.6	Enzymy	61
4.1.7	Protilátky	62
4.1.8	Komerční soupravy a standardy	62
4.1.9	Počítačová analýza	62
4.1.10	Použité oligonukleotidy	63
<b>4.2</b>	<b>Metody</b>	<b>64</b>
4.2.1	Manipulace s DNA	64
4.2.2	Manipulace s proteiny	66
4.2.3	Manipulace s <i>E. coli</i>	69
4.2.4	Manipulace se <i>S. pneumoniae</i>	72

4.2.5	Kinázová reakce <i>in vitro</i>	73
4.2.6	Mutageneze	74
4.2.7	Mikroskopie	75
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>76</b>
<b>5.1</b>	<b>Expresa a purifikace rekombinantního DivIVA</b>	<b>76</b>
<b>5.2</b>	<b>Fosforylace DivIVA proteinkinázou StkP <i>in vitro</i></b>	<b>78</b>
<b>5.3</b>	<b>Mutageneze proteinu DivIVA</b>	<b>80</b>
5.3.1	Příprava modifikovaných proteinů DivIVA	80
5.3.2	Fosforylace modifikovaných forem DivIVA proteinkinázou StkP <i>in vitro</i>	81
<b>5.4</b>	<b>Klonování genu <i>divIVA</i> do vektoru pTYB2</b>	<b>83</b>
5.4.1	Příprava vektoru	83
5.4.2	Expresa a purifikace	84
<b>5.5</b>	<b>Příprava konstruktů pro komplementaci delece <i>divIVA</i> ve <i>S. pneumoniae</i></b>	<b>86</b>
5.5.1	Transformace vektoru pZn-DivIVA do <i>S. pneumoniae</i>	87
5.5.2	Expresa proteinu DivIVA ve <i>S. pneumoniae</i>	90
5.5.3	Příprava komplementačních konstruktů s modifikovaným DivIVA	94
5.5.4	Expresa modifikovaných forem proteinu DivIVA ve <i>S. pneumoniae</i>	95
5.5.5	Fosforylace fosfoablativních forem DivIVA proteinkinázou StkP <i>in vivo</i>	97
<b>5.6</b>	<b>Komplementace delece <i>divIVA</i> modifikovanými formami DivIVA</b>	<b>98</b>
5.6.1	Komplementace $\Delta divIVA$ fosfoablativními mutanty DivIVA	100
5.6.2	Komplementace $\Delta divIVA$ fosfomimetickými mutanty DivIVA	102
<b>5.7</b>	<b>Testy oligomerizace DivIVA ve <i>S. pneumoniae</i></b>	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>DISKUZE</b>	<b>107</b>
<b>6.1</b>	<b>Fosforylace DivIVA prostřednictvím proteinkinázy StkP <i>in vitro</i></b>	<b>107</b>
<b>6.2</b>	<b>Vliv fosforylace na funkci DivIVA <i>in vivo</i></b>	<b>110</b>
<b>6.3</b>	<b>Oligomerizace DivIVA</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>SOUHRN</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>120</b>



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AK	aminokyselina
ATB	antibiotikum
ATP	adenozintrifosfát
BSA	hovězí serumalbumin
BN-PAGE	modrá nativní polyakrylamidová elektroforéza
CBD	chitin vazebná doména
CPS	polysacharidy pouzdra
CSP	peptid stimulující kompetenci
DivIV <sub>A</sub> <sub>BS</sub>	DivIVA u <i>Bacillus subtilis</i>
DivIV <sub>A</sub> <sub>CG</sub>	DivIVA u <i>Corynebacterium glutamicum</i>
DivIV <sub>A</sub> <sub>EF</sub>	DivIVA u <i>Enterococcus faecalis</i>
DivIV <sub>A</sub> <sub>SC</sub>	DivIVA u <i>Streptomyces coelicolor</i>
DivIV <sub>A</sub> <sub>SPN</sub>	DivIVA u <i>Streptococcus pneumoniae</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ESTPK	Ser/ Thr proteinkináza eukaryotického typu
His tag	histidinová kotva
chr. DNA	chromozomální DNA
IPTG	izopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
Kb	tisíce párů bází
KD	kinázová doména
Mb	miliony párů bází
MW	molekulová hmotnost
OD <sub>600</sub>	optická denzita při 600 nm
PASTA	domény nacházející se u penicilin vazebných proteinů a některých Ser/ Thr proteinkináz
pb	páry bází
PBP	penicilin vazebný protein
PCR	polymerázová řetězová reakce
pThr	fosforylovaný threonin
PVDF	polyvinylidendifluorid
rpm	otáčky za minutu
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS
Thr15	threonin na pozici 15
Thr201	threonin na pozici 201
WT	divoký typ ( <i>wild type</i> )

# 1 ÚVOD

Každá bakteriální buňka se neustále vyrovnává s tlakem okolního prostředí. Životaschopnost jednotlivce i mikrobiální populace jako celku úzce souvisí se schopností rychle a účelně reagovat na změny vnějších podmínek. Z těchto důvodů si bakterie vyvinuly rozličnou škálu mechanismů, které jim umožňují zaznamenávat informace o okolí, zprostředkovat adekvátní odpověď a vzájemně se dorozumívat.

Jedním ze systémů, který hraje klíčovou roli v buněčné signalizaci, je fosforylace a defosforylace proteinů. Fosforylace je reverzibilní kovalentní modifikace proteinů katalyzovaná proteinkinázami, která se účastní regulace řady esenciálních buněčných procesů. Jednou z možností, jak realizovat fosforylaci proteinů, je prostřednictvím ATP dependentních Ser/ Thr proteinkináz eukaryotního typu. Tyto enzymy jsou v bakteriální říši poměrně časté. Vyskytují se u fylogeneticky odlišných bakterií, které využívají různé životní strategie. Identifikace a charakterizace substrátů proteinkináz je nezbytným krokem pro pochopení vnitrobuněčných signálních kaskád, které tyto regulační proteiny kontrolují.

Vhodným modelovým organizmem pro studium funkce Ser/ Thr proteinkináz eukaryotického typu se stal *Streptococcus pneumoniae*. Tento významný lidský patogen kóduje jedinou eukaryotickou proteinkinázu StkP. Ta je příkladem zvláštní skupiny proteinkináz, které mají ve své extracelulární části charakteristické PASTA domény schopné vázat  $\beta$ -laktamový kruh, a tedy i jeho strukturní analog koncový acyl D-alanyl-D-alanin peptidoglykanového prekursoru. Předpokládá se, že právě tato vlastnost zodpovídá za účast některých Ser/ Thr proteinkináz na regulaci buněčného dělení. Syntéza buněčné stěny a správné načasování tvorby a umístění buněčné přepážky je komplexní děj, jehož narušení významně ovlivňuje životaschopnost bakterie.

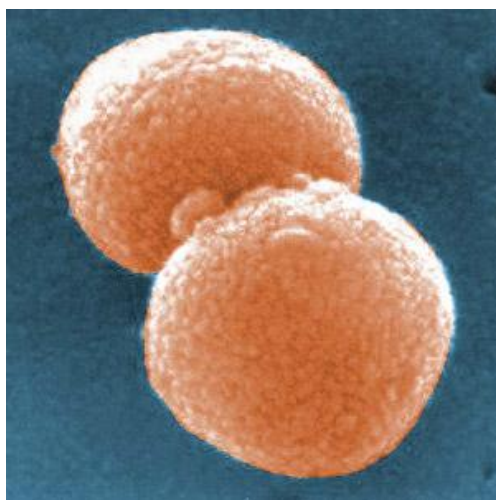
Pomocí fosfoproteomické analýzy bylo identifikováno několik substrátů pneumokokové proteinkinázy StkP. Jedním z nich byl protein DivIVA účastnící se buněčného dělení (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010). Cílem této diplomové práce bylo zjistit, které aminokyselinové zbytky DivIVA podléhají fosforylaci proteinkinázou StkP, a jaký vliv má tato modifikace na funkci DivIVA.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* patří mezi klinicky významné bakterie, které podle biochemických a morfologických vlastností řadíme do skupiny grampozitivních kataláza negativních koků. Koky mají zašpičatělý (lancetovitý) tvar a vyskytují se převážně ve dvojicích. Z tohoto důvodu bývá *S. pneumoniae* často označován jako „diplokok“. Jedná se o bakterii fakultativně anaerobní (mikroaerofilní), která je poměrně náročná na kultivační podmínky.

*S. pneumoniae* (obr. 2-1) je extracelulární lidský patogen. Na krevním agaru roste v koloniích obklopených zónou viridace (jedná se o tzv.  $\alpha$  nebo také neúplnou hemolýzu). U této bakterie rozlišujeme dvě hlavní morfologické fáze. Vyrůstá buď v drsných koloniích ve fázi R (Rough = drsný) jako neopouzdrěná nevirulentní forma, nebo v hladkých koloniích opouzdrěných virulentních bakterií ve fázi S (Smooth = hladký). Polysacharidové pouzdro je vytvořeno u všech virulentních kmenů a představuje hlavní virulenční faktor, a současně i nejvýznamnější antigen bakterie *S. pneumoniae* (MORONA *et al.*, 2000). Kmeny, které vytvářejí velká kvanta pouzdrné substance, rostou v nápadně hlenovitých až splývavých koloniích. Někdy je tento morfologický jev označován za fázi M (Mucosal = mukózní). Podle typu pouzdrného antigenu rozlišujeme více než 90 sérotypů *S. pneumoniae*.



**Obr. 2-1: *Streptococcus pneumoniae*: detailní snímek dvojice koků**  
Převzato a upraveno z [www.leganerd.com](http://www.leganerd.com).

Bakteriální formy bez vytvořeného pouzdra běžně kolonizují horní cesty dýchací, kde jsou součástí normální mikroflóry (MORONA *et al.*, 2003). Výskyt v nosohltanu a

ústní části hltanu je přítomen u 15 % dětí a 5 % dospělých (KADIOGLU *et al.*, 2008). Opouzdřené formy jsou vysoce virulentní a nezřídka způsobují záněty horních cest dýchacích, zejména nosohltanu a nosních dutin, a také záněty středního ucha. *S. pneumoniae* způsobuje i mnohem závažnější onemocnění jako například meningitidu, pneumonii či sepsi (GILLESPIE a BALAKRISHNAN, 2000). Do čtyřicátých let dvacátého století, tedy do doby, než se začala užívat antibiotická léčba, způsoboval pneumokok více úmrtí než rakovina a srdeční nemoci dohromady (LOPEZ, 2004).

### 2.1.1 Historický význam

*S. pneumoniae* není jen významným lidským patogenem, ale i zajímavým modelovým organismem, který je již od svého objevení v roce 1881 intenzivně studován. O objev a popis tohoto kolonizátora horních cest dýchacích se nezávisle na sobě zasloužili Louis Pasteur a George Miller Sternberg.

Důležitou vlastností *S. pneumoniae* je schopnost přirozené kompetence. Termínem přirozená kompetence označujeme fyziologický stav, ve kterém je bakterie schopna přijmout cizorodou DNA ze svého okolí bez předchozích chemických či jiných úprav. Tato vlastnost sehrála nezanedbatelnou úlohu při výběru *S. pneumoniae* jako experimentálního nástroje pro důkaz skutečnosti, že nositelkou dědičnosti je DNA. Těmto pokusům ovšem předcházely slavné experimenty britského lékaře a genetika Fredericka Griffitha, který jako první dokázal horizontální přenos genetické informace mezi bakteriemi procesem zvaným transformace. Při svých pokusech roku 1928 použil dvě formy pneumokoka k infekci myšního hostitele. Smíchal mrtvé buňky formující hladké kolonie a vyvolávající onemocnění, spolu s živými neopouzdřenými nevirulentními koloniemi. Směs těchto buněk vyvolala fatální infekci a posléze smrt hostitele. Z myší krve pak byly izolované pouze opouzdřené bakterie typu S. Infekce pouze jedním nebo druhým kmenem myším neublížila. Griffith byl přesvědčen, že za přeměnu drsné nepatogenní formy v hladkou letální je zodpovědná určitá látka obsažená v usmrcených virulentních kmenech. Tuto blíže nedefinovanou látku označil jako transformační princip. Molekulární podstata tohoto jevu byla vysvětlena až o šestnáct let později. V roce 1944 O. T. Avery, C. M. McLeod a M. McCarty tuto látku izolovali a řadou pokusů dokázali, že za přenos genetické informace z jedné buňky do druhé je zodpovědná deoxyribonukleová kyselina (DNA).

### 2.1.2 Patogeneze

*S. pneumoniae* způsobí každý rok nákazu až 100 milionů lidí. Navzdory širokým možnostem antibiotické léčby u 10 % nemocných bývají tyto infekce letální (ORIHUELA *et al.*, 2004; MORONA *et al.*, 2003). Nejohroženější skupinou jsou především děti

(převážně mladší dvou let), lidé v pokročilejším věku (starší 65 let) a pacienti s vrozenou nebo získanou imunodeficiencí. V rozvojových zemích umírá ročně 5 milionů dětí na akutní plicní infekci, jejímž hlavním agens je právě *S. pneumoniae* (CATTERALL, 1999).

Patogeneze pneumokokové infekce je výsledkem vzájemné interakce mezi virulenčními činiteli *S. pneumoniae* a imunitního systému hostitelského organismu. *S. pneumoniae* patří mezi bakterie, které mohou kolonizovat celou řadu nik. Jak už bylo řečeno, nejčastěji tyto bakterie osídlují sliznice horních cest dýchacích. Při selhání obranných mechanismů hostitele je tato oblast příhodným místem, odkud mohou bakterie proniknout do doposud sterilních prostor a způsobit infekci (HAVLÍK, 2008). Ke vzniku lokálních infekcí dochází nejčastěji na podkladu jiné respirační infekce či chronického respiračního onemocnění. Po vniknutí bakterií do krevního řečiště může infekce vyústit v život ohrožující sepsi či zánět mozkových blan. (BALAKRISHNAN *et al.*, 2000).

Přímé působení virulenčních faktorů *S. pneumoniae* a současně imunitní odpověď hostitele na různé komponenty bakteriální buňky vede k rozvinutí čtyř klíčových projevů onemocnění: adhezi, invazi, zánětu a šoku (GILLEPSIE a BALAKRISHNAN, 2000).

#### 2.1.2.1 Adheze

Již během pokusů F. Griffitha byly rozeznány dvě různé morfologické fáze *S. pneumoniae*, které se liší zastoupením povrchových proteinů v buněčné stěně a celkovým fenotypem obou variant (tabulka 2-1). Charakteristickou vlastností jednotlivých forem je opacita neboli neprůhlednost, která úzce souvisí se schopností adherovat na buněčné povrchy. Větší, neprůhledné kolonie odpovídající morfologické fázi R jsou jednotné, klenuté a mají charakteristické bílé zbarvení. Morfologie průhledných, transparentních kolonií odpovídá S fázi. Obě fáze bakteriální organismus střídavě používá. Jasně, transparentní kolonie tvoří tenčí pouzdro a jsou lépe vybaveny pro počáteční kolonizaci sliznice nosohltanu (WEISER *et al.*, 1994)

Na úspěšném přilnutí *S. pneumoniae* na povrch epiteliálních buněk se podílí tři hlavní skupiny pneumokokových povrchových proteinů: cholin vazebné proteiny, lipoproteiny vázající dvojmocné ionty kovů a proteiny obsahující konzervovaný motiv LPXTG (X představuje jakoukoliv AK) (KADIOGLU *et al.*, 2008).

#### ***Cholin vazebné proteiny***

Cholin vazebné proteiny jsou ukotveny do buněčné stěny pomocí fosfocholinu (ChoP), jenž je nezbytnou součástí teichoových kyselin buněčné stěny a membránově vázaných lipoteichoových kyselin. ChoP se váže na hostitelské buňky přes receptory pro

faktor aktivující tvorbu krevních destiček (PAF, platelet-activating factor). Tento mechanismus je konzervován u řady bakterií, které osídlují horní cesty dýchací (CUNDELL *et al.*, 1995). V genomu *S. pneumoniae* bylo dosud identifikováno 15 cholin vazebných proteinů, například pneumokokové povrchové proteiny PspA a PspC (Pneumococcal Surface Protein A, C) (BERGMANN & HAMMERSCHMIDT, 2006). Ty inhibují aktivaci komplementu hostitele a jsou nutné pro rozvinutí plné virulence bakterie. PspA navíc váže lidský laktoferin, a chrání tak před baktericidní aktivitou apolactoferinu (SHAPER *et al.*, 2004).

### ***Lipoproteiny vázající dvojmočné ionty kovů***

V posledních letech bylo popsáno a prostudováno velké množství těchto proteinů ve snaze najít mezi nimi vhodného kandidáta pro tvorbu vakcíny (BROWN *et al.*, 2001). Dosud je známo více než 40 pneumokokových povrchových lipoproteinů. Delece genu pro některé z nich vede ke snížení, nebo dokonce ztrátě virulence bakterie. Důležitého zástupce této skupiny představuje pneumokokový povrchový antigen PsaA (Pneumococcal Surface Antigen A). PsaA je součástí ABC (ATP – Binding Cassette) transportního systému pro zinečnaté a manganaté ionty. Bylo zjištěno, že dostatečný příjem manganatých iontů je esenciální pro rezistenci *S. pneumoniae* k oxidativnímu stresu (TSENG *et al.*, 2002). Dalšími ABC transportéry jsou lipoproteiny PiaA a PiuA (Pneumococcal Iron Acquisition A, Pneumococcal Iron Uptake A) nezbytné pro příjem a akumulaci železa (BROWN *et al.*, 2002).

### ***Proteiny obsahující LPXTG motiv***

U *S. pneumoniae* bylo dosud objeveno kolem 20 proteinů, které ve své C-koncové doméně nesou konzervovanou sekvenci LPXTG.

LPXTG motiv je rozeznáván enzymem sortázou. Jedná se o transpeptidázu, která katalyzuje tvorbu amidové vazby mezi karboxylovou skupinou threoninu a aminoskupinou peptidového řetízku peptidoglykanu buněčné stěny (KADIOGLU *et al.*, 2008). Prostřednictvím této domény jsou proteiny ukotveny v buněčné stěně. Bylo zjištěno, že tyto proteiny napomáhají adhezi a zvyšují virulenci bakterie. Jsou rozšířené u širokého spektra grampozitivních bakterií (KADIOGLU *et al.*, 2008)

charakteristika	průhledná forma	neprůhledná forma
produkce pouzdra	+	+++
teichoová kyselina	++++	+
povrchová exprese <i>lytA</i>	+++	+
přítomnost PspA	+	++
kolonizace	+++	+
virulence	+	+++

**Tabulka 2-1: Rozdíly ve fenotypu průhledné a neprůhledné formy *S. pneumoniae***

#### 2.1.2.2 Invaze

V průběhu pneumokokové infekce může dojít k proniknutí bakterií do dolních cest dýchacích, a odtud i do krevního řečiště. Tato invaze u mnohých pacientů vede k rozvoji život ohrožující pneumonie, meningitidy či sepse (ORIHUELA *et al.*, 2004). Faktory, které rozhodují o tom, zda dojde nebo nedojde k rozvinutí invazivního onemocnění, mají přímý vliv na dynamickou rovnováhu mezi adhezí patogenních buněk a odstraněním nákazy alveolárními makrofágy a neutrofily.

Schopnost způsobit systémové, invazivní onemocnění není výsadou všech více než 90 dosud známých sérotypů *S. pneumoniae*, ale jen relativně malého počtu. Tyto „úspěšnější kmeny“ disponují geny, které posunují hostitelsko-patogenní rovnováhu ve prospěch patogenní bakterie. Proteiny kódované těmito geny představují velmi významné virulenční faktory a jsou předmětem mnohých studií (obr. 2-2). Mezi nejdůležitější virulenční faktory řadíme:

#### ***Pouzdro***

Jak již bylo zmíněno výše, nepostradatelnou komponentou patogenních kmenů je polysacharidové pouzdro, které chrání bakteriální buňky před fagocytózou ze strany alveolárních makrofágů, jejichž účinkům jsou bakterie vystaveny ihned po kolonizaci plic. Většina pouzderných polysacharidů je navíc záporně nabitá, a snižuje tak adhezi k mukopolysacharidům obsaženým v hlenu. Pouzdro tak brání uvíznutí a usnadňuje přístup k epiteliálním povrchům. Syntéza bakteriálního pouzdra je kódovaná tzv. *csp* geny (MORONA *et al.*, 2003).

### ***Hyaluronátlyáza (Hyl)***

Tento enzym degraduje jednotlivé součásti extracelulární matrix štěpením 1,4-glykozidické vazby, a výrazně tak usnadňuje průnik bakterie do hostitelské tkáně. Byl nalezen u všech virulentních kmenů *S. pneumoniae*. Kmeny se zvýšenou aktivitou Hyl jsou častěji izolovány od pacientů se zánětem mozkových blan či sepsí. To svědčí o klíčové roli Hyl v prolomení hematoencefalické bariéry (JEDRZEJAS *et al.*, 2002).

### ***Exoglykozidázy – $\beta$ -galaktozidáza (BgaA) a $\beta$ -N-acetylglukozaminidáza (StrH)***

Tyto proteiny katalyzují štěpení koncových cukrů z hostitelských glykokonjugátů. Dochází tak k narušení povrchu hostitelských tkání, a zároveň odkrytí dalších receptorů pro pneumokokové adheziny. Bakteriální buňky tak mohou snadněji kolonizovat epiteliální povrchy i pronikat do příslušných tkání (KING *et al.*, 2006).

### ***Neuraminidáza***

Neuraminidáza představuje další povrchově vázanou exoglykozidázu. Díky schopnosti štěpit kyselinu sialovou z povrchových glykoproteinů, glykolipidů a oligosacharidů bývá označována jako sialidáza. Novější studie ukazují, že jejím substrátem mohou být i solubilní proteiny, například laktoferin, IgA2 nebo některé sekreční produkty (KING *et al.*, 2004).

Genom *S. pneumoniae* obsahuje přinejmenším tři geny pro neuraminidázy: *nanA*, *nanB* a *nanC*. Všechny kmeny kódují *nanA*, většina i *nanB* a přibližně 50 % *nanC* (PETTIGREW *et al.*, 2006). Produkty těchto genů se liší jak v aminokyselinové sekvenci, tak v optimálních enzymatických podmínkách. Experimenty s mutanty s nefunkční NanA a NanB dokazují jejich důležitost pro přežití bakterií v dýchacím traktu i krevním řečišti. Význam aktivity neuraminidázy ve virulenci *S. pneumoniae* potvrzuje skutečnost, že u pacientů s pneumokokovou meningitidou, jejichž mozkomíšní mok obsahoval zvýšené množství N-acetyl-neuraminové kyseliny, došlo s vyšší pravděpodobností k bakteriemii (JEDRZEJAS, 2001).

### ***Pneumokokové adhesiny – PavA (Pneumococcal Adhesion and Virulence A) a enoláza (Eno)***

Oba tyto povrchové proteiny *S. pneumoniae* váží komponenty extracelulární matrix. Receptorem pro PavA je fibronektin. Enoláza váže plazminogen. Absence PavA výrazně snižuje bakteriální virulenci (KADIOGLU *et al.*, 2008).



### ***Pneumolyzin (Ply)***

Pneumolyzin je velmi účinný cytoplazmatický toxin patřící do rodiny cholesterol dependentních cytolyzinů. K jeho uvolnění do hostitelské tkáně dochází v průběhu lyze bakteriální buňky. Ply je produkován jako 52 kDa monomer, který po vazbě na cílovou buněčnou membránu oligomerizuje a vytváří vysokomolekulární pór. Výsledkem je masivní únik intracelulárních látek a příliv vody z okolního prostředí, což vede k osmotické nerovnováze a následné lyzi cílové buňky (TILLEY *et al.*, 2005). Vlivem toxinu je při invazivní pneumokokové infekci zničeno široké spektrum eukaryotických buněk včetně bronchiálního epitelu, alveolárního epitelu a endotelu plic. Pneumolyzin také poškozují hostitele inhibicí fagocytů a buněk imunitního systému hostitele.

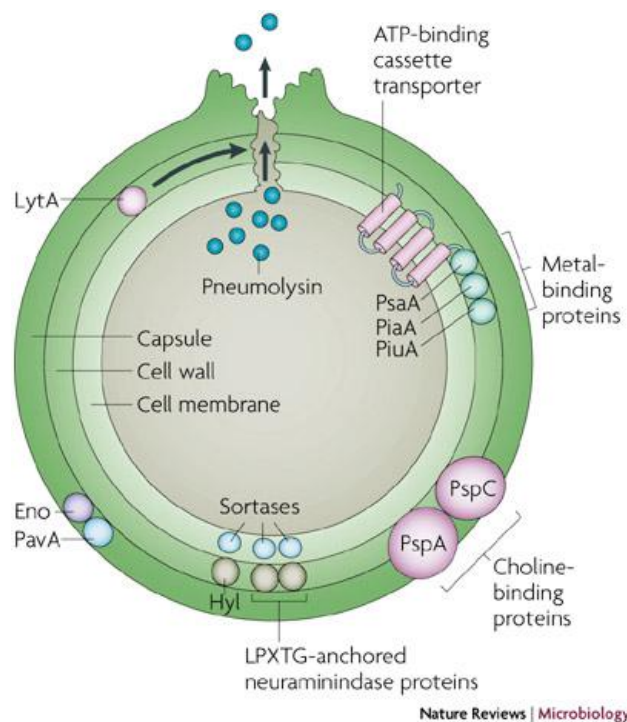
#### 2.1.2.3 Zánět a šok

Zánětlivá odpověď hostitelského organismu a přímé poškození plic souvisí mj. s pneumokokovými autolytickými enzymy, proteiny stimulujícími produkci cytokinů a oxidu dusného NO v buňkách imunitního systému a již výše popsaným pneumolyzinem. Ten aktivuje fosfolipázu A, která degraduje široké spektrum membránových fosfolipidů hostitelské buňky. Výsledný toxický efekt vede k zánětu a poškození plic (KADIOGLU *et al.*, 2008). Významným prozánětlivým faktorem je také pneumokoková esteráza A (EstA), která se podílí na aktivaci produkce NO v lidských makrofázích (KANG *et al.*, 2009).

Autolytické enzymy hydrolyzují vazbu mezi *N*-acetylmuramovou kyselinou a alaninovým zbytkem pentapeptidového řetízku peptidoglykanu. Výsledkem je degradace buněčné stěny a následná lyze buňky. Fragmenty rozštěpeného peptidoglykanu mohou zasahovat do krevního srážení a způsobovat koagulopatie. Nejvýraznějším autolyzinem *S. pneumoniae* je LytA.

### ***Autolyzin LytA (N-acetylmuramoyl-L-alanin-amidáza)***

Jedná se o amidázu, která štěpí *N*-acetylmuramoyl-L-alaninovou vazbu peptidoglykanu. Je členem rodiny cholin vazebných proteinů. Odštěpené molekuly peptidoglykanu a teichoových kyselin přímo vyvolávají zánět. LytA se také nepřímou podílí na virulenci bakterie, protože svojí aktivitou uvolňuje intracelulární virulenní faktory jako například pneumolyzin nebo purpuru produkující faktor (KADIOGLU *et al.*, 2008).



**Obr. 2-2: Důležité virulenční faktory *S. pneumoniae***

**Capsule:** pouzdro; **pneumolysin:** pneumolyzin; **LytA:** autolysin; **PspA** a **PspC:** pneumokokové povrchové proteiny A a C; **Hyl:** hyaluronátlyáza; **PavA:** pneumokokový adhezín A; **Eno:** enoláza; **PsaA:** pneumokokový povrchový antigen A; **PiaA** a **PiuA:** pneumokokové proteiny pro příjem a akumulaci železa  
Převzato z Kadioglu *et al.*, 2008.

### 2.1.3 Pneumokokové vakcíny

I přes vysokou kvalitu lékařské péče a celosvětově rozšířené používání antibiotické léčby představuje *S. pneumoniae* stále závažné etiologické agens. V rozvojových zemích je s tímto patogenem spojena smrt každého šestého dítěte (CUTTS *et al.*, 2005). Proto se do vývoje účinné širokospektrální pneumokokové vakcíny vkládá velké úsilí. Dosud však nebyla připravena vakcína, která by poskytovala efektivní ochranu před všemi patogenními sérotypy, vyvolávala dostatečnou imunitní odpověď u novorozenců, dospělých i starších lidí a byla cenově dostupná i pro rizikové skupiny v rozvojových státech.

Na základě znalostí struktury polysacharidového pouzdra *S. pneumoniae* byla v roce 1983 vyvinuta polyvalentní 23-složková vakcína, která obsahuje 23 purifikovaných pouzderných polysacharidových antigenů, které reprezentují téměř 90 % sérotypů způsobujících invazivní onemocnění v USA a Evropě. Pouzderné polysacharidy (CPSs) jsou účinné antigeny a vyvolávají vznik dostatečného množství ochranných protilátek u dětí starších dvou let a dospělých. Tato vakcína ovšem není vhodná pro nejohroženější skupinu, novorozence, kteří mají kvůli nevyzrálému imunitnímu systému omezenou protilátkovou odpověď k polysacharidům (BOGAERT *et al.*, 2004).

Nyní se kromě výše zmíněné 23-složkové vakcíny používají také 7-složkové a 13-složkové konjugované sacharidové vakcíny, které jsou efektivní proti nejfrekventovanějším sérotypům *S. pneumoniae* vyvolávajícím sepse, meningitidy, pneumonie a akutní zánět středního ucha. Polysacharidové antigeny jsou u těchto vakcín navázány na nosný protein CRM197 (netoxický analog difterického toxinu) a adsorbovány na minerální nosič. Výhodou konjugovaných vakcín je výborná imunitní odpověď u novorozenců, nevýhodou je ovšem její vysoká cena, která neumožňuje širší použití v rozvojových státech, kde je mortalita dětí v důsledku invazivních onemocnění *S. pneumoniae* nejvyšší (SOHN *et al.*, 2010). Navíc byla v několika klinických studiích zaznamenána jasná záměna sérotypu právě v důsledku vakcinace (GIEFING *et al.*, 2008).

Mnohé výzkumy se v současné době zaměřují na vývoj alternativní pneumokokové vakcíny, u které by byly eliminovány dosavadní nedostatky. Podrobné studie virulenních faktorů *S. pneumoniae* vedly k nalezení vhodných antigenů. Mezi nejpravděpodobnější účinné kandidáty patří: netoxický derivát pneumolyziny, povrchové lipoproteiny PsaA a PiaA, PcsB, protein důležitý pro dělení buněk u streptokoků skupiny B a StkP, serin/threoninová proteinkináza. Proteiny PcsB a StkP jsou vysoce konzervované u převážné většiny sérotypů *S. pneumoniae* (GIEFING *et al.*, 2008).

## 2.2 Buněčné dělení

Buněčné dělení je jedním ze základních biologických procesů, esenciálních pro vývoj a zachování všech živých organismů. Bakteriální buňka nacházející ve svém okolí vhodné chemické i fyzikální podmínky roste. Přijímá z okolí energii a živiny, a podle svého genetického programu, modulovaného aktuálními podmínkami prostředí, syntetizuje sama sebe, všechny komponenty svého těla, zvětšuje svoji hmotnost i svůj objem. Po dosažení jisté velikosti se příčně rozdělí na buňky dvě, ty opět rostou a celý cyklus se opakuje.

Buněčné dělení, následované po dělení jaderném, je zajištěno makromolekulárním komplexem, divizomem, obsahujícím řadu konzervovaných proteinů, které se skládají v přesně určeném pořadí do specifického místa dělení. Na konci tohoto procesu musí být vytvořeny dva nové buněčné póly, a také všechny buněčné obaly zahrnující cytoplazmatickou membránu, buněčnou stěnu, u gramnegativních bakterií i vnější membránu, popřípadě S vrstvu. Bylo zjištěno, že hlavní aktéři dělení si jsou velmi podobní napříč celou škálou bakteriální říše. Existuje však i řada dalších dělicích proteinů zajišťujících specifickou funkci nezbytnou jen pro úzkou skupinu bakterií.

Díky mnohým výzkumům a neustále se zlepšujícím technologiím byly definovány základní kroky bakteriálního buněčného dělení:

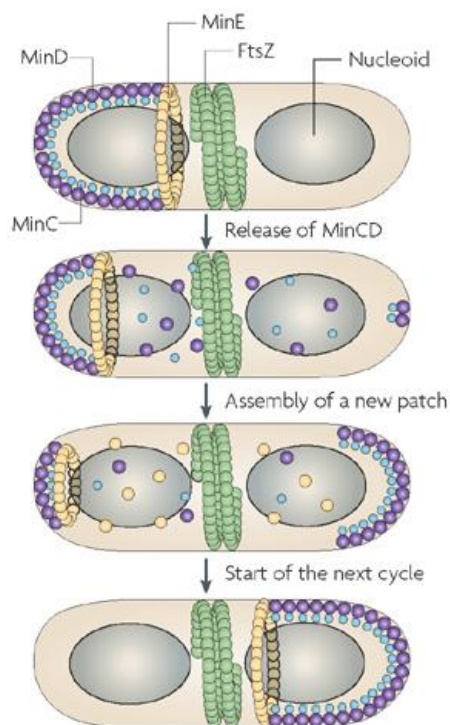
- (i) výběr dělicího místa,
- (ii) složení časného dělicího komplexu, ve kterém je téměř u všech bakterií přítomen tubulinový homolog FtsZ, a většinou i FtsA,
- (iii) interakce dělicího cytoplazmatického komplexu s membránou a dalšími buněčnými obaly,
- (iv) sestavení pozdního dělicího komplexu, který zajišťuje syntézu peptidoglykanu a uzavření dělicí přepážky.

Průběh buněčného dělení se liší mezi bakteriemi grampozitivními a gramnegativními. Zároveň byly pozorovány rozdíly mezi bakteriemi s odlišnou morfologií.

Syntéza buněčné stěny a správné načasování tvorby přepážky je komplexní děj, jehož narušení významně ovlivňuje životaschopnost bakterie. Na regulaci tohoto klíčového procesu se podílí jak jednotlivé složky dělicího komplexu, tak i speciální kontrolní proteiny, jako je metabolický senzor UgtP, proteázový komplex ClpXP a rovněž proteinkinázy, enzymy zajišťující přenos signálu z vnějšího prostředí do buňky.

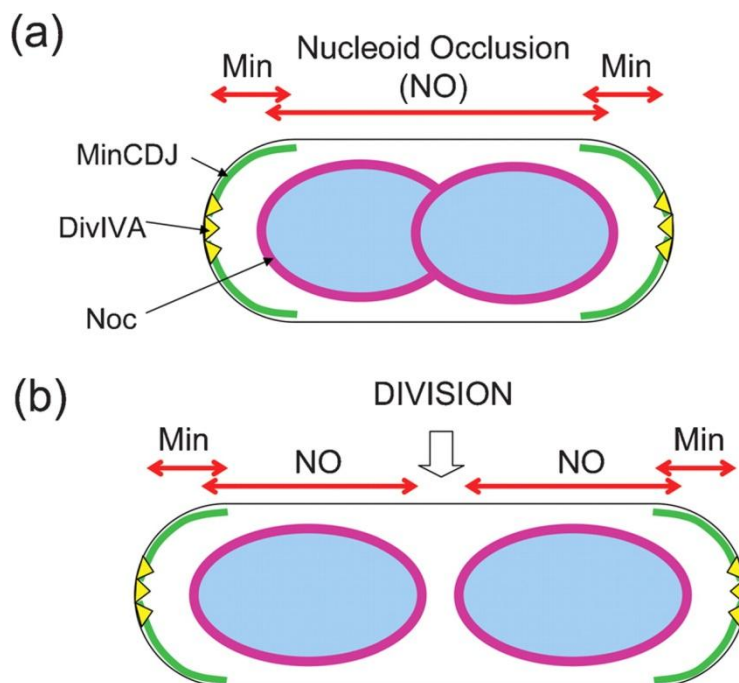
### 2.2.1 Výběr dělicího místa

Klíčovou událostí v iniciaci dělení je utvoření kontraktálního Z-kruhu, složeného především z cytoskeletálního proteinu FtsZ (LUTKENHAUS & ADDINALL, 1997). Správné načasování a výběr dělicího místa je regulován několika faktory. Prvním faktorem je přítomnost chromozomu, který zabraňuje složení dělicího komplexu v daném místě. Tento efekt se nazývá chromozomální okluze (nucleoid occlusion) (MULDER & WOLDRINGH, 1989; WOLDRINGH *et al.*, 1990) (obr. 2-3; 2-4). Druhým důležitým faktorem je tzv. Min systém zodpovídající za specifickou blokádu nežádoucího potenciálního dělicího místa na buněčných pólech (TEATHER *et al.*, 1974) (obr. 2-3, 2-4). Použitím mutantních buněk zbavených jádra a buněk s defektním Min systémem bylo dokázáno, že oba mechanismy jsou na sobě nezávislé (SUN & MARGOLIN, 1998; SUN & MARGOLIN, 2001). Ačkoliv žádný z těchto systémů není esenciální, jejich současná inaktivace je pro bakterii fatální v důsledku neschopnosti sestavit funkční Z-kruh (BERNHARDT & de BOER, 2004). Dlouhou dobu nebyl objeven žádný další regulační systém, který by se podílel na tvorbě dělicího komplexu zpravidla uprostřed buňky. Recentní studie ukazují, že časové a prostorově přesné umístění dělicího komplexu je ovlivněno i časnými stádii replikace chromozomální DNA (MORIYA *et al.*, 2010). Toto zjištění navíc podporuje fakt, že řada bakterií nekóduje Min proteiny, ani efekторы chromozomální okluze (MARGOLIN, 2001).



**Obr. 2-3: Výběr dělicího místa u *E. coli***

Převzato z Thanbichler & Shapiro, 2008. Popis v textu, kapitoly 2.2.1.1 a 2.2.1.2.



**Obr. 2-4: Výběr dělicího místa u *B. subtilis***

NO: chromozomální okluze; Min: Min systém

a) inhibice dělení; b) vytvoření správného dělicího místa uprostřed buňky

Převzato z Errington, 2010. Popis v textu, kapitoly 2.2.1.1 a 2.2.1.2.

### 2.2.1.1 Vliv chromozomální okluze a časných stádií replikace

Při pokusech s bakteriemi, u kterých byla poškozena DNA replikace, popřípadě segregace sesterských chromozomů, bylo pozorováno, že v blízkosti poškozených jader buněčné dělení neprobíhá (MULDER & WOLDRINGH, 1989). Ve zdravé, normálně se dělící, tyčinkovité bakterii existují v průběhu dělení tři místa, ve kterých DNA chybí nebo je její koncentrace silně redukována. Jedno místo leží uprostřed, mezi replikovanými a segregovanými chromozomy, zbylé dvě se nachází na buněčných pólech. Aby se bakterie mohla funkčně dělit, musí mít vyvinuté mechanismy pro rozpoznávání středového místa, které neobsahuje DNA. Středové místo se vyskytuje cyklicky, vždy jedenkrát za generační dobu bakterie, proto se předpokládá, že signály vedoucí k buněčnému dělení jsou nejen prostorové, ale i časové (MULDER & WOLDRINGH, 1989).

Ačkoliv se mechanismus chromozomální okluze studuje už více než dvacet let není stále jednoznačně vyřešen. Původní model je založen na představě, že poloha dělicího místa je závislá výhradně na umístění chromozomů. Jejich přítomnost inhibuje syntézu buněčné stěny v jejich těsné blízkosti (WOLDRINGH *et al.*, 1991). Novější model uvádí, že přítomnost chromozomů zabraňuje skládání Z-kruhu. Tento model se testoval u *E. coli* a *B. subtilis*. Použitím mutant s defektní organizací a segregací chromozomů (například *mukB* a *parC* mutant), bylo zjištěno, že může docházet k vytvoření Z-kruhu a rozdělení buněk i napříč chromozomem (COOK & ROTHFIELD, 1999; SUN & MARGOLIN, 1998). Vznikají tak buňky s nekompletní genetickou výbavou. Ve většině případů bylo toto poškození letální. K dělení ovšem docházelo v místech, kde koncentrace DNA byla nižší v porovnání se situací u divokého kmene dané bakterie (SUN & MARGOLIN, 1998; REGAMY *et al.*, 2000). Tato zjištění podpořila myšlenku, že rozhodující není přítomnost DNA samotné, ale její koncentrace (HARRY, 2001). S tím souvisí i skutečnost, že k formování Z-kruhu může docházet ještě před úplným dokončením segregace chromozomů (WU *et al.*, 1995). K formování Z-kruhu může docházet dokonce i před úplným dokončením replikace chromozomu. Stačí, aby bylo zreplikováno zhruba 40 % DNA a kulovitý chromozom se změnil na dvoulaločný (SHARPE *et al.*, 1998). Inhibiční efekt začíná mizet a v prostoru mezi velkými laloky se může formovat Z-kruh. Je vytvořen také model, ve kterém výběr dělicího místa podléhá mechanismu, který je nezávislý na pozici chromozomů (COOK & ROTHFIELD, 1999). Opírá se o skutečnost, že dělicí komplex se neskládá přesně uprostřed segregovaných chromozomů, a zároveň o již výše zmíněné poznatky o možném rozdělení buněk v místě, kde se nachází chromozom.

První efektor chromozomální okluze byl identifikován u *B. subtilis* a díky své úloze v chromozomální okluzi (Nucleoid Occlusion) byl nazván Noc (YyaA). Váže se ke specifické nukleotidové sekvenci 5'-ATTTCCCGGAAAT-3' (WU *et al.*, 2009). Tato sekvence se

vyskytuje rovnoměrně téměř po celém chromozomu (BRAMKAMP & van BAARLE, 2009). Pokusy s různými mutanty dokázaly, že Noc hraje klíčovou roli v ochraně před nežádoucím dělením skrz chromozom. Inhibuje zřejmě FtsZ akumulaci nebo polymeraci v blízkosti chromozomu. Přesný mechanismus je dosud nejasný. Jeho nadprodukce způsobuje částečnou inhibici dělení. Zvýšená koncentrace Noc se projeví navázáním většího množství jeho molekul na chromozom. Inhibiční efekt se tudíž rozšiřuje i do zóny, kde se při správné koncentraci proteinu Noc Z-kruh již může formovat. Aby došlo k dělení i při nadprodukcí tohoto regulačního proteinu, chromozomy se musí rozejít do větších vzdáleností od středu než za normální situace (TONTHAT *et al.*, 2011). Také se zjistilo, že jeho koncentrace v replikujícím se chromozomu je nejnižší ve středu chromozomu, což odpovídá skutečnosti, že Z-kruh se může formovat ještě před dokončením replikace (WU & ERRINGTON, 2003).

Dalším specifickým efektozem chromozomální okluze je protein *E. coli* SlmA (Synthetic Lethal with a defective Min systém) (BERNDHART & DE BOER, 2005). Stejně jako protein Noc patří i SlmA do skupiny DNA vazebných proteinů, přestože se liší v aminokyselinové sekvenci a každý z nich je členem jiné proteinové rodiny (CHO *et al.*, 2011). Zatímco Noc náleží do rodiny ParB proteinů, SlmA do rodiny transkripčních regulátorů TetR, pro něž je charakteristická dimerizace zprostředkovaná jejich C-koncovou doménou. SlmA se váže na DNA k palindromatickým sekvencím 5'-GTGATGTACTIONAC-3', neslouží ovšem jako regulátor na transkripční úrovni (TONTHAT *et al.*, 2011). Současně s DNA může SlmA vázat svojí C-koncovou doménou i hlavní dělicí protein FtsZ. Homodimer SlmA se včleňuje mezi dvě podjednotky FtsZ odlišných protofilament a vytváří tzv. sendvič FtsZ-SlmA-FtsZ. V tomto komplexu není inhibována vazba GTP na molekuly FtsZ, a tedy ani jejich polymerace, ale vytvořená protofilamenta se nemohou správně skládat a formovat klíčový Z-kruh (TONTHAT *et al.*, 2011). V případě, že bakteriální buňka není vystavena žádnému buněčnému stresu, nejsou oba proteiny, Noc i SlmA, pro bakterii esenciální. Pokud však dojde k narušení některých základních biologických procesů, jako například neúplnému rozchodu dceřiných chromozomů či nefunkčnímu Min systému, stávají se tyto proteiny nezbytným efektozem pro přežití (WU *et al.*, 2009).

Za přídatný mechanismus chromozomální okluze je považován vliv časných stádií replikace chromozomu. Je-li u delečních mutant *noc<sup>-</sup>* *B. subtilis* inhibován některý z iniciačních proteinů zahajujících replikaci DNA, zejména protein DnaB, je tvorba centrálního Z-kruhu značně omezena (MORIYA *et al.*, 2010). Předpokládá se, že na ochraně proti nežádoucímu „přeříznutí“ chromozomu se podílí další proteiny. Ty jsou buď redundantní k Noc proteinu, nebo membránově vázané a hromadí se v místě budoucího septa při poruchách

replikace chromozomu. Stéricky tak brání tvorbě funkčního dělicího komplexu (BERNHARDT *et al.*, 2010).

### 2.2.1.2 Min systém

Důležitým krokem pro poznání mechanismu zodpovědného za výběr dělicího místa ve středu buňky se stalo studium mutant produkujících tzv. minibuňky. Tyto mutanty se dělí s přibližně normální frekvencí, ale dělicí komplex je u nich mnohdy nesprávně umístěn na pólech buňky. Produkty tohoto dělení jsou malé, kulovité, obvykle bezjaderné buňky (ADLER *et al.*, 1967). Podle nich dostal tento regulační systém své jméno. Zdá se, že Min proteiny jsou přítomny v širokém spektru bakterií, a dokonce i v chloroplastech a mitochondriích některých eukaryot, což potvrzuje endosymbiotickou teorii vzniku těchto nezbytných organel (NAKANISHI *et al.*, 2009) Podrobně je Min systém studován u dvou tyčinkovitých bakterií, gramnegativní *E. coli* a grampozitivní *B. subtilis*, které používají odlišnou strategii působení Min systému (obr. 2-3; 2-4).

U *E. coli* obsahuje *min* lokus tři geny: *minC*, *minD* a *minE*. Proteiny MinCDE představují první objevený membránově vázaný cytoskeletální systém u bakterií (VATS *et al.*, 2010). Mutace v *minC*, *minD* nebo ve všech třech genech způsobují vznik buněk s typickým mini fenotypem, zatímco inaktivace *minE* má za následek vznik dlouhých, úzkých, nedělených buněk a náhodné rozmístění MinC a MinD uvnitř buňky (DE BOER *et al.*, 1989). Proteiny MinC a MinD fungují společně jako negativní regulátor formování Z-kruhu a buněčného dělení na pólech buňky, kde opisují šroubovitou trajektorii. Ačkoliv MinC a MinD působí *in vivo* jako heterodimer MinCD, potlačení polárního dělicího místa je specifickou funkcí MinC (DE BOER *et al.*; 1992, HU *et al.*, 1999). Bylo totiž zjištěno, že při nadprodukcí MinC u bakterie s deletovaným *minD* genem se dělicí přepážka nevytváří na pólech buňky, ale v jejím středu (DE BOER *et al.*, 1992). Zvýšená produkce MinCD zabraňuje tvorbě Z-kruhu ve středu buňky, naopak inhibiční funkce MinCD může být překonána zvýšenou koncentrací FtsZ (HU *et al.*, 1999).

MinC se skládá ze dvou zřetelných domén podobné velikosti spojených flexibilním řetízkem (CORDELL *et al.*, 2001). Obě domény mají vazebnou afinitu pro protein FtsZ a jsou potřebné pro správné fungování Min systému (ZHOU & LUTKENHAUS, 2005; SHIOMI & MARGOLIN, 2007). N-koncová doména (MinC<sup>N</sup>) interaguje s  $\alpha$  helixem H-10 FtsZ a nese hlavní regulační aktivitu MinC. Při zvýšené expresi MinC<sup>N</sup> dochází k blokaci buněčného dělení, dokonce i v delečních kmenech *minD*. Recentní studie dokazují, že MinC<sup>N</sup> neinhibuje GTPázovou aktivitu FtsZ, a neovlivňuje tedy jeho polymerizaci a sestavení protofilament z jednotlivých podjednotek. Inhibiční aktivita spočívá v narušení soudržnosti a uskupení



jednotlivých vláken do Z-kruhu (SHEN & LUTKENHAUS, 2010). Je zajímavé, že důsledkem interakce FtsZ a MinC<sup>N</sup> dochází ke zkracování FtsZ protofilament. Molekulární mechanismus však zůstává dosud neznámý (SHEN & LUTKENHAUS, 2011; DAJKOVIC *et al.*, 2008). Zatímco MinC<sup>N</sup> se váže pouze k molekulám FtsZ, C-koncová doména (MinC<sup>C</sup>) zprostředkovává dimerizaci MinC, a zároveň jeho vazbu k MinD (HU & LUTKENHAUS, 2000; CORDELL *et al.*, 2001). MinC<sup>C</sup> navíc kompetuje o vazebné místo na molekulách FtsZ s dalšími členy dělicího komplexu, proteiny FtsA a ZipA (SHEN & LUTKENHAUS, 2009). Jejich přítomnost je nutná pro stabilizaci Z-kruhu. Inhibiční aktivita MinC<sup>C</sup> je, na rozdíl od MinC<sup>N</sup>, aktivována vazbou na MinD, případně na profágový protein DicB (JOHNSON *et al.*, 2002).

Monomerní protein MinD je membránově-asociovaná ATPáza, přes kterou je MinC i MinE připojen k membráně (DE BOER *et al.*, 1991; RASKIN & DE BOER, 1997). Jak naznačuje krystalová struktura MinD typická pro rozsáhlou rodinu nukleotid vazebných proteinů, k MinC se váže právě blízko oblasti vázající nukleotid (HAYASHI *et al.*, 2001). MinD slouží jako motor při přebíhání komplexu MinCD z jedné strany buňky na druhou. Buněčná distribuce MinCD byla sledována pomocí fluorescenčně označeného MinC i MinD. Potvrdilo se očekávání, že jeho nejvyšší koncentrace se nachází na pólech a směrem ke středu se postupně snižuje (HU & LUTKENHAUS, 1999). Nezůstává ovšem stále na jednom místě, ale osciluje mezi póly s periodou okolo 10 – 30 s. Tato perioda i koncentrace komplexu MinCD se mění v závislosti na koncentraci proteinu MinE, na fázi buněčného cyklu i na přítomnosti specifických fosfolipidů. MinD-ATP se přednostně váže k záporně nabitým fosfolipidům, například ke kardiolipinu, který se nachází ve vyšší koncentraci v membráně na pólech a také ve středu buňky (SHIOMI & MARGOLIN, 2007). V průběhu oscilace se komplex vždy na určitou dobu zastavuje jak na buněčných pólech, tak i ve středu buňky. Se zvětšující se velikostí buňky a blížícím se dělením se pauzy uprostřed bakterie prodlužují. Komplex MinCD se tímto způsobem podílí na svém rovnoměrném rozložení do dceřiných buněk, na konstrikci Z-kruhu a posléze na rozpadu celého divizomu. V neposlední řadě tak brání v nově vytvořených buňkách reiniciaci dělení (JUAREZ & MARGOLIN, 2010; SHEN & LUTKENHAUS, 2011).

MinE je malý dimerní protein tvořený dvěma oddělenými doménami, N-koncovou anti-MinCD doménou a C-koncovou dimerizační doménou. C-koncová doména je také zodpovědná za rozpoznání potenciálního dělicího místa uprostřed buňky, a nikoliv na pólech (PICHOFF *et al.*, 1995). Pomocí fluorescenční mikroskopie bylo dokázáno, že se kumuluje blízko nebo přímo ve středu buňky a vytváří prstenec nezávislý na přítomnosti Z-kruhu, ale závislý na funkci MinD. Tento prstenec není pevně vázaný v jednom místě, ale v relativně

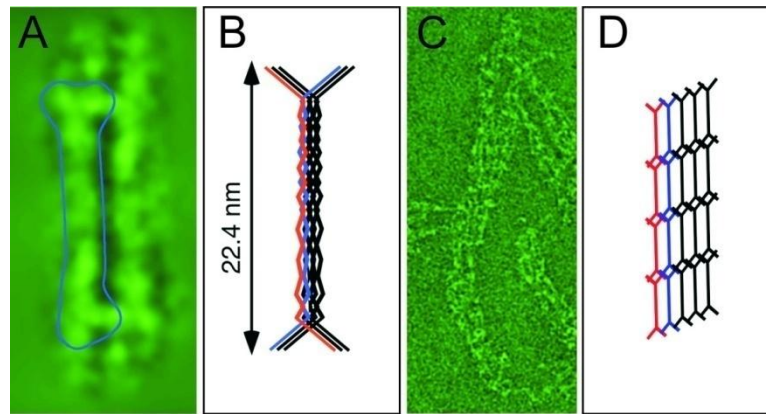
úzkém rozpětí osciluje a rozkládá se ještě před ukončením cytokineze. Působí jako antagonist MinCD a napomáhá výběru dělicího místa vyřazením MinCD ze středu buňky. Pokud je správný poměr MinD a MinE v buňce, inhibiční aktivita MinCD je omezena pouze na póly. Pokud je na MinD navázáno ATP, může MinCD komplex polymerovat na membráně od pólů směrem ke středu buňky. Když se MinCD dostane do kontaktu s MinE, dojde k hydrolyze ATP navázaného na MinD, depolymerizaci MinCD a uvolnění jednotlivých MinD do cytoplazmy. Po nukleotidové výměně navázaného ADP za ATP dojde opět k vazbě a polymerizaci MinCD na membráně na opačné straně buňky v místě, kde není přítomen MinE (HU & LUTKENHAUS, 2001) (obr. 2-3). Nedávné pokusy s delečními mutanty *minE* ukázaly, že afinita komplexu MinCD k proteinu FtsZ je odlišná v různých částech buňky. Polární Z-kruh je mnohem více senzitivní k inhibiční aktivitě MinCD než centrální Z-kruh, dokonce i v absenci MinE (SHEN & LUTKENHAUS, 2011).

Jednotlivé proteiny Min systému jsou v bakteriální říši rozšířeny velmi nerovnoměrně. Proteiny podobné MinD se vyskytují u mnoha druhů a jsou vysoce zakonzervovány. Například u *E. coli* a *B. subtilis* je aminokyselinové složení MinD ve 42 % identické. MinC proteiny se objevují stále hojně, ale jejich primární sekvence se už liší, u *E. coli* a *B. subtilis* se shoduje pouze ve 29 %. Rozšířenost a podobnost MinE proteinů je omezená ještě mnohem více. V *B. subtilis* se MinE vůbec nevyskytuje, ale aktivitu MinCD zde kontroluje protein DivIVA a nově objevený protein MinJ, který tvoří most mezi DivIVA a komplexem MinCD (PATRICK & KEARNS, 2008). DivIVA je asociován s buněčnými póly, prostřednictvím MinJ se váže k MinD, a tím udržuje inhibiční aktivitu MinCD mimo buněčný střed (obr. 2-4). Komplex DivIVA-MinJ-MinCD zůstává umístěn v pólech i po dokončení dělení. Tím předchází potenciálnímu budoucímu dělení v těchto místech (MARSTON *et al.*, 1998). Inhibice dělení na pólech buňky není jediná funkce komplexu DivIVA-MinJ-MinCD. Delece nebo inaktivace genu *yvjD* kódující protein MinJ způsobuje mj. poruchu v lokalizaci pozdních dělicích proteinů, PBP-2B a FtsL. Navíc v nepřítomnosti proteinů MinC, MinD nebo MinJ nedochází po proběhnutém dělení k destabilizaci dělicího komplexu. Proteiny FtsA, FtsL a PBP-2B zůstávají asociovány s nově vzniklými póly, kde mohou iniciovat nové, nežádoucí dělení. Tyto skutečnosti jasně naznačují, že Min systém hraje také důležitou roli v kompozici a dekompozici dělicího makrokomplexu, divizomu (van BAARLE & BRAMKAMP, 2010).

Výběr dělicího místa u jednotlivých bakterií má své specifické vlastnosti. Například některé grampozitivní koky Min systém zcela postrádají, nebo naopak u rodu *Clostridium* jsou přítomny oba proteiny, MinE i DivIVA.

## ***DivIVA***

Jak již bylo zmíněno výše, jedná se o důležitý regulační protein vysoce konzervovaný u grampozitivních bakterií. Představuje klíčového hráče nejen v prostorové kontrole buněčného dělení, ale i v mnohých dalších biologických procesech. Poprvé byl objeven a popsán u modelové bakterie *B. subtilis* (CHA & STEWART, 1997). DivIVA *B. subtilis* (DivIVA<sub>BS</sub>) je malý protein o velikosti 19,5 kDa složený ze 164 aminokyselin. Částečnou sekvenční homologií připomíná eukaryotní protein tropomyosin (EDWARDS *et al.*, 2000). V jeho sekundární struktuře byly predikovány  $\alpha$ -helikální, šroubovitě (coiled-coil) domény zodpovídající za schopnost DivIVA<sub>BS</sub> tvořit oligomery. Pokusy s purifikovanou biologicky aktivní variantou DivIVA9 dokázaly, že vytváří komplexy složené z 6 – 8 proteinových kopií. Transmisní elektronovou mikroskopií bylo zjištěno, že jednotlivé oligomery dlouhé 22,4 nm a široké 2,9 nm mají rozšířené konce a svým tvarem připomínají „psí kost“ (obr. 2-5). Konce oligomerů mohou vzájemně interagovat a formovat rozsáhlou dvourozměrnou síť, která pravděpodobně významně ovlivňuje aktivitu proteinu (STAHLBERG *et al.*, 2004). DivIVA<sub>BS</sub> pravděpodobně funguje jako tzv. lešení pro další proteiny, čímž je lokalizuje do středu buňky a/ nebo na buněčné póly. Interakcí s komplexem MinCD prostřednictvím MinJ chrání bakterii před asymetrickým dělením. Jakmile je utvořen centrální Z-kruh spolu se stabilizačním proteinem FtsW, DivIVA<sub>BS</sub> putuje z pólů do místa dělicí přepážky, kde zůstává během konstriktce i po ní (PERRY & EDWARDS, 2004). V průběhu sporulace hladina komplexu MinCD výrazně klesá. DivIVA<sub>BS</sub> není lokalizován v septu, ale zůstává na pólech buňky. Zde interaguje s DNA vazebným proteinem RacA, který je zodpovědný za uchycení chromozomu v budoucí spoře (BEN-JEHUDA *et al.*, 2003). V případě, že RacA není funkční, klesá účinnost sporulace na 50 %, přestože má *B. subtilis* vyvinutý další systém pro zachycení chromozomu v prespoře. Tento sekundární mechanismus je stejně jako předešlý závislý na DivIVA<sub>BS</sub>, který zajišťuje vazbu Spo0J a Soj, funkčních analogů RacA (WU & ERRINGTON, 2003). DivIVA<sub>BS</sub> není pro bakterii esenciální, ale jeho inaktivace vede k produkci aberantních, bezjaderných mini buněk a naopak jeho nadprodukce způsobuje tvorbu dlouhých vláken.



### Obr. 2-5: Oligomerizace DivIVA

a) purifikované oligomery DivIVA; b) model oligomeru složeného ze šesti molekul DivIVA; c) dvourozměrná síť tvořená komplexy DivIVA; d) model dvourozměrné sítě složené z hexamerů DivIVA  
Převzato z Zweers *et al.*, 2008.

Stále aktuálním tématem je molekulární mechanismus zodpovědný za cílenou lokalizaci DivIVA do dělicího septa a na buněčné póly. Deleční analýzy dokázaly, že zanoření proteinu do membrány je funkcí N-koncové domény, která obsahuje amfipatický  $\alpha$ -helix a úsek 20 hydrofobních aminokyselin (LENARCIC *et al.*, 2009). Zatímco N-koncová doména je konzervovaná u homologních proteinů DivIVA většiny grampozitivních bakterií, C-konec je mnohem více variabilní jak do velikosti, tak do aminokyselinové sekvence. V nedávné době byl vytvořen model krystalové struktury N-koncové domény DivIVA<sub>BS</sub>. Ukázalo se, že skutečně formuje šroubovice ohraničené smyčkami, které obsahují hydrofobní a pozitivně nabitě aminokyselinové zbytky. Je patrné, že elektrostatické interakce jsou rozhodující pro integraci DivIVA do membrány. Pozitivně nabitě aminokyseliny kompenzují silný negativní náboj na povrchu lipidové dvojvrstvy (OLIVA *et al.*, 2010). Další studie identifikovaly fenylyalanin na pozici 17 a dva sousedící argininy na pozici 18 a 19 důležité pro polární cílení DivIVA<sub>BS</sub> (PERRY & EDWARDS, 2004). Proč se vyskytuje DivIVA právě na pólech a v dělicím septu je však dosud nejasné. Je možné, že DivIVA patří mezi proteiny, jejichž lokalizace je determinovaná negativním zakřivením membrány (LENARCIC *et al.*, 2009). Model C-terminální domény tvořící tetrametr připomíná srpovitou BAR doménu eukaryotických proteinů. Právě tyto domény rozpoznávají membránová zakřivení, která jsou přímým podnětem pro lokalizaci proteinu (OLIVA *et al.*, 2010). V *B. subtilis* byl v nedávné době objeven malý membránový protein SpoVM, který se účastní tvorby sporového obalu. Jedná se o příklad bakteriálního proteinu, který rozeznává konvexní stranu membrány, kde je také lokalizován (RAMAMURTHI & LOSICK, 2009). DivIVA oproti tomu preferuje stranu konkávní.

Proteiny homologní k DivIVA jsou rozšířené u grampozitivních streptokoků, stafylokoků, streptomycét, mykobakterií a korynebakterií. Byl objeven i u fylogeneticky zcela odlišných druhů, jako například u *Deinococcus radiodurans*, cyanobakterií, a dokonce i u gramnegativní půdní bakterie *Myxococcus xanthus* (AKIYMA *et al.*, 2003, FADDA *et al.*, 2007).

*Streptococcus pneumoniae*, stejně jako *Staphylococcus aureus*, postrádá Min systém, a nepatří ani mezi bakterie schopné sporulovat. Přesto kóduje protein DivIVA<sub>SPN</sub> o velikosti 30,2 kDa. Gen *divIVA* se nachází na chromozomu v oblasti tzv. *dcw* klastru (division and cell wall) (FADDA *et al.*, 2003). Proteiny kódované touto chromozomální oblastí se uplatňují v buněčném dělení a stavbě buněčné stěny. DivIVA<sub>SPN</sub> je lokalizován na pólech buňky a v buněčném septu, kam putuje zhruba po 5 minutách po utvoření Z-kruhu. Interaguje s mnohými dalšími dělicími proteiny, dále s esenciální pneumokokovou hydrolázou PcsB a dělicím proteinem LytB. Deleční analýzou bylo zjištěno, že se podílí na kontrole buněčné morfologie, uspořádání buněčné přepážky a dělení buňky včetně segregace chromozomu (FADDA *et al.*, 2007). DivIVA<sub>SPN</sub> byl identifikován jako jeden ze substrátů serin/threoninové proteinkinázy StkP *S. pneumoniae* (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010).

Homologní DivIVA<sub>SC</sub> u vláknité půdní bakterie *Streptomyces coelicolor* je multifunkční protein, který zodpovídá za syntézu peptidoglykanu, buněčnou morfologii, apikální růst a zakládání nových větví (HEMPEL *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009). Obdobné funkce mají i proteiny Wag31 a antigen 84, analogy DivIVA u *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium smegmatis* (KANG *et al.*, 2008), stejně jako DivIVA<sub>CG</sub> u *Corynebacterium glutamicum* a *Brevibacterium glutamicum*. Ačkoliv DivIVA<sub>SC</sub> *S. coelicolor* může komplementovat mutaci genu *divIVA* u *Corynebacterium glutamicum*, existují rozdíly v syntéze buněčné stěny u obou bakterií. U *S. coelicolor* jsou zóny růstu buněčné stěny zakládány *de novo* tvorbou nových postranních hyf. Větvení předchází akumulace DivIVA do tzv. ložisek podél stěn. U *C. glutamicum* nastává růst buněčné stěny na pólech. Za apikální růst je zodpovědný DivIVA<sub>CG</sub>. Při dosažení kritické velikosti dochází k iniciaci dělení ve středu buňky (KANG *et al.*, 2008; LETEK *et al.*, 2009).

Je zajímavé, že u některých druhů je protein DivIVA esenciální (např. *Enterococcus faecalis*), zatímco u jiných (např. *Staphylococcus aureus*) nevede jeho inaktivace k žádným fenotypovým projevům (RAMIREZ-ARCOS *et al.*, 2005, PINHO *et al.*, 2004).

## 2.3 Z-kruh – jeho tvorba, stabilizace a destabilizace

### 2.3.1 FtsZ polymerace a dynamické vlastnosti Z-kruhu

Protein FtsZ je klíčová složka dělicího komplexu přítomná u všech eubakterií, většiny archaebakterií, a dokonce i v organelách mnohých eukaryot (MARGOLIN, 2005). Patří do rozsáhlé *fts* rodiny, která dostala svůj název podle společného fenotypu jejich mutant charakterizovaného teplotně senzitivním vláknitým růstem (Filamentous Temperature-Sensitive growth). Stojí na vrcholu pomyslné pyramidy vytvářející dělicí místo. Formuje tzv. Z-kruh nezbytný pro cílení dalších dělicích proteinů do vznikajícího místa dělení (LUTKENHAUS & ADDINALL, 1997).

Jedná se o první objevený prokaryotní cytoskeletální protein. Na základě omezené, ale přesvědčivé sekvenční podobnosti a schopnosti vázat a hydrolyzovat GTP představuje homolog tubulinu (DE BOER *et al.*, 1992). V N-koncové doméně obsahuje tzv. G-box, pro tubulin příznačný motiv GGGTGS/TG (NOGALES *et al.*, 1998). Oba proteiny mají podobnou velikost okolo 40–50 kDa. Z-krytalové struktury FtsZ a  $\alpha\beta$  tubulinu je patrné, že mají téměř shodné sekundární a terciární uspořádání (LOWE & AMOS, 1999). Recentní biochemické výzkumy také ukazují, že nejsou pouze strukturními homology, ale sdílí také některé funkční vlastnosti. Stejně jako tubulin, vytváří FtsZ protofilamenta, z kterých může formovat tubuly, jež mají sice menší průměr (zhruba 14-20 nm) oproti eukaryotickým mikrotubulům, ale většinou se skládají ze shodného počtu protofilament (12-13) (BRAMHILL & THOMPSON, 1994). FtsZ může vytvářet i další typy polymerů, například dvourozměrné listy tvořené rovnými vlákny vytvářející síť podobnou mikrotubulové mříži nebo malé prstence s polovičním průměrem (zhruba 23 nm) oproti prstencům z tubulinu. *In vitro* se zakřivená FtsZ protofilamenta skládají do šroubovitého útvaru (LU *et al.*, 2000).

Bylo zjištěno, že tubulinu je podobný i mechanismus hydrolyzy GTP. Hydrolyzy GTP se účastní tzv. T7 smyčka molekuly FtsZ. T7 smyčka váže manganaté a hořečnaté kationty a vkládá se do nukleotid-vazebného místa další podjednotky. FtsZ je tedy samostatně se aktivující GTPáza. GTPázová aktivita je ovšem závislá na FtsZ polymeraci (ADAMS & ERRINGTON, 2009). GTP hydrolyza významně ovlivňuje rozložení a dynamický charakter již mnohokrát zmíněné klíčové struktury v dělicí se bakterii, Z-kruhu. Hydrolyzovaný fosfát není ihned po reakci odštěpen. Právě uvolnění hydrolyzovaného fosfátu hraje důležitou roli v dynamice polymeru. Stabilitu polymeru udává GTP čepička přítomná na jednom konci FtsZ polymeru.

Předmětem mnohých studií je architektura Z-kruhu, která není dosud jednoznačně objasněna. Pomocí elektronové mikroskopie se zjistilo, že se nejedná o kontinuální kruh, ale o

velký počet krátkých, překrývajících se protofilament (LI *et al.*, 2007). Během sestavování Z-kruhu *in vitro* dochází ke dvěma výrazným přeměnám závislým na koncentraci FtsZ molekul. Při kritické koncentraci 0,5 – 1  $\mu\text{M}$  dochází k iniciačnímu kroku, skládání jednovláknových protofilament. Při 3  $\mu\text{M}$  koncentraci vznikají laterální interakce mezi protofilamenty a vzniká vysoce uspořádaná makromolekulární struktura (DAJKOVIC *et al.*, 2008). Koncentrace FtsZ molekul *in vivo* značně převyšuje kritickou koncentraci potřebnou pro tvorbu vysokomolekulárních struktur. Z-kruh se může *in vivo* velmi rychle tvořit, ale i rozkládat. Jeho složení trvá přibližně od 1 do 3 minut, rozklad pouhou minutu (ADDINAL *et al.*, 1996). Polymerace je závislá na schopnosti FtsZ molekul vázat GTP, nikoliv na hydrolytické aktivitě (MUKHERJEE & LUTKENHAUS, 1994). Použitím metody FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) se také ukázalo, že zhruba jen 30 % buněčného FtsZ tvoří Z-kruh a jednotlivé molekuly FtsZ se snadno vymění za molekuly přítomné v cytoplazmě. Rychlost výměny proteinových podjednotek v Z-kruhu se shoduje s rychlostí hydrolyzy GTP (STRICKER *et al.*, 2002).

Stejně jako architektura Z-kruhu je intenzivně zkoumán i mechanismus jeho stažení. Pokusy s *ftsZ26* mutanty *E. coli*, které tvoří šroubovité Z-kruh a dělicí přepážku a s *rodA* mutanty, které vykazují růst podobný kulovitým bakteriím místo tyčinkovitým, se zjistilo, že pro stažení Z-kruhu není nutné jeho úplné uzavření. Všechny modely vyžadují kotvu spojující FtsZ s membránou. Kromě FtsZ jsou nezbytné ještě další dělicí proteiny. V prvním modelu kloužou krátká vlákna vzájemně jedno po druhém za pomoci motorového, doposud neidentifikovaného proteinu. Přitom se zmenšuje obvod kruhu. V dalším modelu dochází k depolymerizaci FtsZ vláken v místě kotvy, která ovšem musí zůstat neobjasněným mechanismem připevněná ke konci vlákna. Tento model je podpořen skutečností, že při nadprodukcí FtsZ je inhibováno stažení Z-kruhu, zvýšená koncentrace totiž potlačuje depolymerizaci. Třetí model je založen na představě, že při hydrolyze GTP na GDP nebo při odštěpení  $P_i$  dojde ke změně konformace a FtsZ vlákna se více ohýbají (LU *et al.*, 2000). Poslední popsany model je v dnešní době preferován. Jednak proto, že doposud nebyly objeveny molekulární motory, které by se podílely na stažení Z-kruhu a tento model využívá ke konstrikci pouze předpokládanou sílu generovanou přeměnou rovných GTP vazebných polymerů na zakřivené GDP vazebné polymery (LI *et al.*, 2007). Obě morfologické podoby FtsZ polymerů byly mnohokrát pozorovány *in vivo* i *in vitro* (OSAWA *et al.*, 2008; LAN *et al.*, 2009). Tento model podporuje i matematická analýza a skutečnost, že i přes jinak významnou podobnost C-koncové domény FtsZ a tubulinu se liší v sekvenci zodpovědné za interakci s motorovými proteiny, která u FtsZ zcela chybí (NOGALES *et al.*, 1998). Místo

toho obsahuje unikátní, vysoce konzervovaný peptid (9 AK), který je postradatelný pro polymeraci FtsZ, ale esenciální pro buněčné dělení.

Ač stále zůstává mnoho nevyřešených otázek kolem FtsZ a utváření Z-kruhu, je jisté, že se jedná o vhodný potencionální cíl antimikrobiálních látek. Hledání a vývoj nových léků se zaměřuje na inhibici polymerace FtsZ a GTPázové aktivity. Slibným místem účinku léčiv se jeví také laterální interakce mezi jednotlivými protofilamenty i interakce s dalšími dělicími proteiny a sestavení makromolekulárního komplexu. V nedávné době byla připravena nová antibakteriální sloučenina OTBA (kyselina 3-{5-[4-oxo-2-thioxo-3-(3-trifluormethylfenyl)-thiazolidin-5-ylidenemethyl]-furan-2-yl}benzoová) bránící GTP hydrolyze, a tedy destabilizaci protofilament (DASGUPTA, 2009). Účinný, pro hostitelské buňky netoxický, je i nový přípravek proti FtsZ *Mycobacterium tuberculosis*. Jedná se o trisubstituované benzimidazoly, které inhibují FtsZ polymeraci a formování vysokomolekulárních struktur (KUMAR *et al.*, 2011).

### 2.3.2 Membránová kotva

Všechny modely stažení Z-kruhu vyžadují pevnou vazbu kruhu na membránu. Membránová kotva je také požadovaná pro sladění membránové invaginace se syntézou peptidoglykanu tvořícího dělicí přepážku.

Proteiny tvořící membránovou kotvu nejsou ještě zcela známy. Předpokládá se, že patří do rozsáhlé rodiny penicilin vazebných proteinů, tzv. PBPs (Penicillin Binding Proteins) nebo proteinů stabilizujících PBP komplex v dělicím septu. Hlavním kandidátem je protein ZipA, podrobně studovaný u *E. coli* a protein FtsA, konzervovaný v celé bakteriální říši.

#### 2.3.2.1 ZipA

ZipA (Z Interacting Protein A) je membránový protein s molekulovou hmotností 36,3 kDa složený ze třech domén: transmembránové kotvy s neobvyklou topologií, dlouhého flexibilního ramene bohatého na aminokyseliny prolin a glutamin a z rozsáhlé globulární cytoplazmatické domény. Pomocí strukturálních studií C-koncové domény bylo zjištěno, že sestává z šesti antiparalelních  $\beta$ -listů a tří helixů a připomíná doménu mnoha RNA vazebných proteinů (MOSYAK *et al.*, 2000). Ačkoliv je ZipA pro dělení některých bakterií nepostradatelný, jeho primární sekvence je velmi málo konzervována. Doposud byl objeven pouze u Gammaproteobakterií (ADAMS & ERRINGTON, 2009). Obdobnou vzácnou topologií nese protein EzrA identifikovaný u *B. subtilis* (LEVIN *et al.*, 1999). Tyto proteiny mají zcela odlišné role v buněčném dělení, proto zůstává stále nejasná důležitost této společně sdílené membránové topologie.



ZipA je rovnoměrně rozmístěn ve vnitřní membráně bakteriální buňky. V iniciačním stádiu buněčného dělení se protein kumuluje v místě tvořícího se Z-kruhu. C-koncová doména ZipA zahrnuje rozsáhlou oblast (143 AK), kterou se přímo váže ke krátkému úseku (20 AK) na C-konci FtsZ. Pro své umístění nevyžaduje kromě FtsZ žádný další protein (HALE & DE BOER, 1999), ale přítomnost ZipA je nezbytná pro cílení dalších dělicích efektorů, počínaje proteinem FtsK. Vazba FtsZ fragmentu k aminokyselinovým zbytkům ZipA je zprostředkována především hydrofobními interakcemi, a dále pak dvěma vodíkovými vazbami a je odpovědná za zvýšené spojování FtsZ protofilament do svazků. Ukazuje se, že tyto svazky jsou důležité pro formování makroskopického Z-kruhu. Polymery FtsZ jsou v přítomnosti ZipA stabilizovány podobně jako v přítomnosti dvojmocných kationtů (MUKHERJEE & LUTKENHAUS, 1999).

Dále bylo zjištěno, že v přítomnosti obou či pouze jednoho z proteinů FtsA i ZipA se Z-kruh formuje. V případě absence obou se netvoří. Svědčí to o určité redundanci těchto proteinů, zejména při kotvení Z-kruhu na membránu. Pro úspěšnou konstrikci jsou ovšem nezbytné oba. Zvýšená exprese genu *zipA* ovšem buněčné dělení ruší (HALE & DE BOER, 1999).

Celkové množství ZipA v *E. coli* je 10-100krát menší než množství FtsZ. Pouze 30 % z celkového počtu ZipA je umístěno na Z-kruhu. Metodou FRAP bylo dokázáno podobné dynamické chování jako u FtsZ (STRICKER *et al.*, 2002).

#### 2.3.2.2 FtsA

FtsA (40,2 kDa) je další dobře popsáný dělicí protein nacházející se u široké škály bakterií v operonu *dcw* (Division Cell Wall) spolu s genem kódujícím FtsZ. Jedná se o esenciální komponentu časného dělicího komplexu. Doposud bylo zjištěno, že je postradatelný pouze u *B. subtilis*, ačkoliv nepřítomnost FtsA způsobuje filamentaci bakteriálních buněk v důsledku nižší frekvence formování Z-kruhu (ISHIKAWA *et al.*, 2006). Na základě jeho primární sekvence byl zařazen do rozsáhlé rodiny aktinových proteinů, kam patří nejen aktin, ale i Hsc70 (heat-shock cognate protein), hexokinázy či glycerolkinázy. Nedávno objasněná krystalová struktura FtsA z *Thermotoga maritima* potvrzuje zřetelnou podobnost s aktinem, tj. přítomnost dvou  $\alpha/\beta$  domén se společným jádrem a interdoménovou štěrbinou chránící nukleotid vazebné místo. V této oblasti se také váží hořčnaté ionty (VAN DEN ENT & LÖWE, 2000).

FtsA není pozorován u všech bakterií a molekulární sekvence se do určité míry u jednotlivých druhů liší. Odlišná je i schopnost rozpoznávat různé nukleotid fosfáty. FtsA většiny studovaných bakteriálních druhů váže pouze ATP. Experimenty s purifikovaným FtsA

*Streptococcus pneumoniae* (FtsA<sub>SPN</sub>) dokázaly, že může vázat nejen ATP, ale i GTP a se sestupnou afinitou i ADP, GDP, AMP a GMP (LARA *et al.*, 2005). FtsA funguje jako lešení pro další proteiny v místě dělení a stabilizátor Z-kruhu. Jeho C-konec obsahuje vysoce konzervovaný membránový amfipatický helix, který je od jádra proteinu oddělen flexibilním linkrem. Předpokládá se, že prostřednictvím tohoto helixu se FtsA spolupodílí na ukotvení Z-kruhu k membráně. Amfipatický helix je za normálních laboratorních podmínek esenciální pro funkci FtsA (PICHOFF & LUTKENHAUS, 2005). Nedávno bylo prokázáno, že polymerizuje a vytváří aktinu podobná dlouhá vlákna (LARA *et al.*, 2005). U *B. subtilis* dochází k jeho dimerizaci, vazbě a hydrolýze ATP. Energie z hydrolýzy ATP může být použita nejen k řízení a kompletování proteinů v dělicím místě, ale eventuálně napomáhá i buněčné konstrikci. Zajímavé je, že tento dělicí protein je u *E. coli* a *S. pneumoniae* fosforylován, zatímco u *B. subtilis* ne (FEUCHT *et al.*, 2001; SUN *et al.*, 2008).

Pomocí kvasinkové dvouhybridní analýzy a fluorescenční mikroskopie se zjistilo, že se FtsA hromadí a kompletuje na Z-kruhu v době jeho vzniku. Pro správné zacílení vyžaduje pouze FtsZ, na jehož kyselý, vysoce konzervovaný C-konec se váže spolu s dalším dělicím proteinem ZipA. Delece *ftsA* genu u *B. subtilis* vede k poškození dělení a poruchám sporulace. Pro úspěšné dělení je potřeba správného intracelulárního poměru FtsA vůči FtsZ (DEWAR *et al.*, 1992). U *E. coli* je průměrný počet FtsA a FtsZ molekul na buňku zhruba 50-200 a 5000-20000, správný poměr se tedy blíží hodnotě 1:100, oproti *B. subtilis* a *S. pneumoniae*, kde je množství FtsA mnohem vyšší a potřebný poměr je 1:5, u pneumokoka dokonce 1:1,5. Vyšší množství FtsA u *B. subtilis* a *S. pneumoniae* může kompenzovat nepřítomnost FtsA homologu ZipA. Je také možné, že na dělení grampozitivních bakterií, které mají silnější peptidoglykanovou vrstvu a větší vnitřní osmotický tlak, je potřeba hydrolyzovat více ATP. Nadprodukce buď FtsA, nebo FtsZ vede k inhibici dělení, které může být potlačeno vzrůstající hladinou ostatních dělicích proteinů (FEUCHT *et al.*, 2001).

### 2.3.3 Proteiny stabilizující Z-kruh

Regulace stability Z-kruhu je nezbytným předpokladem pro úspěšné dokončení bakteriálního dělení. Byla identifikována řada proteinů, které podporují tvorbu Z-kruhu ve středu buňky. Tyto enzymy interagují buď přímo, nebo nepřímo s klíčovým proteinem FtsZ a pozitivně ovlivňují jeho polymeraci či upevňují vazby mezi jednotlivými FtsZ protofilamenty.

Mezi stabilizátory patří proteiny ZapA, ZapB, ZapC a SepF. Ačkoliv nejsou esenciální pro tvorbu Z-kruhu, jejich absence způsobuje poruchy tvorby dělicí přepážky a změněné načasování konstrikce Z-kruhu. Na pozadí dalších mutací může vést poškození jednoho z těchto modulátorů i k fatálnímu fenotypu.

### 2.3.3.1 ZapA

ZapA je malý protein identifikovaný jako antagonist komplexu MinCD u širokého spektra bakteriálních druhů. Podrobněji byl studován u dvou modelových bakterií – *E. coli* a *B. subtilis*. U obou těchto organismů je lokalizován do dělicího komplexu v rané fázi jeho vzniku. Díky přímé interakci s FtsZ napomáhá s komplementováním divizomu a zvyšuje zesíťování protofilament uvnitř Z-kruhu (GUEIROS-FILHO & LOSICK, 2002; DAJKOVIC *et al.*, 2010). ZapA nepatří mezi esenciální regulátory, ačkoliv jeho nepřítomnost na pozadí jiných mutací (např. buňky s nepřírodně nízkou hladinou FtsZ nebo delecí genu *ezrA* může mít i letální následky (HAMOEN *et al.*, 2006). Naopak, je-li nadprodukován, může kompenzovat nadprodukcí proteinu MinD u *B. subtilis* (GUEIROS-FILHO & LOSICK, 2002). Přítomnost ZapA homologních proteinů byla nedávno objevena i v mitochondriálních dělicích komplexech (YOSHIDA *et al.*, 2009)

Krystalová struktura odhalila, že monomer ZapA se skládá z C-koncové domény obsahující šroubovité („coiled-coil“) domény a z malé globulární N-koncové domény. Monomery vytváří prostřednictvím šroubovitých úseků C-koncové domény paralelní dimery. Dva dimery se ještě dále spojují a formují antiparalelní tetramer. Oligomerizace je omezena koncentrací molekul ZapA. V buňce se protein vyskytuje buď jako dimer nebo tetramer (LOW *et al.*, 2004). Vysokomolekulární uspořádané struktury tvořené proteinem ZapA dosud nebyly pozorovány.

Existují dva modely popisující mechanismus působení ZapA. První předpokládá, že se ZapA váže na FtsZ poblíž nukleotid vazebného místa. GTP se díky změně konformace FtsZ způsobené vazbou proteinu ZapA stává méně přístupný pro hydrolyzu. FtsZ polymery jsou tímto způsobem stabilizovány (SMALL *et al.*, 2007). Druhý model operuje s multimerní povahou proteinu. Tetramer ZapA se váže současně na několik FtsZ protofilament a zesiluje laterální interakce mezi těmito svazky (LOW *et al.*, 2004). Oba modely jsou předmětem současných výzkumů, jisté je, že se protein ZapA podílí na lokalizaci dalšího stabilizačního proteinu ZapB.

### 2.3.3.2 ZapB

ZapB představuje další časný dělicí faktor, který podporuje tvorbu Z-kruhu a následný proces dělení. Jedná se o malý, neesenciální protein (81 AK) o velikosti 9,5 kDa obsahující šroubovité („coiled-coil“) domény, díky nimž vytváří oligomery. Zatím byl objeven pouze u některých Gammaproteobakterií, poprvé u *E. coli* (EBERSBACH *et al.*, 2008).

ZapB je přítomen v dělicím septu brzy po vytvoření Z-kruhu a zůstává zde po celou dobu zrání dělicího komplexu i během konstrikce. Jeho lokalizace je umožněna interakcí

s proteinem ZapA (GALLI & GERDES, 2010). Deleční mutanty *zapB*<sup>-</sup> jsou sice životaschopné, ale v důsledku neschopnosti se úspěšně rozdělit vytváří dlouhé buňky. Z-kruh se vytváří s nižší frekvencí a navíc má pozměněnou morfologii (ADAMS & ERRINGTON, 2009).

Stejně jako u proteinu ZapA i u ZapB zůstává mechanismus působení dosud neobjasněný. Předpokládá se, že ZapB tvoří krátká filamenta uvnitř Z-kruhu a propojuje jednotlivé ZapA tetramery. Prostřednictvím těchto tetramerů se podílí na zesílení tvorby svazků z jednotlivých FtsZ protofilament. Pokusy s mutantními kmeny *zapA*<sup>-</sup> podporují možnost, že protein ZapB může stimulovat správné uspořádání Z-kruhu i mechanismem nezávislým na proteinu ZapA (GALLI & GERDES, 2010).

#### 2.3.3.3 ZapC

V současné době byl nezávisle na sobě dvěma skupinami identifikován nový člen dělicí aparatury u *E. coli*, ZapC (Z-associated protein C, YcbW) (HALE *et al.*, 2011; DURAND-HEREDIA *et al.*, 2011). Spolu s proteiny FtsA, ZipA a ZapA přímo interaguje s klíčovým dělicím hráčem FtsZ již v časně fázi vzniku Z-kruhu. Předpokládá se, že je rozšířen mezi Gammaproteobakteriemi.

Ačkoliv se nejedná o esenciální protein, jeho nedostatek nebo naopak nadbytek může způsobit mírné prodloužení bakteriální buňky a poruchu morfologie Z-kruhu. Inaktivace ZapC navíc výrazně zhoršuje průběh dělení u kmenů s další delecí jednoho nebo více genů pro FtsA, ZipA, ZapA či ZapB. Bylo zjištěno, že se významně podílí na svazování FtsZ polymerů uprostřed bakterie a správné tvorbě Z-kruhu. Stabilitu Z-kruhu ovlivňuje i potlačením GTPázové aktivity FtsZ. Zdá se, že Zap proteiny mohou být částečně redundantní, přestože se jejich sekvence zcela liší (HALE *et al.*, 2011; DURAND-HEREDIA *et al.*, 2011).

#### 2.3.3.4 SepF

SepF (Septum Forming) představuje další komponentu dělicího komplexu požadovanou pro bezchybnou tvorbu středového dělicího septa. Poprvé byl objeven a studován u *B. subtilis* jako produkt genu *ylmF* (ISHIKAWA *et al.*, 2006).

*In vivo* interaguje s proteinem FtsZ a rovněž sám se sebou. Jeho lokalizace do Z-kruhu závisí pouze na přítomnosti FtsZ. Delece nebo inaktivace genu *ylmF* neohrožuje životaschopnost *B. subtilis*, ale vytvořená dělicí přepážka je abnormálně tenká. Rovněž může docházet k separaci buněk ještě před dokončením kompletace divizomu, což podporuje hypotézu, že se protein SepF podílí na konstrikci Z-kruhu (HAMOEN *et al.*, 2006). Při studiu fenotypového projevu dvojitých mutant *sepF*<sup>-</sup> *ftsA*<sup>-</sup> se zjistilo, že tyto proteiny jsou částečně redundantní. Nadprodukce jednoho může komplementovat absenci druhého. Současná mutace

obou genů vede k jednoznačné zástavě dělení (ISHIKAWA *et al.*, 2006). *In vitro* SepF snižuje kritickou koncentraci molekul FtsZ potřebnou pro tvorbu protofilament a složitějších struktur a napomáhá spojování jednotlivých FtsZ vláken do svazků. Navíc redukuje GTPázovou aktivitu FtsZ molekul, čímž se podílí na stabilitě FtsZ polymerů (SINGH *et al.*, 2008).

Zdá se, že se tento pozitivní regulátor vyskytuje u celé škály grampozitivních bakterií. U *S. pneumoniae* je gen kódující SepF součástí *ftsA* operonu a jeho absence způsobuje rozsáhlé morfologické změny včetně defektů dělicí přepážky (FADDA *et al.*, 2003). Homologní proteiny jsou přítomné i u cyanobakterií, pro které představují nezbytnou složku dělení a jejich absence má pro bakteriální buňku fatální následky (MIYAGISHIMA *et al.*, 2005).

### 2.3.4 Proteiny negativně ovlivňující stabilitu Z-kruhu

Součástí řádné funkce dělicího komplexu je i schopnost zastavit buněčné dělení v případě poškození replikace DNA, nesprávného rozchodu dceřiných chromozomů nebo defektů tvorby dělicího septa. Kromě Min systému se na složení nežádoucích Z-kruhů na pólech buňky podílí i proteiny destabilizující FtsZ polymery. Předmětem současných výzkumů je i role těchto enzymů během konstrikce divizomu.

Dosud byl identifikován protein Sula, který je exprimován při rozsáhlém poškození DNA či EzrA způsobující depolymeraci FtsZ polymerů. Negativní role v regulaci buněčného dělení byla objevena i u proteázového komplexu ClpXP a glukosyltransferázy UgtP. MciZ je peptid modulující stabilitu Z-kruhu během sporulace *B. subtilis*.

#### 2.3.4.1 Sula

Protein Sula je dimerní neesenciální protein o velikosti 18,7 kDa, který byl identifikován jako inhibitor buněčného dělení během tzv. SOS odpovědi vyvolané rozsáhlým poškozením DNA (HUISMAN *et al.*, 1984). Buněčné dělení je tímto proteinem velmi rychle zastaveno. Inhibice dělení trvá po celou dobu opravy DNA. Následně je Sula degradován specifickou proteázou Lon.

Sula interaguje s C-koncovou doménou jednotlivých molekul FtsZ v místě T7 smyčky, a blokuje tak jejich úspěšnou polymeraci a tvorbu vysokomolekulárních struktur. Vazba Sula na monomery FtsZ přítomné v cytoplazmě způsobuje jejich vyřazení z možnosti podílet se na dynamické přestavbě FtsZ protofilament formujících Z-kruh. Již existující Z-komplexy jsou díky hydrolázové aktivitě vlastních podjednotek brzy rozloženy. Pokud je však FtsZ výrazně nadprodukován, Z-kruh se vytváří a dělení pokračuje i v přítomnosti Sula (CORDELL *et al.*, 2003).

Sula není v bakteriální říši příliš rozšířený. Dosud byly objeveny pouze dva další proteiny zodpovědné za inhibici dělení během SOS odpovědi – YneA u *B. subtilis* a DivS u

*Corynebacterium glutamicum*. Ani jeden není homologní k SulA, ani k sobě navzájem. Zatímco DivS blokuje sestavení Z-kruhu, YneA brání lokalizaci pozdějších dělicích proteinů (LysM a DivIC) do vznikajícího divizomu (KAWAI *et al.*, 2003; OGINO *et al.*, 2008).

#### 2.3.4.2 EzrA

U *B. subtilis* byl objeven jako negativní regulátor FtsZ polymerace protein EzrA kódovaný genem *ezrA*. Jedná se o integrální membránový protein s molekulární hmotností 65 kDa, který svou vazbou k FtsZ destabilizuje FtsZ polymery a zvyšuje kritickou koncentraci FtsZ nutnou k vytvoření Z-kruhu. U mutant *ezrA*<sup>-</sup> byla zjištěna přítomnost vícečetných vysoce stabilních Z-kruhů nejen uprostřed buňky, ale i na pólech. Gen *ezrA* je konzervován u mnohých grampozitivních bakterií s nižším zastoupením GC párů.

EzrA je kontinuálně exprimovaný protein vyskytující se v hojném počtu (10000 až 20000 kopií) rovnoměrně rozmístěný v cytoplazmatické membráně. V počátečním stádiu tvorby dělicího septa se váže na C-koncovou doménu FtsZ ve středu buňky. Přestože se zdá přítomnost negativního regulátoru v dělicím komplexu nežádoucí, EzrA významně participuje na udržení přirozené dynamické povahy středového Z-kruhu (HAEUSSER *et al.*, 2007). Bakteriální kmeny s nižší produkcí proteinu EzrA mají statisticky významně opožděné dělení oproti divokému typu. Pravděpodobně je toto zpoždění způsobeno vyšší stabilitou Z-kruhu nebo vyčerpáním dalších dělicích proteinů na vznikající polární Z-kruhy (KAWAI & OGASAWARA, 2006; HAEUSSER *et al.*, 2007).

EzrA inhibuje FtsZ polymeraci dvěma odlišnými způsoby. Jednak snižuje afinitu monomerů FtsZ pro GTP, a zároveň zvyšuje rychlost GTP hydrolyzy ve FtsZ polymerech (CHUNG *et al.*, 2007). V současné době se zkoumá role proteinu EzrA spolu s nově objevenou komponentou dělicího komplexu GpsB (Guiding PBP-1 Shuttling protein B) v koordinaci délky buňky s fází dělicího cyklu (TAVARES *et al.*, 2008).

#### 2.3.4.3 ClpX

ClpX je tzv. substrát rozpoznávající část proteázového komplexu ClpXP, který je v bakteriální říši vysoce zakonzervován. V nedávné době byl identifikován nový substrát ClpX - nepostradatelný dělicí protein FtsZ (CAMBERG *et al.*, 2009). ClpX patří do rodiny AAA proteinů (ATPases Associated with various cellular Activities), obsahuje charakteristický motiv potřebný pro vazbu a hydrolyzu ATP. Funguje buď sám jako chaperon, nebo ve spolupráci s proteázou ClpP eliminuje špatně složené proteiny. Aktuálním tématem je role tohoto proteinu v regulaci bakteriálního dělení.

ClpX, případně komplex ClpXP představuje negativní regulátor tvorby Z-kruhu. Zdá se, že mechanismus působení je různý u různých bakteriálních druhů. U *B. subtilis* je ClpX velmi

hojným proteinem. Delece genu *clpX* potlačuje defekty dělení vzniklé nadprodukcí komplexu MinCD, regulátoru chránícího buněčné póly před nežádoucím dělením. ClpX specificky interaguje s FtsZ *in vitro* a inhibuje schopnost polymerace FtsZ nezávisle na proteolytické aktivitě partnerského ClpP (HAEUSSER *et al.*, 2009). *In vivo* destabilizuje Z-kruh dosud neobjasněným způsobem. ClpXP u bakterie *Caulobacter crescentus* kontroluje buněčné dělení nepřímo prostřednictvím degradace transkripčního regulátoru CtrA (DZIEDZIC *et al.*, 2010). Negativní regulace dělení prostřednictvím ClpXP u *E. coli* je spojena s ATP dependentní proteolytickou funkcí ClpXP. *In vitro*, ClpXP degraduje FtsZ monomery i polymery. Protofilamenta jsou degradována výrazně rychleji. Nadprodukce ClpXP způsobuje prodlevu dělení oproti divokému typu a filamentaci buněk (CAMBERG *et al.*, 2011).

#### 2.3.4.4 UgtP

UgtP je membránově vázaná glukosyltransferáza, která se podílí na regulaci tvorby dělicího komplexu v závislosti na růstové rychlosti a velikosti buňky. Role tohoto metabolického senzoru v buněčném dělení byla studována u *B. subtilis*, ale zdá se, že je tento mechanismus zodpovídající za koordinaci buněčné velikosti a dělení zakonzervován v celé bakteriální říši (WEART *et al.*, 2007).

UgtP funguje jako účinný inhibitor tvorby Z-kruhu během rychlého bakteriálního růstu v nutričně bohatých podmínkách. Naopak v prostředí chudém na živiny je aktivita tohoto proteinu potlačena. Inhibiční aktivita UgtP je částečně dependentní na dostupnosti UDP-glukózy, ačkoliv hlavní role glukózové dostupnosti je přemístění UgtP do divizomu. UgtP se reverzibilně váže na FtsZ a touto interakcí narušuje laterální vazby mezi protofilamenty. Potlačení dělení trvá do doby, než bakteriální buňka dosáhne dostatečné velikosti (WEART *et al.*, 2007).

#### 2.3.4.5 MciZ

V průběhu sporulace *B. subtilis* je produkován krátký protein (40 AK) MciZ (Mother Cell Inhibitor of FtsZ), který inhibuje tvorbu Z-kruhu (HANDLER *et al.*, 2008). Absence tohoto peptidu vede ke zvýšené frekvenci formování Z-kruhu v pozdějších stádiích sporulace. Jednotlivé peptidy MciZ se váží na monomery FtsZ v blízkosti nukleotid vazebného místa, a snižují tak schopnost polymerace (HANDLER *et al.*, 2008). Přesný mechanismus působení MciZ je zatím neobjasněný.

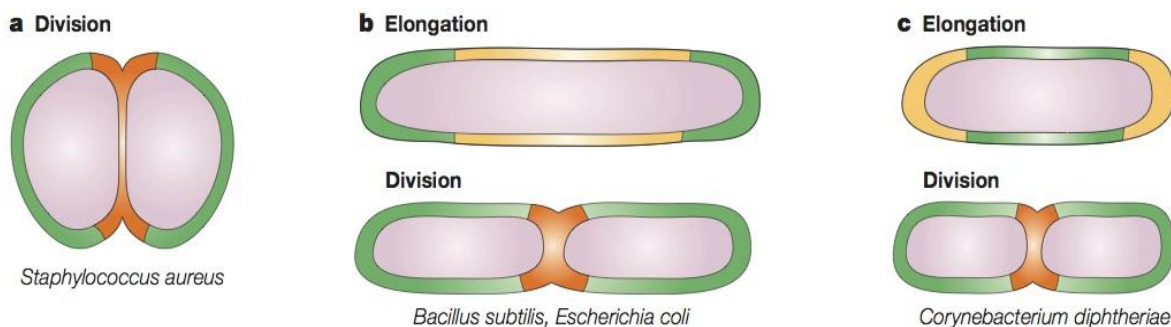
## 2.4 Syntéza buněčné stěny a peptidoglykanu

Buněčná stěna se vyskytuje nad cytoplazmatickou membránou všech doposud objevených bakterií, s výjimkou mykoplazmat. Chrání buňky před nepříznivými chemickými i fyzikálními vlivy prostředí, uděluje jim odolnost proti vyschnutí, podílí se na udržování buněčného tvaru a kompenzuje značný přetlak panující uvnitř buňky. Její porušení se může stát pro bakterii letální, proto je nezbytné vyvinout mechanismus zajišťující správné načasování a tvorbu buněčné stěny na nově formovaných pólech během dělení.

Součástí buněčné stěny grampozitivních i gramnegativních bakterií je peptidoglykan, látka specifická pro prokaryota. Jedná se o lineární polymer dvou střídajících se aminocukrů, *N*-acetylglukozaminu (GlcNAc) a jeho 3-*O*-*D*-laktyl derivátu *N*-acetylmuramové kyseliny (MurNAc) spojených navzájem  $\beta$ -1,4 glykozidickými vazbami. Na karboxylovou skupinu kyseliny muramové je navázán řetízek čtyř aminokyselin (L-alanin-*D*-glutamová kyselina-*X*-*D*-alanin; *X*-proměnná druhově specifická aminokyselina, například diaminopimelová kyselina). Jednotlivé tetrapeptidové řetízky jsou mezi sebou navzájem propojeny. U grampozitivních bakterií je zpravidla přímo spojen *N*-koncový *D*-alanin jednoho peptidového řetízku s předposlední aminokyselinou druhého řetízku, zatímco u grampozitivních je spojení zprostředkováno jednou nebo několika dalšími aminokyselinami. Díky těmto propojením tvoří lineární polymery síťovinu, pevnější u grampozitivních bakterií, kde jsou propojení častější.

Proteiny zodpovědné za katalýzu reakcí nutných pro vznik a modifikaci peptidoglykanu spadají do skupiny penicilin vazebných proteinů. V rostoucí bakterii se musí peptidoglykanový váček (sacculus) zvětšovat spolu s buňkou. To se děje vsunováním stavebních jednotek peptidoglykanu do stávající struktury. Přesné vymezení místa inserce prekurzorů do již existující peptidoglykanové vrstvy, a stejně tak i procesy řídící toto směrování nejsou zcela objasněny. Zdá se, že u tyčinkovitých bakterií *B. subtilis* a *E. coli* jsou jednotlivá místa vnášení peptidoglykanových podjednotek rozmístěna po obvodu bočních stěn ve tvaru helixu, dále i v místě dělení, ale téměř žádná nejsou na pólech buňky. U kulovitých bakterií jako například *Staphylococcus aureus* nebo *Streptococcus pneumoniae*, nastává syntéza primárně v místě dělení (CABEEN & JACOBS-WAGNER, 2005 ) (obr. 2-6). Aby inserce nových prekurzorů peptidoglykanu byla možná, musí probíhat současně, řízeně a sladěnou rychlostí nejprve rozštěpení peptidoglykanu, a po vložení nové podjednotky, jeho opětná resyntéza. Proces štěpení zajišťují peptidoglykanové hydrolázy.





**Obr. 2-6: Místa růstu buněčné stěny u bakterií s různou morfologií**

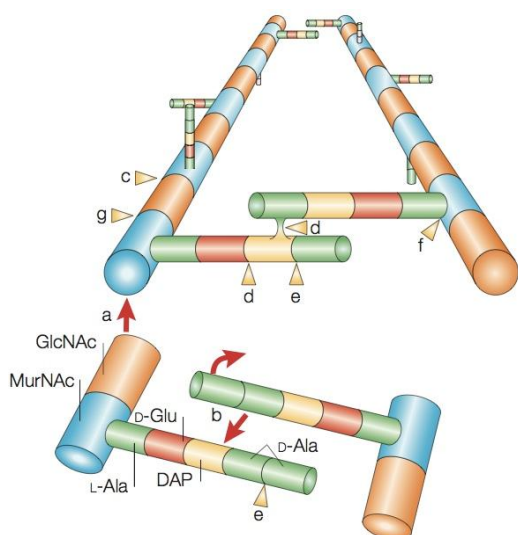
Převzato z Cabeen *et al.*, 2005. Popis v textu, kapitola 2-4

Syntéza buněčné stěny u bakterií se dělí na dvě základní kategorie: syntéza spojená s prodlužovacím růstem (periferální syntéza) a syntéza buněčné přepážky spojená a buněčným dělením (septální syntéza). Kokovité bakterie typu *S. aureus* syntetizují buněčnou stěnu pouze během dělení a prodlužovací růst u nich nebyl zaznamenán. Ovoidní bakterie typu *S. pneumoniae* a všechny tyčinkovité bakterie uskutečňují také prodlužovací růst. U těchto bakterií jsou PBPs a některé proteiny buněčného dělení specificky zapojené do syntézy peptidoglykanu buď v rámci prodlužovacího růstu, nebo v rámci syntézy buněčné přepážky a jejich funkce se nepřekrývají. Například u *S. pneumoniae* se protein FtsW a PBP2X podílí na septální syntéze peptidoglykanu v buněčné přepážce, zatímco RodA a PBP2B jsou součástí aparátu pro periferální syntézu peptidoglykanu (ZAPUN *et al.*, 2008).

#### 2.4.1 Penicilin vazebné proteiny

Penicilin vazebné proteiny PBPs se zkoumají již více než 40 let. Nynější strukturální informace spolu s pokračujícími dlouhodobými biochemickými výzkumy využívajícími moderní technologie (dvouhybridní analýzu, imunofluorescenci a další) vedly k detailnímu popisu vlastností těchto enzymů a objasnění jejich funkce při syntéze peptidoglykanu. Název PBPs byl odvozen od jejich schopnosti vázat  $\beta$ -laktamová (penicilinová a cefalosporinová) antibiotika, která inhibují funkci PBPs, a tím i syntézu peptidoglykanu.  $\beta$ -laktamový kruh je strukturální analog jejich přirozeného substrátu, koncového acyl D-alanyl-D-alaninu pentapeptidového řetězku navázaného na peptidoglykanovém prekurzoru (GHUYSEN, 1991).

PBPs katalyzují polymeraci glykanových řetězců (transglykosylace) a zároveň příčné spojování mezi jednotlivými řetězci (transpeptidace). Některé PBPs mohou hydrolyzovat poslední D-alanin z koncového pentapeptidu (DD-karboxypeptidace) nebo hydrolyzují peptidovou vazbu spojující dva glykanové řetězce (endopeptidace) (obr. 2-7).



**Obr. 2-7: Funkce PBPs při syntéze peptidoglykenu**

a) transglykosylace; b) transpeptidace; c) lytická transglykosylace; d) endopeptidace; e) karboxypeptidace; f) amidázová aktivita; g) N-acetylglukozamidázová aktivita

Převzato z Cabeen *et al.*, 2005.

Různé druhy bakterií mají variabilní počet specifických PBPs, které můžeme rozdělit dle jejich molekulové hmotnosti do dvou hlavních kategorií: nízkomolekulární LMW (Low Molecular Weight) a vysokomolekulární HMW PBPs (High Molecular Weight).

HMW jsou víceúčelové PBPs nezbytné pro peptidoglykanovou polymeraci a inserci do již existující buněčné stěny (GOFFIN & GHUYSEN, 1998). Jejich topologie sestává z cytoplazmatického ocásku, transmembránové kotvy a dvou domén spojených flexibilním raménkem lokalizovaným na vnějším povrchu cytoplazmatické membrány, v místě vzniku peptidoglykanu (LOVERING *et al.*, 2007). V závislosti na struktuře a katalytické aktivitě jejich N-koncové domény přísluší jednotlivé PBPs do třídy A nebo do třídy B. C-koncová penicilin vazebná doména obou tříd má transpeptidázovou aktivitu, katalyzuje příčné spojování peptidů mezi dvěma sousedícími glykanovými řetězci. Ve třídě A je N-koncová doména zodpovědná za jejich glykosyltransferázovou aktivitu, katalyzující elongaci nezesíťovaných glykanových řetězců. Ve třídě B N-koncová doména hraje roli v buněčné morfogenezi interakcí s dalšími proteiny (SAUVAGE *et al.*, 2008).

LMW PBPs nesou D,D-karboxypeptidázovou a endopeptidázovou aktivitu. Rozdělují se do třídy A, B, a C. Třída C je někdy dále dělena na jednotlivé podkategorie (GOFFIN & GHUYSEN, 1998).

PBPs spolu s peptidoglykanovými hydrolázami jsou součástí pozdního dělicího komplexu a budou popsány v kapitole 2.4.3.

## 2.4.2 Peptidoglykanové hydrolázy

Bakteriální peptidoglykanové hydrolázy tvoří rozsáhlou a různorodou skupinu enzymů schopných štěpit kovalentní vazby v peptidoglykanových polymerech, případně v jeho rozpuštěných fragmentech. Fyziologické funkce těchto enzymů zahrnují regulaci růstu

buněčné stěny, peptidoglykanovou přeměnu během růstu, oddělení dceřiných buněk při buněčném dělení a autolýzu. Některé hydrolázy mají specifické funkce, například zvětšují póry v peptidoglykanu, kterými prochází bičíky, nebo štěpí peptidoglykan během sporulace či germinace. Mnohdy je složité určit přesnou funkci dané hydrolázy. Podílí se na tom skutečnost, že většina bakterií obsahuje celou řadu hydroláz, které plní stejnou funkci a mohou se zastupovat. Navíc každá hydroláza může mít více jak jednu funkci (VOLLMER *et al.*, 2008).

Načasování aktivity hydroláz zodpovědných za štěpení dělicí přepážky se liší u grampozitivních a gramnegativních bakterií. Většina grampozitivních bakterií nejprve utvoří dělicí přepážku, a následně ji uprostřed rozštěpí. U gramnegativních bakterií štěpení přepážky nastává současně spolu s buněčným dělením, což vede ke konstrikcí ve tvaru V (VOLLMER *et al.*, 2008).

Jelikož je buněčná stěna pro životaschopnost většiny bakterií nepostradatelná, poměr syntetických a degradačních reakcí musí být přísně regulován. Regulace probíhá na všech úrovních, počínaje transkripcí jednotlivých enzymů, jejich regulací substrátem, až po posttranslační modifikace.

U *E. coli* je známo 18 hydroláz, přičemž dvě z nich, AmiA a AmiC, jsou nezbytné při separaci dceřiných buněk. Amidázy AmiA a AmiC se skládají ze čtyř domén. Na N-konci je tzv. Tat signální sekvence (Twin-Arginin protein Transport), díky které jsou tyto proteiny směrovány do periplazmy. Bylo dokázáno, že pro správné umístění AmiA a AmiC do dělicí přepážky je nezbytná ještě tzv. targeting doména (BERNHARDT & DE BOER, 2003). Nedávno byl objeven další enzym účastnící se separace dceřiných buněk nazvaný EnvC, který funguje jako endopeptidáza (BERNHARDT & DE BOER, 2004).

Jako analog AmiC u grampozitivních bakterií byl identifikován enzym Atl (autolysin), který je lokalizován ve středovém dělicím místě. U *S. pneumoniae* byly objeveny další proteiny spojené s degradací buněčné stěny během separace dceřiných buněk. LytA je hlavní autolysin *S. pneumoniae*, který funguje jako N-acetylmuramoyl-L-alanin-amidáza. Další je muramidáza LytB a LytC, první identifikovaný pneumokokový lysozym.

### **2.4.3 Komponenty pozdního dělicího komplexu**

Díky velké rozmanitosti penicilin vazebných proteinů se složení komplexu řídicího syntézu peptidoglykanu dělicí přepážky u jednotlivých bakterií liší. Různé jsou i cesty vedoucí ke složení těchto pozdních dělicích komplexů. Nejlépe prostudované je složení a závislosti jednotlivých proteinů u *E. coli*, zástupce gramnegativních bakterií, a *B. subtilis*, zástupce grampozitivních bakterií.

U *E. coli* je pořadí skládání jednotlivých proteinů až na jednu výjimku lineární: FtsZ → [FtsA ZipA ZapA] → FtsK → FtsQ → [FtsL FtsB YgbQ] → FtsW → FtsI → FtsN. Nejprve se na Z-kruh váže FtsK, který nevyžaduje žádný další pozdní dělicí protein, zatímco FtsN se může navázat pouze tehdy, jsou-li v komplexu přítomny všechny předešlé proteiny. Oba proteiny FtsL a YgbQ potřebují, aby se v komplexu nacházel FtsK a FtsQ, ale nezávisí jeden na druhém. FtsB se váže na FtsL (ERRINGTON *et al.*, 2006). Ekvivalentní proteiny u *B. subtilis* jsou skládány do divizomu ve dvou krocích. Časný komplex závisí pouze na lokalizaci FtsZ. Po určité pravidelné době (20 % buněčného cyklu) jsou do vznikajícího komplexu umístěny pozdní dělicí proteiny. Ačkoliv nadprodukce FtsZ mění načasování lokalizace časných proteinů, nemá vliv na pozdní dělicí proteiny (GAMBA *et al.*, 2009).

#### 2.4.3.1 FtsI (PBP3)/ PBP-2B

FtsI u *E. coli* je vysokomolekulární penicilin vazebný protein (HMW PBP) skládající se na N-konci z malé cytoplazmatické domény, dále pak membránového segmentu následovaného tzv. non-penicillin binding (nPB) doménou a na C-konci z rozsáhlé periplazmatické PB domény, která nese jeho transpeptidázovou aktivitu (GOFFIN & GHUYSEN, 1998). Membránový segment je tvořen pouze 17 aminokyselinami a spolu s cytoplazmatickou doménou vytváří membránovou kotvu, která cílí FtsI do dělicího místa (WEISS *et al.*, 1997). Zdá se, že nPB doména slouží jako intramolekulární chaperon, který napomáhá správnému složení PB domény. Transpeptidázová aktivita PB domény je inhibována β-laktamovými antibiotiky (cephalexin, piperacillin, furazlocillin), inhibice ovšem neovlivňuje umístění proteinu do dělicího místa (WEISS *et al.*, 1997).

FtsI je specifický pro syntézu peptidoglykanu dělicí přepážky, na syntéze peptidoglykanu při elongaci se u *E. coli* podílí PBP2. Inhibice PBP2 vede ke ztrátě tyčinkovitého tvaru, zatímco inhibice FtsI zastavuje buněčné dělení. Pokusy s GFP-FtsI ukázaly, že se začleňuje do dělicího komplexu až v pozdější fázi. Pro své umístění vyžaduje FtsZ-kruh s navázaným FtsA, FtsK, FtsQ a FtsW (WANG *et al.*, 1997).

Jako funkční homolog FtsI u *B. subtilis* byl na základě aminokyselinové sekvence a pozice genu identifikován protein PBP-2B. Gen *pbp2B* se nachází uvnitř konzervované skupiny genů kódujících proteiny potřebné pro dělení a syntézu buněčné stěny. Na rozdíl od *E. coli* je tento gen u *B. subtilis* duplikován. Jedna kopie nazývaná *spoVD* kóduje protein nutný pro syntézu modifikovaného buněčného materiálu sporového kortexu. Druhá kopie kóduje právě PBP-2B (DANIEL *et al.*, 1996). K iniciaci dělení a skládání pozdního dělicího komplexu stačí malé množství PBP-2B, ovšem pro vývoj dělicí přepážky je nutné jeho

kontinuální přibývání. PBP-2B zůstává na svém místě až dokonce dělení. Ekvivalentní protein u *S. pneumoniae* se nazývá PBP-2X.

#### 2.4.3.2 FtsK

FtsK je membránově vázná DNA-translokáza, která katalyzuje translokaci chromozomu do dceřiné buňky v závislosti na energii uvolněné z hydrolyzy ATP. FtsK u *E. coli* je esenciální protein (147 kDa) obsahující hydrofobní N-koncovou doménu (200 AK) se 4-5 transmembránovými  $\alpha$  helixy, doménu bohatou na prolin a glutamin (660 AK) a hydrofilní C-koncovou doménu (470 AK) s nukleotid vazebným místem. Primární sekvence FtsK je vysoce konzervovaná a vyskytuje se u velkého počtu bakteriálních a plazmidových proteinů. Většina těchto plazmidových proteinů a některé bakteriální jsou požadovány pro segregaci molekul DNA (BEGG *et al.*, 1995). FtsK je umístěn ve středovém dělicím místě v dřívější fázi dělení ještě před začátkem konstrikce. Jeho lokalizace je závislá pouze na přítomnosti FtsZ a FtsA. Ačkoliv patří mezi velké proteiny, pro úspěšné dělení je dostačující pouze N-koncová doména. Pokud chybí nebo je narušena, dělení neprobíhá. C-koncová doména váže ATP a napomáhá segregaci nově replikovaných chromozomů. Zesílená exprese *ftsK* genu je součástí SOS odpovědi a uděluje zvýšenou rezistenci k poškození DNA (WANG & LUTKENHAUS, 1998).

U *B. subtilis* se vyskytuje jako sekvenční homolog FtsK neesenciální SpoIIIE uplatňující se během sporulace v přemístění chromozomu do budoucí prespory. Ačkoliv gen *spoIIIE* není nutný pro vegetativní růst, jeho delece zvyšuje citlivost DNA k poškozujícím činitelům. V pozdní fázi dělení se v 6 % bakterií vyskytuje SpoIIIE ve středové dělicí přepážce (WU & ERRINGTON, 1997).

#### 2.4.3.3 FtsN

Gen *ftsN* byl izolován jako supresor teplotně citlivých *ftsA* mutací a do jisté míry i *ftsI*, *ftsQ* a *ftsK* mutací (DAI *et al.*, 1996). Protein FtsN (36 kDa) se skládá z krátkého N-cytoplazmatického konce, transmembránového segmentu a velké C-koncové periplazmatické domény. Jeho homolog byl doposud nalezen jen u střevní bakterie *Haemophilus* spp. Slabá sekvenční podobnost byla nalezena u některých amidáz, například u Cw1C a SpoIIB v *B. subtilis*. U *E. coli* se nalézá v relativně nízkém počtu 20-50 molekul na buňku

Specifickou dělicí funkci nese pravděpodobně C-koncová doména, ale její biochemická funkce není dosud vyřešena. Zdá se, že by mohla štěpit určité vazby v buněčné stěně. Další možnou funkcí FtsN je účast při sevření dělicí přepážky (DAI *et al.*, 1996).

#### 2.4.3.4 FtsL/ DivIC/ YluC

FtsL u *E. coli* je malý (13 kDa) membránový protein složený ze tří krátkých domén: N-koncové cytoplazmatické domény (37 AK), transmembránového segmentu (20 AK) a C-koncové periplazmatické domény (64 AK), která obsahuje sedmkrát opakovaný motiv charakteristický pro tzv. leucinový zip. Přítomnost tohoto motivu podporuje předpoklad, že FtsL váže další molekulu FtsL nebo jiného proteinu a funguje jako homo- či heterodimer. U *E. coli* váže FtsB, další protein obsahující leucinový zip a u *B. subtilis* DivIC (SIEVERS & ERRINGTON, 2000).

Ačkoliv je primární sekvence tohoto dělicího proteinu jen málo konzervována, jeho strukturní homology se vyskytují u celé řady bakterií a tvoří esenciální součást dělicího komplexu (SIEVERS & ERRINGTON, 2000).

Použitím fluorescenční mikroskopie se potvrdilo umístění FtsL v dělicím místě. U *E. coli* je lokalizace závislá na předchozím navázání FtsZ, FtsA, ZipA a FtsQ, ale nezávislá na FtsI a FtsN. Přesná funkce FtsL není zatím jasná. Soudí se, že se účastní konstriktce Z-kruhu při cytokinezi (GHIGO & BECKWITH, 2000).

V *B. subtilis* je přítomen kromě FtsL ještě další strukturně podobný protein DivIC. Dvouhybridní analýza a gelová elektroforéza prokázaly, že C-koncové domény FtsL a DivIC se váží a tvoří dvoušroubovicovou strukturu. Pokud se DivIC nenachází v komplexu, je rychle degradován (SIEVERS & ERRINGTON, 2000).

Nedávné výzkumy prokázaly, že FtsL a jeho strukturní ekvivalenty patří mezi vysoce nestabilní proteiny. Tato nestabilita hraje důležitou roli v regulaci buněčného dělení, zejména v jeho načasování. U *B. subtilis* zodpovídá za rychlý turnover N-koncová doména. Jako klíčový element v degradaci FtsL u *B. subtilis* byla identifikována membránová metaloproteáza YluC, která patří do skupiny proteinů regulujících intramembránovou proteolýzu RIP (Regulated Intramembrane Proteolysis). Tyto proteázy fungují jako významný regulační mechanismus mnoha biologických dějů. Vyskytují se jak u prokaryot, tak eukaryot. Regulace transkripce uvolněním membránově vázaného transkripčního faktoru je společnou funkcí RIP (BRAMKAMP *et al.*, 2006).

#### 2.4.3.5 FtsQ/ DivIB

FtsQ je další dělicí protein *E. coli* s krátkou cytoplazmatickou N-koncovou doménou (24 AK), jedním transmembránovým segmentem (25 AK) a rozsáhlou periplazmatickou doménou (227 AK). Obsahuje specifickou POTRA doménu (Polypeptide Transport-Associated), která slouží jako místo interakce s dalšími proteiny a pravděpodobně nese i funkci chaperonu. V *E. coli* asociuje s FtsL a FtsB a vytváří trimer, který je posléze umístěn do dělicího místa, zatímco

homologní proteiny u *S. pneumoniae* tvoří přechodný komplex až během tvorby přepážky. Pomocí dvouhybridní analýzy a imunoprecipitace se zjistilo, že se v dělicím komplexu dále váže k FtsI, FtsN a FtsW (D'ULISSE *et al.*, 2007).

Navzdory tomu, že byl objeven před 27 lety, zůstává jeho hlavní funkce stále nejasná. Díky vysokému počtu interakcí s ostatními dělicími proteiny se předpokládá, že vytváří strukturní spoj mezi časnými a pozdními dělicími proteiny, napomáhá jejich správnému skládání a reguluje aktivitu proteinů syntetizujících peptidoglykan.

Gen *ftsQ* leží u mnohých bakterií hned za genem *ftsA* a *ftsZ*. U *B. subtilis* a dalších grampozitivních bakterií je na stejném místě gen *divIB* kódující DivIB, pravděpodobný homolog FtsQ. Ačkoliv je primární sekvence FtsQ a DivIB shodná jen z 15 %, zaujímají podobnou konformaci. Výzkumem *divIB* delečních mutant se zjistilo, že DivIB není pro bakterii esenciální, na rozdíl od FtsQ, který je pro *E. coli* nepostradatelný. Počet jeho molekul se také liší. U *E. coli* se vyskytuje ve velmi nízkém počtu (cca 20 molekul na buňku), zatímco u *B. subtilis* je jeho množství stonásobné. Funkce stejně jako u FtsQ není zcela odhalena, ale je jasné, že chrání FtsL před degradací (ERRINGTON *et al.*, 2003).

#### 2.4.3.6 FtsW

FtsW *E. coli* je člen tzv. SEDS rodiny proteinů (Shape, Elongation, Division, Sporulation). Tyto proteiny kontrolují a určují buněčný tvar a syntézu peptidoglykanu během růstu, dělení a sporulace. Stejně jako většina ostatních členů této skupiny obsahuje 8-10 transmembránových oblastí, velké extracelulární smyčky a N- i C-koncovou doménu v cytoplazmě. Na chromozomu leží v uzavřené oblasti genů pro PBP třídy B (GERARD *et al.*, 2002). Pro většinu bakterií obsahujících buněčnou stěnu je tento protein nepostradatelný (HENRIQUES *et al.*, 1998).

FtsW se může vyskytovat ve dvou různých formách – krátké nebo dlouhé. Obě formy jsou kódované genem *ftsW*, ale mají posunutý transkripční začátek. Genetické analýzy potvrzují, že pro normální růst a morfologii je dostačující krátká forma (WANG *et al.*, 1998).

FtsW je umístěn ve středu buňky a jeho hlavní funkce v syntéze peptidoglykanu spočívá v přenosu prekurzorů navázaných na lipid II (N-acetylglukozamin-N-acetylmuramoyl-pentapeptid-pyrofosforyl undecaprenol) z cytoplazmatické strany membrány na vnější stranu. Funkce FtsW a FtsI jsou úzce spojeny a jsou specifické pro syntézu peptidoglykanu dělicí přepážky. Funkci FtsW v elongační syntéze peptidoglykanu přebírá RodA (MISTRY *et al.*, 2008).

## 2.5 Úloha proteinkináz v regulaci buněčného dělení

Nezbytným předpokladem pro přežití každého organismu je schopnost autoregulace všech důležitých metabolických procesů v závislosti na změnách vnitřního i vnějšího prostředí. Klíčovým mechanismem mezibuněčné i vnitrobuněčné komunikace je přenos signálu pomocí fosforylace a defosforylace proteinů. Fosforylace představuje kovalentní posttranslační modifikaci katalyzovanou enzymy – proteinkinázami. Opačným procesem je defosforylace zprostředkovaná proteinfosfatázami.

U prokaryot se na regulaci buňčného dělení i dalších esenciálních fyziologických procesech podílí ATP-dependentní serin/ threoninové a tyrosinové proteinkinázy eukaryotického typu (ESTPK). Jejich přítomnost v bakteriální říši byla prokázána na konci 80. let 20. století (HANKS *et al.* 1988). Jedná se o enzymy, které obsahují všechny konzervované domény charakteristické pro eukaryotní kinázy a jsou schopné přenášet fosfátovou skupinu z ATP především na hydroxylovou skupinu serinu nebo threoninu za současného vzniku ADP a fosforylovaného proteinu. Bylo zjištěno, že se vyskytují u téměř dvou třetin osekvenovaných, fylogeneticky odlišných bakterií, které mají rozličné životní strategie (PÉREZ *et al.*, 2008). ESTPK se vyskytují jako cytoplazmatické i transmembránové. Transmembránové proteinkinázy slouží mnohdy jako receptory.

Většina proteinkináz eukaryotického typu patří do jedné nadrodiny. Obsahují katalytickou doménu tvořenou 250 – 300 aminokyselinovými zbytky, která se skládá z 11 konzervovaných subdomén oddělených méně konzervovanými oblastmi (HANKS *et al.*, 1988). Konzervované subdomény tvoří komponenty aktivního místa nebo se účastní tvorby sekundárních struktur, které stabilizují aktivní místo. Kromě katalytické domény obsahují proteinkinázy často přídatné domény plnící rozmanité funkce.

Přídatné domény jsou značně variabilní a mohou zastávat řadu funkcí. Některé zodpovídají za interakce mezi proteiny (například WD repetice u *Anabaena* (WANG *et al.*, 2002)), jiné nesou katalytickou funkci (adenylátcyklázová doména u *Anabaena* (WANG *et al.*, 2002)). Funkcí některých domén je vazba specifického ligandu. Například tzv. PASTA domény (kapitola 2.5.1) mohou vázat peptidoglykanové podjednotky (SHAH *et al.*, 2008).

ESTPK se prostřednictvím fosforylace svých substrátů zúčastňují mnohých buněčných procesů. Regulují vývoj a diferenciaci, řídí růst, dělení a sporulaci, odpovídají na stresové situace a jsou nezbytnou součástí řady metabolických drah. U patogenních bakterií se podílejí na expresi virulentních faktorů, interakci s hostitelskými epiteliálními povrchy, interferenci se signálními drahami hostitele či produkci cytotoxinů.



### 2.5.1 Proteinkinázy s PASTA doménami

Zvláštní skupinou ESTPK jsou transmembránové proteinkinázy s PASTA doménami (Penicillin-binding protein And Serine/Threonine kinase Associated domain). Modelovou proteinkinázou, která nese ve své extracelulární části několik opakování těchto domén, se stala proteinkináza PknB *M. tuberculosis* (AV-GAY et al., 1999). Proteinkinázy homologní k PknB byly nalezeny zejména u grampozitivních bakterií rodu Actinobacteria a Firmicutes (JONES & DYSON *et al.*, 2006). Příkladem je i proteinkináza StkP u *S. pneumoniae*. PASTA domény nebyly objeveny pouze u Ser/ Thr proteinkináz, ale i u penicilin vazebných proteinů. Další studie ukázaly, že se nacházejí i u jiných hypotetických proteinů. U gramnegativních bakterií je jejich přítomnost vzácná.

Na základě znalosti krystalové struktury PBP-2X ze *S. pneumoniae* bylo zjištěno, že dvě kopie PASTA domény se nachází vedle transpeptidázové domény PBPs (GORDON *et al.*, 2000). Tvoří trojrozměrnou globulární strukturu složenou ze tří  $\beta$  listů a jednoho  $\alpha$  helixu. PBP-2X je esenciální protein, který hraje významnou roli v sestavení pozdního dělicího komplexu u *S. pneumoniae*. PBP-2X je schopen vázat dvě molekuly  $\beta$ -laktamového antibiotika cefuroximu. První molekula je kovalentně navázána do transpeptidázové domény, zatímco druhá se nekovalentně váže právě na PASTA domény. Předpokládá se, že PASTA domény jsou díky schopnosti vázat  $\beta$ -laktamový kruh, schopny vázat též jeho strukturální analog, koncový acyl D-alanyl-D-alanin peptidoglykanového prekurzoru. Proto byla navržena hypotéza, že ESTPK obsahující PASTA domény se účastní regulace syntézy buněčné stěny během dělení (YEATS *et al.*, 2002). Tuto hypotézu podporuje i skutečnost, že u kmenů *S. pneumoniae* rezistentních na  $\beta$ -laktamová antibiotika byly kromě jiných mutací objeveny aminokyselinové záměny v PASTA doménách. Navíc většina doposud objevených proteinkináz, které mají jednu či více kopií PASTA domén, se nachází v operonech nutných pro biosyntézu buněčné stěny.

Funkce proteinkináz s PASTA doménami u různých bakteriálních druhů je intenzivně zkoumána. Zdá se, že většina se účastní regulace růstu, vývoje a dělení. U patogenních druhů navíc zvyšují virulenci kmene. Role některých blíže prostudovaných proteinkináz u vybraných bakterií bude popsána v následujících kapitolách.

#### 2.5.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

*M. tuberculosis* je intracelulární lidský patogen způsobující vážné infekční onemocnění tuberkulózu. Sekvenací genomu byla odhalena přítomnost celkem 11 genů kódujících proteinkinázy eukaryotického typu, které ovlivňují řadu důležitých biologických procesů. PASTA domény jsou součástí dvou z nich, PknA a PknB.

Mykobakteriální ESTKP jsou možným cílem pro budoucí antituberkulózní léky (WEHENKEL *et al.*, 2008). Nadějným kandidátem se stala právě proteinkináza PknB, která je nezbytná pro růst mykobakterií. PknB představuje modelovou proteinkinázu s PASTA doménami a spolu s PknA je součástí složité kaskády regulující buněčné dělení a morfologii (KANG *et al.*, 2005).

Oba esenciální geny *pknA* a *pknB* leží blízko replikačního počátku ve stejném operonu s geny *pbpA* a *rodA*, které se účastní kontroly syntézy peptidoglykanu a tvorby dělicí přepážky. Bylo prokázáno, že k maximální expresi proteinkináz PknA a PknB dochází během exponenciální fáze a že jejich nadprodukce vede ke zpomalení růstu, změně morfologie buňky a poruchám buněčného dělení (KANG *et al.*, 2005).

Mezi identifikované substráty těchto proteinkináz patří dva proteiny zahrnuté v buněčném dělení FtsZ (THAKUR & CHARKRABORTI, 2006) a Wag31, homolog proteinu DivIVA u *B. subtilis* (KANG *et al.*, 2005), dále pak proteiny podílející se na biosyntéze peptidoglykanu MurD (THAKUR & CHARKRABORTI, 2008), GlnU (PARIKH *et al.*, 2009) a penicilin vazebný protein PbpA (DASGUPTA *et al.*, 2006). Dalšími substráty jsou například KasA a KasB, proteiny účastnící se tvorby kyseliny mykolové (MOLLE *et al.*, 2006).

#### 2.5.1.2 *Bacillus subtilis*

*B. subtilis* je jednou z nejstudovanějších bakterií patřící mezi grampozitivní sporující aerobní tyčinky. Analýza genomové sekvence odhalila přítomnost genu *prkC* kódujícího serin/threoninovou proteinkinázu PrkC. Ve stejném operonu leží i gen *prpC* kódující příbuznou fosfatázu PrpC (MADEC *et al.*, 2002).

Studiem delečních mutant bylo zjištěno, že PrkC spolu s PrpC nejsou esenciální, ale jsou požadovány pro správnou tvorbu biofilmu a účinnou sporulaci (MADEC *et al.*, 2002). Novější výzkumy také poukazují na roli PrkC při klíčení spory. Jako její substrát byl identifikován protein EF-G (Elongation Factor G) (SHAH *et al.*, 2008). EF-G je esenciální ribozomální GTPáza zahrnutá v mRNA a tRNA translokaci. PrkC u *B. subtilis* je první proteinkináza eukaryotického typu, u které byla identifikována její aktivační molekula - fragmenty peptidoglykanu, které se váží na C-koncovou část PrkC obsahující tři PASTA domény. PrkC je *in vivo* schopna vázat také muropeptidy, které rostoucí bakterie uvolňují do okolního prostředí. V závislosti na tomto aktivačním signálu dochází ke spuštění signální kaskády vedoucí k synchronizovanému klíčení spor (SHAH *et al.*, 2008).

### 2.5.1.3 *Enterococcus faecalis*

*E. faecalis* patří mezi grampozitivní enterokoky způsobující častá infekční onemocnění střevního traktu. Významným lidským patogenem se tato bakterie stala díky rozšířené rezistenci k mnohým antibiotikům.

Díky sekvenci genomu byla dokázána přítomnost proteinkinázy PrkC obsahující pět opakování PASTA domény. PrkC slouží jako transmembránový receptor, který monitoruje celistvost buněčné stěny a zprostředkovává odpověď na stresové podmínky prostředí. Mutace v genu *prkC* má za následek sníženou rezistenci k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům a poruchy dělení (KRISTICH *et al.*, 2007).

### 2.5.1.4 *Streptococcus mutans*

Mezi významné zástupce vytvářející mikrobiální zubní povlak patří *S. mutans*, hlavní původce zubního kazu. Virulenní vlastnosti zahrnují schopnost udržet se a růst ve smíšené kultuře na povrchu zubu. Pro přežití v dutině ústní je také nezbytná tolerance k nízkému pH a genetická kompetence, která napomáhá genomové plasticitě, a tedy i adaptaci na měnící se podmínky prostředí. Mezi klíčové komponenty regulující tyto vlastnosti patří proteinkináza PknB a příbuzná proteinfosfatáza PppL. Mutace v genech kódujících tyto enzymy má za následek defektní tvorbu biofilmu a poruchy genetické kompetence a rezistence na nízké pH (HUSSAIN *et al.*, 2005).

Bylo zjištěno, že PknB *S. mutans* podporuje také produkci bakteriocinu, antimikrobiální látky ovlivňující hustotu dalších bakteriálních druhů, zejména *S. sanguinis*. Je pravděpodobné, že regulační kaskáda zahrnuje dvousložkové systémy ComDE a VicKR, které souvisí s kompetencí a virulencí (BANU *et al.*, 2010).

### 2.5.1.5 *Streptococcus agalactiae*

*S. agalactiae* patří mezi streptokoky skupiny B (group B streptococci, GBS). Jedná se o významného lidského patogena, který způsobuje novorozeneckou pneumonii, sepsi a meningitidu. Stejně jako *S. pneumoniae* obsahuje jedinou serin/ threoninovou proteinkinázu nesoucí PASTA doménu. Stk1 představuje vhodného kandidáta pro vývoj nových léků (OXOBY *et al.*, 2010)

Biochemické analýzy ukázaly, že Stk1 je lokalizována v membráně a fosforyluje celou řadu substrátů. Reguluje růst, virulenci a buněčnou segregaci. Na správné regulaci těchto buněčných procesů se také podílí příbuzná fosfatáza Stp1. Mutace v genech *stk1* a *stp1* způsobuje prodloužení lag fáze, tvorbu dlouhých neoddělených buněk a výrazně sníženou virulenci v porovnání s divokým kmenem (RAJAGOPAL *et al.*, 2003).

Mezi její substráty patří dělicí proteiny DivIVA a FtsZ (SILVESTRONI *et al.*, 2009), adenylosukcinátsyntetázu PurA, která reguluje biosyntézu purinů (RAJAGOPAL *et al.*, 2005), dále pozitivní regulátor exprese cytotoxinů CovR (RAJAGOPAL *et al.*, 2006; LEMBO *et al.*, 2010) a anorganická pyrofosfatáza PpaC (RAJAGOPAL *et al.*, 2003).

#### 2.5.1.6 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* je řazen mezi koaguláza pozitivní stafylokoky. Je dobře adaptovaný na kolonizaci kůže a sliznic a spolu se streptokoky patří k nejčastějším původcům pyogenních infekcí.

*S. aureus* kóduje proteinkinázu PknB se třemi PASTA doménami a proteinfosfatázu Stp1. Tyto enzymy jsou zahrnuty v metabolických drahách regulujících tvorbu buněčné stěny, rezistenci k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům a buněčné dělení (BELTRAMINI *et al.*, 2009). Identifikace nových substrátů PknB a Stp1 odhalila jejich roli v regulaci exprese hemolyzinů a virulenci (BURNSIDE *et al.*, 2010). Předpokládá se, že fosforylační dráhy ovládané PknB/Stp1 jsou esenciální pro přežití bakterie uvnitř hostitele (DÉBARBOUILLÉ *et al.*, 2009).

Několik objevených substrátů stafylokokové kinázy a fosfatázy jsou enzymy uplatňující se v glykolýze, citrátovém cyklu a syntéze proteinů (LOMAS-LOPEZ *et al.*, 2007). PknB i Stp1 patří mezi proteiny s globálním účinkem.

#### 2.5.1.7 *Corynebacterium glutamicum*

*C. glutamicum* je půdní nepatogenní grampozitivní bakterie, která se průmyslově využívá pro produkci aminokyselin. V jejím genomu byly odhaleny čtyři geny kódující serin/ threoninové proteinkinázy eukaryotického typu, PknA, PknB, PknG a PknL. Jedná se o neesenciální, částečně redundantní proteiny, které se uplatňují v regulaci syntézy komponent buněčné stěny a buněčného dělení (SCHULTZ *et al.*, 2009). Proteinkinázy PknB a PknL jsou homologní k mykobakteriální PknB. Ve své extracelulární doméně nesou několik opakování PASTA domén.

Identifikovanými substráty jsou FtsZ, ligáza MurC, která je nezbytná pro biosyntézu peptidoglykanu a inhibitor 2-oxoglutarátdehydrogenázy protein Odhl (FIUZA *et al.*, 2008, SCHULTZ *et al.*, 2009).

## 2.6 Proteinkináza StkP u *S. pneumoniae*

*S. pneumoniae* se stal vhodným modelovým organizmem pro studium proteinkináz a proteinfosfatáz eukaryotického typu. Analýza genomové sekvence *S. pneumoniae* totiž odhalila přítomnost pouze jediného genu *stkP*, který je homologní s geny kódujícími ESTPK.

Tento gen se nachází v těsné blízkost genu *phpP* homologního se Ser/ Thr proteinfosfatázou typu PP2C.

V naší laboratoři byla proteinkináza StkP spolu s přilehlou fosfatázou PhpP detailně charakterizována. Jedná se o mangan dependentní kinázu, která se skládá z katalytické kinázové domény lokalizované v cytoplazmě, z transmembránové části a čtyř extracelulárních opakování PASTA domén (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2005). Bylo zjištěno, že StkP má schopnost autofosforylace a podléhá defosforylaci ze strany fosfatázy PhpP.

StkP není pro životaschopnost *S. pneumoniae* v laboratorních podmínkách esenciální. Fenotypový projev mutace *stkP* je ovšem velmi výrazný. Inaktivace genu *stkP* inzerční mutagenézí vede v nevirulentních kmenech k výraznému snížení až ztrátě přirozené kompetence a předčasné lyzi buněk. Ve virulentních kmenech je inaktivací narušena virulence a invaze bakterií přes epiteliální povrch hostitelských buněk (ECHENIQUE *et al.*, 2004).

Porovnáním hladiny genové exprese kmenů *S. pneumoniae*  $\Delta$ *stkP* a *S. pneumoniae* WT byly určeny geny, jejichž exprese je závislá na přítomnosti StkP. Bylo prokázáno, že StkP ovlivňuje expresi více než 4 % genů *S. pneumoniae*, čímž se řadí mezi proteiny s globální regulační funkcí. StkP hraje roli v pozitivní regulaci transkripce genů účastnících se tvorby buněčné stěny, biosyntézy pyrimidinu, opravy DNA, příjmu železa a rezistence ke stresovým podmínkám (zvýšená teplota, snížené pH, antibiotika, osmotický a oxidační stres) (SASKOVÁ *et al.*, 2007).

Mnohé recentní výzkumy se zabývají aktivačními molekulami jednotlivých proteinkináz. Prvním objeveným aktivačním signálem byly již výše zmíněné fragmenty peptidoglykanu, které spouští enzymatickou kaskádu proteinkinázy PrkC u *B. subtilis* (SHAH *et al.*, 2008). Nedávno byl podobný objev potvrzený i u StkP. Bylo zjištěno, že C-koncová extracelulární doména obsahující konzervované PASTA sekvence je schopna vázat  $\beta$ -laktamové antibiotikum ampicilin, stejně jako syntetické podjednotky peptidoglykanu a peptidoglykanové podjednotky izolované přímo z pneumokokových izolátů (MAESTRO *et al.*, 2011). Ukázalo se, že stejně jako u *B. subtilis* je vazba peptidoglykanu druhově specifická. Je pravděpodobné, že po navázání ligandu na sensorové PASTA domény dojde k dimerizaci proteinkinázy a následné autofosforylaci. Výsledkem je změna konformace a vazba substrátu. Stejný mechanismus závislý na dimerizaci a poté autofosforylaci aktivačních segmentů byl prokázán u Ser/ Thr proteinkináz u eukaryot (PIKE *et al.*, 2008).

Dimerizace proteinkinázy StkP byla potvrzena *in vivo* i *in vitro* pomocí BN-PAGE. Za dimerizaci je zodpovědná transmembránová část proteinu spolu s C-koncovou doménou (PALLOVÁ *et al.*, 2007).

### 2.6.1 Substráty proteinkinázy StkP

Proteinkináza StkP je vysoce konzervovaný protein u všech studovaných klinických izolátů *S. pneumoniae*. Navíc bylo prokázáno, že je dobrým imunogenním antigenem jak u dětí, tak u starších osob. Proto se stala důležitým kandidátem pro vývoj nové pneumokokové vakcíny (GIEFING *et al.*, 2008). Je ovšem důležité znát vnitrobuněčné regulační dráhy, které tento enzym ovlivňuje. Prvním krokem k lepšímu porozumění těchto signálních kaskád je identifikace substrátů StkP.

Dosud bylo objeveno šest substrátů: proteiny buněčného dělení FtsZ a DivIVA, fosfoglukozamin mutáza GlmM, regulátor RitR, hypotetický membránový protein Spr0334 a mangan-dependentní anorganická pyrofosfatáza PpaC (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010, NOVÁKOVÁ *et al.*, 2005, ULIJASZ *et al.*, 2008, GIEFING *et al.*, 2010). Je zajímavé, že proteiny RitR, DivIVA, Spr0334, PpaC a FtsZ, mají své homology u *S. agalactiae*, kde podléhají fosforylaci Ser/ Thr proteinkinázou Stk1 (RAJAGOPAL *et al.*, 2006; SILVESTRONI *et al.*, 2009; GIEFING *et al.*, 2010).

#### 2.6.1.1 FtsZ a DivIVA

Proteiny FtsZ i DivIVA jsou klíčovými hráči v buněčném dělení. FtsZ je fosforylován proteinkinázou StkP pouze *in vitro*, zatímco DivIVA byl identifikován jako substrát *in vivo* i *in vitro* (GIEFING *et al.*, 2010; NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010). Recentní studie ukazují, že rozmístění proteinkinázy StkP v buňce *S. pneumoniae* je závislé na fázi buněčného dělení. StkP je lokalizována do středu buňky spolu s FtsZ a doprovází tvorbu a konstrikci Z-kruhu (GIEFING *et al.*, 2010).

Jelikož je předmětem této diplomové práce právě fosforylace proteinu DivIVA proteinkinázou StkP a ovlivnění regulace buněčného dělení, jsou oba proteiny, DivIVA i StkP, podrobněji popsány v kapitolách 2.2.1.2 a 2.6.

#### 2.6.1.2 GlmM

Prvním objeveným substrátem proteinkinázy StkP *S. pneumoniae in vivo* byl protein fosfoglukozamin mutáza, GlmM. Pomocí kinázové reakce byl tento substrát potvrzen i *in vitro* (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2005).

GlmM katalyzuje první krok v biosyntetické dráze UDP-N-acetylglukozaminu, základního prekursoru komponent buněčné stěny jako je peptidoglykan, lipopolysacharidy a

teichoové kyseliny. Tento protein je široce rozšířený v bakteriální říši. V *E. coli* je nezbytný pro růst a je produkován v neaktivní defosforylované formě. Aktivní forma musí být fosforylována (MENGIN-LECREULX & HEIJENOORT, 1996).

#### 2.6.1.3 RitR

Jako další substrát proteinkinázy StkP *in vitro* byl identifikován transkripční regulátor RitR. Tento protein *S. pneumoniae* patří do rodiny CovR regulátorů s globálním dopadem (RAJAGOPAL *et al.*, 2006). Bývá označován jako „osiřelý“ regulátor, jelikož ve svém sousedním lokusu v genomu postrádá histidinovou doménu.

RitR je transkripční regulátor důležitý pro regulaci metabolismu železa v buňce. Ve své defosforylované formě funguje jako účinný represor genu *piu*, který kóduje transportér železa. Fosforylace enzymu pneumokokovou proteinkinázou StkP na C-koncové doméně způsobí jeho konformační změnu a následné uvolnění z operátoru. Transkripce už není inhibovaná a může probíhat (ULIJASZ *et al.*, 2004, ULIJASZ *et al.*, 2008).

Aby byla regulace aktivity tohoto represoru v rovnováze, musí podléhat i defosforylaci. Bylo zjištěno, že interaguje i se Ser/ Thr proteinfosfatázou PhpP. StkP a PhpP spolu o navázání RitR kompetují a oba jsou nezbytné pro expresi Piu transportéru (ULIJASZ *et al.*, 2008).

#### 2.6.1.4 PpaC

Funkce mangan-dependentní anorganické pyrofosfatázy PpaC je rovněž závislá na fosforylaci pneumokokovou proteinkinázou StkP. Ačkoliv byla prokázána fosforylace PpaC *in vivo*, interakce StkP a PpaC *in vitro* nebyla potvrzena (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010).

Pyrofosfatázy jsou esenciální enzymy, které katalyzují hydrolýzu anorganického pyrofosfátu na orthofosfát. Pyrofosfát (PPi) je tvořen především jako produkt mnoha biosyntetických reakcí, které využívají ATP a slouží také jako zdroj energie v těchto reakcích. PPi navíc reguluje řadu enzymů, jejichž aktivitu téměř vždy inhibuje. Proto má regulace koncentrace pyrofosfátu pyrofosfatázami zásadní význam pro metabolismus (LAHTI, 1983).

#### 2.6.1.5 Spr0334

Nejnověji identifikovaným substrátem proteinkinázy StkP *in vitro* je hypotetický membránový protein Spr0334, jehož funkce dosud nebyla objasněna. Nevykazuje ani výraznou homologii s žádnou známou proteinovou rodinou (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010). První výsledky naznačují jeho roli v buněčném dělení (NOVÁKOVÁ *et al.*, nepublikované výsledky).

Zajímavým faktem je, že u příbuzné bakterie *S. agalactiae* byl nalezen homologní protein SAK\_0375, který je rovněž fosforylován Ser/ Thr proteinkinázou Stk1 (SILVESTRONI *et al.*, 2009).



### 3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Vzhledem k tomu, že *S. pneumoniae* kóduje jedinou proteinkinázu eukaryotního typu StkP, je vhodným modelovým organizmem pro studium funkce proteinkináz v rámci bakteriální buňky. Srovnáním fosfoproteomických map divokého kmene *S. pneumoniae* Rx1 a *S. pneumoniae*  $\Delta$ *stkP* byl mimo jiné identifikován jako substrát proteinkinázy StkP protein DivIVA. Cílem této diplomové práce bylo objasnit vztah proteinkinázy StkP a proteinu buněčného dělení DivIVA a vliv fosforylace na vlastnosti a funkci DivIVA.

Za tímto účelem byly stanoveny následující úkoly:

1. Připravit vhodný vektor pro expresi genu *divIVA* v *E. coli*
2. Exprimovat a purifikovat rekombinantní protein DivIVA z *E. coli* a otestovat jeho fosforylaci proteinkinázou StkP *in vitro*
3. Připravit fosfoablativní mutanty DivIVA (mutageneze genu *divIVA* ve vektoru pETPhos1505) a otestovat jejich fosforylaci *in vitro*
4. Připravit fosfoablativní a fosfomimetické mutace genu *divIVA* v plazmidu určeném pro komplementaci *divIVA* delece ve *S. pneumoniae*
5. Ověřit expresi fosfoablativních a fosfomimetických mutant DivIVA *in vivo* a potvrdit jejich funkčnost analýzou fenotypu
6. Zjistit, zda dochází k oligomerizaci DivIVA *in vivo* a zda je oligomerizace ovlivněna fosforylací

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Bakteriální kmeny

##### 4.1.1.1 *ESCHERICHIA COLI*

***E. coli* BL21(DE3)** (Novagen): (F<sup>-</sup> ompT gal [dcm] [lon] hsdSB (rB- mB-) (DE3))

Použití: exprese proteinů s histidinovou kotvou

***E. coli* JM109** (Promega): recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rK -mk +), e14 (mcrA ), supE44, relA1, (lac-proAB)/F' [traD36, proAB +, lac I q, lacZ M15]

Použití: propagace plazmidových vektorů

##### 4.1.1.2 *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

***S. pneumoniae* Sp1** (Rx derivát, str1 hexA)

Použití: výchozí nevirulentní experimentální kmen

***S. pneumoniae* Sp5** (rif-23): nevirulentní kmen nese chromozomálně kódovanou rezistenci k rifampicinu

Použití: zdroj DNA pro testování indukované kompetence

***S. pneumoniae* Sp10** ( $\Delta$ stkP)

Použití: identifikace substrátů StkP

***S. pneumoniae* Sp26** ( $\Delta$ diIVA)

Použití: příprava kmenů s vloženým komplementačním konstruktem

#### 4.1.2 Plazmidy

**pETPhos1505** (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010): pETPhos je expresní a klonovací plazmid *E. coli* speciálně upravený pro studium substrátů Ser/ Thr proteinkináz (CANOVA *et al.*, 2008). pETPhos1505 má velikost 6475 pb a nese gen pro ampicilinovou rezistenci a gen *divIVA* pod indukibilním T7 promotorem. Byl použit pro expresi DivIVA s připojenou histidinovou kotvou. Aby nevznikala potenciální místa nespecifické fosforylace, neobsahuje linker spojující histidinovou kotvou s proteinem žádné seriny ani threoniny. Kotva může být odštěpena TEV proteázou.

**pTYB2** (NEB): Komerční expresní vektor pTYB2 má velikost 7474 pb a kóduje gen pro ampicilinovou rezistenci. Plazmid umožňuje fúzi rekombinantního proteinu na C-terminálním konci s inteinem nesoucím chitin vazebnou doménu (CBD) K odštěpení

inteinu se používá DTT, merkaptoetanol či cystein. Expresí cílových proteinů (v našem případě DivIVA) je pod kontrolou T7 IPTG-inducibilního promotoru.

**pEX-StkP-T** (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2005): Jedná se upravený vektor pET28b o velikosti 5369 pb. Plazmid kóduje gen pro kanamycinovou rezistenci, T7 IPTG inducibilní promotor a sekvenci kódující histidinovou kotvu fúzovanou s genem pro kinázovou doménu StkP. Tento plazmid byl použit pro expresi rekombinantní kinázové domény StkP s histidinovou kotvou v *E. coli*.

**pZn-DivIVA** (NOVÁKOVÁ L.; nepublikované výsledky): je plazmid připravený na základě vektoru pJWV25 (EBERHARDT *et al.*, 2009) o velikosti 8587 pb, který byl původně určen pro expresi proteinů fúzovaných s GFP ve *S. pneumoniae*. Tento vektor obsahuje inducibilní zinkový promotor a dvě sekvence (*gatC* a *bgaA*) homologní se sekvencí na chromozomu *S. pneumoniae*. Díky těmto sekvencím lze vektor použít k vložení konstruktů do postradatelného lokusu *bga* genomu *S. pneumoniae* homologní rekombinací. Selekcčním znakem vektoru je rezistence pro tetracyklin. Vektor byl použit k vložení komplementačního konstruktů  $P_{czcD}$ -*divIVA* do genomu *S. pneumoniae*.

### 4.1.3 Půdy a média

Množství jednotlivých přísad, pokud není uvedeno jinak, je udáváno na 1 litr média, doplňují se do celkového objemu destilovanou vodou a sterilizují se. Do pevných půd byl přidán 1,5 % agar. Selekcční půdy byly připraveny přidáním příslušného antibiotika v potřebné koncentraci (kanamycin 50 µg/ml; ampicilin 100 µg/ml; rifampicin 1 µg/ml; tetracyklin 2,5 µg/ml; chloramfenikol 5 µg/ml) do média vychlazeného na cca 45°C.

#### 4.1.3.1 Kultivace *E. coli*

**LB (Luria-Bertani médium):** trypton 10 g, yeast extrakt 5 g, NaCl 10 g, pH 7,5

**SOB:** trypton 20 g; yeast extract 5 g; NaCl 0,58 g; KCl 0,186 g;

po sterilizaci: 1 M MgCl<sub>2</sub> 10 ml; 1 M MgSO<sub>4</sub> 10 ml

#### 4.1.3.2 Kultivace *S. pneumoniae*

**CAT médium:** casitone (BD) 10 g; trypton 5 g; yeast extract 1g; NaCl 5 g

**CATcomplet médium (CATc):** na 1 litr CAT média bylo přidáno: 0,5 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 34 ml; 20 % glukóza 10 ml; pH 7,5

**CTM médium:** na 10 ml CATc média bylo přidáno: 0,1 M CaCl<sub>2</sub> 50 µl; 8 % BSA 0,25 ml; pH 7,8

**M17G médium** (Difco): 37,5 g M17, po sterilizaci přidat 10 ml 20 % glukózy

**TSB médium** (Difco)

**GELÓZA D (pevné médium):** glukóza 1 g; NaCl 5 g; neopeptone 5 g; Tris-base 1,25 g; casitone 10 g; agar 10 g

**KREVNÍ AGAR:** Columbia krevní agar (LabMediaServis)

#### 4.1.4 Pufry a roztoky

##### 4.1.4.1 Agarózová gelová elektroforéza

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

Loading dye 6x (Fermentas)

##### 4.1.4.2 Izolace chromozomální DNA *S. pneumoniae*

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

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

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

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

##### 4.1.4.3 Izolace plazmidové DNA *E. coli*

PEB I. roztok: 50 mM glukosa; 25 mM Tris; 10 mM EDTA; pH 8,0

PII roztok: 0,2 M NaOH; 1 % SDS

TE pufr: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8.0

##### 4.1.4.4 Přenos proteinů a imunodetekce

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

20 % metanol

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

##### 4.1.4.5 Příprava kompetentních buněk

TB pufr: 10 mM PIPES; 15 mM CaCl<sub>2</sub>; 250 mM KCl; sterilizace filtrací, poté přidáno MnCl<sub>2</sub> (výsl. konc. 55 mM); pH 6.7

##### 4.1.4.6 Purifikace proteinů

Proteázové inhibitory (Roche)

Ni-NTA Resin (QIAGEN)

Lyzační pufr 10 mM imidazol; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; pH 8

Promývací pufr 20 mM imidazol; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; pH 8

Eluční pufr 250 mM imidazol; 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300mM NaCl; pH 8

Dialyzační pufr 10x 250 mM Tris; 1 M NaCl; pH 7,5

Cleavage pufr 20 mM HEPES; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 50 mM DTT;  
vždy čerstvý

#### 4.1.4.7 SDS-PAGE

Vzorkový pufr 5x 350 mM Tris; 20 % glycerol; 15 % SDS; 25 %  $\beta$ -merkaptoetanol;  
bromfenolová modř; pH 6,8

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

Barvicí roztok 0,5 g Coomassie blue; 450 ml metanol; 100 ml kyselina octová; 450 ml  
destilovaná voda

Odbarvovací roztok 20 % kyselina octová; 10 % metanol

#### 4.1.4.8 BN-PAGE

Katodový pufr B 50 mM Tris; 7,5 mM imidazol; Coomassie blue G-250,  
0,2 %; pH 7

Katodový pufr B/10 50 mM Tris; 7,5 mM imidazol; Coomassie blue G-250  
0,002 %; pH 7

Anodový pufr 25 mM imidazo; pH 7

Gel pufr (3x) 75 mM imidazol; 1,5 M aminohexanová kyselina

Vzorkový pufr 0,1 % ponceau; 1 % kyselina octová

### 4.1.5 Chemikálie

<i>Chemikálie</i>	<i>Firma</i>	<i>Zkratka</i>
Adenosin-5 [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]trifosfát	ICN	[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP
Agaróza	Sevac	
Akrylamid	Sevac	
Ampicilin	Sigma	Amp
Bacto-agar	BD company	
Bacto-casitone	BD company	
Bromfenolová modř	Lachema	BPB
Coomassie blue R-250	Merck	
Competence Stimulating Peptide	Biopharm	CSP
2' - deoxyadenosin-5' -trifosfát	Promega	dATP
2' - deoxycytidin-5' -trifosfát	Promega	dCTP
2' - deoxyguanosin-5' -trifosfát	Promega	dGTP
2' - deoxythymidin-5' -trifosfát	Promega	dTTP
Dimethylsulfoxid	Sigma	DMSO

Dithiotreitol	Promega	DTT
Dodecylsulfát sodný	Serva	SDS
D-Glukosa	Lachema	
Gel red	Roche	
Glycin	Serva	
Hovězí sérový albumin frakce V	Roth	BSA
Chloramfenikol	Sigma	Cm
Imidazol	Lachema	
Izopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktozid	Sigma	IPTG
Kanamycin	Sigma	Kan
Kys. ethylenaminotetraoctová, dvojsodná sůl, p.a.	Serva	EDTA
6x Loading Dye Solution	Fermentas	
N,N'-methylenbisakrylamid	Serva	bisAA
Neopepton	Difco	
Peroxosíran amonný, p.a.	Lachema	APS
Ponceau	Serva	
Proteinasa K	Boehringer	
Rifampicin	Sigma	Rif
RNasa A	Promega	
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin	Serva	TEMED
Tetracyklin	Serva	Tet
Tris(hydroxymethyl)aminometan	Sigma	Tris base
Tryptone Peptone	Difco	
Tween 20	Sigma	
Yeast extract	BD company	YE

#### 4.1.6 Enzymy

##### 4.1.6.1 Modifikační enzymy

<i>Pfu</i> Ultra DNA polymeráza	Fermentas	
<i>Taq</i> polymeráza	Bioline	
Velocity polymerázy	Bioline	
T4 DNA ligáza	New England BioLabs (dále jen NEB), Fermentas	
Benzonáza	Merc	

#### 4.1.6.2 Restrikční enzymy

<i>PvuI</i>	NEB
<i>XhoI</i>	NEB
<i>NdeI</i>	NEB
<i>DpnI</i>	NEB

#### 4.1.7 Protilátky

**Monoclonal anti-polyhistidine peroxidase conjugate** - myší protilátka proti histidinové kotvě konjugovaná s křenovou peroxidázou (Sigma)

**Phospho-Threonine Antibody** - králičí polyklonální protilátka proti pThr (Cell Signalling Technology)

**Protilátka proti DivIVA** – králičí polyklonální protilátka proti DivIVA (FADDA *et al.*, 2007; dar O. Massida)

**Anti-Rabbit IgG peroxidase conjugate** - sekundární kozí protilátka proti králičím IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou (Sigma)

#### 4.1.8 Komerční soupravy a standardy

Min Elute<sup>TM</sup> Reaction Cleanup Kit (QIAGEN) – přečištění DNA

QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) – izolace DNA z agarózového gelu

QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (QIAGEN) – izolace plazmidové DNA

QuikChange<sup>®</sup> II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) – vytvoření bodové mutace

BCA Protein Assay (Pierce) – měření koncentrace proteinů

SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) – vyvolání chemiluminiscenčního signálu

1 kB DNA Ladder Plus – (NEB, Fermentas)

Prestained Protein Marker (NEB)

#### 4.1.9 Počítačová analýza

**Clonewin**: sestavování map klonovacích vektorů

**www.tigr.org** (The Institute for Genomic Research): informace o genomové sekvenci *S. pneumoniae*

#### 4.1.10 Použité oligonukleotidy

název	sekvence 5'-3'	použití
LN32 F	GCTCATCATGTTGATTGTCA	ověření integrace do <i>bgaA</i> chr. lokusu <i>S. pneumoniae</i>
LN89 F	CGGC <u>CATATG</u> CCAATTACATCATTAG	klonování <i>divIVA</i> do pTYB2 ( <i>NdeI</i> )
LN113 F	GGACAAGACTTTTGGAG <u>GCT</u> CGATTTCAGAGGTT	mutace Thr15 na Ala
LN114 R	AACCTCTGAATCG <u>AGC</u> TCCAAAAGTCTTGTCC	mutace Thr15 na Ala
LN124 F	GAACCAATTGATATG <u>GCA</u> CGTCAGTTCTCTC	mutace Thr201 na Ala
LN125 R	GGAGAAGCTGACG <u>TGCC</u> CATATCAATTGGTTC	mutace Thr201 na Ala
LN131 F	AAGGAGGCAAATATGCCAATTACATCAT TAGAAATAAA	ověření integrace kompl. konstruktů do chr. <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>
LN132 R	AAGGAGGCAAATATGCCAATTACATCAT TAGAAATAAA	ověření integrace kompl. konstruktů do chr. <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>
LN135 R	CGGC <u>CTCGAG</u> CTTCTGGTTCTTCATACAT TG	klonování <i>divIVA</i> do pTYB2 ( <i>XhoI</i> )
LN142 F	AGGACAAGAGTTTTTCTTTGG	ověření integrace kompl. konstruktů do <i>bga</i> lokusu chr. <i>S. pneumoniae</i>
LN151 F	GGACAAGACTTTTGGAG <u>GAA</u> CGATTTCAGAGGTT	mutace Thr15 na Glu
LN152 R	AACCTCTGAATCG <u>TTCT</u> TCCAAAAGTCTTGTCC	mutace Thr15 na Glu
LN153 F	GAACCAATTGATATG <u>GAA</u> CGTCAGTTCTCTC	mutace Thr201 na Glu
LN154 R	GAGAGAAGCTGACG <u>TTCC</u> CATATCAATTGGTTC	mutace Thr201 na Glu

Všechny oligonukleotidy byly objednány u firmy Metabion international AG. Označené sekvence oligonukleotidů označují změněné nukleotidové tripletty (oligonukleotidy určené pro mutagenезi) nebo sekvenci rozpoznávanou příslušnou restriční endonukleázou (oligonukleotidy určené ke klonování).



## 4.2 Metody

### 4.2.1 Manipulace s DNA

#### 4.2.1.1 Polymerázová řetězová reakce - PCR

Jedná se o metodu, která umožňuje rychle a vysoce selektivně namnožit určitou nukleotidovou sekvenci obsaženou v jakékoliv DNA. Ze znalosti sekvence DNA, kterou chceme amplifikovat, jsou odvozeny a navrženy dva oligonukleotidy na opačných koncích požadované sekvence. Tyto oligonukleotidy ohraničují amplifikovaný úsek a slouží jako primery pro *in vitro* syntézu DNA pomocí DNA polymerázy. Celá reakce probíhá ve třech na sebe navazujících krocích: denaturace, hybridizace primerů a elongace. V průběhu denaturace dochází díky krátkodobému zvýšení teploty k oddělení obou řetězců od sebe. Ve druhé fázi připravené oligonukleotidy nasedají na komplementární sekvenci DNA. Podmínkou je ovšem ochlazení reakčního roztoku. Poslední krok představuje samotnou syntézu příslušného úseku DNA z primerů za přítomnosti deoxyribonukleosidtrifosfátů a termostabilní DNA-dependentní DNA polymerázy. Díky teplotní stabilitě DNA polymerázy izolované z termofilních bakterií může probíhat více amplifikačních cyklů za sebou.

Pro správný průběh reakce je nutné zvolit pufr s požadovanou koncentrací hořčičných iontů. Aby docházelo k přesné hybridizaci primerů s komplementárním úsekem DNA, musí se určit správná teplota ( $T_m$ ) tohoto kroku.  $T_m$  se odvozuje od složení obou oligonukleotidů podle vzorce:  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ ;  $T_m$  (°C); G, C, A, T – počet jednotlivých bází v oligonukleotidu.

#### ***PCR s PfuUltra a Velocity polymerázou***

Tyto polymerázy byly použity pro reakce, kdy jsme potřebovali co nejpřesnější amplifikaci daného fragmentu. *PfuUltra* polymeráza byla použita pro amplifikaci genu *divIVA*. Reakční podmínky byly stanoveny podle pokynů výrobce této polymerázy (Stratagene). PCR směs obsahovala 200 ng templátové DNA; 2,5 každého oligonukleotidu (10  $\mu$ M); 1  $\mu$ l dNTP (10 mM); 10  $\mu$ l 5x reakčního pufru; 0,5  $\mu$ l *PfuUltra* polymerázy (0,5 U) a H<sub>2</sub>O pro doplnění do celkového objemu 50  $\mu$ l. Amplifikace probíhala v 25 cyklech za následujících podmínek: počáteční denaturace 98°C 30 s, denaturace 98°C 10 s, připojení primerů 52°C 30 s, elongace 72°C 1,5 min. Závěrečná elongace probíhala při 72°C 10 min. Amplifikace genu *divIVA* pomocí *Velocity* polymerázy probíhala podobně. Opět jsme se řídili návodem od výrobce (Bioline).

Polymerázy *PfuUltra* a *Velocity* jsme používali také pro zavádění mutací do genu pro DivIVA (kapitola 4.2.6).

#### ***PCR s LA polymerázou***

Tento typ PCR jsme použili pro ověřování vložení požadovaného DNA fragmentu na určené místo ve správné orientaci. Standardně tato reakce probíhala podle návodu výrobce LA polymerázy (TopBio). PCR směs obsahovala 200 ng templátové DNA (chromozomální DNA *S. pneumoniae*); 2,5 každého oligonukleotidu (10  $\mu$ M); 1  $\mu$ l dNTP (10 mM); 5  $\mu$ l 10x reakčního pufru; 1  $\mu$ l DMSO; 0,5  $\mu$ l LA polymerázy (0,5 U) a H<sub>2</sub>O pro doplnění do celkového objemu 50  $\mu$ l. Amplifikace probíhala ve 25 cyklech za následujících podmínek: počáteční denaturace 95 °C 1 min, denaturace 95°C 30 s, připojení primerů 50°C 30 s, elongace 68°C 3 min. Závěrečná elongace probíhala při 68°C 10 min.

#### ***PCR reakce na koloniích E. coli***

Tato reakce byla použita při ověřování vložení požadovaného DNA fragmentu na určené místo ve správné orientaci. PCR probíhala za přítomnosti *Taq* polymerázy. Reakční podmínky byly zachovány podle pokynů výrobce (Bioline). Templátová DNA byla do reakce nanášena sterilním párátkem jako celá kolonie narostlá na misce s pevným agarem. K narušení struktury buněčné stěny a zahájení lyze buněk došlo díky přidání 2,5  $\mu$ l 10 % Tweenu 20 do reakční směsi o celkovém objemu 25  $\mu$ l.

#### 4.2.1.2 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Restrikční endonukleázy (RE) jsou enzymy rozeznávající specifické sekvence dvouřetězcové DNA (dsDNA), kterou štěpí v obou vláknech za vzniku fragmentů s přesně definovanými konci. Ke své činnosti nepotřebují přítomnost ATP a kromě štěpení substrátovou DNA nijak nemodifikují.

Při práci s RE jsme se řídili pokyny od výrobce a používali jsme doporučené pufrы (NEB). Štěpení DNA dvěma různými enzymy probíhalo buď jednofázově, nebo postupně jednou a posléze druhou restriktaázou. Toho bylo využito zejména tehdy, pokud nemohl být použit společný pufr. Pokud bylo potřeba, byly fragmenty před restrikcí přečištěny pomocí kitu Min Elute<sup>TM</sup> Reaction Cleanup Kit (QIAGEN).

#### 4.2.1.3 Ligace

Spojování jednotlivých fragmentů DNA umožňují specifické ATP-dependentní enzymy – ligázy. Ligace standardně probíhala v konečném objemu 20  $\mu\text{l}$  při pokojové teplotě za použití T4 DNA ligázy. Reakční podmínky byly dodrženy podle návodu od výrobce (Fermentas, NEB).

#### 4.2.1.4 Agarózová gelová elektroforéza

Jednu z nejpraktičtějších a nejběžněji používaných metod vhodnou pro separaci makromolekul představuje právě agarózová gelová elektroforéza. Principem je rozdílná elektroforetická pohyblivost dělených molekul. Rychlost pohybu fragmentů v agarózovém poli je závislá na molekulové hmotnosti a konformaci DNA, koncentraci gelu, použitém napětí a složení elektroforetických roztoků. Velikost fragmentů je odvozena prostým srovnáním se standardem.

DNA jsme analyzovali použitím horizontální agarózové elektroforézy a pufru TAE. Do gelu jsme přidali barvu Gel Red, která nám umožnila detekci DNA fragmentů v UV světle. Vzorky DNA o standardním finálním objemu 30  $\mu\text{l}$  jsme nanesli rozpuštěné v 5  $\mu\text{l}$  6x Loading Dye Solution (Fermentas). Separace DNA fragmentů probíhala při napětí 5  $\text{V}/\text{cm}^2$ .

Fragmenty DNA separované v agarózovém gelu jsme izolovali pomocí komerční soupravy Gel Extraction Spin Kit (QIAGEN) podle pokynů od výrobce.

### 4.2.2 Manipulace s proteiny

#### 4.2.2.1 SDS-polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)

Jedná se o běžnou metodu umožňující rozdělení proteinů v elektrickém poli podle jejich molekulové velikosti. Zkoumaný vzorek proteinů byl před nanesením inkubován 10 min při 100°C se vzorkovým pufrům obsahujícím SDS (dodecylsulfát sodný). Pomocí SDS byly proteiny denaturovány a získaly stejný záporný náboj na jednotku hmoty. Mohly se tak v polyakrylamidovém gelu rozdělit pouze v závislosti na své molekulové hmotnosti. Elektroforéza probíhala v přístroji ATTO při napětí 15  $\text{V}/\text{cm}^2$  ve 4 % zaostřovacím gelu a 12 % separačním gelu. Složení gelů je uvedeno v následující tabulce (tabulka 4-2).

gel	10% akrylamid	1,5 M Tris pH 8,8	0,5 M Tris pH 6,8	10% SDS	H <sub>2</sub> O	TEM ED	0% APS	celkový objem
separační 12%	5,6 ml	3,5 ml	-	140 µl	4,7 ml	8 µl	80 µl	14 ml
zaostřovací 4%	0,53 ml	-	1 ml	40 µl	2,5 ml	5 µl	50 µl	4 ml

**Tab. 4-2: Složení gelů na SDS-PAGE**

#### 4.2.2.2 Modrá nativní polyakrylamidová elektroforéza (BN-PAGE)

Modrá nativní polyakrylamidová elektroforéza patří mezi separační metody, které umožňují rozdělit proteinové komplexy v enzymaticky aktivním stavu. Princip separace je založen na interakci s barvou Coomassie blue G250, která se k vzorku přidává a vytváří negativní náboj na povrch proteinu. Během migrace k anodě se proteiny separují částečně na základě svojí hmotnosti, ale především dle svého objemu (protein není denaturován). BN-PAGE jsme využívali ke zjišťování schopnosti oligomerizace proteinu DivIVA.

Používali jsme gradientový separační gel (4 % - 16 % akrylamidový gel) a zaostřovací gel. Vzorky jsme připravovali podle publikovaného protokolu (VITTIG *et al.*, 2006). Elektroforéza probíhala v přístroji ATTO v katodovém a anodovém pufu (kapitola 4.1.4.8). Při migraci vzorků zaostřovacím gelem byl použit proud 100 V, později 15 mA/max. 500 V. Složení gelů je uvedeno v tabulce 4-3.

gel	AB – 3 mix	Gel buffer 3x	H <sub>2</sub> O	glycerol	TEMED	10 % APS	celkový objem
separační 4 %	1,5 ml	6 ml	10,4 ml	-	10 µl	100 µl	18 ml
separační 16 %	4,8 ml	5 ml	3 ml	3,8 ml	7,5 µl	75 µl	15 ml
zaostřovací	0,44 ml	2 ml	3,4 ml	-	10 µl		6 ml

**Tab. 4-3: Složení gelů na BN-PAGE**

#### 4.2.2.3 Barvení proteinů na separačním gelu

Proteiny v separačním polyakrylamidovém gelu byly po 30 min barveny roztokem, který obsahoval barvu Coomassie Blue R250. Následně byl gel odbarvován odbarvovacím roztokem a naskenován.

#### 4.2.2.4 Měření koncentrace proteinů

Koncentraci proteinů jsme stanovovali použitím komerční soupravy BCA Protein Assay Reagent (Pierce). Tato metoda umožňuje kolorimetricky stanovit koncentraci proteinů. Při přípravě vzorků pro měření koncentrace byly zachovány pokyny výrobce, reakce probíhala 30 min při 37°C.

Nejprve jsme si podle pokynů od výrobce vytvořili kalibrační křivku z BSA, která obsahovala různé známé koncentrace tohoto proteinu (0-20-40-60-80-100 µg proteinu). Míru vzniklého modrofialového zabarvení jsme měřili jako absorbanci při vlnové délce 562 nm. Z grafu závislosti koncentrace BSA na absorbanci jsme získali regresní přímku, podle které jsme mohli vypočítat koncentraci proteinu v našich vzorcích. Při měření jsme postupovali podle pokynů výrobce.

#### 4.2.2.5 Přenos proteinů na membránu („Western blotting“)

Prvním krokem imunodetekce proteinů je přenos těchto proteinů ze separačního akrylamidového gelu na PVDF membránu Immobilon-P (Millipore). Membrána byla nejprve aktivována smočením v metanolu. Přenos probíhal v blotovacím pufu (kapitola 4.1.4.4) 60 min při 250 mA. Používali jsme přístroj The Mini Trans-Blot<sup>®</sup> (BioRad) a při sestavování jsme se řídili pokyny výrobce.

#### 4.2.2.6 Imunodetekce proteinů

Fosforylované proteiny jsme detekovali primární polyklonální králičí protilátkou proti pThr a sekundární kozí protilátkou proti králičím IgG, která je konjugovaná s křenovou peroxidázou. V případě detekce DivIVA jsme používali králičí polyklonální protilátku a sekundární kozí protilátku konjugovanou s křenovou peroxidázou proti králičím IgG. Pro imunodetekci histidinové kotvy jsme použili monoklonální myší protilátku proti poly-His také konjugovanou s křenovou peroxidázou.

K vyvolání signálu jsme použili komerční soupravu SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce). Křenová peroxidáza v přítomnosti peroxidu štěpí luminal, výsledkem je signál zachytitelný rentgenovým filmem, který po vyvolání umožňuje identifikovat polohu zkoumaných proteinů.

Při imunodetekci pThr byl dodržován následující postup:

1. blokace proteinů na membráně, 30 min v 3 % BSA v TBS-T ,
2. inkubace s primární protilátkou (ředění 1: 2 000) v 1 % BSA v TBS-T, přes noc při 4°C,
3. promytí 3 x 10 minut v TBS-T

4. inkubace se sekundární protilátkou (ředění 1: 5 000) v TBS-T 1 hodinu
5. promytí 3 x 10 minut v TBS-T
6. vyvolání signálu pomocí komerční soupravy dle návodu od výrobce
7. detekce signálu na rentgenový film

Při imunodetekci poly-His byl dodržován obdobný postup jako již popsany, pouze s následujícími modifikacemi. Membrána byla blokována v 3 % BSA v TBS-T přes noc při 4°C, dále probíhala inkubace 1 hodinu s primární protilátkou (ředění 1:20000) proti poly-His konjugované s peroxidázou v 1 % BSA/TBS-T, další kroky zůstávají nezměněné.

Princip imunodetekce DivIVA je stejný, postup opět pouze lehce upravený. Proteiny byly blokovány 30 min v 5 % BSA v TBS-T, inkubace s primární protilátkou probíhala při 4°C přes noc (ředění 1: 10000 – 20000), se sekundární protilátkou trvala 1 hodinu při pokojové teplotě (ředění 1: 10000).

### **4.2.3 Manipulace s *E. coli***

#### 4.2.3.1 Kultivace *E. coli*

Kultivace *E. coli* probíhala v LB médiu při 37°C za stálého třepání, tak aby se kultura okysličovala v celém svém objemu. Při kultivaci na pevném médiu jsme použili LB médium s 1,5 % agarem, kulturu jsme inkubovali také při 37°C. Selektivních vlastností půd jsme dosáhli přidáním ATB v příslušné koncentraci.

#### 4.2.3.2 Příprava kompetentních buněk *E. coli* JM109

Kompetentní buňky *E. coli* JM109 potřebné pro vysokou účinnost transformace jsme připravovali metodou podle (INOUE *et al.* 1990). 100 ml půdy SOB jsme inokulovali 400 µl bakteriální kultury ve stacionární fázi a kultivovali při 20°C za intenzivního třepání (250 ot/min). Jakmile kultura dosáhla  $OD_{600} = 0,6$ , byla kultivace přerušena a buňky jsme inkubovali 10 min na ledu. Po centrifugaci (10 min, 2500 g, 4°C) jsme buňky resuspendovali v 32 ml ledového pufru TB. Suspenzi jsme ochladili 10 min na ledu a centrifugovali (10 min, 2500 g, 4°C). Buňky jsme resuspendovali v 8 ml pufru TB, přidali jsme DMSO do konečné koncentrace 7 % a nechali 10 min stát na ledu. Suspenze jsme rozdělili po 100 µl do mikrozkušavek a zamrazili v kapalném dusíku. Kompetentní buňky jsme uchovávali při – 80°C.

#### 4.2.3.3 Příprava kompetentních buněk *E. coli* BL21

Kompetentní buňky *E. coli* jsme připravovali vždy čerstvě. Z čerstvě narostlé kultury jsme zaočkovali do LB média na OD 0,05 a nechali narůst do OD 0,6. 1 ml kultury jsme stočili (2 min, 3300 g), pelet jsme dvakrát promyli 1 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> a nakonec resuspendovali ve 100 µl 100 mM CaCl<sub>2</sub>.

#### 4.2.3.4 Transformace DNA do buněk *E. coli*

Využívali jsme metodu teplotního šoku, díky kterému je usnadněn průchod DNA bakteriální stěnou.

Kompetentní buňky jsme pomalu na ledu rozmrazovali a přidali k nim buď čistou plazmidovou DNA, nebo ligační směs. Vše jsme opatrně promíchali a inkubovali 30 min na ledu. Následoval teplotní šok: 1,5 min při 42°C a 1,5 min na ledu. K buněčné suspenzi jsme přidali 900 µl LB média a kultivovali buňky 1 hod při 37°C ve vodní lázni (kultivace zabezpečí plnou expresi rezistence k antibiotiku). Po inkubaci jsme suspenzi vyseli na pevné LB médium s příslušným ATB.

#### 4.2.3.5 Izolace plazmidové DNA

Pokud nebyla požadována vysoká čistota plazmidu, izolovali jsme plazmid metodou alkalické lyze. Princip této metody spočívá v denaturaci DNA v alkalickém prostředí následované rychlou renaturací molekul. Plazmidová „ccc“ (z angl. covalently close circle) forma DNA renaturuje rychleji než chromozomální DNA a proteiny, proto mohou být proteiny a chromozomální DNA po precipitaci s SDS a acetátem draselným z roztoku odstraněny centrifugací.

Izolovanou kolonií jsme zaočkovali 2 ml LB média s antibiotikem a nechali narůst přes noc. Narostlou kulturu jsme stočili (3 min, 16100 g) a pelet jsme důkladně resuspendovali ve 100 µl roztoku PEBI. Dále jsme přidali 200 µl roztoku PII a opatrně promíchali překlápěním. V tomto kroku došlo k lyzi buněk a denaturaci genomové DNA, plazmidová DNA zůstala díky své konformaci nepoškozená. Reakci jsme nechali 5 min při laboratorní teplotě. Po přidání 150 µl 3 M acetátu draselného jsme vše opět šetrně promíchali a inkubovali 10 min na ledu. Po centrifugaci (10 min, 13 000 rpm) jsme odebrali supernatant obsahující plazmidovou DNA a RNA a přidali k němu izopropanol. Směs jsme stočili (10 min, 16100 g). Pelet s vysráženou plazmidovou DNA a RNA jsme promyli 80% etanolem a vysušili. Pelet jsme resuspendovali ve 20 µl TE pufru s RNázouA. Došlo k rozpuštění plazmidové DNA a k degradaci RNA.

Pro získání DNA ve vysoké čistotě jsme používali komerční soupravu QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (QIAGEN) a dodržovali jsme pokyny od výrobce.

#### 4.2.3.6 Exprese a purifikace proteinů

##### ***pET systém***

LB médium s ampicilinem jsme zaočkovali čerstvým inokulem kmene *E. coli* BL21 nesoucím plazmid pET28b anebo pETPhos s příslušným genem na výslednou  $OD_{600} = 0,05$ . Buňky jsme kultivovali při 37°C do  $OD_{600}=0,6$ . V kultuře byla následně indukována exprese proteinu přidáním IPTG na výslednou koncentraci 1 mM. Před indukcí jsme odebrali vzorek kultury. Kultura byla inkubována další 3 hodiny při teplotě 30°C. Během této doby jsme opět odebírali vzorky kultury. Po ukončení kultivace jsme kulturu stočili (5 min, 5 000 g) a získaný buněčný pelet jsme dvakrát promyli v 10 ml pufru (25 mM Tris; 100 mM NaCl; pH 7,5) s proteázovými inhibitory (Roche).

Hlavní metodou využívanou v průběhu purifikace byla afinitní chromatografie, která umožňuje z roztoku s velkým množstvím proteinů připoutat vybraný protein na nosič pomocí kotvy. Ostatní proteiny jsou během jednotlivých promývacích kroků vyplaveny. Zvolený protein je pak možné z nosiče uvolnit, a tím získat roztok obsahující z většinové části příslušný protein. Ve vektoru pETPhos jsou proteiny fúzované s histidinovou kotvou.

Buněčný pelet jsme resuspendovali v promývacím pufru a buňky rozbili pomocí přístroje mini French<sup>®</sup> Pressure Cell Press (*SLM instruments, Inc.*). Odebrali jsme vzorek celkového lyzátu na SDS-PAGE. Dále jsme stočili nerozbité buňky (5 min, 6 000 rpm) a supernatant použili pro další purifikaci. Supernatant jsme centrifugací (15 min, 13 000 rpm, 4°C) zbavili inkluzí a membrán a rozpustnou frakci jsme použili pro další purifikaci.

Proteiny s histidinovou kotvou jsme izolovali pomocí afinitní chromatografie za použití nosiče asociovaného s niklem (Ni-NTA Resin (QIAGEN)) a řídili jsme se pokyny výrobce. Navázání na nosič probíhalo v lyzačním pufru, ostatní proteiny jsme odmyli pomocí promývacího pufru, navázaný protein jsme z nosiče získali elučním pufrům s vysokou koncentrací imidazolu (kapitola 4.1.4.6). Tím došlo k vytěsnění proteinu na základě podobnosti heterocyklického kruhu imidazolu s histidinem v kotvě. Purifikované proteiny jsme dialyzovali proti dialyzačnímu pufru a zamrazili v 5 % glycerolu v -20°C.



### ***pTYB systém***

Plazmid pTYB2 umožňuje fúzi rekombinantního proteinu na C-konci s inteinem obsahujícím chitin vazebnou doménu. Ta slouží k purifikaci proteinu pomocí afinitní chromatografie. Čerstvé inokulum *E. coli* BL21 nesoucí pTYB2 s genem *divIVA* jsme zaočkovali do LB média s ampicilinem na výslednou  $OD_{600}=0,05$ . Buňky jsme kultivovali při 30°C na konečnou  $OD_{600}=0,6$ . Exprese proteinu DivIVA fúzovaného s inteinem byla indukována přidáním IPTG na výslednou koncentraci 0,3 mM a probíhala přes noc při 18°C. Po ukončení exprese jsme kulturu stočili a získaný pelet dvakrát resuspendovali (viz exprese ve vektoru pETPhos).

Afinitní chromatografie byla využita i u izolace proteinu DivIVA fúzovaného s inteinovou kotvou. DivIVA jsme izolovali pomocí nosiče s chitinem navázaným na magnetických kuličkách (IMPACT<sup>TM</sup>-CN (NEB)). Řídili jsme se pokyny od výrobce. Navázání proteinu probíhalo v lyzačním pufru, ostatní proteiny jsme promyli promývacím pufrům. Odštěpení inteinové kotvy bylo indukováno čerstvě připraveným štěpícím pufrům obsahujícím DDT (Cleavage buffer). Proteiny jsme eluovali štěpícím pufrům bez DDT. Purifikovaný protein jsme poté dialyzovali a zamrazili (viz purifikace pET systém).

## **4.2.4 Manipulace se *S. pneumoniae***

### 4.2.4.1 Kultivace *S. pneumoniae*

*S. pneumoniae* jsme kultivovali stacionárně při 37°C v komplexním médiu CAT<sub>C</sub>, TSB nebo M17. Konzervy *S. pneumoniae* jsme připravovali následujícím způsobem: do 10 ml média CAT<sub>C</sub> jsme zaočkovali 200 µl kultury *S. pneumoniae* ( $OD_{600}=0,5$ ) a nechali růst do  $OD_{600}=0,5$ , poté jsme kulturu rozdělili po 1 ml a zamrazili po přidání 15 % glycerolu v -80°C.

### 4.2.4.2 Izolace chromozomální DNA

10 ml komplexního média jsme inokulovali 200 µl kultury *S. pneumoniae* a inkubovali při 37°C do  $OD_{600}=0,5$  (exponenciální fáze). Po centrifugaci (10 min, 7780 g, 4°C) jsme buňky promyli pufrům (10 mM Tris-HCl, pH 7,5) a opět centrifugovali (10 min, 4060 g, 4°C). Buňky jsme resuspendovali v roztoku SEDS a inkubovali při 37°C, dokud nedošlo k lyzi kultury. K lyzátu jsme přidali proteinázu K (2 mg/ml), buněčnou suspenzi jsme inkubovali 15 min při 56°C. Přidali jsme 250 µl TE pufru a následovala extrakce směsí fenol-chloroform (v poměru 1:1). Směs jsme centrifugovali (10 min, 4060 g, při pokojové teplotě). Odebrali jsme horní (vodnou) fázi. Počet extrakcí závisel na množství mezifáze. Nakonec jsme suspenzi extrahovali samotným chloroformem. Chromozomální

DNA jsme precipitovali přidáním 0,1 objemu 3 M NaOAc a 0,6 objemu izopropanolu. Chromozomální DNA se v roztoku vysrážela. Poté jsme ji promyli 80 % etanolem a nechali oschnout na vzduchu do zblednutí. Chromozomální DNA jsme nechali přes noc rozpouštět v TE pufru s RNázou (20 µg/ml).

#### 4.2.4.3 Transformace *S. pneumoniae*

Do 10 ml média CTM jsme zaočkovali 200 µl kultury *S. pneumoniae* z konzervy a nechali narůst při 37°C do  $OD_{600}=0,1$ . Poté jsme z této kultury odebrali 1 ml, ke kterému jsme přidali 250 ng CSP a 200 ng plazmidové DNA (určené k transformaci). Celou směs jsme inkubovali 30 min při 30°C a 1 hod při 37°C. Kulturu jsme naředili a vyseli na misky s gelózou a příslušným ATB. Jako pozitivní kontrolu a pro testování transformační účinnosti jsme použili chromozomální DNA z kmene Sp5, který nese rezistenci na rifampicin. Vyseli jsme ředění  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$  na gelózu s rifampicinem a  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  na gelózu bez ATB. Z poměru získaných transformantů na miskách s ATB ku všem narostlým koloniím na miskách bez ATB jsme vypočítali transformační účinnost.

#### 4.2.4.4 Exprese DivIVA ve *S. pneumoniae*

Do 50 ml komplexního média jsme zaočkovali 1 ml kultury kmene *S. pneumoniae*  $OD_{600}=0,5$ . Zinek indukující expresi DivIVA nebo mutantních forem DivIVA byl přidán do média M17G na začátku kultivace v koncentracích 0 mM; 0,05 mM; 0,1 mM a 0,15 mM; 0,2 mM a 0,25 mM  $ZnCl_2$ . Buňky byly stacionárně kultivovány při 37°C do  $OD_{600}=0,5$ . Poté jsme kulturu stočili (5 min, 7000 g) a pelet resuspendovali v 1 ml pufru (25 mM Tris; 100 mM NaCl; pH 7,5). Buňky jsme rozbili skleněnými kuličkami pomocí přístroje Fast Prep (5 x 25 s, rychlost 4,5). Nerozbité buňky jsme stočili (10 min, 10 000 g) a v supernatantu jsme změřili koncentraci proteinů. Proteiny jsme rozdělili na SDS-PAGE a poté jsme provedli přenos proteinů na membránu a imunodetekci.

### 4.2.5 Kinázová reakce *in vitro*

#### 4.2.5.1 Detekce fosforylace imunodetekcí

Fosforylační reakce *in vitro* byly realizovány v konečném objemu 20 µl. Základní reakční směs obsahovala 25 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 5 mM  $MnCl_2$ ; 5 mM  $MgCl_2$ , 10 µM ATP. Bylo použito cca 0,5 – 2 µg DivIVA a StkP-KD (kinázová doména StkP). Reakce byla zahájena přidáním ATP a probíhala 30 minut při 37°C. Přidáním 5x SDS-vzorkového pufru došlo k ukončení reakce. Proteiny byly separovány v 12 % SDS-

PAGE a poté přeneseny na PVDF membránu Western blottem. Fosforylace byla detekována imunodetekcí protilátkou proti pThr.

#### 4.2.5.2 Detekce fosforylace radioaktivním značením

Reakční směs radioaktivně značené kinázové reakce *in vitro* byla stejného složení jako při detekci fosforylace imunodetekcí. Pouze ATP v každé reakci obsahovalo navíc 1  $\mu\text{Ci}$   $^{32}\text{P}$ -ATP. Reakce probíhala za stejných podmínek jako v případě detekce fosforylace imunodetekcí. Proteiny byly separovány SDS-PAGE, gel byl barven v Coomasie Blue a po odbarvení byl založen do kazety s citlivou fólií na 3 dny.

#### 4.2.6 Mutageneze

Při zavádění záměn aminokyselin do genu pro DivIVA jsme používali metodu tzv. mutagenní PCR. Postupovali jsme podle pokynů výrobce komerční soupravy QuikChange<sup>®</sup> II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Základem byl vektor s genem *divIVA* a dva oligonukleotidové syntetické primery s požadovanou mutací (tabulka 4-4). Každý primer byl komplementární k opačnému vlákně vektoru. K amplifikaci byla použita polymeráza *PfuUltra* nebo *Velocity*. V každém cyklu byl syntetizován celý plazmid.

PCR směs obsahovala 25 – 50 ng templátové DNA (pETPhos1505 nebo pZn-DivIVA), 125 ng každého oligonukleotidu; 1  $\mu\text{l}$  dNTP (10 mM); 5  $\mu\text{l}$  10x reakčního pufru; 0,5 - 1  $\mu\text{l}$  polymerázy (1 U) a  $\text{H}_2\text{O}$  do celkového objemu 50  $\mu\text{l}$ . Amplifikace s *PfuUltra* polymerázou probíhala v 16 cyklech za následujících podmínek: denaturace 95°C 30 s, připojení primerů 55°C 1 min, elongace 68°C 7 min. Amplifikační program s *Velocity* polymerázou byl obdobný pouze s malými změnami. Elongace probíhala 5 min při teplotě 72°C.

Produkt PCR reakce byl poté štěpen enzymem *DpnI*. Endonukleáza *DpnI* specificky štěpí metylovanou a hemimetylovanou DNA (5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3') a byla použita pro štěpení templátového vlákna. V PCR směsi tak zůstala pouze DNA, která obsahovala mutaci.

mutace	nukleotidová záměna	sekvence oligonukleotidu	název primeru
T15A	ACC→GCA	GGACAAGACTTTTGGAG <u>GCT</u> CGATTTCAGAGGT	LN113 F
		T	
		AACCTCTGAATCG <u>AGCT</u> CCAAAAGTCTTGTC	LN114 R
T15E	ACC→GAA	GGACAAGACTTTTGGAG <u>GAA</u> CGATTTCAGAGGT	LN151 F
		T	
		AACCTCTGAATCG <u>TTCT</u> CCAAAAGTCTTGTC	LN152 R
T201A	ACC→GCA	GAACCAATTGATATG <u>GCA</u> CGTCAGTTCTCTC	LN124 F
		GGAGAACTGACG <u>TGCC</u> CATATCAATTGGTTC	LN125 R
T201E	ACC→GAA	GAACCAATTGATATG <u>GAA</u> CGTCAGTTCTCTC	LN153 F
		GAGAGAACTGACG <u>TTCC</u> CATATCAATTGGTTC	LN154 R

**Tab. 4-4: Oligonukleotidy použité na mutagení PCR**

#### 4.2.7 Mikroskopie

Morfologii bakteriálních buněk *S. pneumoniae* jsme sledovali pomocí mikroskopu Olympus BX-60. Využívali jsme olejový imerzní objektiv UPlanApo 100x/ 1,35 Oil Iris a diferenciální interferenční kontrast (DIC) podle Nomarského. Fotografie byly pořízeny pomocí kamery Fluoview a upraveny v grafickém editoru AnalySIS.

Při přípravě preparátu z bakterií napěstovaných na miskách s Columbia krevním agarem jsme zachovávali následující postup. Bakteriální kulturu jsme nabrali sterilní kličkou a resuspendovali ji v 10 µl TSB média. Vzorek jsme smíchali s 10 ul 1 % agarózy rozpuštěné ve sterilní vodě a poté jsme 2 µl vzorku nanесли na podložní sklíčko a přikryli krycím sklíčkem.

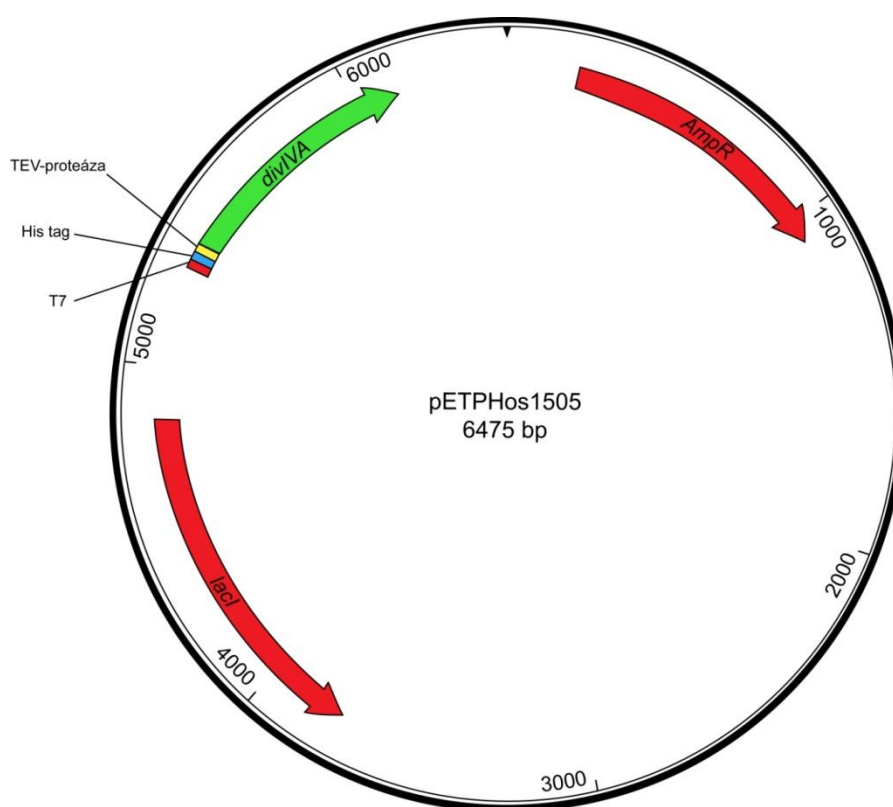
Příprava preparátu *S. pneumoniae* z tekuté kultury probíhala obdobně. Narostlou kulturu jsme naředili na OD<sub>600</sub> 0,5/ ml a centrifugovali ji 5 min při 6000 rpm. Odsáli jsme 950 µl média. Pelet jsme resuspendovali ve zbylých 50 µl média. 10ul kultury jsme smíchali s 10 ul 1 % agarózy. Na podložní sklíčko jsme nanесли 2 µl kultury a přikryli krycím sklíčkem.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Expres a purifikace rekombinantního DivIVA

Abychom mohli potvrdit, zda je DivIVA skutečným substrátem této Ser/ Thr proteinkinázy, byl v naší laboratoři připraven vektor pETPhos1505 (obr. 5-1), který nám umožnil expresi DivIVA a jeho následnou izolaci (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2005).

K přípravě rekombinantního vektoru pETPhos1505 byl použit klonovací a expresní plazmid pETPhos, který je určen pro studium substrátů Ser/ Thr proteinkináz (CANOVA *et al.*, 2008). Gen *divIVA* byl vložen pod T7 inducibilní promotor tak, že na N-konci byla k proteinu připojena histidinová kotva (6x His; His tag). Ta slouží k purifikaci DivIVA pomocí afinitní chromatografie. V případě potřeby může být kotva odštěpena TEV proteázou.

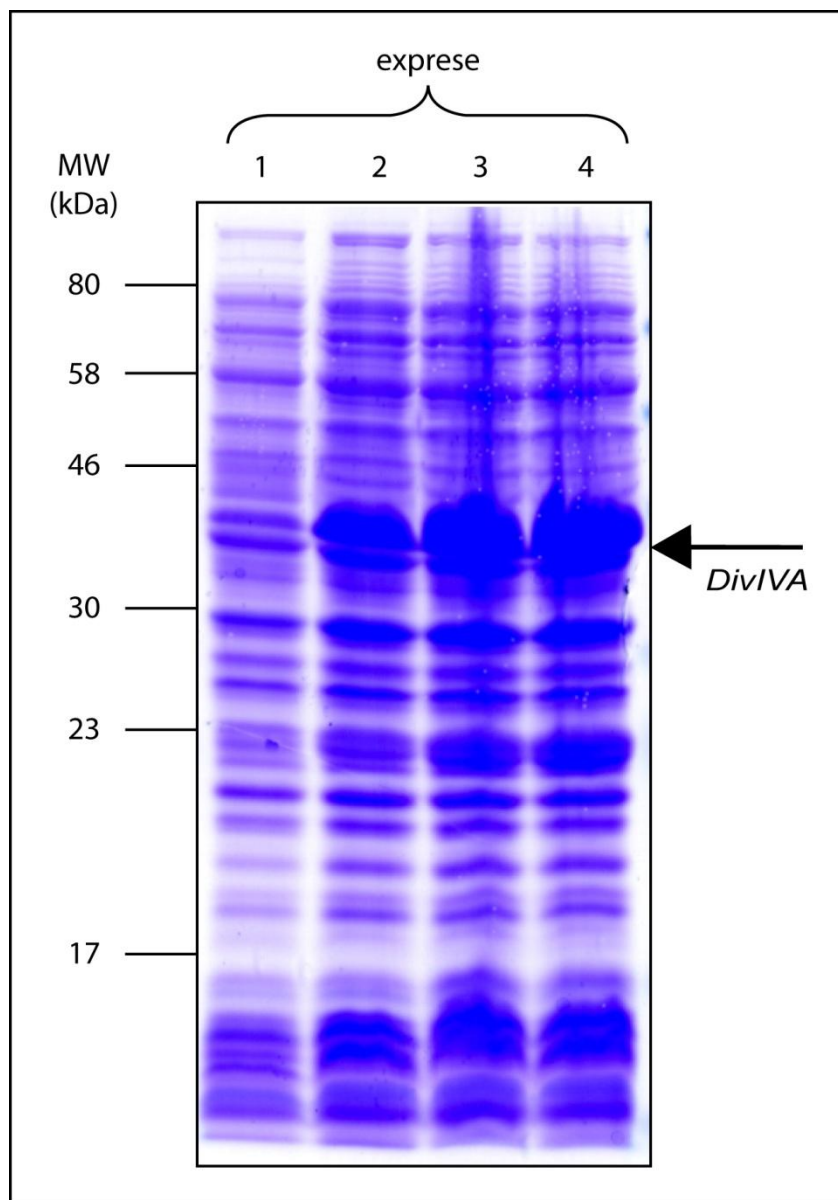


**Obr. 5-1: Mapa expresního vektoru pETPhos1505**

*AmpR*: gen pro ampicilinovou rezistenci; *lacI*: *lac* represor; **T7**: inducibilní promotor T7; **His tag**: sekvence kódující histidinovou kotvu; **TEV proteáza**: specifická sekvence štěpená proteázou; *divIVA*: klonovaný gen kódující protein DivIVA

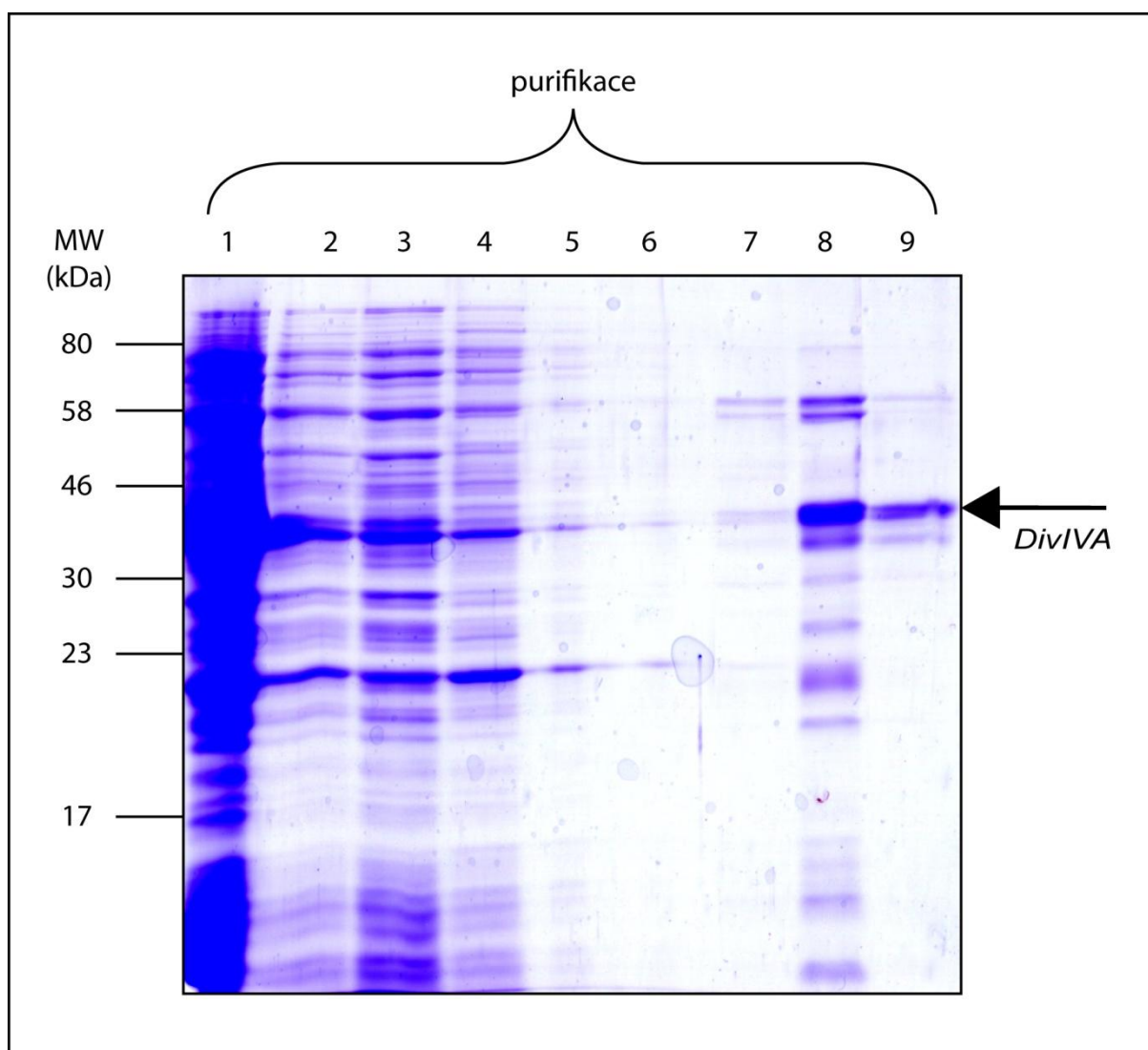
Vektor pETPhos1505 byl transformován do expresního kmene *E. coli* BL21. Pozitivní kolonie nesoucí plazmid jsme nechali narůst v tekutém LB médiu s ampicilinem. Expresi DivIVA jsme indukovali přidáním IPTG. Během kultivace jsme odebírali vzorky kultury. Po třech hodinách jsme expresi ukončili a připravili jsme buněčný lyzát. Vzorky

kultury z exprese jsme poté analyzovali na SDS-PAGE (obr. 5-2). Zjistili jsme, že dostatečné množství proteinu je obsaženo v rozpustné frakci. Za použití afinitní chromatografie se nám podařilo protein z rozpustné frakce izolovat (obr. 5-3). Ačkoliv čistota izolovaného DivIVA nebyla úplná, byla dostačující pro testy fosforylace *in vitro*.



**Obr. 5-2: Expresa proteinu DivIVA**

1) vzorek kultury před indukcí exprese; 2) 1 hod po indukcii; 3) 2 hod po indukcii; 4) 3 hod po indukcii



**Obr. 5-3: Purifikace proteinu DivIVA**

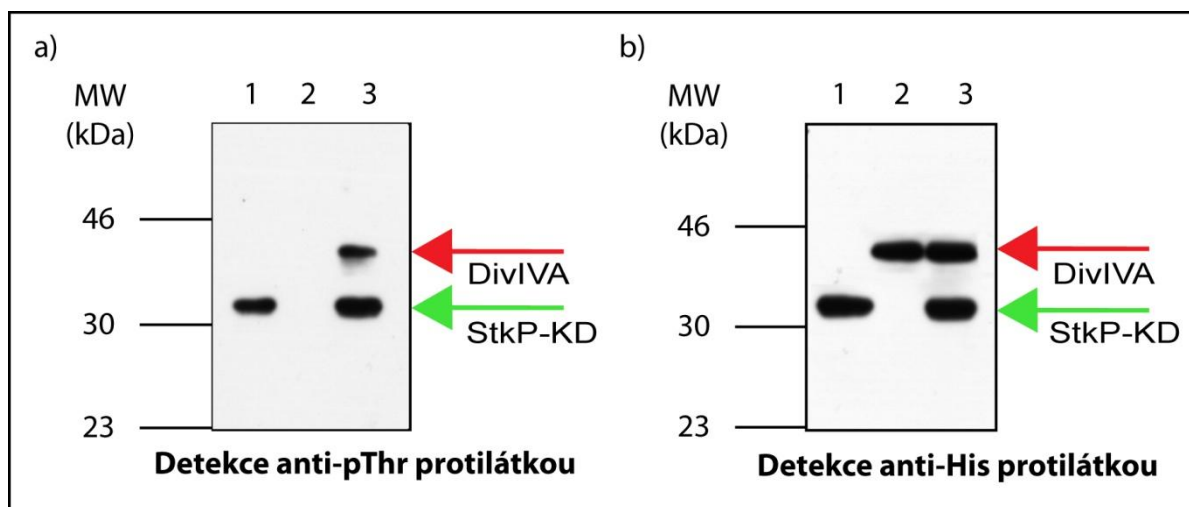
1) vzorek kultury před indukcí exprese; 2) celkový buněčný lyzát; 3) vzorek nenavázaných proteinů; 4) – 6) promytí; 7) – 9) frakce obsahující purifikovaný protein DivIVA

**5.2 Fosforylace DivIVA proteinkinázou StkP *in vitro***

Pomocí kinázové reakce jsme ověřili fosforylaci proteinu DivIVA pneumokokovou proteinkinázou StkP *in vitro*. Principem této reakce je smísení proteinkinázy a substrátu v příslušném pufru v přítomnosti manganatých a hořečnatých iontů a ATP.  $Mn^{2+}$  a  $Mg^{2+}$  ionty jsou potřebné pro stimulaci fosforylační aktivity StkP (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2005). V našich pokusech jsme používali rekombinantní protein StkP-KD, který představuje zkrácenou verzi StkP nesoucí pouze kinázovou doménu. Tato doména je nositelem enzymatické aktivity a je dostatečná pro fosforylaci substrátů *in vitro*. Produkce kinázové domény probíhala v expresním kmeni *E. coli* BL21, který nesl plazmid pEX-Stk-T s klonovaným genem kódujícím StkP-KD (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2005).

Oba proteiny, StkP-KD (kinázová doména StkP) i DivIVA, byly fúzované s histidinovou kotvou, která nám umožňovala nejen purifikaci těchto proteinů, ale i detekci jejich přítomnosti protilátkou proti histidinové kotvě (anti-His protilátka). Fosforylace proteinů byla detekována protilátkou proti fosforylovanému threoninu (anti-pThr protilátka). Negativní kontroly reakce obsahovaly buď pouze proteinkinázu StkP nebo DivIVA.

Anti-His protilátkou jsme podle očekávání detekovali přítomnost proteinů o velikosti StkP-KD (30,1 kDa) a DivIVA (30,2 kDa). Proteinové velikosti byly odvozeny z jejich aminokyselinového složení. Ačkoliv je předpokládaná velikost proteinu DivIVA zhruba stejná jako velikost kinázové domény StkP, v polyakrylamidovém gelu putuje pomaleji a jeho velikost se jeví jako 35 kDa (obr. 5-4a)). Po detekci anti-pThr protilátkou jsme zaznamenali zřetelný signál odpovídající autofosforylované StkP (obr. 5-4b)). Autofosforylaci proteinu DivIVA jsme vyloučili, protože jsme nezaznamenali reakci s anti-pThr protilátkou v kinázové reakci obsahující pouze DivIVA (obr. 5-4a)). Protein DivIVA byl specificky fosforylován pouze v přítomnosti StkP (obr 5-4b)).

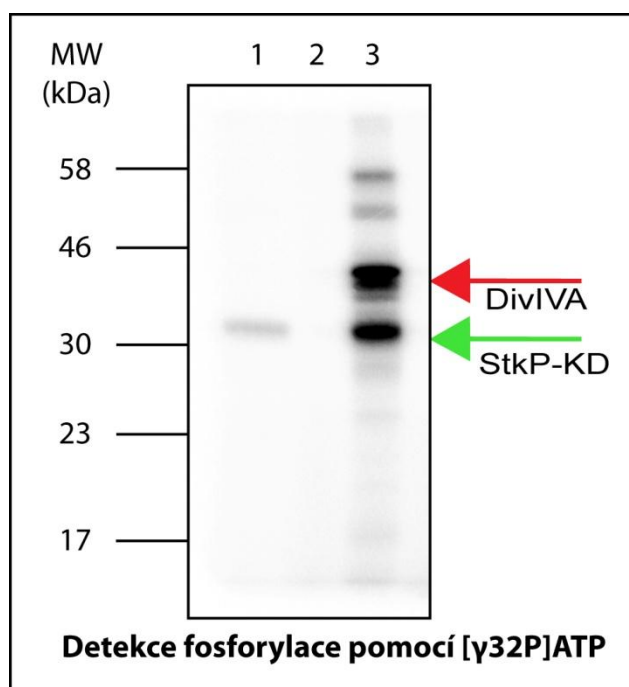


**Obr. 5-4: Fosforylace DivIVA prostřednictvím StkP *in vitro***

1) StkP-KD; 2) DivIVA; 3) StkP-KD + DivIVA

Provedli jsme i variantu kinázové reakce s použitím radioaktivně značeného  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (obr. 5-5). Potvrdilo se nám, že DivIVA je skutečně substrátem StkP *in vitro* a tato proteinkináza podléhá autofosforylaci (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010).





**Obr. 5-5: Fosforylace DivIVA pomocí  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$**   
 1) StkP-KD; 2) DivIVA; 3) StkP-KD + DivIVA

### 5.3 Mutagenese proteinu DivIVA

Jedním z cílů této práce bylo zjistit, které aminokyselinové zbytky DivIVA podléhají fosforylaci proteinkinázou StkP. Ve spolupráci s laboratoří Virginie Molle (Université Lyon, Francie) byl analyzován fosforylovaný protein DivIVA hmotnostní spektrometrií. Byl identifikován threonin na pozici 15 (Thr15), který nesl fosfátovou skupinu. V nedávné době byla navíc u *S. pneumoniae* provedena fosfoproteomová studie, při které se podařilo určit další místo fosforylace DivIVA *in vivo*. Jedná se o threonin na pozici 201 (Thr201) (SUN *et al.*, 2008).

#### 5.3.1 Příprava modifikovaných proteinů DivIVA

Abychom ověřili, zda jsou oba identifikované zbytky, Thr15 i Thr201, fosforylovány StkP, rozhodli jsme se připravit sérii tzv. fosfoablativních mutantů, ve kterých jsme tyto aminokyseliny zaměnili za alanin. Neutrální alanin nemůže být akceptorem fosfátové skupiny a protein nesoucí tuto mutaci nemůže být Ser/ Thr proteinkinázou fosforylován. Prováděli jsme buď záměnu jedné AK, nebo obou AK najednou.

Mutagenesi genu *divIVA* jsme prováděli ve vektoru pETPhos1505 pomocí techniky mutagenní PCR (kapitola 4.2.6) s použitím *PfuUltra* polymerázy a speciálně navržených primerů (kapitola 4.1.10), jejichž sekvence pokrývaly mutované místo v obou směrech. Během každého cyklu PCR reakce byl syntetizován celý plazmid. Po amplifikaci byla PCR

směs štěpena enzymem *DpnI* (5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3'), který specificky rozštěpil původní templátovou metylovanou a hemimetylovanou DNA. V PCR směsi poté zůstala pouze nově amplifikovaná, nemetylovaná DNA s příslušnou mutací. Správnost mutované sekvence byla ověřena pomocí sekvenace. Připravili jsme tři mutované plazmidy: pETPhos1505-T15A, -T201A, -T15+201A (tabulka 5-1).

Jednotlivé plazmidy nesoucí mutantní formy genu *divIVA* jsme transformovali do kompetentních buněk *E. coli* BL21. V pozitivních koloniích jsme indukovali expresi modifikovaných proteinů DivIVA přidáním IPTG. K purifikaci jsme opět používali metodu afinitní chromatografie s využitím histidinové kotvy (kapitola 4.2.3.6).

Původní aminokyselina	AK vnesená mutací	Pracovní název mutace
Thr15	Ala	T15A
Thr201	Ala	T201A
Thr15+Thr201	Ala	T15+201A

**Tab. 5-1: Přehled mutací fosforylovaných aminokyselin v proteinu DivIVA**

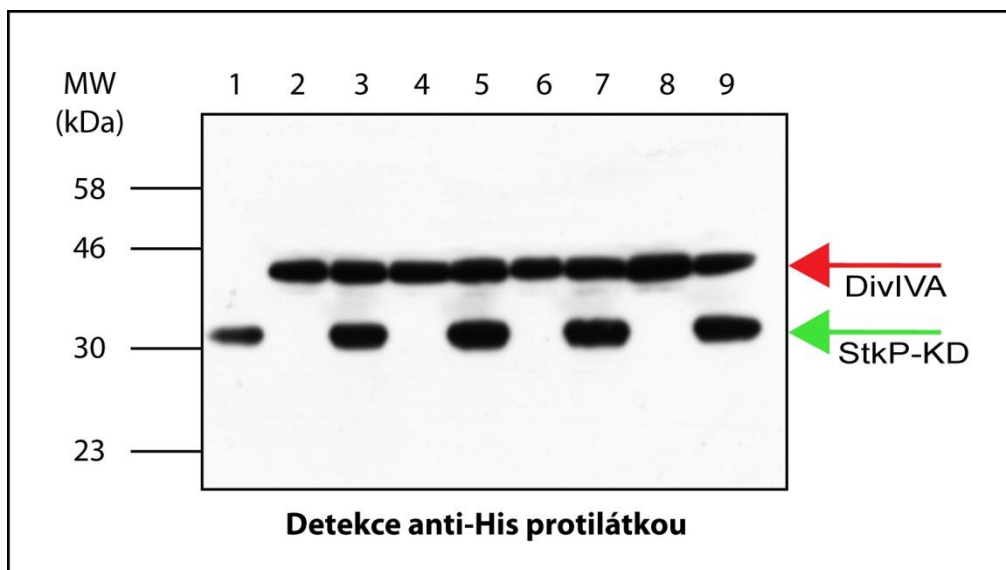
### 5.3.2 Fosforylace modifikovaných forem DivIVA proteinkinázou StkP *in vitro*

Fosforylaci modifikovaných forem DivIVA, ve kterých byly pravděpodobně fosforylované AK nahrazeny alaninem, jsme testovali v kinázové reakci *in vitro*. Reakce probíhala stejně jako v pokusu popsáném v kapitole 5.2.

Jednotlivé mutanty, DivIVA-T15A, -T201A, -T15+T201A, jsme ve vhodném pufru smísili s StkP-KD a manganatými a hořečnatými ionty. Reakci jsme zahájili přidáním ATP a po třicetiminutové inkubaci při 37°C jsme ji ukončili dodáním 5x SDS-vzorkového pufru. Všechny zkoumané proteiny nesly histidinovou kotvu, proto jsme k detekci jejich přítomnosti ve vzorku využívali anti-His protilátku. Fosforylaci proteinů jsme detekovali protilátkou proti pThr.

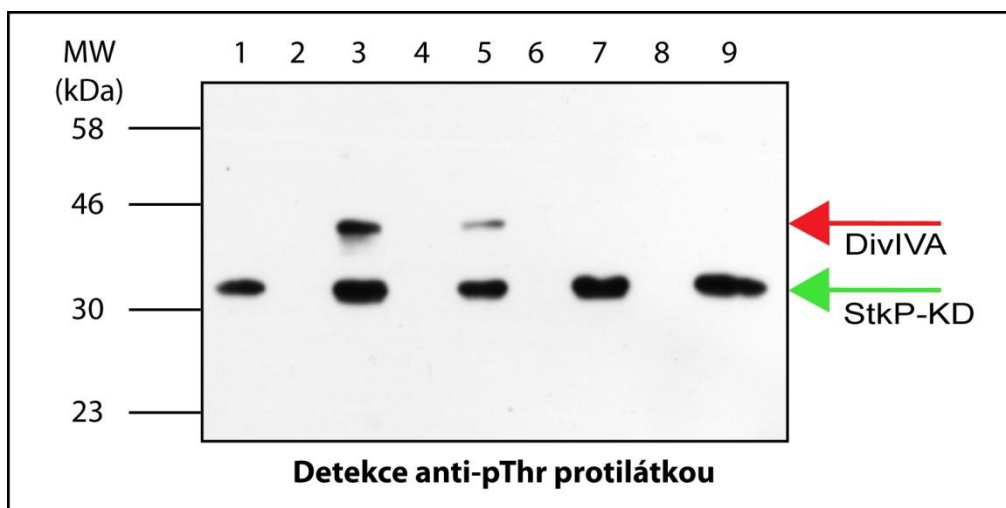
Po detekci anti-His protilátkou jsme zaznamenali signál u všech mutantních proteinů DivIVA odpovídající velikosti divokého typu (obr. 5-6). Záměna threoninu za alanin neovlivňuje rychlost migrace proteinu. Anti-pThr protilátkou jsme detekovali patrný signál pouze u divokého typu DivIVA a u proteinu DivIVA-T15A. Intenzita signálu u DivIVA-T15A je ovšem nižší než u divokého typu. U DivIVA-T201A a dvojitě mutanty jsme nezaznamenali žádnou reakci s anti-pThr protilátkou (obr. 5-7).

Z našich výsledků tedy vyplývá, že protein DivIVA je fosforylován proteinkinázou StkP na Thr201 a s nižší účinností i na Thr15 *in vitro*.



**Obr. 5-6: Fosforylace modifikovaných forem DivIVA prostřednictvím StkP *in vitro***

1) StkP-KD; 2) DivIVA-WT; 3) DivIVA-WT + StkP-KD; 4) DivIVA/T15A; 5) DivIVA/T15A + StkP-KD; 6) DivIVA/T201A; 7) DivIVA/T201A + StkP-KD; 8) DivIVA/T15+201A; 9) DivIVA/T15+T201A + StkP-KD



**Obr. 5-7: Fosforylace modifikovaných forem DivIVA prostřednictvím StkP *in vitro***

1) StkP-KD; 2) DivIVA-WT; 3) DivIVA-WT + StkP-KD; 4) DivIVA/T15A; 5) DivIVA/T15A + StkP-KD; 6) DivIVA/T201A; 7) DivIVA/T201A + StkP-KD; 8) DivIVA/T15+201A; 9) DivIVA/T15+T201A + StkP-KD

## 5.4 Klonování genu *divIVA* do vektoru pTYB2

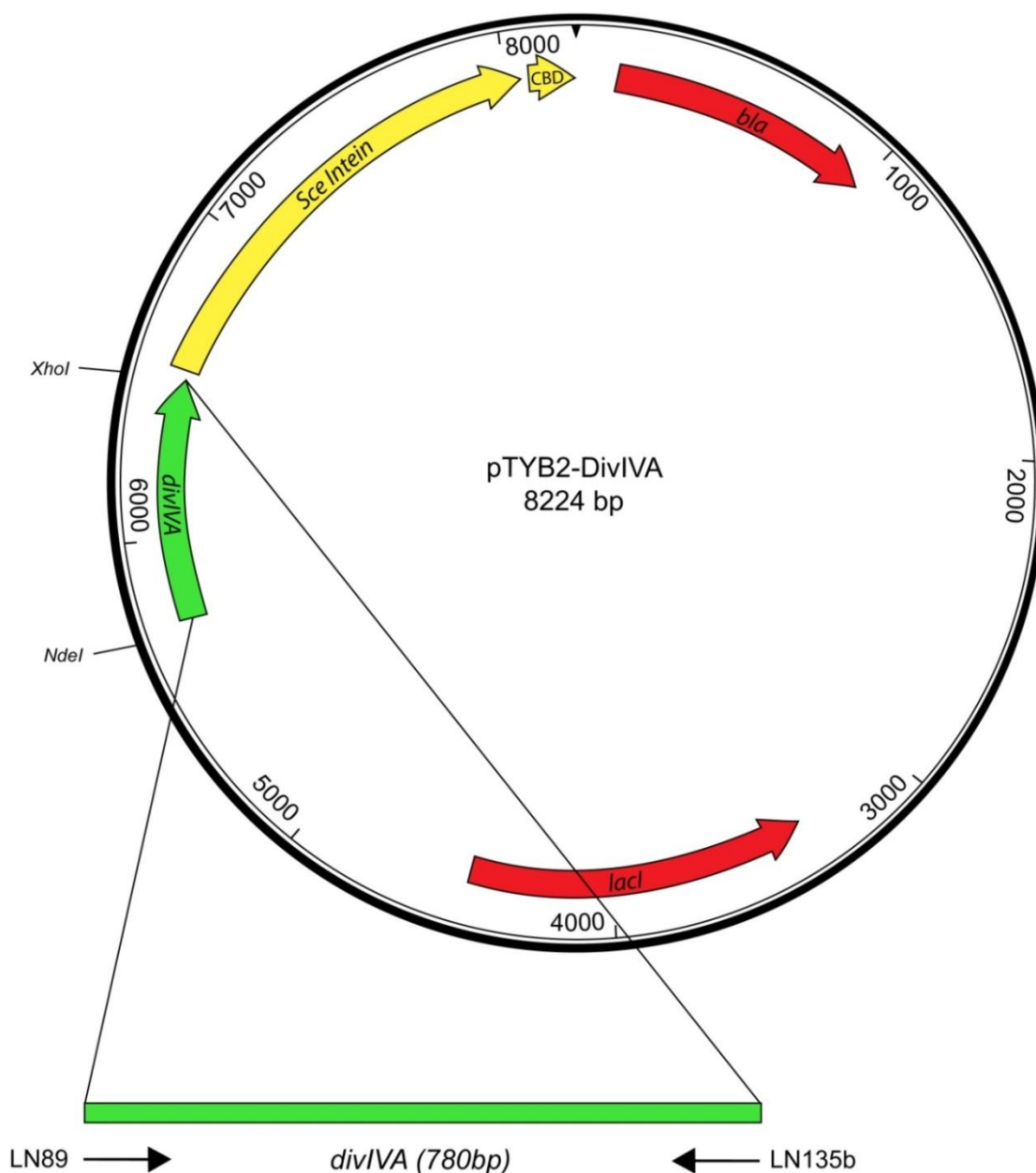
K expresi DivIVA i jeho mutantních forem jsme využívali již připravený vektor pETPhos1505 transformovaný do expresního kmene *E. coli* BL21. Při následné purifikaci pomocí afinitní chromatografie se nám nepodařilo eliminovat všechny ostatní proteiny a izolovat zcela čistý DivIVA (kapitola 4.2.3.6), avšak jeho čistota byla dostatečná pro testy fosforylace. Jelikož pro některé další experimenty, zejména pro studium oligomerizace DivIVA, jsme chtěli získat o vyšší čistotě a bez kotvy, rozhodli jsme se použít pro purifikaci DivIVA alternativní expresní systém a naklonovat gen *divIVA* do expresního plazmidu *E. coli* pTYB2 (NEB).

### 5.4.1 Příprava vektoru

Plazmid pTYB2 je komerčně dostupný vektor, který umožňuje fúzi rekombinantního proteinu na C-konci s inteinem obsahujícím chitin vazebnou doménu. Ta slouží k purifikaci proteinu pomocí afinitní chromatografie. Výhodou tohoto expresního systému je, že lze inteinovou kotvu snadno odštěpit inkubací proteinu v přítomnosti thiolů bez použití proteáz. Vektor dále nese gen pro ampicilinovou rezistenci a polyklonovací místo.

Gen *divIVA* jsme amplifikovali pomocí PCR s *PfuUltra* polymerázou. Použili jsme speciálně navržené oligonukleotidy LN89 a LN135b. Získaný amplifikovaný fragment jsme vložili prostřednictvím *NdeI* a *XhoI* restrikčních míst do plazmidu pTYB2 pod T7 inducibilní promotor tak, že na C-konci byla k proteinu připojena inteinová kotva (obr. 5-8).

Získaný vektor jsme pojmenovali pTYB2-DivIVA a transformovali do kompetentních buněk *E. coli* JM109. Vybrané kolonie *E. coli* rezistentní k ampicilinu jsme otestovali koloniovou PCR, abychom ověřili, zda byl fragment do vektoru naklonován správným způsobem. Sekvence genu byla ověřena sekvenováním.



**Obr. 5-8: Mapa expresního vektoru pTYB2-DivIVA**

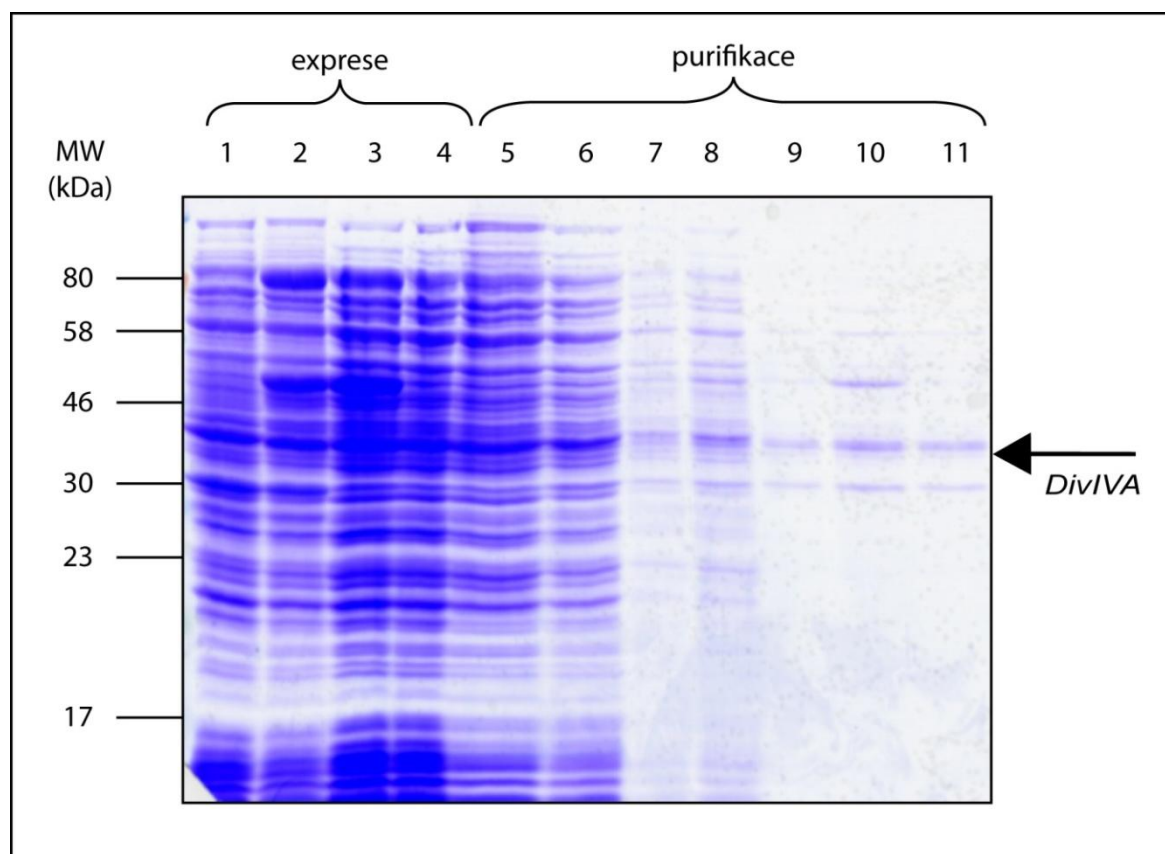
**Bla**: gen pro ampicilinovou rezistenci; **lacI**: *lacI* represor; **Sce Intein**: sekvence kódující intein; **CBD**: sekvence kódující chitin-vazebnou doménu; **divIVA**: klonovaný gen pro DivIVA; **NdeI** a **XhoI**: použitá restrikční místa; **černé šipky** označují použité oligonukleotidy

#### 5.4.2 Expresse a purifikace

Připravený plazmid pTYB2 nesoucí gen *divIVA* jsme stejně jako expresní vektor pET1505 transformovali do kompetentních buněk *E. coli* BL21. Expresse DivIVA byla indukována přidáním IPTG a probíhala 24 hodin při 18°C. Během této doby jsme odebírali vzorky kultury a poté je analyzovali na SDS-PAGE. Pro izolaci rekombinantního DivIVA fúzovaného s inteinovou kotvou metodou afinitní chromatografie jsme využili komerční soupravu IMPACT™-CN (NEB). Řídili jsme se instrukcemi od výrobce. Vzorky z jednotlivých kroků purifikace jsme nanесли na SDS-PAGE. DivIVA se nám podařilo

izolovat z rozpustné frakce s dostatečnou účinností a čistší než v případě purifikace pomocí histidinové kotvy (obr. 5-9). Spolu s DivIVA se ovšem izolovalo i několik dalších neznámých proteinů. Jeden z těchto proteinů mohl být díky své velikosti zaměnitelný s DivIVA. Abychom určili, který protein v polyakrylamidovém gelu představuje DivIVA, provedli jsme imunodetekci s využitím protilátky proti DivIVA. Protein DivIVA migroval ve 12 % polyakrylamidovém gelu jako protein o velikosti 35 kDa. Na gelu tedy představoval horní ze dvou výrazných proteinových pruhů (obr. 5-10).

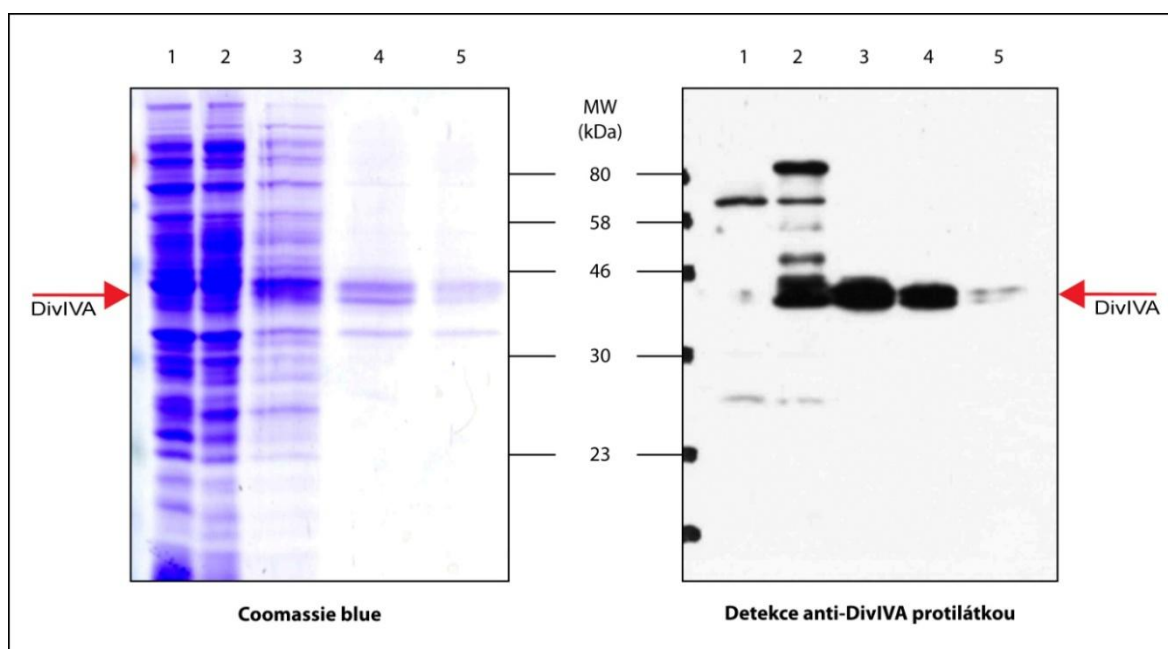
Izolovaný DivIVA jsme využili pro studium oligomerizace pomocí BN-PAGE (kapitola 5-7). Vzhledem k nedostatečné čistotě DivIVA jsme nemohli získat jasné výsledky pomocí barvení BN-PAGE gelu. Proto jsme se rozhodli detekovat tvorbu specifických DivIVA oligomerů *in vitro* pomocí imunodetekce. Získaný signál byl však natolik silný, že docházelo ke zkreslení výsledků. Metodu izolace DivIVA pomocí inteinové kotvy budeme tedy v budoucnu optimalizovat. Doplníme ji o další purifikační krok a tvorbu oligomerů budeme sledovat pomocí barvení BN-PAGE gelu.



**Obr. 5-9: Exprese a purifikace proteinu DivIVA**

**Exprese:** 1) vzorek kultury před indukcí; 2) 1 hod po indukcí; 3) 6 hod po indukcí; 4) 24 hod po indukcí

**Purifikace:** 5) celkový lyzát buněk; 6) nenavázané proteiny; 7) 1. promytí; 8) 2. promytí; 9) - 11) purifikovaný protein



**Obr. 5-10: Detekce proteinu DivIVA**

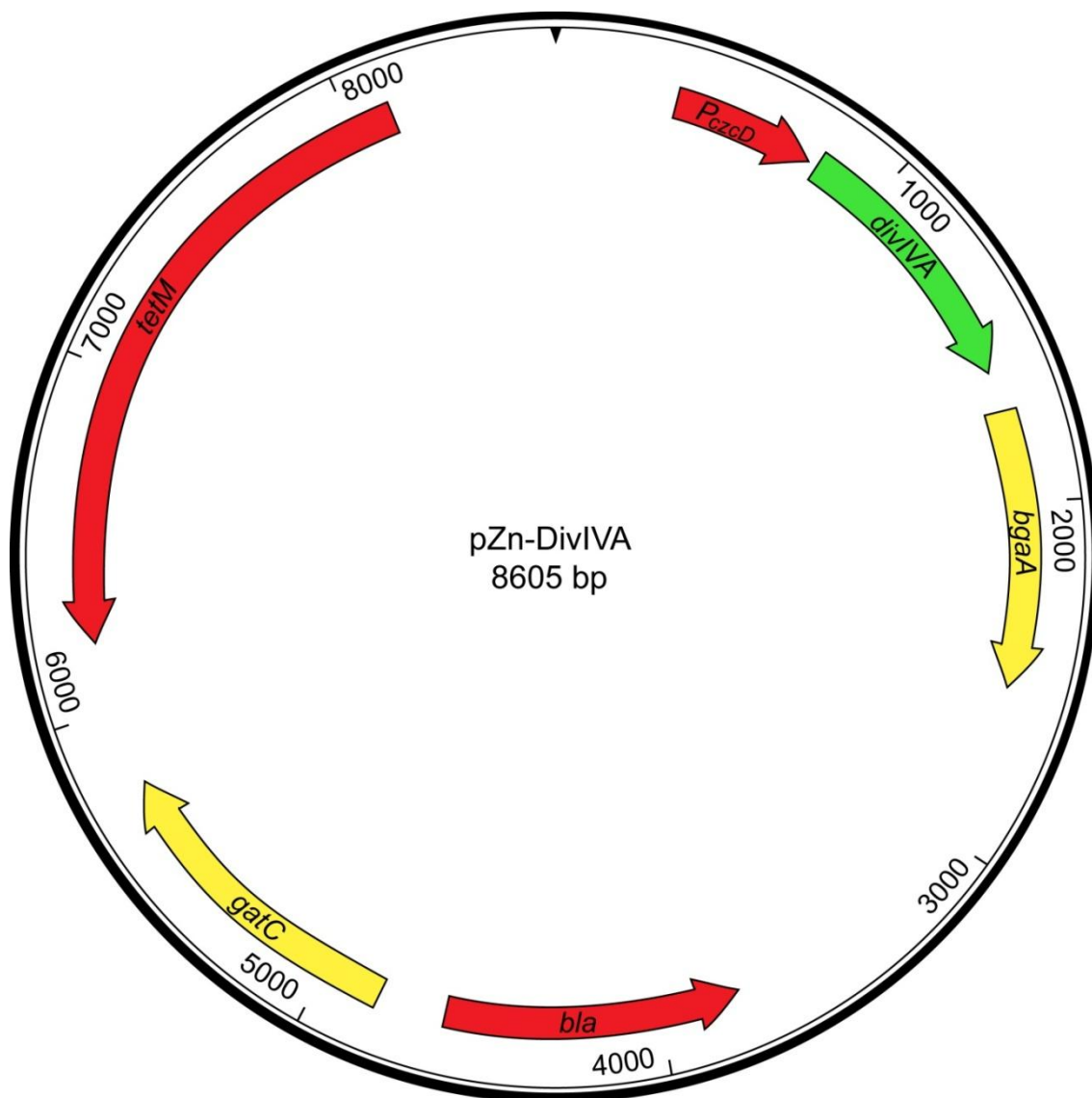
1) vzorek kultury před indukcí; 2) 24 hod po indukcí; 3) – 5) frakce obsahující purifikovaný protein DivIVA

## 5.5 Příprava konstruktů pro komplementaci delece *divIVA* ve *S. pneumoniae*

Dalším předmětem naší práce bylo ověřit, zda jsou aminokyselinové zbytky Thr15 a Thr201 proteinu DivIVA *S. pneumoniae* fosforylovány *in vivo*. Fosforylace *in vitro* může vést ke vzniku artefaktů. Abychom mohli studovat fosforylací *in vivo*, potřebovali jsme připravit sérii kmenů *S. pneumoniae* exprimující divoký typ a také mutované formy genu *divIVA* pod inducibilním promotorem. Tento systém by nám rovněž umožnil testovat, zda jsou mutované formy DivIVA schopny komplementovat deleci *divIVA* ve *S. pneumoniae*.

Zvolili jsme systém, který umožňuje fúzi vybraného genu s inducibilním zinkovým promotorem a jeho integraci do chromozomu *S. pneumoniae* (EBERHARDT *et al.*, 2009). Tento systém byl dříve úspěšně využit pro expresi proteinů fúzovaných s GFP ve *S. pneumoniae*. Na základě vektoru pJWV25 (EBERHARDT *et al.*, 2009) byl v naší laboratoři připraven plazmid pZn-DivIVA (NOVÁKOVÁ L., nepublikované výsledky). Tento vektor nese  $Zn^{2+}$  inducibilní promotor  $P_{czcD}$ , pod který byl naklonován gen *divIVA*. Dále pak obsahuje *gatC* a *bgaA* sekvence, které jsou homologní se sekvencemi na chromozomu *S. pneumoniae* (obr. 5-11) a umožňují integraci konstruktů do postradatelného *bga* lokusu. Genetická informace kódovaná chromozomem mezi těmito sekvencemi není pro bakterii v laboratorních podmínkách esenciální, a proto může dojít

k vložení požadovaného vektoru do chromozomu homologní rekombinací. Plazmid nese resistenci k tetracyklinu, která umožňuje selekci pozitivních klonů *S. pneumoniae*.



**Obr. 5-11: Mapa vektoru pZn-DivIVA**

*TetM*: gen pro tetracyklinovou resistenci; *bla*: gen pro ampicilinovou resistenci; *P<sub>czcD</sub>*: zinkový indukibilní promotor; *gatC* a *bgaA*: místa pro homologní rekombinaci; *divIVA*: gen pro DivIVA

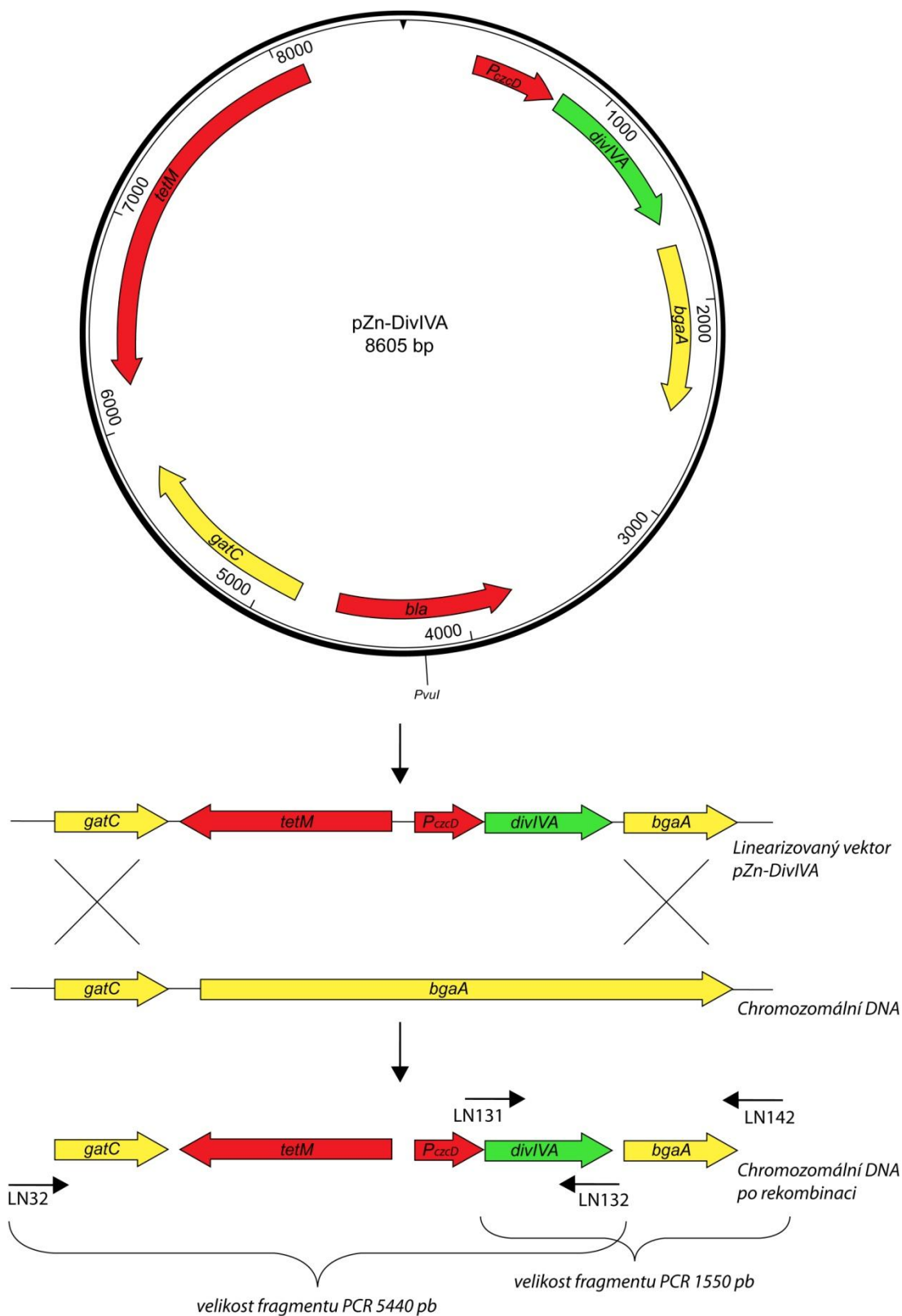
### 5.5.1 Transformace vektoru pZn-DivIVA do *S. pneumoniae*

Získaný vektor pZn-DivIVA jsme linearizovali restrikcí enzymem *PvuI*. Linearizovaný vektor jsme poté transformovali do *S. pneumoniae* Rx1 (Sp1), čímž vznikl merodiploidní kmen *S. pneumoniae* *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA* nazvaný Sp35 (tabulka 5-3). Z transformantů vyrostlých na selekčních miskách s tetracyklinem jsme vybrali tři kolonie, které jsme přeočkovali na misky s krevním agarem, napěstovali je a izolovali chromozomální DNA. Integraci konstruktů do chromozomu jsme ověřili pomocí PCR.



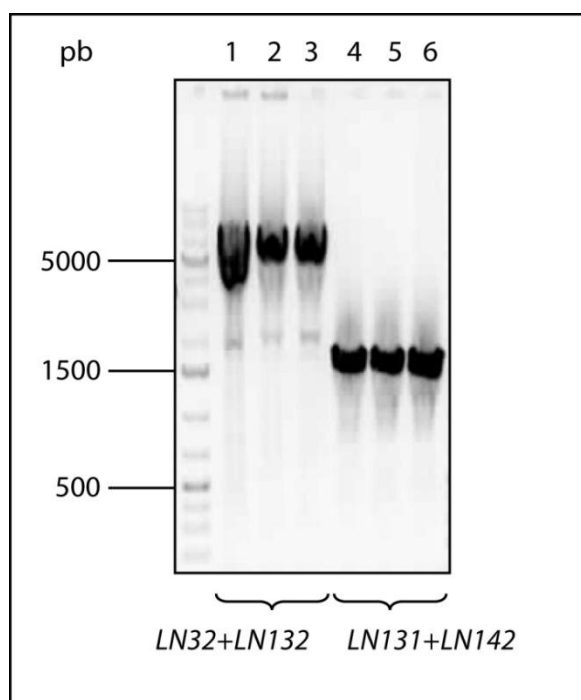
V každé reakci jsme použili vždy jeden oligonukleotid, který byl komplementární k sekvenci mimo rekombinační oblast a druhý, který pokrýval část genu *divIVA* (obr. 5-12). Negativní kontrolou byla amplifikace provedená na templátu DNA divokého typu *S. pneumoniae* Sp1. U kmen Sp35 jsme očekávali vznik fragmentů o velikosti 5440 pb v případě amplifikace s oligonukleotidy LN32 a LN132 nebo velikosti 1550 pb v případě amplifikace s oligonukleotidy LN131 a LN142. U divokého kmene se neměl amplifikovat žádný fragment. Podle výsledků PCR reakce jsme zjistili, že integrace komplementačního konstruktů do chromozomu *S. pneumoniae* proběhla úspěšně (obr. 5-13). Chromozom takto připraveného kmene *S. pneumoniae* nesl tedy dvě kopie genu *divIVA* – jednu na přirozeném místě v chromozomu a druhou pod zinkovým inducibilním promotorem v *bga* lokusu.

Abychom zjistili, zda je vybraný systém vhodný pro komplementaci delece *divIVA* v mateřském organizmu, připravili jsme kmen, který nesl gen *divIVA* pouze pod inducibilním promotorem. Měli jsme k dispozici kmen *S. pneumoniae*  $\Delta divIVA$  s pracovním jménem Sp26 (FADDA *et al.*, 2007; dar MASSIDA O.). Tento kmen jsme transformovali a pozitivní klony selektovali stejným způsobem jako u Sp1. Vzniklý kmen jsme pojmenovali Sp37 ( $\Delta divIVA$ ; *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA*) (tabulka 5-3).



**Obr. 5-12. Schéma integrace komplementačního konstruktů do chromozomu *S. pneumoniae***

*TetM*: gen pro tetracyklinovou rezistenci; *bla*: gen pro ampicilinovou rezistenci;  $P_{czcD}$ : zinkový indukibilní promotor; *gatC* a *bgaA*: místa pro homologní rekombinaci; *divIVA*: gen pro DivIVA; *PvuI*: použité restrikční místo; **černé šipky** označují použité oligonukleotidy



**Obr. 5-13: Kontrolní PCR – ověření vložení komplementačního konstruktů na chromozom**

Kmeny *S. pneumoniae* *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA* (klony 1 – 3): 1) - 3) PCR s oligonukleotidy LN32 a LN132, předpokládaná velikost fragmentu 5440 pb; 4) - 6) PCR s oligonukleotidy LN131 a LN142, předpokládaná velikost fragmentu 1550 pb

### 5.5.2 Exprese proteinu DivIVA ve *S. pneumoniae*

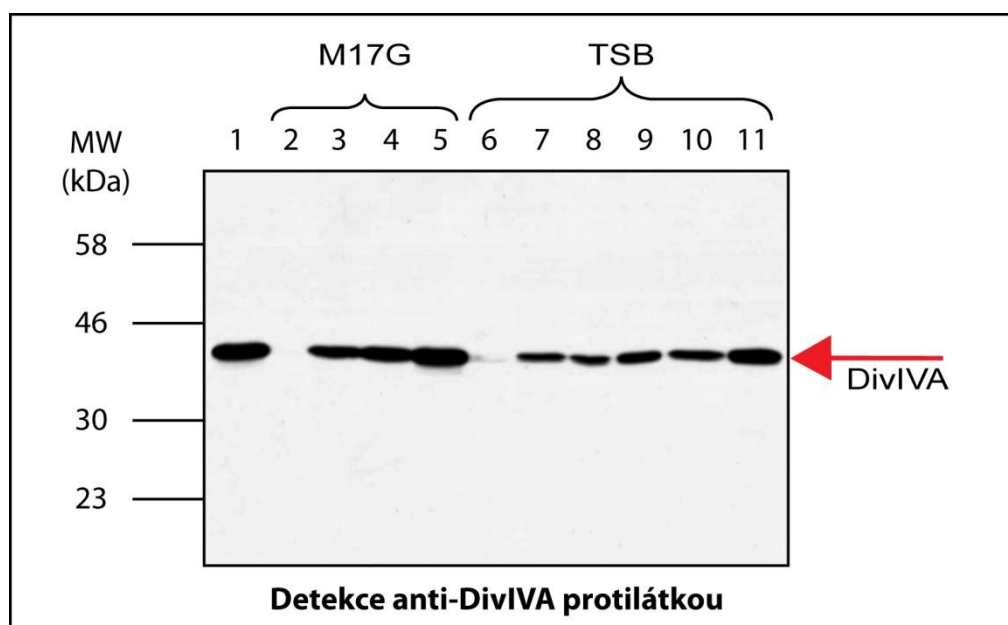
Ve vytvořeném komplementačním kmeni Sp37 jsme testovali expresi genu *divIVA* pod zinkovým promotorem. Jelikož *S. pneumoniae* patří mezi poměrně náročně kultivovatelné bakterie a exprese proteinů je závislá na složení média, museli jsme nejprve produkci DivIVA optimalizovat.

Kmen Sp37 jsme zaočkovali do třech různých komplexních médií – CAT<sub>C</sub>, M17 a TSB. Použili jsme vzrůstající koncentraci zinečnatých iontů (0; 0,05; 0,1; 0,15, 0,2, 0,25 a 0,35 mM ZnCl<sub>2</sub>). Sp37 pěstovaný v CAT<sub>C</sub> médiu na začátku exponenciální fáze růstu opakovaně lyzoval, proto jsme dále sledovali vliv koncentrace zinku na růst kmene Sp37 a produkci proteinu DivIVA pouze v tekutém médiu M17G a TSB. Pozorovali jsme, že s rostoucí koncentrací zinku se výrazně snižovala bakteriální růstová rychlost. Při vysokých koncentracích ZnCl<sub>2</sub> byl růst dokonce inhibován. V komplexním médiu M17G nevyrostl kmen Sp37 při koncentracích ZnCl<sub>2</sub> 0,35 a 0,25 mM při všech opakováních pokusu. Nejvyšší koncentrace ZnCl<sub>2</sub> v M17G médiu, ve kterém byl kmen Sp37 schopen růstu, byla tedy 0,2 mM. Při této koncentraci ZnCl<sub>2</sub> byl bakteriální růst ovšem výrazně zpomalen a někdy docházelo i k lyzi buněk. V druhém komplexním médiu TSB byla nejvyšší možná koncentrace 0,25 mM ZnCl<sub>2</sub>. Kultivaci v těchto médiích jsme ukončili po

dosažení  $OD_{600}$  0,5 (exponenciální fáze růstu), poté jsme změřili koncentraci proteinů a provedli detekci pomocí anti-DivIVA protilátky. Jako kontrolu jsme použili buněčný lyzát divokého kmene *S. pneumoniae*

V lyzátech z kmene Sp37 pěstovaného v přítomnosti zinku se nám podařilo pomocí anti-DivIVA protilátky detekovat protein DivIVA v obou médiích – M17G i TSB. Produkce DivIVA v kmeni s vloženým komplementačním konstruktem se zvyšovala se vzrůstající koncentrací zinečnatých iontů v médiu (obr. 5-14). Nejsilnější signál byl patrný při koncentraci  $ZnCl_2$  0,15 mM v médiu M17G. Intenzita tohoto signálu odpovídala intenzitě, kterou jsme zaznamenali v lyzátu z divokého typu. Při nižších koncentracích byl signál slabší. V médiu TSB byla exprese DivIVA pod zinkovým promotorem nižší, a ani při nejvyšší možné testované koncentraci zinku (0,25 mM  $ZnCl_2$ ) neodpovídal detekovaný signál intenzitě zaznamenané u divokého typu. Žádný signál jsme nedetekovali v lyzátu kmene Sp37, který byl pěstován bez zinku, což naznačuje, že nedochází k bazální expresi *divIVA* v nepřítomnosti  $ZnCl_2$ .

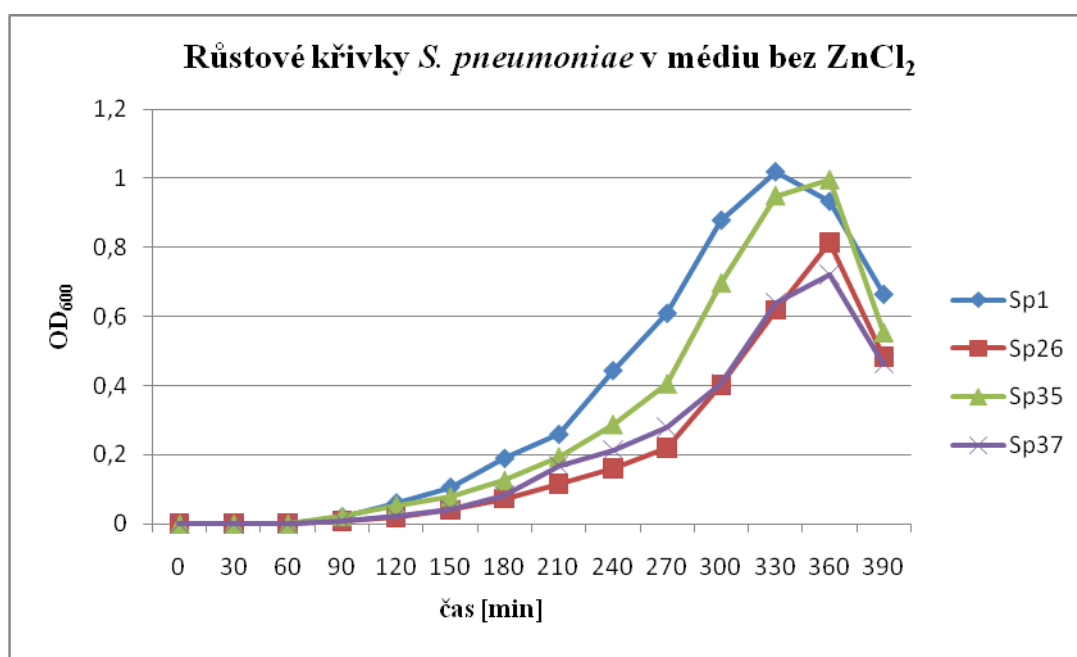
Závěrem lze shrnout, že se nám podařilo ověřit, že je komplementační kmen Sp37 funkční a dochází k nejvyšší indukci exprese DivIVA specificky v přítomnosti  $ZnCl_2$  o koncentraci 0,15 mM v médiu M17G (obr. 5-14). Vybraný komplementační systém je proto vhodný pro studium vlivu fosforylace na funkci DivIVA.



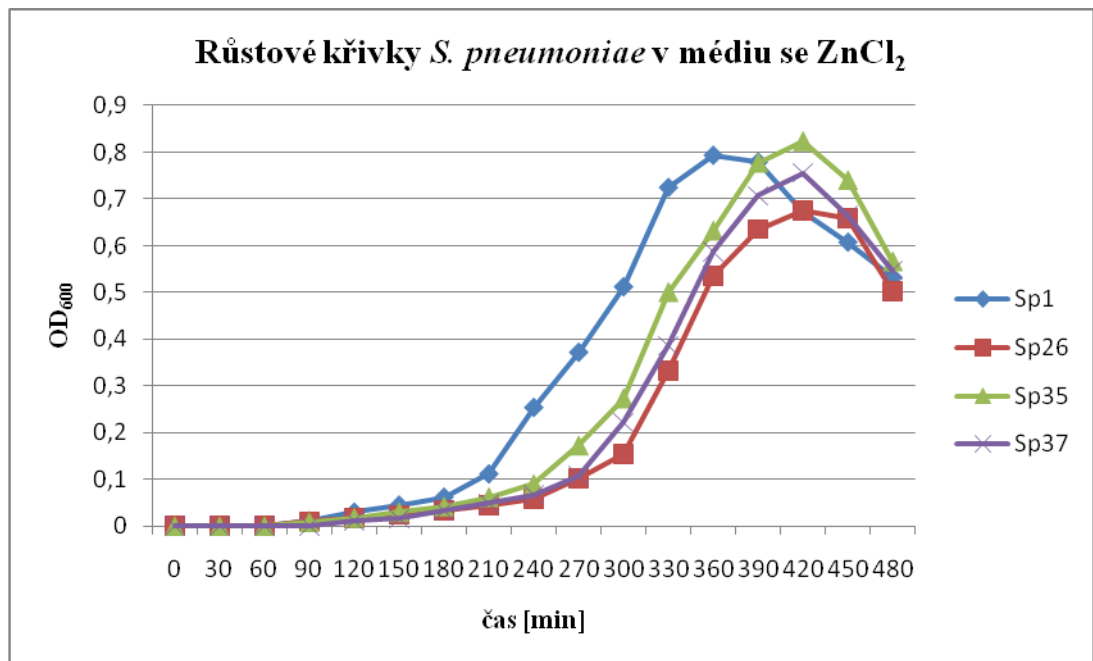
**Obr. 5-14: Exprese DivIVA u komplementačního kmene Sp37**

1) *S. pneumoniae* WT (Sp1); 2) Sp37, M17G, 0 mM  $ZnCl_2$ ; 3) Sp37, M17G, 0,05 mM  $ZnCl_2$ ; 4) Sp37, M17G, 0,1 mM  $ZnCl_2$ ; 5) Sp37, M17G, 0,15 mM  $ZnCl_2$ ; 6) Sp37, TSB, 0 mM  $ZnCl_2$ ; 7) Sp37, TSB, 0,05 mM  $ZnCl_2$ ; 8) Sp37, TSB, 0,1 mM  $ZnCl_2$ ; 9) Sp37, TSB, 0,15 mM  $ZnCl_2$ ; 10) Sp37, TSB, 0,2 mM  $ZnCl_2$ ; 11) Sp37, TSB, 0,25 mM  $ZnCl_2$

U připravených kmenů Sp35 a Sp37 nás zajímalo, jaký vliv má exprese *divIVA* pod zinkovým promotorem  $P_{czcD}$  na růst těchto komplementačních kmenů, a zda dochází ke komplementaci  $\Delta divIVA$ . Testovali jsme tedy růstové charakteristiky kmenů Sp35 a Sp37 v tekutém médiu bez zinku a se zinkem a porovnávali je s růstem kmene Sp26 ( $\Delta divIVA$ ) a divokého typu *S. pneumoniae* Sp1. Kultivace probíhala staticky v komplexním médiu M17G (+/-ZnCl<sub>2</sub>) ve vodní lázni při 37°C. Použili jsme koncentraci 0,15 mM ZnCl<sub>2</sub>, při které docházelo k nejvyšší produkci DivIVA. V časových intervalech jsme odebírali vzorky kultury, u nichž jsme měřili OD<sub>600</sub> a na základě získaných hodnot jsme sestrojili růstovou křivku. Všechna měření byla provedena v triplikátech. Pokus jsme několikrát opakovali. Zde uvádíme reprezentativní růstovou křivku (obr 5-15; 5-16).



**Obr. 5-15: Růstové křivka jednotlivých kmenů *S. pneumoniae* v médiu bez ZnCl<sub>2</sub>**  
 Modrá křivka: Sp1 (WT); červená křivka: Sp26 ( $\Delta divIV$ ); zelená křivka: Sp35 ( $bga::P_{czcD}-divIVA$ ); fialová křivka: Sp37 ( $\Delta divIVA; bga::P_{czcD}-divIVA$ )



**Obr. 5-16: Růstové křivka jednotlivých kmenů *S. pneumoniae* v médiu se ZnCl<sub>2</sub>**  
 Modrá křivka: Sp1 (WT); červená křivka: Sp26 ( $\Delta divIVA$ ); zelená křivka: Sp35 ( $bga::P_{czcD}-divIVA$ ); fialová křivka: Sp37 ( $\Delta divIVA; bga::P_{czcD}-divIVA$ )

V komplexním médiu bez zinku jsme naměřili nejkratší dobu lag fáze u divokého kmene *S. pneumoniae* Sp1, který zároveň dosahoval i nejvyšší OD při přechodu do stacionární fáze. Kmen Sp35 ( $bga::P_{czcD}-divIVA$ ) se vyznačoval obdobnou růstovou charakteristikou. Jeho lag fáze ovšem trvala mírně déle a dříve nastupovala fáze stacionární v porovnání s růstem Sp1. Příčinou tohoto projevu může být vložený komplementační konstrukt, který bakterii zatěžuje. Podle očekávání oba kmeny s delecí genu *divIVA*, Sp26 a Sp37 ( $\Delta divIVA; bga::P_{czcD}-divIVA$ ), měly lag fázi výrazně delší a dosáhly i nižších OD při přechodu do stacionární fáze v porovnání s Sp35 a Sp1 (obr. 5-15). Ze získané růstové křivky vyplývá, že delece genu pro dělicí protein DivIVA výrazně zpomaluje růst *S. pneumoniae* a zhoršuje konkurenceschopnost bakterie.

V tekutém médiu s přidaným zinkem byla lag fáze všech testovaných kmenů delší než při růstu v médiu bez zinku. Pozorovali jsme rovněž, že kultury Sp1, Sp35 a Sp26 přecházely do stacionární fáze při nižší OD. Nadprodukce DivIVA tedy nezvýhodňovala kmen Sp35 v porovnání s ostatními testovanými kmeny *S. pneumoniae*. Kmen Sp37, který nese komplementační konstrukt, vykazoval jako jediný progresivnější růst v přítomnosti ZnCl<sub>2</sub> v porovnání s růstem v nepřítomnosti ZnCl<sub>2</sub>. V důsledku exprese genu *divIVA* ležícího pod zinkovým inducibilním promotorem dochází pravděpodobně k částečné komplementaci delece *divIVA* (obr. 5-16).

Na základě našich pozorování lze shrnout, že přítomnost zinku v médiu zpomaluje a zatěžuje růst *S. pneumoniae*. Nepodařilo se nám jednoznačně prokázat, že exprese *divIVA* pod indicibilním promotorem vede ke komplementaci mutace.

### 5.5.3 Příprava komplementačních konstruktů s modifikovaným DivIVA

Jak už bylo výše řečeno, chtěli jsme zjistit, které aminokyselinové zbytky DivIVA jsou fosforylovány *in vivo*, a jak tato fosforylace ovlivňuje funkci proteinu ve *S. pneumoniae*. K tomu jsme potřebovali vytvořit sérii komplementačních konstruktů, ve kterých jsme modifikovali gen *divIVA* umístěný pod zinkový indukibilní promotor. Stejně jako u mutagenese DivIVA *in vitro*, jsme zaměřovali pravděpodobně fosforylované aminokyseliny Thr15 a Thr201. Původní AK jsme mutací měnili buď za neutrální AK alanin nebo za fosfomimetickou AK kyselinu glutamovou. Záměna za alanin umožní určit, zda je příslušná aminokyselina akceptorem fosfátové skupiny a také, do jaké míry ovlivní mutace funkci proteinu nezávisle na fosforylaci. Fosfomimetické AK patří mezi polární aminokyseliny, které mají ve svém postranním řetězci karboxylovou skupinu. Díky negativnímu náboji tak mohou napodobovat fosforylovaný stav proteinu.

Mutagenesi genu *divIVA* jsme prováděli ve vektoru pZn-DivIVA pomocí mutagenní PCR a polymerázy Velocity nebo *PfuUltra*, které amplifikují vybraný úsek DNA s vysokou přesností. Sekvence speciálně navržených oligonukleotidů (kapitola 4.1.10) pokrývaly mutované místo v obou směrech. Proces mutagenese byl stejný jako v kapitole 5.3.1. Abychom ověřili správnost mutované sekvence, nechali jsme jednotlivé modifikované vektory pZn-DivIVA sekvenovat. Celkově jsme takto připravili šest modifikovaných plazmidů: pZn-DivIVA/T15A, /T15E, /T201A, /T201E, /T15+T201A, /T15+T201E (tabulka 5-2).

Připravené vektory jsme linearizovali restriční endonukleázou *PvuI* a transformovali do kmene Sp26 ( $\Delta divIVA$ ). Úspěšnost integrace plazmidu do chromozomu jsme ověřili kontrolní PCR provedenou stejným postupem jako v kapitole 5.5.1. Podařilo se nám připravit šest kmenů *S. pneumoniae*, které ve svém chromozomu nesly modifikovaný gen *divIVA* ležící pod zinkovým indukibilním promotorem. Jednotlivým kmenům jsme přiřadili pracovní název: Sp49 ( $\Delta divIVA$ ; *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA/T15A*), Sp50 ( $\Delta divIVA$ ; *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA/T201A*), Sp51 ( $\Delta divIVA$ ; *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA/T15+201A*), Sp63 ( $\Delta divIVA$ ; *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA/T15E*), Sp56 ( $\Delta divIVA$ ; *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA/T201E*), Sp64 ( $\Delta divIVA$ ; *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA/T15+201E*) (tabulka 5-3).

původní AK	AK vnesená mutací	pracovní název mutace
Thr15	Ala	T15A
	Glu	T15E
Thr201	Ala	T201A
	Glu	T201E
Thr15+Thr201	Ala	T15+201A
	Glu	T15+201E

**Tab. 5-2: Přehled mutací fosfoaminokyselin v proteinu DivIVA**

Pracovní název kmene	Charakteristika kmene
Sp1	WT
Sp10	$\Delta$ <i>stkP</i>
Sp26	$\Delta$ <i>divIVA</i>
Sp35	<i>bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA</i>
Sp37	$\Delta$ <i>divIVA</i> ; <i>bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA</i>
Sp49	$\Delta$ <i>divIVA</i> ; <i>bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA/15A</i>
Sp50	$\Delta$ <i>divIVA</i> ; <i>bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA/T201A</i>
Sp51	$\Delta$ <i>divIVA</i> ; <i>bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA/T15+201A</i>
Sp63	$\Delta$ <i>divIVA</i> ; <i>bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA/T15E</i>
Sp56	$\Delta$ <i>divIVA</i> ; <i>bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA/T201E</i>
Sp64	$\Delta$ <i>divIVA</i> ; <i>bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA/T15+201E</i>

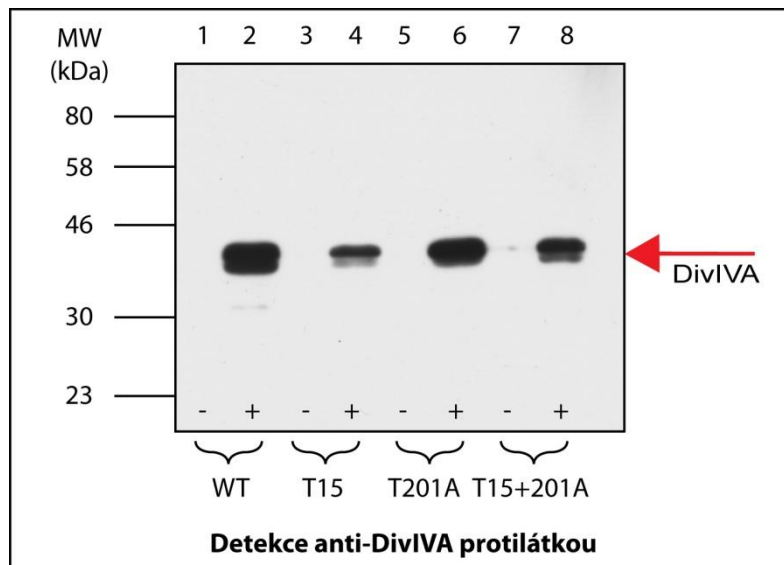
**Tab. 5-3: Přehled připravených a používaných kmenů *S. pneumoniae***

#### 5.5.4 Expres modifikovaných forem proteinu DivIVA ve *S. pneumoniae*

Pro expresi mutantního proteinu DivIVA v kmenech *S. pneumoniae* s vloženým komplementačním konstruktem (Sp49 – 51, Sp56, Sp63 a Sp64) jsme použili stejné optimalizované podmínky jako u kmene Sp37 (kapitola 5.5.2). Kultivace těchto kmenů probíhala v komplexním médiu M17G v přítomnosti 0,15 mM ZnCl<sub>2</sub> i bez ZnCl<sub>2</sub>. Jako kontrolu jsme použili kmen Sp37. Stejně jako v případě růstu Sp37 jsme kultivaci ukončili po dosažení optimální OD<sub>600</sub> 0,5. V lyzátech připravených z těchto kmenů jsme detekovali přítomnost mutantního proteinu anti-DivIVA protilátkou. Žádný signál jsme nezaznamenali v lyzátech z kmenů pěstovaných v nepřítomnosti ZnCl<sub>2</sub> (obr. 5-17 a 5-18). Signál jsme pomocí anti-DivIVA protilátky detekovali ve všech buněčných lyzátech

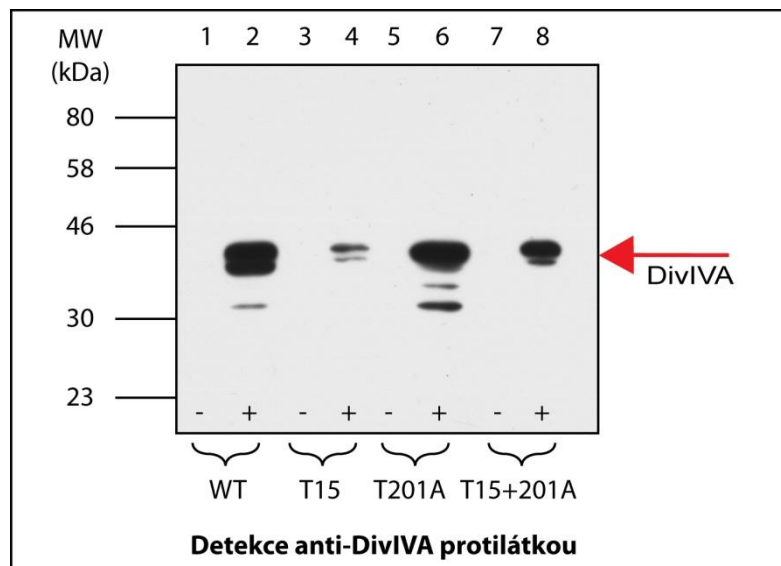


připravených z komplementačních kmenů *S. pneumoniae* kultivovaných v přítomnosti  $ZnCl_2$  (obr. 5-17; 5-18). Intenzita signálu modifikovaného proteinu s mutací T15 (A i E) a dvojitou mutací T15+201 byla slabší. Vysvětlujeme si to nižší stabilitou proteinu DivIVA s mutací T15 (fosfoablativní či fosfomimetickou).



**Obr. 5-17: Expres fosfoablativních mutant DivIVA u kmenů Sp49-51**

1) Sp37 bez zinku; 2) Sp37 0,15 mM  $ZnCl_2$ ; 3) Sp63 bez zinku; 4) Sp63 0,15 mM  $ZnCl_2$ ; 5) Sp56 bez zinku; 6) Sp56 0,15 mM  $ZnCl_2$ ; 7) Sp64 bez zinku; 8) Sp64 0,15 mM  $ZnCl_2$



**Obr. 5-18: Expres fosfomimetických mutant DivIVA u kmenů Sp56, Sp63, Sp64**

1) Sp37 bez zinku; 2) Sp37 0,15 mM  $ZnCl_2$ ; 3) Sp63 bez zinku; 4) Sp63 0,15 mM  $ZnCl_2$ ; 5) Sp56 bez zinku; 6) Sp56 0,15 mM  $ZnCl_2$ ; 7) Sp64 bez zinku; 8) Sp64 0,15 mM  $ZnCl_2$

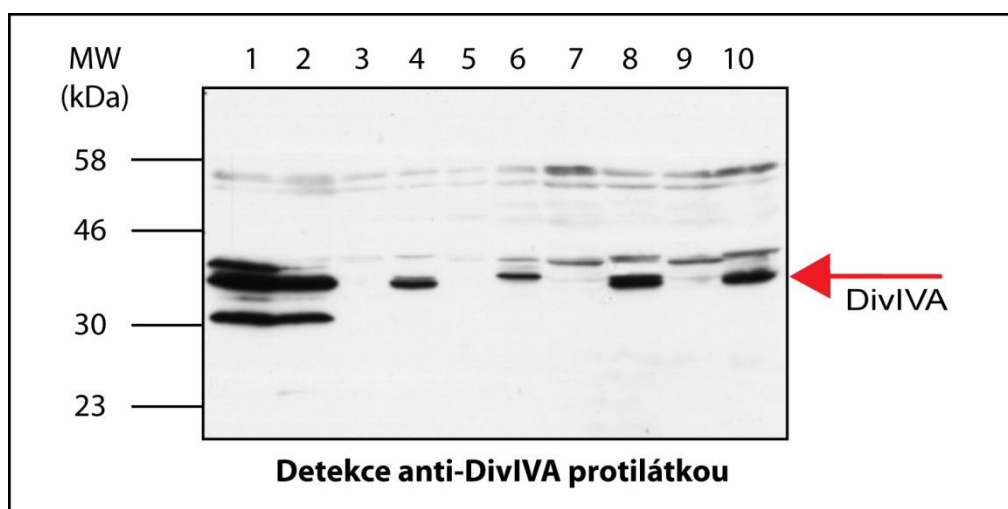
### 5.5.5 Fosforylace fosfoablativních forem DivIVA proteinkinázou StkP *in vivo*

Komplementační kmeny *S. pneumoniae* nesoucí pod zinkovým inducibilním promotorem modifikovaný gen *divIVA* (fosfoablativní mutace, Sp49-51) jsme využívali ke studiu fosforylace proteinu DivIVA *in vivo*. Specifická exprese modifikovaného proteinu v kmenech Sp49–51 byla popsána v kapitole 5.5.3 (obr. 5-17; obr. 5-19). V připravených buněčných lyzátech jsme detekovali fosforylované proteiny pomocí anti-pThr protilátky. Přítomnost fosfoablativních mutant DivIVA v těchto lyzátech jsme ověřili pomocí anti-DivIVA protilátky. Jako kontrolu jsme použili lyzáty z kmene Sp10 ( $\Delta$ *stkP*), Sp37 a z divokého typu *S. pneumoniae* Sp1.

Pomocí protilátky proti DivIVA jsme potvrdili produkci modifikovaného proteinu DivIVA v lyzátech připravených z kmenů Sp49-51 pěstovaných v médiu se zinkem. DivIVA byl samozřejmě detekován i v lyzátech Sp1, Sp10 a Sp37. Kmeny Sp1 a Sp10 byly kultivovány v médiu bez zinku. DivIVA u kmene Sp37 byl produkován pouze v médiu se zinkem (obr. 5-19).

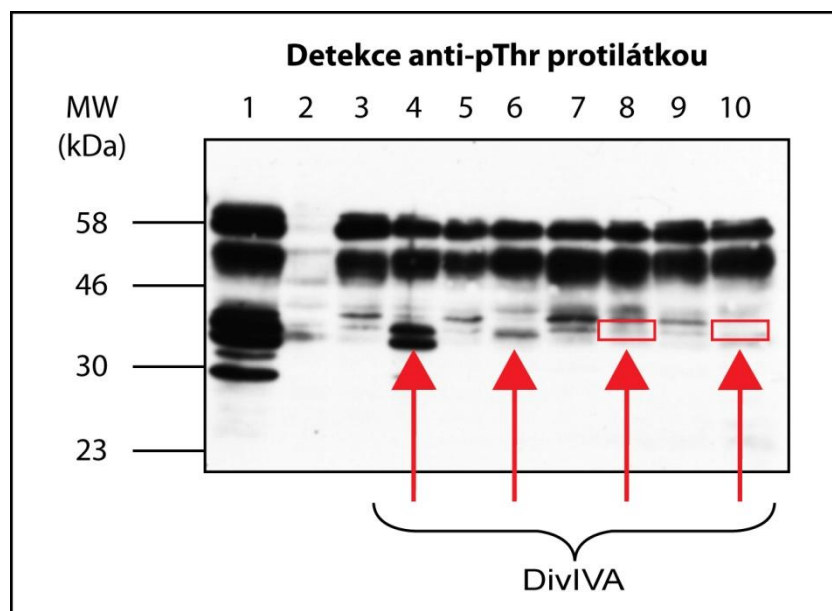
Po detekci anti-pThr protilátkou jsme zaznamenali patrný signál odpovídající velikosti DivIVA u kmene Sp49, který kóduje DivIVA-T15A (obr. 5-20). Intenzita tohoto signálu byla ovšem výrazně nižší než v lyzátech divokého typu a kmene Sp37. V lyzátech Sp50 ( $\Delta$ *divIVA*; *bga*::*P<sub>czcD</sub>-divIVA/T201A*), Sp51 ( $\Delta$ *divIVA*; *bga*::*P<sub>czcD</sub>-divIVA/T15+201A*) a Sp10 jsme nezaznamenali žádnou reakci s anti-pThr protilátkou odpovídající velikosti proteinu DivIVA (obr. 5-20). S protilátkou proti pThr reagovaly i další fosforylované proteiny v buněčných lyzátech všech použitých kmenů.

Výsledky imunodetekce potvrdily naše závěry ze studie fosforylace DivIVA *in vitro* a jsou v souladu s fosfoproteomickou studií provedenou u *S. pneumoniae* (SUN *et al.*, 2008). Je zřejmé, že pro fosforylaci DivIVA proteinkinázou StkP je esenciální aminokyselinou Thr201. S nižší účinností je ovšem fosforylován protein DivIVA i na Thr15.



**Obr. 5-19: Expres fosfoablativních mutant DivIVA u kmenů Sp49-51**

1) Sp1; 2) Sp10; 3) Sp37 bez zinku; 4) Sp37 0,15 mM ZnCl<sub>2</sub>; 5) Sp49 bez zinku; 6) Sp49 0,15 mM ZnCl<sub>2</sub>; 7) Sp50 bez zinku; 8) Sp50 0,15 mM ZnCl<sub>2</sub>; 9) Sp51 bez zinku; 10) Sp51 0,15 mM ZnCl<sub>2</sub>



**Obr. 5-20: Fosforylace modifikovaných forem DivIVA *in vivo***

1) Sp1; 2) Sp10; 3) Sp37 bez zinku; 4) Sp37 0,15 mM ZnCl<sub>2</sub>; 5) Sp49 bez zinku; 6) Sp49 0,15 mM ZnCl<sub>2</sub>; 7) Sp50 bez zinku; 8) Sp50 0,15 mM ZnCl<sub>2</sub>; 9) Sp51 bez zinku; 10) Sp51 0,15 mM ZnCl<sub>2</sub>

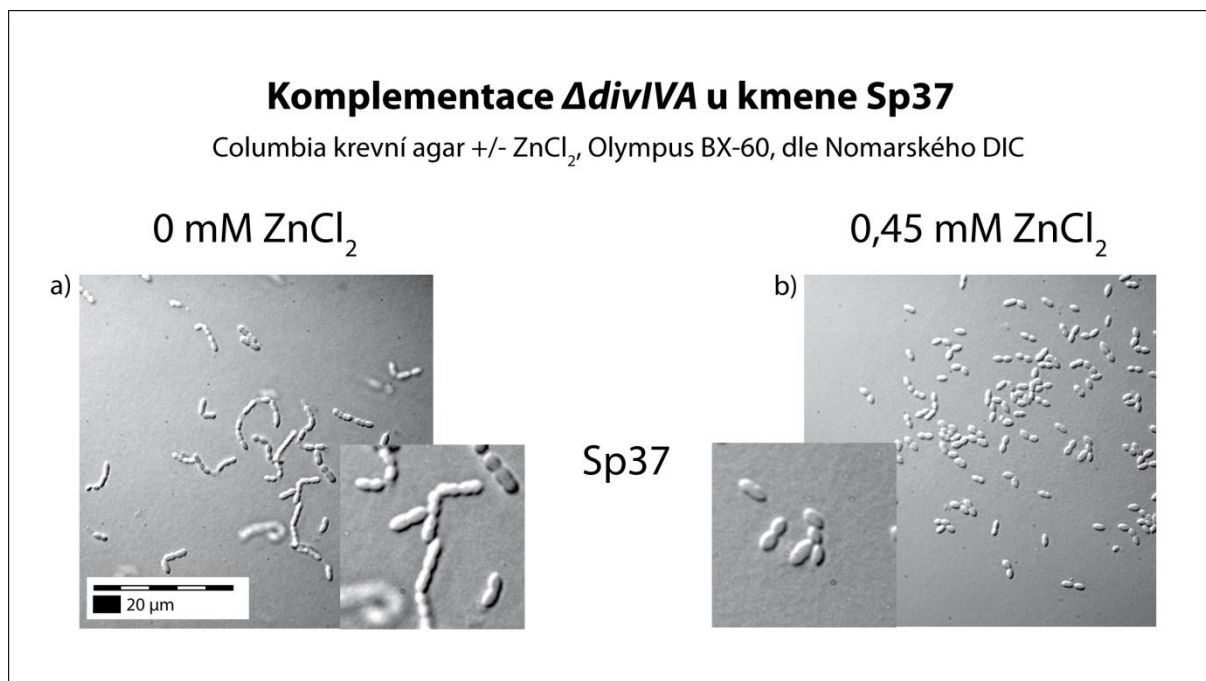
## 5.6 Komplementace delece *divIVA* modifikovanými formami DivIVA

Připravené kmeny s vloženým komplementačním konstruktem nám umožnili sledovat, jakým způsobem fosforylace proteinu DivIVA ovlivňuje jeho funkci. Komplementaci delece genu *divIVA* fosfoablativními mutanty a fosfomimetickými mutanty DivIVA jsme pozorovali na buněčné úrovni mikroskopem Olympus BX-60. Jelikož delece genu *divIVA* nebo ztráta funkčnosti tohoto proteinu vede k poruchám dělení

a tvorbě dlouhých řetízků z nerozdělených buněk, zaměřili jsme se právě na změny buněčné morfologie u jednotlivých komplementačních kmenů (Sp49-51, Sp56, Sp63 a Sp64).

Komplementaci jsme nejprve sledovali u kmene Sp37 ( $\Delta divIVA$ ; *bga::PczcD-divIVA*). Tento kmen jsme pěstovali jak v tekutém komplexním médiu M17G v přítomnosti 0,15 mM ZnCl<sub>2</sub>, tak na miskách s krevním agarem v přítomnosti zinku i bez zinku. Na pevném médiu jsme testovali schopnost růstu a komplementace  $\Delta divIVA$  v závislosti na koncentraci ZnCl<sub>2</sub> (0; 0,1; 0,15; 0,25; 0,35 a 0,45 mM ZnCl<sub>2</sub>). Kmen Sp37, stejně jako všechny ostatní kmeny *S. pneumoniae* s vloženým komplementačním konstruktem, rostl na pevném médiu i s vyšší koncentrací ZnCl<sub>2</sub> (0,45 mM). Preparáty jsme připravili z kultur, které se nacházely v exponenciální fázi růstu (OD<sub>600</sub> 0,5 v tekutém médiu; po 10 hodinách růstu na krevních miskách, 37°C). Poté jsme je sledovali olejovým imerzním objektivem (100x; 1,35) za použití DIC (kapitola 4.2.7). Bakteriální buňky pěstované v tekutém médiu se zinkem i bez zinku vykazovaly typický mutantní fenotyp – tvořili dlouhé nerozdělené řetízky buněk. Ke komplementaci delece genu *divIVA* na úrovni morfologie buněk tedy nedocházelo, ačkoliv jsme prokázali, že k produkci DivIVA dochází (kapitola 5.5.4). Úplná komplementace  $\Delta divIVA$  však byla zřejmá při růstu komplementačního kmene na misce s krevním agarem a se 0,45 mM ZnCl<sub>2</sub> (obr. 5-21b)). Na krevní misce bez zinku se delece genu projevovala charakteristickým „řetízkováním“ buněk, zatímco na miskách se zinkem tvořili bakterie dvojice – typický fenotyp divokého typu *S. pneumoniae* (obr. 5-21). U bakterií pěstovaných na miskách s nižší koncentrací ZnCl<sub>2</sub> jsme pozorovali pouze částečnou komplementaci. Buňky byly obvykle spojeny do krátkých řetízků.

Z našeho pozorování vyplývá, že ke komplementaci  $\Delta divIVA$  u kmene Sp37 dochází pouze při kultivaci buněk na misce s krevním agarem a s 0,45 mM ZnCl<sub>2</sub>. Tyto podmínky jsme zachovali při studiu komplementace u „fosfoablativních“ i „fosfomimetických“ komplementačních kmenů. Příčinou rozdílu ve fenotypu kmene Sp37 mohou být jiné povrchové struktury nebo odlišné enzymatické vybavení u bakterií pěstovaných v tekutém médiu oproti bakteriím, které jsou kultivovány na pevném médiu. Nemůžeme ani vyloučit vliv rozdílné hladiny exprese DivIVA.



**Obr. 5-21: Komplementace  $\Delta divIVA$  u kmene Sp37**  
Sp37 ( $\Delta divIVA$ ;  $bga::P_{czcD}-divIVA$ ): a) na krevní misce bez zinku; b) se zinkem

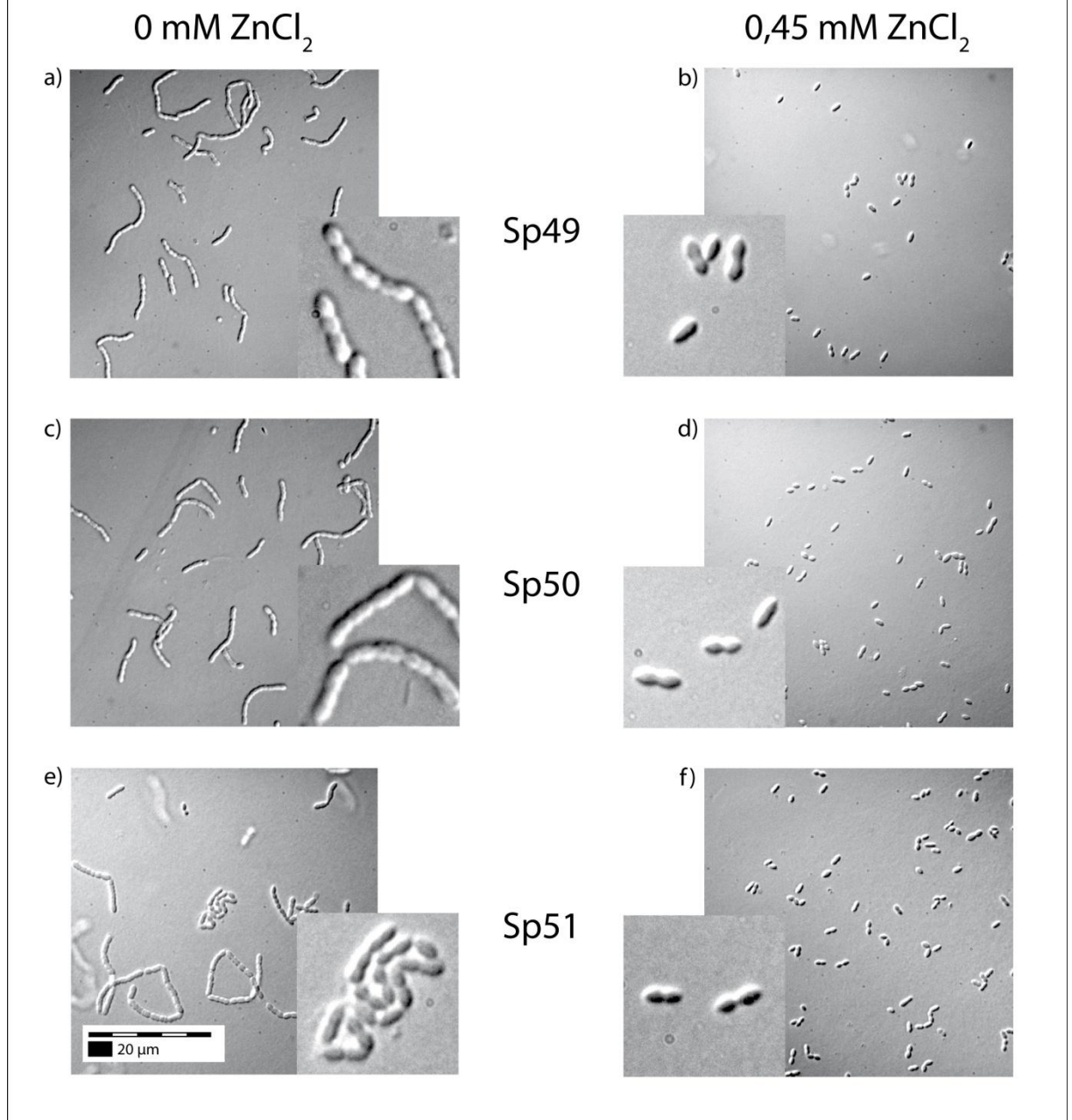
### 5.6.1 Komplementace $\Delta divIVA$ fosfoablativními mutanty DivIVA

Komplementační kmeny *S. pneumoniae* Sp49-51 nesoucí pod zinkovým inducibilním promotorem gen *divIVA* se zavedenou fosfoablativní mutací jsme napěstovali stejně jako kmen Sp37 na miskách s krevním agarem v přítomnosti zinku i bez zinku (kapitola 5.6). Mutantní formy DivIVA, které mají zaměněný threonin za alanin, nemohou být fosforylovány Ser/ Thr proteinkinázou. Můžeme tak studovat, je-li ovlivněna funkčnost nefosforylovaného proteinu.

Bakteriální buňky pěstované na miskách s krevním agarem bez zinku tvořily dlouhé řetízky, zatímco na miskách s koncentrací  $ZnCl_2$  0,45 mM jsme pozorovali „zdravé“ diplokoky u všech kmenů *S. pneumoniae* s fosfoablativní mutací proteinu DivIVA (obr. 5-22). Docházelo tedy ke komplementaci  $\Delta divIVA$  fenotypu proteinem DivIVA, který měl zaměněné původní aminokyseliny Thr15 a Thr201 za alanin. Z výsledků je zřejmé, že přestože DivIVA není fosforylován, je plně funkční.

## Komplementace $\Delta divIVA$ fosfoablativními mutanty DivIVA

Columbia krevní agar +/-  $ZnCl_2$ , Olympus BX-60, dle Nomarského DIC



**Obr. 5-22: Komplementace  $\Delta divIVA$  fosfoablativními mutanty DivIVA**

**Sp49** ( $\Delta divIVA$ ;  $bga::P_{czcD}-divIVA/T15A$ ): a) krevní miska bez zinku; b) se zinkem

**Sp50** ( $\Delta divIVA$ ;  $bga::P_{czcD}-divIVA/T201A$ ): c) krevní miska bez zinku; d) se zinkem

**Sp51** ( $\Delta divIVA$ ;  $bga::P_{czcD}-divIVA/T5+201A$ ): e) krevní miska bez zinku; f) se zinkem

### 5.6.2 Komplementace $\Delta divIVA$ fosfomimetickými mutanty DivIVA

Komplementaci u kmenů Sp56, Sp63 a Sp64, které nesou pod zinkovým inducibilním promotorem gen *divIVA* s fosfomimetickou záměnou původního threoninu za kyselinu glutamovou, jsme zjišťovali stejným způsobem jako u kmenů Sp37 a Sp49-51 (kapitola 5.6; 5.6.1). Kyselina glutamová simuluje fosforylovaný stav proteinu. Fosfomimetické záměny slouží k ucelení poznatků o vlivu fosforylace na funkci DivIVA.

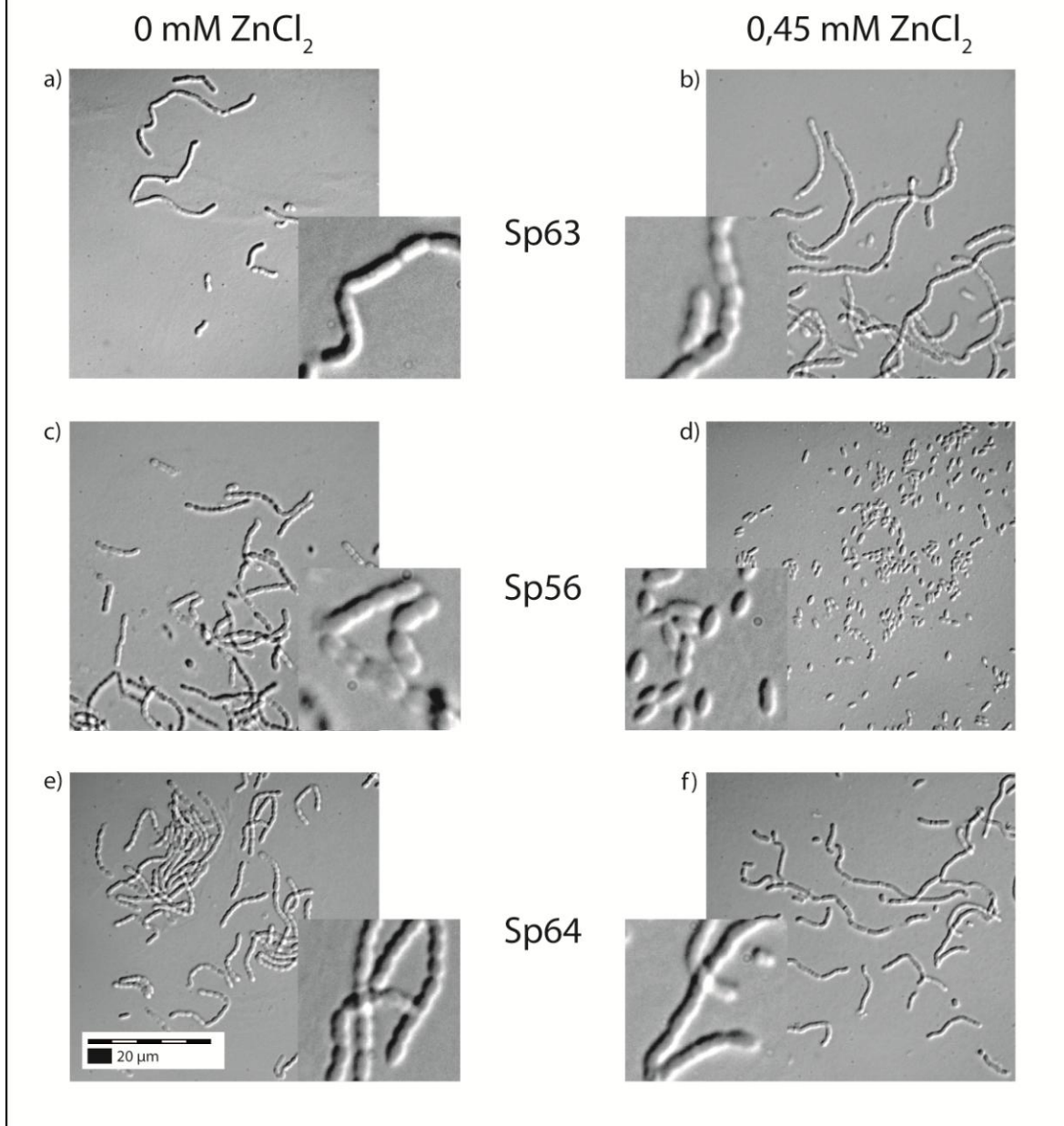
Pozorovali jsme, že bakterie všech „fosfomimetických“ kmenů Sp56, Sp63 i Sp64 rostoucí na miskách s krevním agarem bez zinku vytvářely dlouhé řetízky neoddělených buněk (obr. 5-23 a), c), e)). Ke komplementaci tohoto fenotypu došlo na krevních miskách s 0,45 mM ZnCl<sub>2</sub> pouze u kmene Sp56 ( $\Delta divIVA$ ; *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA/T201E*), který kóduje DivIVA/T201E (obr. 5-23 d)). Ostatní „fosfomimetické“ kmeny, Sp63 a Sp64, nekomplementují delecí genu pro DivIVA (obr. 5-23 b), f)).

Komplementační kmeny Sp63 ( $\Delta divIVA$ ; *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA/T15E*) a Sp64 ( $\Delta divIVA$ ; *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA/T15+201E*) v přítomnosti zinečnatých iontů produkují protein DivIVA, který nese jednoduchou mutaci T15E nebo dvojitou mutaci T15+201E. Tyto mutace proteinu DivIVA ovlivňují funkci proteinu, a tak i jeho schopnost komplementovat delecí přirozeného genu *divIVA*. Z našeho pozorování vyplývá, že pokud je zaměněn Thr15 za Glu, je protein DivIVA nefunkční, a je tedy pravděpodobné, že fosforylace na Thr15 vede k inaktivaci DivIVA.

V jednotlivých komplementačních kmenech kódujících DivIVA s mutací T15A/E nebo T15+201A/E jsme detekovali nižší hladinu exprese těchto modifikovaných proteinů oproti divokému typu DivIVA u kmene Sp1 (kapitola 5.5.4). Zvažujeme proto i možnost, že ke komplementaci  $\Delta divIVA$  nedochází v důsledku nízké produkce či nestability modifikovaného proteinu DivIVA, který nese fosfomimetickou záměnu původního Thr15.

## Komplementace $\Delta divIVA$ fosfomimetickými mutanty DivIVA

Columbia krevní agar +/-  $ZnCl_2$ , Olympus BX-60, dle Nomarského DIC



**Obr. 5-23: Komplementace  $\Delta divIVA$  fosfomimetickými mutanty DivIVA**

**Sp63** ( $\Delta divIVA$ ;  $bga::P_{czcD}-divIVA/T15E$ ): a) krevní miska bez zinku; b) se zinkem

**Sp56** ( $\Delta divIVA$ ;  $bga::P_{czcD}-divIVA/T201E$ ): c) krevní miska bez zinku; d) se zinkem

**Sp64** ( $\Delta divIVA$ ;  $bga::P_{czcD}-divIVA/T15+201E$ ): e) krevní miska bez zinku; f) se zinkem



## 5.7 Testy oligomerizace DivIVA ve *S. pneumoniae*

V sekundární struktuře proteinu DivIVA a jeho homologů (například Wag31 u *M. tuberculosis*) byly predikovány šroubovitě (tzv. coiled-coil) domény. Tyto domény se vyskytují mj. u eukaryotického tropomyosinu a zodpovídají za schopnost proteinu tvořit oligomery. Byly provedeny pokusy s purifikovanou biologicky aktivní variantou DivIVA *B. subtilis* (DivIVA9). Zjistilo se, že vytváří komplexy složené z 6-8 proteinových kopií (STAHLBERG *et al.*, 2004). Oligomery DivIVA byly nedávno prokázány i u půdní bakterie *Streptomyces coelicolor*. Schopnost skládat se do proteinových komplexů je u *S. coelicolor* důležitá pro funkci DivIVA (WANG *et al.*, 2009). Proto jsme se rozhodli otestovat, zda DivIVA *S. pneumoniae* tvoří vysokomolekulární komplexy *in vivo*, a jestli fosforylace proteinu ovlivňuje jeho schopnost oligomerizace.

Oligomerizaci DivIVA jsme testovali pomocí nativní proteinové elektroforézy (BN-PAGE, kapitola 4.2.2.2) a následné detekce anti-DivIVA protilátkou. BN-PAGE představuje metodu, která umožňuje rozdělit proteiny v enzymaticky aktivním, nedenedurovaném stavu. K separaci proteinů jsme využívali gradientový 4 % - 16 % polyakrylamidový gel.

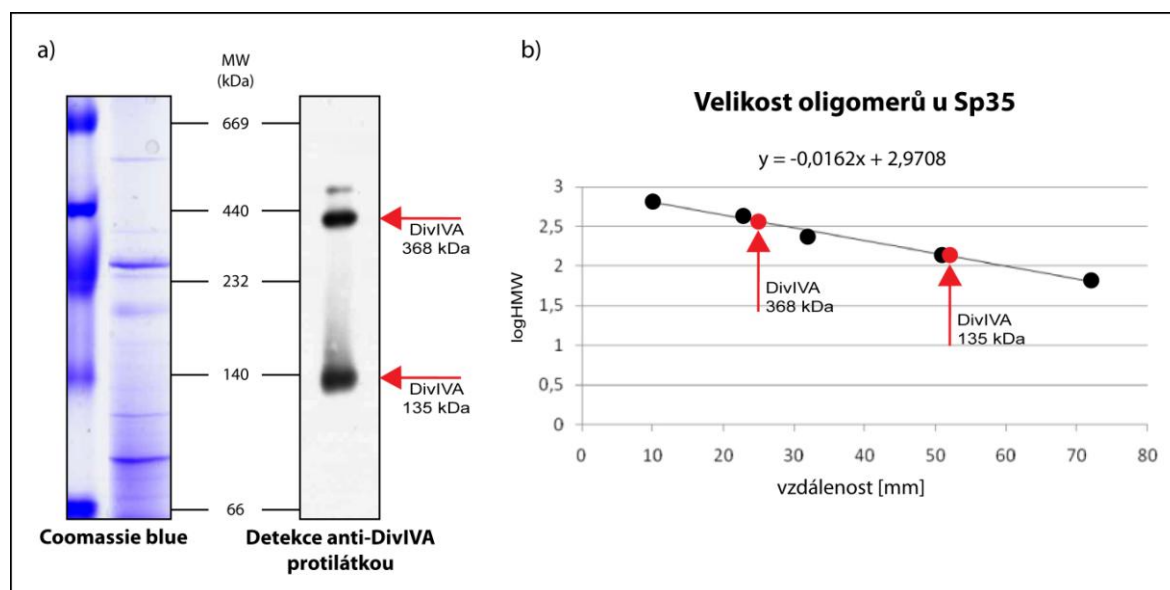
Schopnost proteinu DivIVA tvořit vysokomolekulární komplexy jsme studovali u kmenů Sp1, Sp10 a Sp35. Divoký typ *S. pneumoniae* Sp1 a kmen Sp10 (*ΔstkP*) jsme napěstovali v komplexním médiu M17G. Kmen Sp35 (*bga::P<sub>ccD</sub>-divIVA*) byl kultivován v médiu M17G s 0,15 mM ZnCl<sub>2</sub>. V přítomnosti zinku byl protein DivIVA u kmene Sp35 nadprodukován. Kultivaci jsme ukončili po dosažení optimální OD<sub>600</sub> 0,5. Poté jsme připravili bezbuněčné lyzáty a proteiny jsme rozdělili v polyakrylamidovém gelu za nedenedurojících podmínek. Následně jsme je pomocí metody Western blotting přenesli na membránu. DivIVA jsme detekovali anti-DivIVA protilátkou.

U kmene Sp1 a Sp35 jsme pomocí protilátky proti DivIVA zaznamenali dva výrazné signály označující různé stupně oligomerizace (obr 5-24; 5-25). První signál odpovídal velikosti přibližně 360 kDa, druhý kolem 140 kDa. U kmene Sp10 jsme anti-DivIVA protilátkou detekovali při stejné době expozice filmu pouze jediný signál, který představoval vysokomolekulární proteinové komplexy (obr. 5-25). Velikostně se shodoval s vyšším stupněm oligomerizace. Po delší době expozice se objevil slabý signál odpovídající i menším komplexům.

Protein DivIVA *S. pneumoniae* má molekulovou hmotnost 30,2 kDa. Z našich výsledků je patrné, že je schopen *in vivo* tvořit makromolekuly složené z několika proteinových kopií. Abychom určili molekulovou hmotnost detekovaných komplexů, změřili jsme vzdálenost migrace jednotlivých proteinových standardů o známé molekulové

hmotnosti od čela gelu. Vytvořili jsme graf závislosti migrace na molekulové hmotnosti a spočítali regresní rovnici (obr. 5-24; 5-25). Pomocí regresní rovnice jsme vypočítali pravděpodobnou velikost DivIVA komplexů. Detekovali jsme komplexy o molekulové hmotnosti odpovídající přibližně 360 kDa a 140 kDa, které odpovídají oligomerům sestavených z 12 a 4 kopií DivIVA. U kmene Sp10 (*AstkP*) není DivIVA fosforylován, ale vysokomolekulární komplexy formuje. Z našich výsledků vyplývá, že pro tvorbu oligomerů není fosforylace nezbytná.

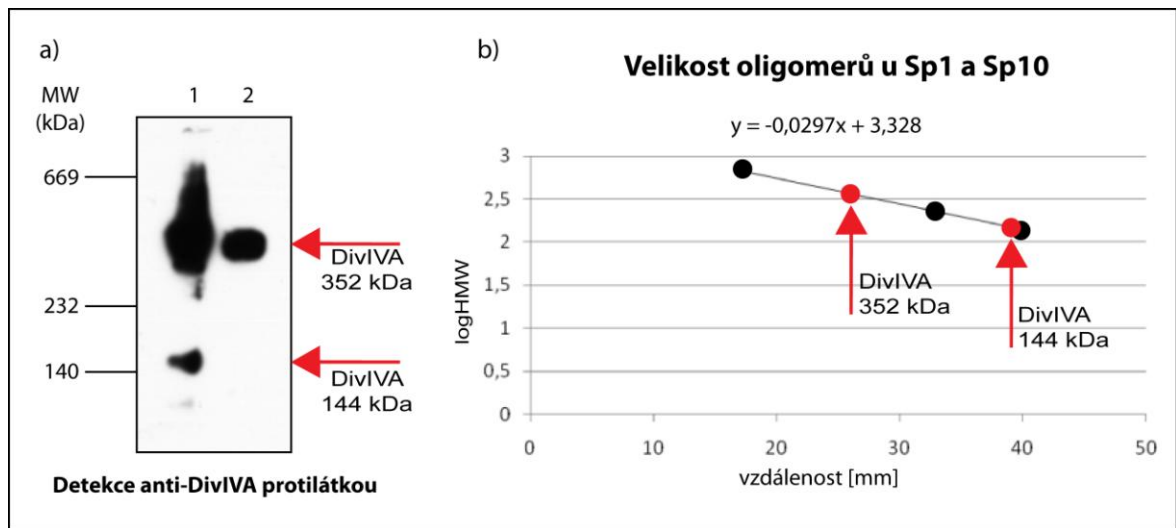
Snažili jsme se získat ucelené informace o vlivu fosforylace na schopnost proteinu DivIVA skládat se do makromolekulárních komplexů. Proto jsme testovali oligomerizaci pomocí BN-PAGE i u komplementačních kmenů kódujících protein DivIVA s fosfomimetickou mutací (Sp56, Sp63 a Sp64). Bohužel se nám nepodařilo detekovat žádný signál, pravděpodobně kvůli snížené expresi či stabilitě modifikovaného proteinu DivIVA. V budoucnu budeme tedy testovat oligomerizaci modifikovaných forem DivIVA jiným způsobem, například dvouhybridovým systémem.



**Obr. 5-24: Oligomerizace proteinu DivIVA u kmene Sp35**

a) BN-PAGE a imunodetekce DivIVA

b) graf závislosti relativní pohyblivosti proteinových standardů v gelu na jejich molekulové hmotnosti; **černá** kolečka: proteinové standardy; **červená** kolečka: DivIVA



**Obr. 5-26: Oligomerizace proteinu DivIVA u kmene Sp1 a Sp10**

a) imunodetekce DivIVA: 1) Sp1; 2) Sp10

b) graf závislosti relativní pohyblivosti proteinových standardů v gelu na jejich molekulové hmotnosti; **černá** kolečka: proteinové standardy; **červená** kolečka: DivIVA

## 6 DISKUZE

### 6.1 Fosforylace DivIVA prostřednictvím proteinkinázy StkP *in vitro*

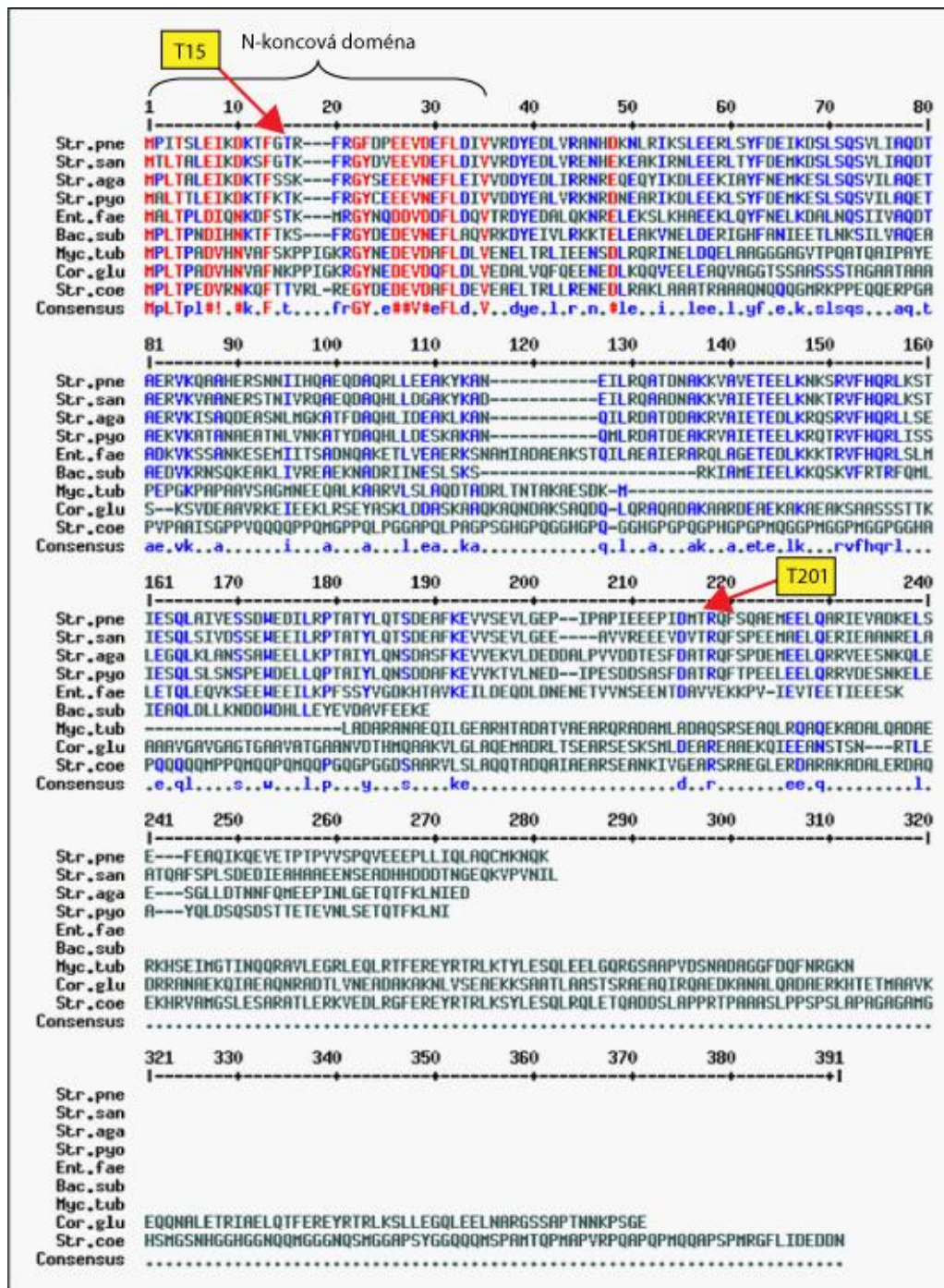
V genomu *Streptococcus pneumoniae* byla identifikována jediný gen pro Ser/ Thr proteinkinázu eukaryotického typu nazvaný *stkP*. StkP je membránová mangan-dependentní proteinkináza, která obsahuje katalytickou kinázovou doménu lokalizovanou v cytoplazmě, transmembránový helix a čtyři kopie PASTA domény v C-koncové extracelulární části. PASTA domény slouží jako senzory a jsou nezbytné pro aktivaci proteinkinázy. Předpokládá se, že StkP je aktivována po navázání specifického ligandu (patrně volných podjednotek peptidoglykanu) na PASTA domény podobným mechanismem, jaký byl popsán u eukaryotních receptorových proteinkináz (MAESTRO *et al.*, 2011; NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010). Proteinkináza StkP je dobrým imunogenním antigenem. Bylo zjištěno, že je zároveň vysoce konzervovaná mezi studovanými klinickými izoláty, proto se stala vhodným kandidátem na vývoj nové pneumokokové vakcíny (GIEFING *et al.*, 2008).

StkP není esenciální pro přežití bakterie v laboratorních podmínkách, ale fenotypový projev mutace *stkP* je velmi výrazný. Inaktivace *stkP* v nevirulentních kmenech *S. pneumoniae* způsobuje předčasnou buněčnou lyzi a výrazné snížení schopnosti přirozené kompetence. Ve virulentních kmenech *S. pneumoniae* se inaktivace *stkP* projevuje snížením až úplnou ztrátou virulence (ECHENIQUE *et al.*, 2004). Proteinkináza StkP působí v bakteriální buňce jako globální regulátor genové exprese, jelikož se účastní regulace exprese více než 4 % genů z genomu *S. pneumoniae* (SASKOVÁ *et al.*, 2007). Ovlivňuje odpověď na různé druhy stresu a reguluje celou řadu metabolických drah. Tato práce se zabývá studiem role StkP v regulaci buněčného dělení u *S. pneumoniae*. Kmen *S. pneumoniae* s mutací v genu *stkP* produkuje dlouhé buňky s defektem v tvorbě buněčných přepážek (GIEFING *et al.*, 2008). Porovnáním fosfoproteomu divokého kmene *S. pneumoniae* a kmene s inaktivovanou proteinkinázou  $\Delta stkP$  bylo identifikováno několik substrátů StkP *in vivo*, mezi nimi i protein buněčného dělení DivIVA (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010). Naším cílem bylo zjistit, které aminokyselinové zbytky DivIVA podléhají fosforylaci proteinkinázou StkP, a jak tato posttranslační kovalentní modifikace ovlivňuje vlastnosti a funkci proteinu DivIVA.

DivIVA u *Streptococcus pneumoniae* (DivIVA<sub>SPN</sub>) je protein složený z 266 aminokyselin. Ve spolupráci s laboratoří Virginie Molle (Université Lyon, Francie) byla pomocí hmotnostní spektrometrie identifikována fosforylovaná aminokyselina Thr15. Dále byl jako akceptor fosfátové skupiny u proteinu DivIVA *in vivo* určen Thr201 (SUN *et al.*,

2008). Abychom dokázali, že jsou právě tyto aminokyselinové zbytky fosforylovány proteinkinázou StkP *in vitro*, rozhodli jsme se připravit modifikované formy DivIVA, ve kterých jsme zaměnili předpokládané fosforylované aminokyseliny za neutrální alanin (T15A, T201A, T15+201A). Alanin nemůže nést fosfátovou skupinu, a nemůže tedy být Ser/ Thr proteinkinázou fosforylován. Mutagenezi jsme prováděli v genu *divIVA* naklonovaném v expresním vektoru pETPhos1505. Připravili jsme následující plazmidy: pETPhos1505-T15A, -T201A, T15+201A. Tyto plazmidy jsme transformovali do kmene *E. coli* BL21, ve kterém byly modifikované formy proteinu DivIVA exprimovány. Rekombinantní proteiny jsme izolovali pomocí afinitní chromatografie a podrobili je *in vitro* fosforylaci. Za použití standardních podmínek kinázové reakce se nám podařilo prokázat, že místem fosforylace je Thr201 i Thr15. Thr15 je ovšem proteinkinázou StkP *in vitro* fosforylován s nižší účinností. Stejně výsledky jsme získali i při použití kinázové reakce v přítomnosti  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP.

Porovnali jsme známé sekvence genu *divIVA* u několika bakterií a zjistili jsme, že oba threoniny jsou u rodu *Streptococcus* konzervované. Thr15 se nachází v N-koncové doméně, která je vysoce konzervovaná u většiny bakterií. Tato část se významně podílí na lokalizaci proteinu a jeho ukotvení do membrány (kapitola 6.2) (OLIVA *et al.*, 2010, LENARNIC *et al.*, 2009). Na rozdíl od Thr201, který spadá do málo konzervované oblasti, se Thr15 vyskytuje i u příbuzného rodu *Enterococcus* a u půdní bakterie *Streptomyces coelicolor* (obr. 6-1). Fosforylace proteinu DivIVA Ser/ Thr proteinkinázou Stk1 byla *in vivo* i *in vitro* prokázána u *Streptococcus agalactiae* (SILVESTRONI *et al.*, 2009). Pneumokoková proteinkináza StkP i Stk1 *S. agalactiae* jsou homologní k mykobakteriální PknB, která představuje modelovou Ser/ Thr proteinkinázu s PASTA doménami. Jedním ze substrátů PknB byl identifikován protein Wag31, homolog DivIVA u *Mycobacterium tuberculosis*. Bylo zjištěno, že akceptorem fosfátové skupiny u Wag31 je Thr73. Zjistilo se, že fosforylace tohoto dělicího proteinu výrazně ovlivňuje jeho funkci (kapitola 6-2) (HAMASHA *et al.*, 2010; JANI *et al.*, 2010).



**Obr. 6-1: Srovnání sekvencí DivIVA u různých bakterií**

**Str. pne:** *Streptococcus pneumoniae*; **Str. san:** *Streptococcus sanguinis*; **Str.aga:** *Streptococcus agalactiae*; **Str.pyo:** *Streptococcus pyogenes*; **Ent.fae:** *Enterococcus faecalis*; **Bac.sub:** *Bacillus subtilis*; **Myc.tub:** *Mycobacterium tuberculosis*; **Cor.glu:** *Corynebacterium glutamicum*; **Str. coe:** *Streptomyces coelicolor*

## 6.2 Vliv fosforylace na funkci DivIVA *in vivo*

Protein buněčného dělení DivIVA se vyskytuje téměř výhradně u grampozitivních bakterií. Ačkoliv se obvykle nejedná o esenciální protein, jeho inaktivace u většiny bakteriálních druhů způsobuje závažné poruchy syntézy peptidoglykanu, buněčného dělení či růstu. Výjimečně delece genu *divIVA* nevede k žádným fenotypovým projevům (*Staphylococcus aureus*) (PINHO & ERRINGTON, 2004), nebo naopak má fatální důsledky (*Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium smegmatis*) (RAMIREZ-ACROS *et al.*, 2005; NGUYEN *et al.*, 2007). Podrobně byl DivIVA zkoumán u zástupce grampozitivních bakterií *B. subtilis*. DivIVA<sub>BS</sub> hraje důležitou roli při výběru správného dělicího místa uprostřed buňky. Spolu s proteiny MinC, MinD a MinJ slouží jako negativní regulátor vzniku makromolekulárního dělicího komplexu na pólech buňky. Inaktivace DivIVA<sub>BS</sub> má za následek vznik bezjaderných mini buněk, zatímco jeho nadprodukce způsobuje tvorbu dlouhých vláken z nerozdělených buněk. U sporulujících bakterií navíc interaguje s proteinem RacA, a podílí se tak na uchycení chromozomu v budoucí prespoře (BEN-JEHUDA *et al.*, 2003). Proteiny homologní k DivIVA<sub>BS</sub> byly objeveny u mnohých dalších grampozitivních bakterií s rozličnými životními strategiemi. Zajímavým zjištěním byl objev přítomnosti DivIVA u odlišných skupin bakterií, jako například u *Deinococcus radiodurans* či u gramnegativní bakterie *Myxococcus xanthus* (AKIYMA *et al.*, 2003). Úloha proteinu DivIVA v životním cyklu jednotlivých bakterií se stále zkoumá. U streptomycét, korynebakterií a mykobaktérií je DivIVA součástí rozsáhlého systému zodpovídajícího za syntézu buněčné stěny, buněčnou morfologii a apikální růst (kapitola 2.2.1.2).

Inaktivace proteinu DivIVA u *S. pneumoniae* způsobuje poruchu tvorby dělicí přepážky a vznik dlouhých řetízků složených z neoddělených buněk. Gen *divIVA* se spolu s dalšími geny zodpovědnými za tvorbu buněčné stěny a dělení nachází na chromozomu v tzv. *dcw* klastru. Pomocí fluorescenční mikroskopie bylo dokázáno, že je lokalizován na buněčných pólech a ve středu buňky, kam migruje po několika minutách po utvoření Z-kruhu, esenciální dělicí struktury (FADDA *et al.*, 2007). Předpokládá se, že DivIVA slouží jako tzv. lešení pro mnohé další proteiny, a podílí se tak na jejich umístění v dělicím septu nebo na buněčných pólech. Mezi potenciální interakční partnery DivIVA<sub>SPN</sub> patří proteiny tvořící funkční dělicí komplex (například FtsZ, FtsA, FtsK, DivIVB, DivIC, FtsL nebo FtsW) a proteiny podílející se na stavbě buněčné stěny (PBP-2). Dosud bylo prokázáno, že může také interagovat s proteiny LytB a PcsB (FADDA *et al.*, 2007).

Jednou z dosud ne zcela objasněných otázek zůstává, jaký molekulární mechanismus je zodpovědný za cílenou lokalizaci proteinu DivIVA na póly buňky a do dělicí přepážky a

jeho ukotvení v membráně. Bylo navrženo několik hypotéz. Studovala se možnost, zda za přesné umístění proteinu není zodpovědný jev zvaný chromozomální okluze, který brání vytvoření dělicího komplexu v místě chromozomu. Zjistilo se, že protein DivIVA není u buněk zbavených jádra rozmístěn náhodně a jeho lokalizace se neliší od zdravých bakterií (RAMAMURTHI & LOSICK, 2009). Proto byla tato možnost vyloučena. Běžným způsobem cílení proteinů je prostřednictvím interakce s jinými proteiny, například integrálními membránovými. Jelikož je protein DivIVA spojen s membránou, testovala se i tato varianta. DivIVA se ovšem vázal i k lipidové dvojvrstvě zbavené proteinů (LENARNIC *et al.*, 2009). Bylo prokázáno, že cytoplazmatická membrána není homogenní. U *B. subtilis* se v polárních a septálních oblastech se vyskytuje více kardiolipinu (CP) a fosfatidyletanolaminu (PE) (NISHIBORI *et al.*, 2005). Zdá se pravděpodobné, že lokalizace DivIVA je závislá na přítomnosti specifických lipidů v membráně. Delece genů pro biosyntézu různých fosfolipidů ovšem nevedly ke změně lokalizace DivIVA (LENARNIC *et al.*, 2009). Aktuálním tématem je cílené umístění proteinu DivIVA determinované negativním zakřivením membrány (LENARNIC *et al.*, 2009; RAMAMURTHI & LOSICK, 2009). Příkladem proteinu, který rozeznává geometrickou topologii membrány je malý membránový protein SpoVM uplatňující se při tvorbě sporového obalu. Na rozdíl od DivIVA, který se váže na konkávní stranu cytoplazmatické membrány, rozeznává konvexní stranu membrány, kde je také lokalizován (RAMAMURTHI *et al.*, 2009). DivIVA u *B. subtilis* není staticky umístěn na pólech buňky či ve formujícím se divizomu, ale dynamicky se pohybuje v závislosti na fázi životního cyklu bakterie. Primárně se vyskytuje v dělicím septu, kde je membrána nejvíce zakřivená (LENARNIC *et al.*, 2009). Výsledky z transmisního elektronového mikroskopu nedokazují, že by se membrána prostřednictvím vazby DivIVA deformovala. Rozsáhlou deleční analýzou bylo zjištěno, že se na lokalizaci podílí N-koncová doména obsahující amfipatický helix, která je vysoce konzervovaná u homologních proteinů DivIVA u většiny grampozitivních bakterií (obr. 6-1) (OLIVA *et al.*, 2010, LENARNIC *et al.*, 2009). C-konec DivIVA se liší jak délkou, tak i aminokyselinovým složením (obr. 6-1). V nedávné době byly vytvořeny modely krystalové struktury N-koncové domény DivIVA *B. subtilis*. Tento model pomohl při hledání konkrétních aminokyselinových zbytků zodpovídajících za ukotvení DivIVA do cytoplazmatické membrány. Jedná se o hydrofobní zbytky, které kompenzují silný negativní náboj na povrchu lipidové dvojvrstvy. Bylo zjištěno, že N-konec konzervovaný u DivIVA většiny bakterií formuje dimer ohraničený smyčkami. Díky tomu se na povrch dostávají dva fenylalaniny na pozici 17 (Phe17), které jsou esenciální pro integraci do membrány. S pozitivně nabitým



membránovým povrchem interagují argininy na pozici 18 (Arg18). Tyto aminokyselinové zbytky jsou značně konzervované, výjimečně jsou nahrazeny stejně nabitou aminokyselinou (OLIVA *et al.*, 2010). C-koncová doména je poměrně málo konzervovaná, ale je zjevné, že se díky přítomnosti šroubovitých (tzv. coiled-coil) domén podílí na oligomerizaci DivIVA. Schopnost vytvářet makromolekulární komplexy je patrně pro správnou funkci i přesnou lokalizaci DivIVA důležitá (kapitola 6-3) (OLIVA *et al.*, 2010, LENARNIC *et al.*, 2009).

Jedním z našich cílů bylo objasnit vliv fosforylace proteinkinázou StkP na funkci proteinu DivIVA, případně na jeho lokalizaci *in vivo*. V nedávné době byla provedena obdobná studie u proteinu Wag31 u *M. tuberculosis*. Mykobakteriální homolog DivIVA, Wag31, byl identifikován jako jeden ze substrátů Ser/ Thr proteinkináz PknA a PknB. Je zřejmé, že fosforylace Wag31 ovlivňuje biosyntézu polárního peptidoglykanu. Byla vytvořena hypotéza, že fosforylovaný stav molekul Wag31 umožňuje jejich oligomerizaci a následnou lokalizaci. Multimerní protein správně umístěný na pólech buňky pak může ovlivňovat syntézu peptidoglykanu buď přímo, nebo nepřímo prostřednictvím interakce s enzymy zahrnutými v tvorbě buněčné stěny (například Mur proteiny) (JANI *et al.*, 2010).

Studium vlivu fosforylace na funkci proteinu DivIVA jsme zahájili ověřením, zda je DivIVA substrátem proteinkinázy StkP i *in vivo*. Předchozí pokusy byly prováděny s rekombinantním proteinem DivIVA produkovaném v expresním kmeni *E. coli*. Podařilo se nám prokázat, že je DivIVA skutečným substrátem proteinkinázy StkP *in vitro* a je fosforylován na aminokyselinových zbytcích Thr15 a Thr201. Fosforylace *in vitro* může vést ke vzniku artefaktů. Abychom mohli studovat, zda je tento dělicí protein fosforylován pneumokokovou proteinkinázou StkP v mateřském organizmu, rozhodli jsme se připravit kmeny *S. pneumoniae*, ve kterých bylo možno indukovat expresi proteinu DivIVA divokého typu a mutantních forem.

Vytvořili jsme tedy plazmid pZn-DivIVA, který obsahoval gen *divIVA* pod inducibilním zinkovým promotorem. Konstrukt jsme prostřednictvím alelické výměny integrovali do *bga* lokusu jednak na chromozomu *S. pneumoniae* divokého typu a také na chromozomu kmene s delecí genu *divIVA*. V připraveném kmeni Sp37 ( $\Delta divIVA$ ; *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA*) jsme optimalizovali produkci DivIVA. Zajímavé bylo, že účinnost exprese *divIVA* pod zinkovým promotorem záležela na složení komplexního média a použité koncentraci ZnCl<sub>2</sub>. Produkce DivIVA v komplementačním kmeni byla optimální v médiu M17G při 0,15 mM ZnCl<sub>2</sub>. Za těchto podmínek bylo množství proteinu DivIVA v kmeni Sp37 srovnatelné s množstvím DivIVA u divokého typu *S. pneumoniae*.

Sledovali jsme také, jaký vliv má exprese *divIVA* pod zinkovým promotorem na růst připravených kmenů (Sp35 *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA*; Sp37  $\Delta$ *divIVA*; *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA*). Zajímalo nás, zda bude indukovaná exprese DivIVA kompenzovat pomalý růst kmene s  $\Delta$ *divIVA* nebo zda nadprodukce DivIVA ovlivní růst divokého kmene. U obou kmenů jsme testovali růstovou charakteristiku v médiu v přítomnosti zinečnatých iontů i v jejich nepřítomnosti a porovnávali ji s růstem divokého kmene *S. pneumoniae* a kmene s delecí přirozeného genu pro DivIVA. Zjistili jsme, že vložený komplementační konstrukt bakterii zatěžuje a znevýhodňuje ji oproti divokému typu. Z našich pokusů je také zjevné, že přítomnost zinku v tekutém médiu zpomaluje růst *S. pneumoniae*. Pomocí růstové charakteristiky se nám nepodařilo jednoznačně potvrdit, že exprese *divIVA* pod zinkovým promotorem vede ke komplementaci  $\Delta$ *divIVA* mutace.

Gen *divIVA* naklonovaný pod zinkovým inducibilním promotorem v plazmidu pZn-DivIVA jsme následně pomocí mutagenní PCR modifikovali. Obě pravděpodobně fosforylované aminokyseliny, Thr15 a Thr201, jsme zaměňovali buď za neutrální alanin (T15A, T201A, T15+201A), nebo za fosfomimetickou kyselinu glutamovou (T15E, T201E, T15+201E), která napodobuje fosforylovaný stav proteinu. Připravili jsme plazmidy pZn-DivIVA-T15A/E, -T201A/E, -T15+201A/E., které jsme poté integrovali do chromozomu kmene *S. pneumoniae*  $\Delta$ *divIVA*. U vytvořených komplementačních kmenů *S. pneumoniae* jsme testovali expresi a fosforylaci DivIVA. Z výsledků vyplývá, že při stejných kultivačních podmínkách je množství modifikovaného proteinu s jednoduchou mutací Thr15 (T15A i E) nebo dvojitou mutací (T15+201A i E) v buňce nižší než množství divokého typu DivIVA u komplementačního kmene Sp37. Domníváme se, že záměna Thr15 za jinou aminokyselinu pravděpodobně vede ke snížení stability proteinu. Fosfoablativní ani fosfomimetická mutace Thr201 neovlivňovala expresi modifikovaného genu *divIVA* či stabilitu proteinu. Detekovali jsme shodné množství DivIVA u divokého typu *S. pneumoniae* a DivIVA-T201A/E v buňkách komplementačních kmenů *S. pneumoniae*.

Abychom ověřili, které aminokyseliny DivIVA podléhají fosforylaci proteinkinázou StkP *in vivo*, připravili jsme si lyzáty z „fosfoablativních“ komplementačních kmenů *S. pneumoniae*, ve kterých jsme detekovali fosforylované proteiny protilátkou proti pThr a přítomnost proteinu DivIVA a jeho fosfoablativních mutantních forem jsme ověřili protilátkou proti DivIVA. Jako kontrolu jsme použili lyzáty z kmene *S. pneumoniae*  $\Delta$ *stkP*, Sp37 a z divokého typu *S. pneumoniae*. Zjistili jsme, že *in vivo* je protein DivIVA fosforylován na Thr201 a s nižší účinností i na Thr15. Tyto výsledky jsou v souladu se závěry ze studia fosforylace *in vitro* a potvrzují i nedávno provedenou fosfoproteomickou

studii *S. pneumoniae*, ve které byl právě Thr201 u DivIVA určen jako fosforylovaný aminokyselinový zbytek (SUN *et al.*, 2008).

Jak už bylo výše řečeno, delece genu *divIVA* nebo ztráta funkčnosti DivIVA u *S. pneumoniae* způsobuje poruchu dělení a vznik dlouhých řetízků z nerozdělených bakterií. Zaměřili jsme se tedy na změny buněčné morfologie u jednotlivých komplementačních kmenů a ze získaných pozorování jsme odvozovali vliv fosforylace na funkčnost proteinu DivIVA. Jako kontrolní kmen jsme použili Sp37. Tento kmen jsme využili i na optimalizaci kultivačních podmínek pro testy komplementace. Kmen Sp37 jsme pěstovali v komplexním médiu se zinkem (M17G médium se 0,15 mM ZnCl<sub>2</sub>) a také v médiu M17G bez zinku. V obou případech buňky vykazovaly mutantní fenotyp, ke komplementaci tedy nedocházelo. Úplnou komplementaci mutace jsme pozorovali pouze při kultivaci komplementačního kmene Sp37 na krevní misce s agarem v přítomnosti 0,45 mM ZnCl<sub>2</sub>. Bakterie rostoucí na misce s krevním agarem s koncentrací ZnCl<sub>2</sub> nižší než 0,45 mM vytvářely krátké řetízky, docházelo tedy pouze k částečné komplementaci  $\Delta divIVA$ . Zamýšleli jsme se nad příčinou rozdílu ve fenotypu kmene Sp37 kultivovaném v tekutém a pevném médiu. Vysvětlením mohou být jiné povrchové struktury nebo odlišné enzymatické vybavení u bakterií pěstovaných v tekutém médiu oproti bakteriím, které jsou kultivovány na misce s krevním agarem. Nemůžeme vyloučit ani vliv rozdílné hladiny exprese DivIVA, ačkoliv při ověřování exprese *divIVA* pod zinkovým promotorem v tekutém médiu u kmene Sp37 jsme zjistili, že množství produkovaného DivIVA je srovnatelné s produkcí DivIVA v divokém typu *S. pneumoniae*.

Dále jsme sledovali fenotyp komplementačních kmenů kódujících gen *divIVA* se zavedenou fosfoablativní mutací, které jsme stejně jako Sp37 napěstovali na pevném médiu se zinkem (0,45 mM ZnCl<sub>2</sub>) a bez zinku. Bakterie, které rostly na misce s krevním agarem bez zinku, byly spojeny do dlouhých řetízků, zatímco na misce se zinkem jsme pozorovali „zdravé“ diplokoky. Docházelo tedy ke komplementaci  $\Delta divIVA$  fenotypu proteinem DivIVA, který měl zaměněné původní aminokyseliny Thr15 a Thr201 za alanin. Z výsledků můžeme tvrdit, že přestože DivIVA není fosforylován, je plně funkční. Porucha dělení pozorovaná u kmene *S. pneumoniae* s delecí genu *stkP* tedy není způsobena ztrátou funkce proteinu DivIVA. To potvrzuje i porovnání fenotypu kmene  $\Delta divIVA$  a kmene  $\Delta stkP$ . Nepřítomnost DivIVA u *S. pneumoniae* má za následek tvorbu dlouhých řetízků z nerozdělených buněk. Buňky u kmene  $\Delta stkP$  jsou delší a širší než u divokého kmene *S. pneumoniae*, ale neformují tak dlouhé řetízky jako kmen  $\Delta divIVA$ . Je tedy zřejmé, že porucha buněčného dělení u kmene  $\Delta stkP$  je způsobena ještě jinými faktory než modifikací funkce DivIVA. Pravděpodobným kandidátem je například protein FtsZ.

Nedávno bylo prokázáno, že FtsZ je fosforylován proteinkinázou StkP *in vitro*, význam této modifikace *in vivo* však objasněn nebyl (GIEFING *et al.*, 2010).

Komplementaci jsme stejným způsobem jako „fosfoablativní“ kmeny sledovali i u připravených „fosfomimetických“ komplementačních kmenů *S. pneumoniae*. Tyto kmeny produkovaly protein DivIVA, který měl původní threoniny zaměněny za kyselinu glutamovou, která napodobuje fosforylovaný stav proteinu. Fosfomimetické záměny nám posloužili k ucelení poznatků o vlivu fosforylace na funkci DivIVA. Z našich pozorování je patrné, že hyperfosforylace negativně ovlivňuje funkčnost proteinu DivIVA. Kmeny *S. pneumoniae* kódující DivIVA/T15E a DivIVA/T15+201E pěstované na misce s krevním agarem a 0,45 mM ZnCl<sub>2</sub> vytvářely dlouhé řetízky. Nedocházelo tedy ke komplementaci *ΔdivIVA* fenotypu. Kmen produkující DivIVA/T201E na misce se zinkem delecí *divIVA* komplementoval. Z našich výsledků vyplývá, že ani jedna námi zavedená mutace aminokyselinového zbytku Thr201 neovlivňuje negativně funkci DivIVA. Nepodařilo se nám tedy zatím přiblížit, jaký význam fosforylace Thr201 má. Naopak mutace Thr15, která simuluje fosforylovaný stav proteinu, způsobuje jeho inaktivaci. Jelikož jsme v jednotlivých komplementačních kmenech kódujících DivIVA s mutací T15A/E nebo T15+201A/E detekovali nižší množství těchto modifikovaných proteinů oproti DivIVA u divokého typu *S. pneumoniae*, nevylučujeme ani možnost, že ke komplementaci *ΔdivIVA* nedochází v důsledku nízké produkce či malé stability modifikovaného proteinu DivIVA. Nabízí se však i další atraktivní vysvětlení. Jak už bylo výše zmíněno, Thr15 se vyskytuje ve vysoce konzervované N-koncové doméně, která je potřebná pro správnou lokalizaci DivIVA a jeho interakci s membránou. Je tedy také možné, že záměna threoninu za kyselinu glutamovou může způsobit delokalizaci DivIVA. Již dříve bylo prokázáno, že záměna některých hydrofobních aminokyselin za pozitivně nabitou kyselinu glutamovou v N-konci vede k delokalizaci proteinu (LENARNIC *et al.*, 2009). Nabízí se tedy vysvětlení, že fosforylace Thr15, která vede k zavedení negativního náboje na N-konec DivIVA, znemožní interakci proteinu s membránou, a tím vede k inhibici jeho funkce v buněčném dělení.

### 6.3 Oligomerizace DivIVA

Jedním z cílů této diplomové práce bylo zjistit, zda je DivIVA u *S. pneumoniae* schopen oligomerizovat a tvořit vysokomolekulární struktury. Dále nás zajímalo, jaký vliv má fosforylace na oligomerizaci, a potažmo i na funkci DivIVA.

Schopnost proteinu DivIVA tvořit oligomery byla jako první studována u *B. subtilis*. DivIVA<sub>BS</sub> je vícefunkční protein tvořený 164 AK o molekulové hmotnosti 19,5 kDa. V jeho sekundární struktuře byly pomocí počítačové analýzy predikovány šroubovitě, coiled-coil domény, které jsou zodpovědné právě za skládání jednotlivých molekul DivIVA do vysokomolekulárních struktur. Tyto domény jsou konzervované i u homologních proteinů DivIVA dalších grampozitivních bakterií a připomínají esenciální domény eukaryotního proteinu tropomyosinu. Pomocí analytické ultracentrifugace a elektroforézy bylo *in vitro* prokázáno, že DivIV<sub>BS</sub> tvoří oligomery složené z 10 – 12 proteinových kopií o přibližné molekulové hmotnosti 200 kDa (MUCHOVÁ *et al.*, 2002). Za oligomerizaci DivIV<sub>BS</sub> jsou zodpovědné domény v centrální části proteinu. Pomocí nativní gelové elektroforézy byly identifikovány vysokomolekulární komplexy tvořené shodným počtem podjednotek DivIVA i *in vivo*. Mutační studie DivIVA<sub>BS</sub> objasnila vliv oligomerizace na funkčnost proteinu. Je zřejmé, že oligomerizace DivIVA<sub>BS</sub> je důležitá pro jeho správnou funkci v buněčném dělení (MUCHOVÁ *et al.*, 2002). Vysokomolekulární komplexy DivIVA u *B. subtilis* byly zkoumány i pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Ke studiu byla použita biologicky aktivní varianta DivIVA9 (DivIVA<sub>BS</sub>/E162K). Byly pozorovány oligomery s molekulovou hmotností 145 kDa tvořené 6 – 8 podjednotkami DivIVA9 (STAHLBERG *et al.*, 2004). Jednotlivé oligomery byly dlouhé 22,4 nm a široké 2,9 nm a na obou koncích vytvářely globulární rozšíření. Svým tvarem připomínaly „psí kost“. Bylo dokázáno, že rozšířené konce mohou vzájemně interagovat a formovat rozsáhlou dvourozměrnou síť, která pravděpodobně významně ovlivňuje lokalizaci a aktivitu proteinu (STAHLBERG *et al.*, 2004). Nejnovější poznatky o oligomerizaci DivIVA<sub>BS</sub> jsou založeny na studiu modelu jeho krystalové struktury, z které se usuzuje, že vytváří tetrametry (OLIVA *et al.*, 2010).

Oligomerizace DivIVA byla studována i u vláknité bakterie *Streptomyces coelicolor*. DivIVA<sub>SC</sub> je středně velký protein (389 AK) o molekulové hmotnosti 41 kDa zodpovědný za apikální růst bakterie a zakládání nových hyf. Aminokyselinová sekvence DivIVA<sub>SC</sub> obsahuje vysoce konzervovanou N-koncovou část a coiled-coil domény společné pro DivIVA u většiny bakteriálních druhů. Navíc však obsahuje dlouhou C-koncovou část (AK 309 - 398) a tzv. PQG úsek bohatý na aminokyseliny prolin, glutamin a glycin (AK 66 – 201) (obr. 6-1). Bylo zjištěno, že tyto oblasti jsou pro oligomerizaci i správnou funkci DivIVA<sub>SC</sub> postradatelné

(WANG *et al.*, 2009), zatímco prvních 22 AK na N-koncové části a coiled-coil doména (AK 210 – 314) nikoliv. Vysokomolekulární struktury DivIVA<sub>SC</sub> byly objeveny *in vitro* i *in vivo*. Purifikované komplexy DivIVA<sub>SC</sub> se mohou skládat do dlouhých filament připomínajících eukaryotní cytoskeletální struktury (WANG *et al.*, 2009). Oligomery DivIVA byly identifikovány i u dalších grampozitivních bakterií, například u *Mycobacterium smegmatis* nebo *Enterococcus faecalis*, kde jsou tvořeny 10 – 12 proteinovými podjednotkami (NGUYEN *et al.*, 2007; RIGDEN *et al.*, 2008).

Schopnost vytvářet oligomery DivIVA jsme testovali pomocí nativní proteinové elektroforézy u divokého typu *S. pneumoniae*, dále pak u kmene s delecí genu pro StkP a kmene Sp35, který nesl dvě kopie genu *divIVA*. Ve všech kmenech se nám podařilo detekovat komplexy o molekulové hmotnosti odpovídající přibližně 360 kDa a 140 kDa. Z těchto výsledků vyplývá, že DivIVA tvoří oligomery sestavené z 12 a 4 proteinových kopií. Shodné komplexy byly popsány i v jiných bakteriích, což odkazuje na podobné funkce i vlastnosti DivIVA a homologních proteinů u různých bakteriálních druhů. DivIVA u kmene *S. pneumoniae*  $\Delta$ stkP není fosforylován, přesto formuje vysokomolekulární komplexy. Zdá se tedy, že fosforylace není pro tvorbu oligomerů potřebná.

## 7 SOUHRN

Výsledky této diplomové práce můžeme shrnout do následujících bodů:

- Připravili jsme vhodný plazmid pTYB2-DivIVA pro expresi genu *divIVA* v *E. coli*. Protein DivIVA jsme nadprodukovali a izolovali pomocí afinitní chromatografie.
- Zjistili jsme, že rekombinantní protein DivIVA je v přítomnosti proteinkinázy StkP *in vitro* fosforylován.
- Mutagenézí jsme připravili fosfoablativní formy genu *divIVA* v expresním vektoru pETPhos1505. Zaměňovali jsme předpokládané fosforylované aminokyseliny Thr15 a Thr201 za neutrální alanin. Modifikované formy i divoký typ genu *divIVA* jsme exprimovali v *E. coli*, izolovali jsme proteiny DivIVA-WT, -T15A, -T201A a -T15+201A a následně jsme testovali, které aminokyselinové zbytky podléhají fosforylaci proteinkinázou StkP. Zjistili jsme, že protein DivIVA je *in vitro* fosforylován proteinkinázou StkP na Thr201 a s nižší účinností i na Thr15.
- Připravili jsme fosfoablativní a fosfomimetické mutace genu *divIVA* v plazmidu určeném pro komplementaci *divIVA* delece ve *S. pneumoniae*. Původní aminokyseliny Thr15 a Thr201 jsme zaměnili buď za neutrální alanin, nebo za fosfomimetickou kyselinu glutamovou, která simuluje fosforylovaný stav proteinu. Vytvořené plazmidy pZn-DivIVA-T15A/E; -T201A/E; T15+201A/E jsme integrovali do *bga* lokusu kmene *S. pneumoniae* s delecí přirozeného genu *divIVA*. Vytvořili jsme komplementační kmeny, které nesly modifikovaný gen *divIVA* pod zinkovým inducibilním promotorem. V těchto kmenech jsme optimalizovali expresi fosfoablativních a fosfomimetických forem DivIVA.
- Potvrdili jsme, že je DivIVA fosforylován *in vivo* proteinkinázou StkP na Thr201 a s nižší účinností i na Thr15.
- U připravených komplementačních kmenů *S. pneumoniae* jsme sledovali komplementaci  $\Delta$ *divIVA* fosfoablativními a fosfomimetickými formami DivIVA analýzou jejich fenotypu. Ze získaných výsledků jsme odvozovali vliv fosforylace na

aktivitu proteinu DivIVA. Zjistili jsme, že pokud není DivIVA fosforylován, je plně funkční. Naopak hyperfosforylace DivIVA negativně ovlivňuje jeho funkčnost.

- Zjistili jsme, že DivIVA *S. pneumoniae* tvoří oligomery složené ze 4 nebo 12 proteinových kopií. Schopnost DivIVA vytvářet vysokomolekulární komplexy není podmíněna fosforylací proteinu.



## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adams, D. W. and Errington, J.** (2009): Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol.* 7:642–653.
- Addinall, S. G., Bi, E. and Lutkenhaus, J..** (1996): FtsZ ring formation in *fts* mutants. *J Bacteriol.* 178:3877-3884.
- Adler, H. I, Fisher, W. D., Cohen, A., and Hardigree, A. A.** (1967): Miniature *Escherichia coli* cells deficient in DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 57:321–326.
- Akiyama, T., Inouye, S. and Komano, T.** (2003): Novel developmental genes, fruCD, of *Myxococcus xanthus*: involvement of a cell division protein in multicellular development. *J Bacteriol.* 185:3317-3324.
- Av-Gay, Y., Jamil, S. and Drews, S. J.** (1999): Expression and characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinase PknB. *Infect Immun.* 67:5676-5682.
- Balakrishnan, I., Crook, P., Morris, R. and Gillespie, S. H.** (2000): Early predictors of mortality in pneumococcal bacteraemia. *J Infect Dis.* 40:256–261.
- Banu, L. D., Conrads, G., Rehrauer, H., Hussain, H., Allan, E. and van der Ploeg, J. R.** (2010): The *Streptococcus mutans* serine/threonine kinase, PknB, regulates competence development, bacteriocin production, and cell wall metabolism. *Infect Immun.* 78:2209-2220.
- Barak, I. and Wilkinson, A. J.** (2007): Division site recognition in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev.* 31:311–326.
- Begg, K. J., Dewar, S. J. and Donachie, W. D.** (1995): A new *Escherichia coli* cell division gene, *ftsK*. *J Bacteriol.* 177:6211-6222.
- Beltramini, A. M., Mukhopadhyay, C. D., and Pancholi, V.** (2009): Modulation of cell wall structure and antimicrobial susceptibility by a *Staphylococcus aureus* eukaryote-like serine/threonine kinase and phosphatase. *Infect Immun.* 77:1406-1416.
- Ben-Yehuda, S., Rudner, D. Z. and Losick, R.** (2003): RacA, a bacterial protein that anchors chromosomes to the cell poles. *Science* 299:532-536.
- Bergmann, S. and Hammerschmidt, S.** (2006): Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology.* 152:295–303.
- Bernhardt, T. G. and de Boer, P. A.** (2003): The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Mol Microbiol.* 48: 1171–1182.
- Bernhardt, T. G. and de Boer, P. A.** (2004): Screening for synthetic lethal mutants in *Escherichia coli* and identification of EnvC (YibP) as a periplasmic septal ring factor with murein hydrolase activity. *Mol Microbiol.* 52: 1255–1269.
- Bernhardt, T. G., and de Boer, P. A.** (2005): SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over chromosomes in *E. coli*. *Mol Cell.* 18:555–564.
- Bogaert, D., Hermans, P. W., Adrian, P. V., Rumke, H. C. and de Groot, R.** (2004): Pneumococcal vaccines: an update on current strategies. *Vaccine.* 22:2209-2220.
- Bramhill, D., and Thompson, C. M.** (1994): GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:5813-5817.

- Bramkamp, M. and van Baarle, S.** (2009): Division site selection in rod-shaped bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 12:683-688.
- Bramkamp, M., Emmins, R., Weston, L., Donovan, C., Daniel R. A. and Errington, J.** (2008): A novel component of the division-site selection system of *Bacillus subtilis* and a new mode of action for the division inhibitor MinCD. *Mol Microbiol.* 70:1556–1569
- Bramkamp, M., Weston, L., Daniel, R. A. and Errington, J.** (2006). Regulated intramembrane proteolysis of FtsL protein and the control of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 62:580-591.
- Brown, J. S., Gilliland, S. M. and Holden, D. W.** (2001): A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Mol Microbiol.* 40:572–585.
- Brown, J. S., Gilliland, S. M., Ruiz-Albert, J. and Holden, D. W.** (2002): Characterization of Pit, a *Streptococcus pneumoniae* iron uptake ABC transporter. *Infect Immun.* 70:4389–4398.
- Burnside, K., Lembo, A., de Los Reyes, M., Iliuk, A., Binhtran N. T., Connelly, J. E., Lin, W. J., Schmidt, B. Z., Richardson, A. R., Fang, F. C., Tao, W. A. and Rajagopal, L.** (2010): Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase. *PLoS One.* 5:e1071.
- Cabeen, M. T. and Jacobs-Wagner, C.** (2005): Bacterial cell shape. *Nature rev Microbiol.* 3:601-610.
- Camberg, J. L., Hoskins, J. R. and Wickner, S.** (2009): ClpXP protease degrades the cytoskeletal protein, FtsZ, and modulates FtsZ polymer dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:10614-10619.
- Camberg, J. L., Hoskins, J. R. and Wickner, S.** (2011): The Interplay of ClpXP with the Cell Division Machinery in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 193:1911-1018.
- Canova, M. J., Kremer, L., Molle, V.** (2008): pETPhos: a customized expression vector designed for further characterization of Ser/Thr/Tyr protein kinases and their substrates. *Plazmid.* 60:149-53.
- Canvin, J. R., Paton, J. C., Boulnois, G. J., Andrew, P. W. and Mitchell, T. J.** (1997): *Streptococcus pneumoniae* produces a second haemolysin that is distinct from pneumolysin. *Microb Pathog.* 22:129-132.
- Catterall, J. R.** (1999): *Streptococcus pneumoniae*. *Thorax.* 54:929-937.
- Cook, W. R. and Rothfield, L. I.** (1999): Nucleoid-independent identification of cell division sites in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181:1900-1905.
- Cordell, S. C., Anderson, R. E. and Lowe, J.** (2001): Crystal structure of the bacterial cell division inhibitor MinC. *EMBO J.* 20:2454-2461.
- Cordell, S. C., Robinson, E. J. and Lowe, J.** (2003): Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 7889-7894.
- Cundell, D. R., Gerard, N. P. Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I. and Tuomanen, K.** (1995): *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature.* 377:435-438.
- Cutts, F. T., Zaman, S. M., Enwere, G., Jaffar, S., Levine, O. S., Okoko, J. B., Oluwalana, C., Vaughan, A., Obaro, S. K., Leach, A., McAdam, K. P., Biney, E. et al.** (2005): Efficacy of nine-valent pneumococcal conjugate vaccine against pneumonia and

invasive pneumococcal disease in The Gambia: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 114365:1139-1145.

**Dai, K., Xu, Y. and Lutkenhaus, J.** (1996): Topological characterization of the essential *Escherichia coli* cell division protein FtsN. *J Bacteriol*. 178:1328-1334.

**Dajkovic, A. and Lutkenhaus, J.** (2006): Z ring as executor of bacterial cell division. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 11:140–151.

**Dajkovic, A., Lan, G., Sun, S. X., Wirtz, D. and Lutkenhaus, J.** (2008): MinC spatially controls bacterial cytokinesis by antagonizing the scaffolding function of FtsZ. *Curr Biol*. 18:235-244.

**Dajkovic, A., Pichoff, S., Lutkenhaus, J. and Wirtz, D.** (2010): Cross-linking FtsZ polymers into coherent Z rings. *Mol Microbiol*. 78:651-668.

**Daniel, R. A., Williams, A. M. and Errington, J.** (1996): A complex four-gene operon containing essential cell division gene *pbpB* in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 178:2343-2350.

**Dasgupta, A., Datta, P., Kundu, M. and Basu, J.** (2006): The serine/threonine kinase PknB of *Mycobacterium tuberculosis* phosphorylates PBPA, a penicillin-binding protein required for cell division. *Microbiology*. 152:493-504.

**Dasgupta, D.** (2009): Novel compound with potential of an antibacterial drug targets FtsZ protein. *Biochem J*. 14:423.

**de Boer, P. A. J., Crossley, R. E. and Rothfield, L. I.** (1992): Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 174:63-70.

**de Boer, P. A. J., Crossley, R. E., Hand, A. R., and Rothfield, L. I.** (1991): The MinD protein is a membrane ATPase required for the correct placement of the *Escherichia coli* division site. *EMBO J*. 10:4371-4380.

**Débarbouillé, M., Dramsi, S., Dussurget, O., Nahori, M. A., Vaganay, E., Jouvion, G., Cozzone, A., Msadek, T. and Duclos, B.** (2009): Characterization of a serine/threonine kinase involved in virulence of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 191:4070-4081.

**Den Blaauwen, T., Buddelmeijer, N., Aarsman, M. E. G., Hameete, C. M. and Nanninga, N.** (1999): Timing of FtsZ assembly in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 181:5167-5175.

**Dewar, S. J., Begg, K. J. and Donachie, W. D.** (1992): Inhibition of cell division initiation by an imbalance in the ratio of FtsA to FtsZ. *J Bacteriol*. 174:6314-6316.

**D'Ulisse, V., Fagioli, M., Ghelardini, P. and Paolozzi, L.** (2007): Three functional subdomains of the *Escherichia coli* FtsQ protein are involved in its interaction with the other division proteins. *Microbiology*. 153:124-138.

**Durand-Heredia, J. M., Yu, H. H., De Carlo, S., Lesser, C. F. and Janakiraman, A.** (2011): Identification and characterization of ZapC, a stabilizer of the FtsZ ring in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 193:1405-1413.

**Dziedzic, R., Kiran, M., Plocinski, P., Ziolkiewicz M., Brzostek, A., Moomey, M., Vadrevu, I. S., Dziadek, J., Madiraju, M. and Rajagopalan, M.** (2010): *Mycobacterium tuberculosis* ClpX interacts with FtsZ and interferes with FtsZ assembly. *PLoS One*. 5:e11058.

- Eberhardt, A., Wu, L. J., Errington, J., Vollmer, W. and Veening, J. W.** (2009): Cellular localization of choline-utilization proteins in *Streptococcus pneumoniae* using novel fluorescent reporter systems. *Mol Microbiol.* 74:395-408.
- Ebersbach, G., Galli, E., Møller-Jensen, J., Löwe, J. and Gerdes, K.** (2008): Novel coiled-coil cell division factor ZapB stimulates Z ring assembly and cell division. *Mol Microbiol.* 68:720-735.
- Edwards, D. H. and Errington J.** (1997) The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. *Mol Microbiol.* 24:905–915.
- Edwards, D. H., Thomaidis, H. B. and Errington, J.** (2000): Promiscuous targeting of *Bacillus subtilis* cell division protein DivIVA to division sites in *Escherichia coli* and fission yeast. *EMBO J.* 19:2719-2727.
- Echenique, J., Kadioglu, A., Romao, S., Andrew, P. W. and Trombe, M. C.** (2004): Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 72:2434-2437.
- Errington, J.** (2006): Regulated intramembrane proteolysis of FtsL protein and the control of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 62:580-591.
- Errington, J.** (2010): From spores to antibiotik via the cell cycle. *Microbiology.* 156:1-13.
- Errington, J., Daniel, R. A. and Scheffers, D. J.** (2003): Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67:52–65.
- Fadda, D., Pishedda, C., Caldara, F., Whalen, M. B., Anderluzzi, D., Domenici, E. and Massidda, O.** (2003): Characterization of divIVA and other genes located in the chromosomal region downstream of the dcw cluster in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 185:6209–6214
- Fadda, D., Santona, A., D'Ulisse, V., Ghelardini, P., Ennas, M. G., Whalen, M. B. and Massidda, O.** (2007): *Streptococcus pneumoniae* DivIVA: localization and interactions in a MinCD-free context. *J Bacteriol.* 189:1288-1298.
- Fernandez, P., Saint-Joanis, B., Barilone, N., Jackson, M., Gicquel, B., Cole, S. T. and Alzari, P.** (2006): The Ser/Thr protein kinase PknB is essential for sustaining mycobacterial growth. *J Bacteriol.* 188:7778-7784.
- Feucht, A., Lucet, I., Yudkin, M. D. and Errington, J.** (2001): Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of ***Bacillus subtilis***. *Mol. Microbiol.* 40:115-125.
- Fiuza, M., Canova, M. J., Zanella-Cleon, I., Becchi, M., Cozzone, A. J., Mateos, L. M., Kremer, L., Gil, A. J. and Molle, V.** (2008): From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the role of PknA and PknB in cell division. *J Biol Chem.* 283:18099-18112.
- Flärdh, K.** (2003): Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* 49:1523–1536
- Frost, A., Unger, V. M. and de Camilli, P.** (2009): The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell.* 137:191–196
- Galli, E. and Gerdes, K.** (2010): Spatial resolution of two bacterial cell division proteins: ZapA recruits ZapB to the inner face of the Z-ring. *Mol Microbiol.* 76:1514-1526.

- Gamba, P., Veening, J. W., Saunders, N. J., Hamoen, L. W. and Daniel, R. A.** (2009): Two-step assembly dynamics of the *Bacillus subtilis* divisome. *J Bacteriol.* 191:4186–4194.
- Gerard, P., Vernet, T. and Zapun, A.** (2002): Membrane topology of the *Streptococcus pneumoniae* FtsW division protein. *J Bacteriol.* 184:1925-1931.
- Ghigo, J. M. and Beckwith, J.** (2000): Cell division in *Escherichia coli*: role of FtsL domains in septal localization, function, and oligomerization. *J Bacteriol.* 182:116-129.
- Ghuysen, J. M.** (1991): Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol.* 45:37-67.
- Gieffing, C., Jelencsics, K. E., Gelbmann, D., Senn, B. M., Nagy, E.** (2010): The pneumococcal eukaryotic-type serine/treonine protein kinase co-localizes with the cell division apparatus and interacts with FtsZ in vitro. *Microbiology.* 156:1697-1707.
- Gieffing, C., Meinke, A. L., Hanner, M., Henics, T., Bui, M. D., Gelbmann, D., Lundberg, U., Senn, B. M., Schunn, M., Habel, A., Henriques-Normark, B., Ortqvist, A., Kalin, M., von Gabain, A. and Nagy, E.** (2008): Discovery of a novel class of highly conserved valine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *J Exp Med.* 205:117-131.
- Gillespie, S. H. and Balakrishnan, I.** (2000): Pathogenesis of pneumococcal infection. *J Med Microbiol.* 49:1057-1067.
- Glass, J. I., Belanger, A. E. and Robertson, G. T.** (2002): *Streptococcus pneumoniae* as a genomics platform for broad-spectrum antibiotic discovery. *Curr Opin Microbiol.* 5:338-342.
- Goffin, C. and Ghuysen, J. M.** (1998): Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:1079-1093
- Gordon, E., Mouz, N., Duee, E. and Dideberg, O.** (2000): The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J Mol Biol.* 299:477-485.
- Graham, R. M. and Paton, J. C.** (2006): Differential role of CbpA and PspA in modulation of in vitro CXC chemokine responses of respiratory epithelial cells to infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 74:6739-6749.
- Gregory, J. A., Becker, E. C. and Pogliano, K.** (2008): *Bacillus subtilis* MinC destabilizes FtsZ-rings at new cell poles and contributes to the timing of cell division. *Genes Dev.* 22:3475–3488.
- Gueiros-Filho F. J. and Losick, R.** (2002): A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev.* 16: 2544–2556.
- Haeusser, D. P. and Levin, P. A.** (2008): The great divide: coordinating cell cycle events during bacterial growth and division. *Curr Opin Microbiol.* 11:94–99.
- Haeusser, D. P., Garza, A. C., Buscher, A. Z. and Levin, P. A.** (2007): The division inhibitor EzrA contains a seven-residue patch required for maintaining the dynamic nature of the medial FtsZ-ring. *J Bacteriol.* 189:9001–9010.
- Haeusser, D. P., Lee A. H., Weart, R. B. and Levin P. A.** (2009): ClpX inhibits FtsZ assembly in a manner that does not require its ATP hydrolysis-dependent chaperone activity. *J Bacteriol.* 191: 1986-1991.

- Hale, C. A., and de Boer, P. A. J.** (1999): Recruitment of ZipA to the septal ring of *Escherichia coli* is dependent on FtsZ and independent of FtsA. *J Bacteriol.* 181:167-176.
- Hale, C. A., Shiomu, D., Liu, B., Bernhardt, T. G., Margolin, W., Niki, H. and de Boer, P. A.** (2011): Identification of *Escherichia coli* ZapC (YcbW) as a component of the division apparatus that binds and bundles FtsZ polymers. *J Bacteriol.* 193:1393-1404.
- Hamasha, K., Sahana, M. B., Jani, C., Nyayapathy, S., Kang, C. M. and Rehse, S. J.** (2010): The effect of Wag31 phosphorylation on the cells and the cell envelope fraction of wild-type and conditional mutants of *Mycobacterium smegmatis* studied by visible-wavelength Raman spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun.* 391:664-668.
- Hammerschmidt, S., Wolff, S., Hocke, A., Rosseau, S., Muller, E. and Rohde, M.** (2005): Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun.* 73:4653-4667.
- Hamoen, W. L., Meile, J. C., de Jong, W., Noirot, P. and Errington, J.** (2006): SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. *Mol Microbiol.* 59:989-999.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M. and Hunter, T.** (1988): The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science.* 241:42-52.
- Harry, E. J.** (2001): Bacterial cell division: regulating Z-ring formation. *Mol Microbiol.* 40:795-803.
- Harry, E. J., Monahan, L. and Thompson, L.** (2006): Bacterial cell division: the mechanism and its precision. *Int Rev Cytol.* 253:27-94.
- Havlík, J.** (2008): The importance of pneumococcal vaccination – a clinician’s view. *Klin Microbiol Infekc Lek.* 30:32-35
- Hayashi, I., Oyama, T. and Morikawa, K.** (2001): Structural and functional studies of MinD ATPase: implications for the molecular recognition of the bacterial cell division apparatus. *EMBO J.* 20:1819-1828.
- Henriques, A. O., Glaser, P., Piggot, P. J. and Moran, Jr., C. P.** (1998): Control of cell shape and elongation by the rodA gene in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 28:235-247.
- Hoskins, J., Alborn, W. E., Jr., Arnold, J., Blaszcak, L. C., Burgett, S., DeHoff, B. S., Estrem, S. T., Fritz, L., Fu, D. J., Fuller, W. et al.** (2001): Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol.* 183:5709-5717.
- Howard, M. and Kruse, K.** (2005): Cellular organization by self-organization: mechanisms and models for Min protein dynamics. *J Cell Biol.* 168:533-536.
- Hu, Z. and Lutkenhaus, J.** (1999): Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE. *Mol Microbiol.* 34:82-90.
- Hu, Z. and Lutkenhaus, J.** (2001): Analysis of MinC reveals two independent domains involved in interaction with MinD and FtsZ. *J Bacteriol.* 182:3965-3971.
- Hu, Z., Mukherjee, A., Pichoff, S. and Lutkenhaus, J.** (1999): The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:14819-14824.
- Huisman, O., D'Ari, R. and Gottesman, S.** (1984): Cell-division control in *Escherichia coli*: specific induction of the SOS function SfiA protein is sufficient to block septation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81:4490-4494.

- Hussain, H., Branny, P. and Allan, E.** (2005): A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase is required for biofilm formation, genetic competence, and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 188:1628-32.
- Cha, J. H. and Stewart, G. C.** (1997): The divIVA minicell locus of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 179:1671–1683.
- Cho, H., McManus, H. R., Dove, S. L. and Berndhardt, T. G.** (2011): Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:3773-3778.
- Chung, K. M., Hsu, H. H., Yeh, H. Y., Chang, B. Y.** (2006): Mechanizm of regulation of prokaryotic tubulin-like GTPase FtsZ by membrane protein EzrA. *J Biol Chem.* 282:14891-14897.
- Inouye, S., Jain, R., Ueki, T., Nariya, H., Xu, C. Y., Hsu, M. Y., Fernandez-Luque, B. A., Munoz-Dorado, J., Farez-Vida, E. and Inouye, M.** (2000): A large family of eukaryotic-like protein Ser/Thr kinases of *Myxococcus xanthus*, a developmental bacterium. *Microb Comp Genomics.* 5:103–120.
- Ishikawa, S., Kawai, Y., Hiramatsu, K., Kuwano, M. and Ogasawara, N.** (2006): A new FtsZ-interacting protein, YlmF, complements the activity of FtsA during progression of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 60:1364-1380.
- Jani, C., Eoh, H., Lee, J. J., Hamasha, K., Sahana, M. B., Han, J. S., Nyayapathy, S., Lee, J. Y., Suh, J. W., Lee, S. H., Rehse, S. J., Crick, D. C. and Kang, C. M.** (2010): Regulation of polar peptidoglycan biosynthesis by Wag31 phosphorylation in mycobacteria. *BMC Microbiol.* 10:327
- Jedrzejak, M. J.** (2001): Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65:187–207.
- Jedrzejak, M., Mello, L., de Groot, B. and Li, S.** (2002): Mechanizm of hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. Structures of complexes with the substrate. *J Biol Chem.* 277:28287–28297.
- Jin, H. and Pancholi, V.** (2006): Identification and biochemical characterization of a eukaryotic-type serine/threonine kinase and its cognate phosphatase in *Streptococcus pyogenes*: their biological functions and substrate identification. *J Mol Biol.* 357:1351-72.
- Johnson, J. E., Lackner, L. L. and de Boer, P. A.** (2002): Targeting of (D)MinC/MinD and (D)MinC/DicB complexes to septal rings in *Escherichia coli* suggests a multistep mechanism for MinC-mediated destruction of nascent FtsZ rings. *J Bacteriol.* 184:2951-2962.
- Jones, G. and Dyson, P.** (2006): Evolution of transmembrane protein kinases implicated in coordinating remodeling of gram-positive peptidoglycan: inside versus outside. *J Bacteriol.* 188:7470-6.
- Juarez, J. R. and Margolin, W.** (2010): Changes in the Min oscillation pattern before and after cell birth. *J Bacteriol.* 192:4134-4142.
- Justice, S. S., Garcia-Lara J. and Rothfield, L. I.** (2000): Cell division inhibitors Sula and MinC/MinD block septum formation at different steps in the assembly of the *Escherichia coli* division machinery. *Mol Microbiol.* 37:410–423.
- Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton J. C. and Andrew P. W.** (2008): The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol.* 6:288-301.

- Kang, C. M., Abbott, D. W., Park, S. T., Dascher, C. C., Cantley, L. C. and Husson, R. N.** (2005): The Mycobacterium tuberculosis serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes Dev.* 19:1692-1704.
- Kang, C. M., Nyayapathy, S., Lee, J. Y., Suh, J. W. and Husson, R. N.** (2008): Wag31, a homologue of the cell division protein DivIVA, regulates growth, morphology and polar cell wall synthesis in mycobacteria. *Microbiology.* 154:725–735
- Kang, E. H., Gebru, E., Kim, M. H., Cheng, H. and Park, S. C.** (2009): EstA protein, a novel virulence factor of Streptococcus pneumoniae, induces nitric oxide and pro-inflammatory cytosine production in RAW 264,7 macrophages through NF-kappaB/MAPK. *Microb Pathog.* 47:196-201.
- Kawai, Y. and Ogasawara, N.** (2006): Bacillus subtilis EzrA and FtsL synergistically regulate FtsZ ring dynamics during cell division. *Microbiology.* 152:1129-1141.
- Kawai, Y., Moriya, S. and Ogasawara, N.** (2003): Identification of a protein, YneA, responsible for cell division suppression during the SOS response in Bacillus subtilis. *Mol Microbiol.* 47:1113-1122.
- King, S. J., Hippe, K. R., Gould, J. M., Bae, D., Peterson, S., Cline, R. T., Fasching, C., Janoff, E. N. and Weiser, J. N.** (2004): Phase variable desialylation of host proteins that bind to Streptococcus pneumoniae in vivo and protect the airway. *Mol Microbiol.* 54:159–171.
- King, S., Hippe, K. and Weiser, J.** (2006): Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by Streptococcus pneumoniae. *Mol Microbiol.* 59:961–974.
- Kristich, C. J., Wells, C. L. and Dunny, G. M.** (2007): A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in Enterococcus faecalis mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104:3508-3513.
- Kumar, K., Awasthi, D., Berger, W. T., Tonge, P. J., Slayden, R. A. and Ojima, I.** (2010): Discovery of anti-TB agents that target the cell-division protein FtsZ. *Future Med Chem.* 2:1305-1323.
- Lahti, R.** (1983): Microbial inorganic pyrophosphatases. *Microbiol Rev.* 47: 169-78.
- Lan, G., Daniels, B. R., Dobrowsky, T. M., Wirtz, D. and Sun, S. X.** (2009): Condensation of FtsZ filaments can drive bacterial cell division. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:121-126.
- Lara, B., Rico, A. I., Petruzzelli, S., Santona, A., Dumas, J., Biton, J., Vicente, M., Mingorance, J. and Massidda, O.** (2005): Cell division in cocci: localization and properties of the Streptococcus pneumoniae FtsA protein. *Mol Microbiol.* 55:699–711.
- Lembo, A., Gurney, M. A., Burnside, K., Banerjee, A., de los Reyes, M., Connelly, J. E., Lin, W. J., Jewell, K. A., Vo, A., Renken, C. W., Doran, K. S., Rajagopal, L.** (2010): Regulation of CovR expression in Group B Streptococcus impacts blood-brain barrier penetration. *Mol Microbiol.* 77:431-443.
- Lenarcic, R., Halbedel, S., Visser, L., Shaw, M., Wu, L. J., Errington, J., Marenduzzo, D. and Hamoen, L. W.** (2009): Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *EMBO J.* 28:2272–2282.
- Letek, M., Fiuza, M., Ordonez, E., Villadangos, A. F., Flardh, K., Mateos, L. M. and Gil, J. A.** (2009): DivIVA uses an N-terminal conserved region and two coiled-coil domains to localize and sustain the polar growth in Corynebacterium glutamicum. *FEMS Microbiol Lett.* 297:110–116.



- Levin, P. A., Kurtser, I. G. and Grossman, A. D.** (1999): Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:9642-9647.
- Li, Z., Trimble, M. J., Brun, Y. V. and Jensen, G. J.** (2007): The structure of FtsZ filaments in vivo suggests a force-generating role in cell division. *EMBO J*. 26:4694-708.
- Lin, W. J., Walthers, D., Connelly, J. E., Burnside, K., Jewell, K. A., Kenney, L. J. and Rajagopal, L.** (2009): Threonine phosphorylation prevents promoter DNA binding of the Group B *Streptococcus* response regulator CovR. *Mol Microbiol*. 71:1477-95.
- Lomas-Lopez, R., Paracuellos, P., Riberty, M., Cozzone, A. J. and Duclos, B.** (2007): Several enzymes of the central metabolism are phosphorylated in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 272:35-42.
- Lopez, R.** (2004): *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages: one long argument. *Int Microbiol*. 7:163-171.
- Lovering, A. L., de Castro, L. H., Lim, D. and Strynadka, N. C.** (2007): Structural insight into the transglycosylation step of bacterial cell-wall biosynthesis. *Science*. 315:1402-1405.
- Low, H. H., Moncrieffe, M. C., Löwe, J.** (2004): The crystal structure of ZapA and its modulation of FtsZ polymerisation. *J Mol Biol*. 341:839-852.
- Löwe, J. and Amos, A. L.** (1999): Tubulin-like protofilaments in Ca<sup>2+</sup>-induced FtsZ sheets. *EMBO J*. 18:2364-2371.
- Lu, C., Reedy, M., and Erickson, H. P.** (2000): Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *J Bacteriol*. 182:164-170.
- Lutkenhaus, J.** (2007): Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annu Rev Biochem*. 76:539-562.
- Lutkenhaus, J. and Addinall, S. G.** (1997): Bacterial cell division and the Z ring. *Annu Rev Biochem*. 66:93-116.
- Madec, E., Laszkiewicz, A., Iwanicki, A., Obuchowski, M. and Séror, S.** (2002): Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. *Mol Microbiol*. 46:571-86.
- Margolin, W.** (2001): Spatial regulation of cytokinesis in bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 4:647-652.
- Margolin, W.** (2005): FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:862-6871.
- Marston, A. L. and Errington, J.** (1999): Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. *Mol Microbiol*. 33:84-96.
- Marston, A. L., Thomaidis, H. B., Edwards, D. H., Sharpe, M. E. and Errington, J.** (1998): Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. *Genes Dev*. 12:3419-3430.
- Mengin-Lecreulx, D., and van Heijenoort, J.** (1996): Characterization of the essential gene glmM encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 271:32-39.

- Mistry, B. V., Del Sol, R., Wright, C., Findlay, K. and Dyson, P.** (2008): FtsW is a dispensable cell division protein required for Z-ring stabilization during sporulation septation in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 190:5555-5566.
- Miyagishima, S. Y., Wolk, C. P. and Osteryoung, K. W.** (2005): Identification of cyanobacterial cell division genes by comparative and mutational analyses. *Mol Microbiol.* 56:126-143.
- Miyaji, E. N., Dias, W. O., Gamberini, M., Gebara, V. C., Schenkman, R. P., Wild, J., Riedl, P., Reimann, J., Schirmbeck, R. and Leite, L. C.** (2001): PsaA (pneumococcal surface adhesin A) and PspA (pneumococcal surface protein A) DNA vaccines induce humoral and cellular immune responses against *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine.* 20:805-812.
- Molle, V. and Kremer, L.** (2010): Division and Cell Envelope Regulation by Ser/Thr Phosphorylation: *Mycobacterium* Shows the Way. *Mol Microbiol.* 75:1064-1077.
- Molle, V., Brown, A. K., Besra, G. S., Cozzone, A. J. and Kremer, L.** (2006): The condensing activities of the *Mycobacterium tuberculosis* type II fatty acid synthase are differentially regulated by phosphorylation. *J Biol Chem.* 281:30094-30103.
- Morona, J. K., Miller, D. C., Morona, R. and Paton, J. C.** (2004): The effect that mutations in the conserved capsular polysaccharide biosynthesis genes *cpsA*, *cpsB* and *cpsD* have on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* 189:1905–1913.
- Morona, J. K., Morona, R. and Paton, J. C.** (2006): Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae* type 2 is required for invasive disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:8505–8510.
- Morona, J. K., Morona, R., Miller, D. C. and Paton, J. C.** (2003): Mutational analysis of the carboxy-terminal (YGX)<sub>4</sub> repeat domain of CpsD, an autophosphorylating tyrosine kinase required for capsule biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 185:3009-3019.
- Morona, J. K., Paton J. C., Miller, D. C. and Morona, R.** (2000): Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 35:1431-1442.
- Moryia, S., Rashid, R. A., Rodrigues, C. D. and Harry, E. J.** (2010): Influence of the nukleoid and early stages of DNA replication on positioning the division site in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 76:634-647.
- Mosyak, L., Zhang, Y., Glasfeld, E., Haney, S., Stahl, M., Seehra, J. and Somers, W. S.** (2000): The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by X-ray crystallography. *EMBO J.* 19:3179-3191.
- Mukherjee, A. and Lutkenhaus, J.** (1999): Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations. *J Bacteriol.* 181:823-832.
- Mukherjee, P., Sureka, K., Datta, P., Hossain, T., Barik, S., Das, K. P., Kundu, M. and Basu, J.** (2009): Novel role of Wag31 in protection of mycobacteria under oxidative stress. *Mol Microbiol.* 73:103–119.
- Mulder, E., and Woldringh, C. L.** (1989): Actively replicating nucleoids influence positioning of division sites in *Escherichia coli* filaments forming cells lacking DNA. *J Bacteriol.* 171:4303-4314.
- Nakanishi, H., Suzuki, K., Kabeya, Y., Okazaki, K. and Miyagishima, S. Y.** (2009): Conservation and differences of the Min system in the chloroplast and bacterial division site placement. *Commun Integr Biol.* 2:400-402.

- Nariya, H. and Inouye, S.** (2005): Modulating factors for the Pkn4 kinase cascade in regulating 6-phosphofructokinase in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* 56:1314-1328.
- Nariya, H. and Inouye, S.** (2006): A protein Ser/Thr kinase cascade negatively regulates the DNA-binding activity of MrpC, a smaller form of which may be necessary for the *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol.* 60:1205-17.
- Nguyen, L., Scherr, N., Gatfield, J., Walburger, A., Pieters, J. and Thompson, C. J.** (2007): Antigen 84, an Effector of Pleiomorphism in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol.* 189:7896–7910.
- Nogales, E., Downing, K. H., Amos, L. A. and Lowe, J.** (1998): Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat Struct Biol.* 5:451-458.
- Nováková, L., Bezousková, S., Pompach, P., Spidlová, P., Sasková, L., Weiser, J. and Branny, P.** (2010): Identification of multiple substrates of the StkP Ser/Thr protein kinase in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 192:3629-3638.
- Novakova, L., Saskova, L., Pallova, P., Janecek, J., Novotna, J., Ulrych, A., Echenique, J., Trombe, M. C. and Branny, P.** (2005): Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. *FEBS J.* 272:1243-1254.
- Ogino, H., Teramoto, H., Inui, M. and Yukawa, H.** (2007): DivS, a novel SOS-inducible cell-division suppressor in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol.* 67:597-608.
- Oliva, M. A., Halbedel, S., Freund, S. M., Dutow, P., Leonard, T. A., Veprintsev, D. B., Hamoen, L. W. and Löwe, J.** (2010): Features critical for membrane binding revealed by DivIVA crystal structure. *EMBO J.* 29:1988-2001.
- Orihuela, C. J., Gao, G. L., Francis, K. P., Yu, J. and Tuomanen, E. L.** (2004): Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J Infect Dis.* 190:1661-1669.
- Osaki, M., Arcondeguy, T., Bastide, A., Touriol, C., Prats, H. and Trombe, M. C.** (2009): The StkP/PhpP signaling couple in *Streptococcus pneumoniae*: cellular organization and physiological characterization. *J Bacteriol.* 191:4943–4950.
- Osawa, M., Anderson, D. E. and Erickson, H. P.** (2008): Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. *Science.* 320:792–794.
- Oxoby, M., Moreau, F., Durant, L., Denis, A., Genevard, J. M., Vongsouthi, V., Escaich, S. and Gerusz, V.** (2010): Towards Gram-positive antivirulence drugs: New inhibitors of *Streptococcus agalactiae* Stk1. *Bioorg Med Chem Lett.*
- Pallova, P., Hercik, K., Saskova, L., Novakova, L. and Branny, P.** (2007): A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP of *Streptococcus pneumoniae* acts as a dimer in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 355:526-530.
- Parikh, A., Verma, S. K., Khan, S., Prakash, B. and Nandicoori, V. K.** (2009): PknB-mediated phosphorylation of a novel substrate, N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase, modulates its acetyltransferase activity. *J Mol Biol.* 386:451-64.
- Patrick, J. E. and Kearns D. B.** (2008): MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 70:1166–1179
- Pérez, J., Castañeda-García, A., Jenke-Kodama, H., Müller, R., Muñoz-Dorado, J.** (2008): Eukaryotic-like protein kinases in the prokaryotes and the myxobacterial kinome. 105:15950-15955.

- Perry, S. E. and Edwards, D. H.** (2004): Identification of a polar targeting determinant for *Bacillus subtilis* DivIVA. *Mol Microbiol.* 54: 1237–1249.
- Pettigrew, M. M., Fennie, K. P., York, M. P., Daniels, J. and Ghaffar, F.** (2006): Variation in the presence of neuraminidase genes among *Streptococcus pneumoniae* isolates with identical sequence types. *Infect Immun.* 74:3360–3365.
- Pichoff, S. Lutkenhaus, J.** (2005): Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol Microbiol.* 55:1722-1734.
- Pichoff, S., Vollrath, B., Touriol, C. and Bouché, J. P.** (1995): Deletion analysis of gene minE which encodes the topological specificity factor of cell division in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 18:321-329.
- Pike, A. C., Rellos, P., Niesen, F. H., Turnbull, A., Oliver, A. W., Parker, S. A., Turk, B. E., Pearl, L. H. and Knapp, S.** (2008): Activation segment dimerization: a mechanism for kinase autophosphorylation of non-consensus sites. *EMBO J.* 27:704-14.
- Pinho, M. G. and Errington, J.** (2004): A divIVA null mutant of *Staphylococcus aureus* undergoes normal cell division. *FEMS Microbiol Lett.* 240:145-149.
- Rajagopal, L., Clancy, A. and Rubens, C. E.** (2003): A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence. *J Biol Chem.* 278:14429-14441.
- Rajagopal, L., Vo, A., Silvestroni, A. and Rubens, C. E.** (2005): Regulation of purine biosynthesis by a eukaryotic-type kinase in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol.* 56:1329-46.
- Rajagopal, L., Vo, A., Silvestroni, A. and Rubens, C. E.** (2006): Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signalling mechanisms in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol.* 62:941-957.
- Ramamurthi, K. S. and Losick, R.** (2009): Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:13541–13545.
- Ramirez-Arcos, S., Liao, M., Marthaler, S., Rigden, M. and Dillon, J. A.** (2005): *Enterococcus faecalis* divIVA: an essential gene involved in cell division, cell growth and chromosome segregation. *Microbiology.* 151:1381-1393.
- Ramos, A., Honrubia, M. P., Valbuena, N., Vaquera, J., Mateos, L. M. and Gil, J. A.** (2003): Involvement of DivIVA in the morphology of the rod-shaped actinomycete *Brevibacterium lactofermentum*. *Microbiology.* 149:3531–3542.
- Raskin, D. M., and de Boer, P. A. J.** (1997): The MinE ring: An FtsZ-independent cell structure required for selection of the correct division site in *E. coli*. *Cell.* 91:685–694.
- Regamy, A., Harry, E. J. and Wake, R. G.** (2000): Mid-cell Z ring assembly in the absence of entry into the elongation phase of the round of replication in bacteria: coordinating chromosome replication with cell division. *Mol Microbiol.* 38:423-434.
- Reingold, A.** (2005): Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease — United States, 1998–2003. *MMWR.* 54:893–897.
- Saskova, L., Novakova, L., Basler, M. and Branny, P.** (2007): A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 189:4168-79.

- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala Juan, A., and Charlier, P.** (2008): The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev.* 32:234-258.
- Shah, I. M., Laaberki, M. H., Popham, D. L. and Dworkin, J.** (2008): A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell.* 135:486-96.
- Shaper, M., Hollingshead, S. K., Benjamin, W. H. and Briles, D. E.** (2004): PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin. *Infect Immun.* 72:5031-5040.
- Sharma, K., Gupta, M., Krupa, A., Srinivasan, N. and Singh, Y.** (2006): EmbR, a regulatory protein with ATPase activity, is a substrate of multiple serine/threonine kinases and phosphatase in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS J.* 273:2711-2721.
- Sharpe, M. E., Hauser, P. M., Sharpe, R. G. and Errington, J.** (1998): *Bacillus subtilis* cell cycle as studied by fluorescence microscopy: Constancy of the cell length at initiation of DNA replication and evidence for active nucleoid partitioning. *J Bacteriol.* 180:547-555.
- Shen, B. and Lutkenhaus, J.** (2011): Differences in MinC/MinD sensitivity between polar and internal Z-rings in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 193:367-376.
- Shen, B., and Lutkenhaus, J.** (2009): The conserved C-terminal tail of FtsZ is required for the septal localization and division inhibitory activity of MinC(C)/MinD. *Mol Microbiol.* 72:410-424.
- Shen, B., and Lutkenhaus, J.** (2010): Examination of the interaction between FtsZ and MinC<sup>N</sup> in *E. coli* suggests how MinC disrupts Z rings. *Mol Microbiol.* 75:1285-1298.
- Shiomi, D., and Margolin, W.** (2007): The C-terminal domain of MinC inhibits assembly of the Z ring in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 189:236-243.
- Schultz, C., Niebisch, A., Schwaiger, A., Viets, U., Metzger, S., Bramkamp, M. and Bott, M.** (2009): Genetic and biochemical analysis of the serine/threonine protein kinases PknA, PknB, PknG and PknL of *Corynebacterium glutamicum*: evidence for non-essentiality and for phosphorylation of OdhI and FtsZ by multiple kinases. *Mol Microbiol.* 74:724-741.
- Sievers, J. and Errington, J.** (2000): The *Bacillus subtilis* cell division protein FtsL localizes to sites of septation and interacts with DivIC. *Mol. Microbiol.* 36:846-855.
- Silvestroni, A., Jewell, K. A., Lin, W. J., Connelly, J. E., Ivancic, M. M., Tao, W. A. and Rajagopal, L.** (2009): Identification of serine/threonine kinase substrates in the human pathogen group B streptococcus. *J Proteome Res.* 8:2563-74.
- Singh, J. K., Makde, R. D., Kumar V. and Panda, D.** (2007): A membrane protein, EzrA, regulates assembly dynamics of FtsZ by interacting with the C-terminal tail of FtsZ. *Biochemistry* 46:11013-11022.
- Small, E., Marrington, R., Rodger, A., Scott, D. J., Sloan, K., Roper, D., Dafforn, T. R. and Addinall, S. G.** (2007): FtsZ polymer-bundling by the *Escherichia coli* ZapA orthologue, YgfE, involves a conformational change in bound GTP. *J Mol Biol.* 369:210-221.
- Sohn, H. S., Suh, D. C., Jang, E. and Kwon, J. W.** (2010): Economic evaluation of childhood 7-valent pneumococcal conjugate vaccination in Korea. *J Manag Care Pharm.* 16:32-45.

- Stahlberg, H., Kutejova, E., Muchova, K., Gregorini, M., Lustig, A., Muller, S. A., Olivieri, V., Engel, A., Wilkinson, A. J. and Barak, I.** (2004): Oligomeric structure of the *Bacillus subtilis* cell division protein DivIVA determined by transmission electron microscopy. *Mol Microbiol.* 52:1281–1290.
- Stricker, J., Maddox, P., Salmon, E. D. and Erickson, H. P.** (2002): Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:3171-3175.
- Sun, Q. and Margolin, W.** (1998): FtsZ dynamics during the division cycle of live *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* 180:2050-2056.
- Sun, Q. and Margolin, W.** (2001): Influence of the nucleoid on placement of FtsZ and MinE rings in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 183:1413-1422.
- Sun, X., Ge, F., Xiao, C. L., Yin, X. F., Ge, R., Zhang, L. H. and He, Q. Y.** (2010): Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteome Res.* 9:275-282.
- Tavares, J. R., de Souza, R. F., Meira, G. L. and Gueiros-Filho, F. J.** (2008): Cytological characterization of YpsB, a novel component of the *Bacillus subtilis* divisome. *J Bacteriol.* 190:7096-7107.
- Teather, R. M., Collins, J. F. and Donachie, W. D.** (1974): Quantal behaviour of a diffusible factor which initiates septum formation at potential division sites in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 118:407–413.
- Thakur, M. and Chakraborti, P. K.** (2006): GTPase activity of mycobacterial FtsZ is impaired due to its transphosphorylation by the eukaryotic-type Ser/Thr kinase, PknA. *J Biol Chem.* 281:40107-13
- Thakur, M., and Chakraborti, P. K.** (2008): Ability of PknA, a mycobacterial eukaryotic-type serine/threonine kinase, to transphosphorylate MurD, a ligase involved in the process of peptidoglycan biosynthesis. *Biochem J.* 415:27-33.
- Thanbichler, M. and Shapiro, L.** (2008): Getting organized – how bacterial cells move proteins and DNA. *Nat Rev Microbiol.* 6: 28-40.
- Thomaidis, H. B., Freeman, M., El Karoui, M., Errington, J.** (2001): Division site selection protein DivIVA of *Bacillus subtilis* has a second distinct function in chromosome segregation during sporulation. *Genes Dev.*15:1662–1673.
- Tilley, S., Orlova, E., Gilbert, R., Andrew, P. and Saibil, H.** (2005): Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell.* 121:247–256.
- Tonthat, N. K., Arold, S. T., Pickering, B. F., Van Dyke, M. W., Liang, S., Lu, Y., Beuria, T. K., Margolin, W. and Schumacher, M. A.** (2011): Molecular mechanism by which the nucleoid occlusion factor, SlmA, keeps cytokinesis in check. *EMBO J.* 30:154-164.
- Tseng, H. J., McEwan, A. G., Paton, J. C. and Jennings, M. P.** (2002): Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: PsaA mutants are hypersensitive to oxidative stress. *Infect Immun.* 70:1635–1639.
- Ulijasz, A. T., Andes, D. R., Glasner, J. D. and Weisblum, B.** (2004): Regulation of iron transport in *Streptococcus pneumoniae* by RitR, an orphan response regulator. *J Bacteriol.* 186:8123-36.

- Ulijasz, A. T., Falk, S. P. and Weisblum, B.** (2008): Phosphorylation of the RitR DNA-binding domain by a Ser-Thr phosphokinase: implications for global gene regulation in the streptococci. *Mol Microbiol.* 71:382-90.
- Ulijasz, A. T., Falk, S. T. and Weisblum, B.** (2009): Phosphorylation of the RitR DNA-binding domain by a Ser-Thr phosphokinase: implications for global gene regulation in the streptococci. *Mol Microbiol.* 71:382-390.
- van Baarle, S. and Bramkamp, M.** (2010): The MinCDJ system in *Bacillus subtilis* prevents minicell formation by promoting divisome disassembly. *PLoS One.* 24:9850.
- van den Ent, F., and Löwe, J.** (2000): Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *EMBO J.* 19:5300-5307.
- Varma, A., Huang K. C. and Young, K. D.** (2008): The Min system as a general cell geometry detection mechanism: branch lengths in Y-shaped *Escherichia coli* cells affect Min oscillation patterns and division dynamics. *J Bacteriol.* 190:2106–2117.
- Vats, P., Yu, J. and Rothfield, L.** (2009): The dynamic nature of the bacterial cytoskeleton. *Cell Mol Life Sci.* 66:3353-3362.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P. and Foster, S.** (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev.* 32:259-286.
- Wang, L. and Lutkenhaus, J.** (1998): FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as part of the SOS response. *Mol Microbiol.* 29:731-740.
- Wang, L., Khattar, M. K., Donachie, W. D. and Lutkenhaus, J.** (1998): FtsI and FtsW are localized to the septum in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 180:2810-2816.
- Wang, L., Sun, Y. P., Chen, W. L., Li, J. H. and Zhang, C. C.** (2002): Genomic analysis of protein kinases, protein phosphatases and two-component regulatory systems of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *FEMS Microbiol Lett.* 217:155-65.
- Wang, S. B., Cantlay, S., Nordberg, N., Letek, M., Gil, J. A. and Flärdh, K.** (2009): Domains involved in the in vivo function and oligomerization of apical growth determinant DivIVA in *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiol Lett.* 297:101–109.
- Weart, R. B., Lee, A. H., Chien, A. C., Haeusser, D. P., Hill, N. S. and Levin, P. A.** (2007): A metabolic sensor governing cell size in bacteria. *Cell.* 130:335-347.
- Wehenkel, A., Bellinzoni, M., Graña, M., Duran, R., Villarino, A., Fernandez, P., Andre-Leroux, G., England, P., Takiff, H., Cerveñansky, C., Cole, S. T. and Alzari, P. M.** (2008): Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: physiological roles and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta.* 1784:193-202.
- Weiser, J. N., Austrian, R., Sreenivasan, P. K. and Masure, H. R.** (1994): Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonisation. *Infect Immun.* 62:2582–2589
- Weiss, D. S., Pogliano, K., Carson, M., Guzman, L. M., Fraipont, C., Nguyen-Distèche, M., Losick, R. and Beckwith, J.** (1997): Localization of the *Escherichia coli* cell division protein FtsI (PBP3) to the division site and cell pole. *Mol Microbiol.* 25:671-681.
- Wittig, I., Braun, H. P. and Schägger, H.** (2006): Blue native PAGE. *Nat Protoc.* 1:418-428.
- Woldringh, C. L., Mulder, E., Huls, P. G. and Vischer, N.** (1991): Toporegulation of bacterial division according to the nucleoid occlusion model. *Res Microbiol.* 142:309-320.

- Woldringh, C. L., Mulder, E., Valkenburg, J. A., Wientjes, F. B., Zaritsky, A. and Nanninga, N.** (1990): Role of the nucleoid in the toporegulation of division. *Res Microbiol.* 141:39-49.
- Wu, L. J. and Errington, J.** (1997): Septal localization of the SpoIIIE chromosome partitioning protein in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 16:2161–2169.
- Wu, L. J. and Errington, J.** (2004): Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell.* 117:915-925.
- Wu, L. J. and Errington, J.** (2003): RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 49:1463–1475.
- Wu, L. J., Frank s, A. H. and Wake, R. G.** (1995): Replication through the terminus region of the *Bacillus subtilis* chromosome is not essential for the formation of a division septum that partitions the DNA. *J Bacteriol.* 177:5711-5715.
- Wu, L. J., Ishikawa, S., Kawai, Y., Oshima, T., Ogasawara, N. and Errington, J.** (2009): Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. *EMBO J.* 28:1940–1952.
- Xu, H., Chater, K. F., Deng, Z. and Tao, M.** (2008): A cellulose synthase-like protein involved in hyphal tip growth and morphological differentiation in *Streptomyces*. *J Bacteriol* 190:4971–4978.
- Yeats, C., Finn, R. D. and Bateman, A.** (2002): The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends Biochem Sci.* 27: 438.
- Yoshida, Y., Kuroiwa, H., Hirooka, S., Fujiwara, T., Ohnuma, M., Yoshida, M., Misumi, O., Kawano, S. and Kuroiwa, T.** (2009): The bacterial ZapA-like protein ZED is required for mitochondrial division. *Curr Biol.* 19:1491-1497.
- Young, T. A., Delagoutte, B., Endrizzi, J. A., Falick, A. M. and Alber, T.** (2003): Structure of *Mycobacterium tuberculosis* PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases. *Nat Struct Biol.* 10:168-74.
- Zapun, A., Vernet, T. and Pinho, M. G.** (2008): The different shapes of cocci. *FEMS Microbiol Rev.* 32:345–360.
- Zheng, X., Papavinasasundaram, K. G. and Av-Gay, Y.** (2007): Novel substrates of *Mycobacterium tuberculosis* PknH Ser/Thr kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 355:162-168.
- Zhou, H., and Lutkenhaus, J.** (2005): MinC mutants deficient in MinD- and DicB-mediated cell division inhibition due to loss of interaction with MinD, DicB, or a septal component. *J Bacteriol.* 187:2846-2857.
- Zweers, J. C., Barák, I., Becher, D., Driessen, A. J. M., Hecker, M., Kontinen, V. P., Saller, M. J., Vavrová, L. and van Dijk, J. M.** (2008). Towards the development of *Bacillus subtilis* as a cell factory for membrane proteins and complexes. *Microbial Cell Factories.* 7:10.