

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

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie**



**RNA-polymerasa *Streptococcus pneumoniae*
jako potenciální substrát proteinkinasy StkP**

Zuzana Sušická

Praha 2007

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.

Euzka Jiráková

Práce vznikla v letech 2005-2007 v rámci interního startovacího projektu AV ČR s číslem Z50200510-I050 („Fosforylace alfa-podjednotky RNA polymerasy jako nová forma regulace transkripce u *Streptococcus pneumoniae*“) a za podpory Grantové agentury České republiky v rámci projektu 204/07/P082 („Analýza substrátů Ser/Thr proteinkinasy *Streptococcus pneumoniae* a vliv fosforylace na jejich funkci“).

Děkuji:

... Lindě Novákové za odborné vedení, trpělivost a péči, kterou mi ochotně věnovala vždy, když jsem potřebovala.

... Pavlu Brannymu a celému kolektivu laboratoře Buněčné signalizace za pomoc, podporu a podnětné vědecké zázemí.

... Rodičům, Tomášovi, sestřám a přátelům za optimismus, lásku a důvěru.

1	ÚVOD	8
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
2.1	<i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	9
2.1.1	Morfologie a fyziologie	10
2.1.2	Genetická výbava.....	11
2.1.3	Patogeneze	12
2.1.4	Kompetence	16
2.2	RNA-POLYMERASA: STAVBA A FUNKCE	18
2.2.1	RNA-polymerasa a její podjednotky	18
2.3	PRŮBĚH TRANSKRIPCE A JEJÍ REGULACE	24
2.3.1	Iniciace transkripce	24
2.3.2	Elongace.....	27
2.3.3	Terminace transkripce.....	28
2.3.4	Modifikace RNA-polymerasy v průběhu transkripce.....	28
2.4	PŘENOS SIGNÁLU U <i>S. PNEUMONIAE</i>	31
2.4.1	Dvousložkové systémy	31
2.4.2	Proteinkinasy eukaryotního typu	33
3	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	36
4	MATERIÁL A METODY	37
4.1	MATERIÁL	37
4.1.1	Bakteriální kmeny	37
4.1.2	Vektory	37
4.1.3	Půdy a média.....	37
4.1.4	Pufry a roztoky.....	39
4.1.5	Chemikálie	40
4.1.6	Radiochemikálie	41
4.1.7	Enzymy	42
4.1.8	Protilátky.....	42
4.1.9	Komerční soupravy a standardy.....	42
4.1.10	Počítačová analýza.....	43
4.1.11	Použité oligonukleotidy	44
4.2	METODY	45
4.2.1	Manipulace s DNA	45
4.2.2	Manipulace s proteiny.....	47
4.2.3	Manipulace s <i>E. coli</i>	49
4.2.4	Manipulace s <i>S. pneumoniae</i>	51
4.2.5	Kinázová reakce in vitro	53
4.2.6	Dvourozměrná gelová elektroforéza (2D SDS-PAGE).....	54
4.2.7	Hmotnostní spektrometrie.....	54
5	VÝSLEDKY	55
5.1	EXPRESSE RPOA V <i>E. COLI</i>	56
5.1.1	Příprava vektoru.....	56
5.1.2	Expresse genu <i>rpoA</i> v <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	57
5.2	IN VITRO FOSFORYLACE RPOA POMOCÍ STKP	58
5.3	IDENTIFIKACE FOSFORYLAČNÍCH MÍST A PODJEDNOTKY RNAP.....	60
5.4	SUBSTRÁTOVÁ SPECIFITA STKP	61
5.5	NESPECIFICKÁ FOSFORYLACE RPOA	61

5.5.1	<i>In vitro</i> kinázová reakce v přítomnosti [α 32P]ATP a [γ 32P]ATP	62
5.5.2	Fosforylace denaturovaného proteinu RpoA	62
5.6	PŘÍPRAVA KMENE <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> PRO IZOLACI PROTEINU RPOA ...	63
5.6.1	Příprava kmene <i>S. pneumoinae</i> exprimujícího RpoA s histidinovou kotvou ...	64
5.6.2	Příprava kmene <i>S. pneumoinae</i> RpoA(His) se selekčním znakem	66
5.7	PŘÍPRAVA RPOA(HIS) KMENE S INAKTIVOVANÝM GENEM <i>STKP</i>	69
5.8	PŘÍPRAVA KMENE <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> RPOC(HIS).....	72
5.9	IZOLACE A FOSFORYLACE RNAP-HIS ZE <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	72
6	DISKUZE	75
7	SOUHRN	86
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	87

RNA polymerase of *Streptococcus pneumoniae*, potential substrate of protein kinase StkP

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. In prokaryotes signal transduction by protein phosphorylation was originally thought to occur primarily by histidine kinases which are integral part of so called two-component signalling pathways. Lately, bacterial homologues of eukaryotic Ser/Thr kinases have been found to regulate wide variety of cellular functions such as growth, differentiation, secondary metabolism and pathogenicity.

The genome of pathogenic bacteria *Streptococcus pneumoniae* contains single Ser/Thr protein kinase StkP. Analysis of phosphoproteome maps of both wild-type and *stkP* null mutant strains labelled *in vivo* revealed a possible substrate of StkP: alpha-subunit of RNA polymerase (RpoA) (Nováková, 2005). DNA-dependent RNA polymerase complex (RNAP) plays the central role in gene transcription. Alpha-subunit of RNAP has an important regulatory role in transcription initiation: it interacts specifically with upstream promoter elements and with DNA-bound transcription activators.

The aim of this thesis was to prove that the alpha-subunit of RNA polymerase is a target substrate of StkP. The *rpoA* gene was cloned, expressed as His-tagged protein in *E. coli* and purified to homogeneity. *In vitro* phosphorylation assay showed that recombinant RpoA is a substrate for StkP. Further we isolated RNA polymerase from *Streptococcus pneumoniae* by affinity chromatography and we found that StkP is not able to phosphorylate native RpoA in the RNA polymerase complex. These results may indicate that either StpK phosphorylates only uncomplexed RpoA or that StpK requires additional components/cofactors to phosphorylate RpoA in native complex.

Keywords: RNA polymerase, regulation of gene expression, transcription initiation, *Streptococcus pneumoniae*, phosphorylation, protein kinases, signal transduction

Klíčová slova: RNA-polymerasa, regulace genové exprese, iniciace transkripce, *Streptococcus pneumoniae*, fosforylace, proteinkinasy, signalizace

Seznam použitých zkratk

ADP	adenosindifosfát
AK	aminokyselina
ATB	antibiotikum
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérumalbumin
CSP	<u>C</u> ompetence <u>S</u> timulating <u>P</u> eptide
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GST	glutathion- <u>S</u> -transferasa
IPTG	isopropyl E-D-thiogalaktosid
Kb	tisíce párů bází
LT	laboratorní teplota
Mb	miliony párů bází
OD ₄₀₀	optická denzita při 400 nm
pb	páry bází
PCR	polymerázová řetězová reakce
ppGpp	guanosin-5'-difosfát-3'-difosfát
PVDF	polyvinylidendifluorid
RNA	ribonukleová kyselina
RNAP	RNA-polymerasa
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS
TCS	dvousložkové systémy
TF	transkripční faktor
WT	divoký typ (<i>wild type</i>)
αCTD	C-terminální doména α podjednotky RNA-polymerasy
αNTD	N-terminální doména α podjednotky RNA-polymerasy

1 ÚVOD

Každá bakteriální buňka neustále čelí tlaku okolního prostředí. Schopnost rychle a účelně zareagovat na změnu vnějších podmínek je zásadní pro přežití každé jednotlivé bakterie a populace jako celku. Z těchto důvodů bakterie vyvinuly celou řadu mechanismů, které umožňují zaznamenání signálu, zprostředkování příslušné odpovědi a vzájemnou komunikaci.

Fosforylace a defosforylace proteinů je jedním z klíčových mechanismů, který umožňuje zaznamenat změny okolního prostředí a následně regulovat odpovídající buněčné procesy. Fosforylace je reverzibilní kovalentní modifikace proteinů katalyzovaná proteinkinasami, která se účastní regulace řady esenciálních buněčných procesů. Jednou z možností, jak realizovat fosforylaci proteinů, je prostřednictvím ATP dependentních Ser/Thr proteinkinas eukaryotního typu. Proteinkinasy eukaryotního typu jsou v bakteriální říši časté, i když ne univerzálně rozšířené. Zjistilo se, že tyto proteinkinasy mají v rámci bakteriální populace značný význam pro růst, diferenciaci, sekundární metabolismus a patogenitu.

Běžná bakteriální buňka uchovává ve své chromozomální DNA asi 4 000 genů. Každý jednotlivý gen musí být regulován tak, aby k expresi došlo v příslušném čase a v potřebném množství. Regulace genové exprese umožňuje bakteriální buňce měnit aktuální proteinovou výbavu a tím flexibilně reagovat na změny vnějšího i vnitřního prostředí. Nejdůležitější cílovou úrovní regulace genové exprese je iniciace transkripce, kterou zajišťuje jediný enzym DNA-dependentní RNA-polymerasa.

Vzhledem k tomu, že *Streptococcus pneumoniae* kóduje jedinou proteinkinasu eukaryotního typu, je vhodným modelem pro studium funkce proteinkinas eukaryotního typu v rámci regulace buněčných procesů a významu fosforylace proteinů v rámci bakteriální buňky jako takové. Pomocí fosfoproteomické analýzy byly identifikovány *in vivo* dva potencionální substráty StkP: (i) fosfoglukosaminmutasa (GlmM), která se účastní biosyntézy komponent buněčné stěny, (ii) α podjednotka RNA-polymerasy, která se účastní regulace iniciace transkripce (NOVAKOVA *et al.* 2005).

Cílem této diplomové práce bylo prokázat, zda je α podjednotka RNA-polymerasy přímým substrátem proteinkinasy StkP, popřípadě určit, jaký vliv má tato modifikace na průběh regulace transkripce.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Streptococcus pneumoniae (obr. 2–1) byl jako klinicky významná bakterie objeven a popsán v roce 1881. O tento objev se nezávisle na sobě zasloužili Louis Pasteur a George Miller Sternberg. Do roku 1940, kdy došlo k objevu antibiotik, což značně ulehčilo léčení většiny běžných bakteriálních nákaz, způsoboval *S. pneumoniae* více úmrtí než rakovina a srdeční choroby dohromady (LOPEZ 2004).

V tomto období byl také tento kolonizátor horních cest dýchacích využit jako experimentální nástroj pro důkaz skutečnosti, že nositelkou dědičnosti je DNA.

V posledních desetiletích se *S. pneumoniae* díky své genetické plasticitě zařazuje mezi skupinu bakterií odolných proti běžným antibiotikům, čímž opět narůstá jeho význam mezi patogenními bakteriemi. *S. pneumoniae* způsobí každý rok nákazu až 100 milionů lidí, z čehož u 10% je konečným důsledkem této nákazy smrt (ORIHUELA *et al.* 2004), (MORONA *et al.* 2003).



Obr. 2–1.: *Streptococcus pneumoniae*:

- a) roztěr ze sputa obsahující tmavě zbarvené dvojice koků
- b) detailní snímek dvojice koků

S. pneumoniae je extracelulární lidský patogen. Řadíme jej mezi grampozitivní kataláza negativní koky. Formy bez pouzdra jsou nevirulentní a kolonizují horní cesty dýchací, kde jsou součástí běžné mikroflóry (MORONA *et al.* 2003). Bakteriální formy s vytvořeným pouzdrém jsou vysoce virulentní a způsobují záněty horních cest dýchacích (převážně nosohltanu a nosních dutin) a záněty středního ucha. *Streptococcus pneumoniae*

však může způsobit i mnohem závažnější onemocnění jako například pneumonii, meningitidu a sepsi (GILLESPIE a BALAKRISHNAN 2000).

Streptococcus pneumoniae ohrožuje především děti, starší lidi a skupinu imunodeficientních pacientů (pacienti trpící AIDS, pacienti léčení chemoterapií apod.). V zemích třetího světa umírá ročně 5 milionů dětí na akutní plicní infekci, jejímž hlavním agens je právě *S. pneumoniae*. Vezmeme-li v úvahu vzrůstající procento kmenů rezistentních k penicilinu a omezené účinky dostupné vakcíny (jako vakcína závislá na T-lymfocytech není použitelná pro děti do dvou let), bude počet onemocnění a letálních případů stále stoupat (CATTERALL 1999).

2.1.1 Morfologie a fyziologie

Bakterie *S. pneumoniae* jsou grampozitivní koky zašpičatělého (lancetovitého) tvaru, které se obvykle vyskytují ve dvojicích. Z tohoto důvodu bývá často označován jako tzv. „diplococcus“ (obr. 2–1 b).

Jedná se o bakterii fakultativně anaerobní, která je poměrně náročná na kultivaci. Na krevním agaru roste v koloniích obklopených zónou viridace (jedná se o tzv. α nebo také neúplnou hemolýzu). U této bakterie rozlišujeme dvě hlavní morfologické fáze:

- i) neopouzdržené nevirulentní kmeny vyrůstají v drsných koloniích, tzv. „R fáze“ (Rough = drsný),
- ii) opouzdržené virulentní kmeny vytváří kolonie hladké, tzv. „S fáze“ (Smooth = hladký).

Polysacharidové pouzdro se u virulentních kmenů vyskytuje vždy, je hlavním virulenčním faktorem a nejvýraznějším antigenem (MORONA *et al.* 2000). Podle typu pouzdrného antigenu rozlišujeme více než 90 sérotypů *S. pneumoniae*. Dalším charakteristickým znakem je složení buněčné stěny. Důležitou složku buněčné stěny tvoří teichoové kyseliny bohaté na galaktosamin a fosfocholin. U bakterií se fosfocholin v buněčné stěně vyskytuje jen velmi výjimečně. Cholin je pro pneumokoka nepostradatelným růstovým faktorem a jeho přítomnost je nezbytná pro činnost autolysinů, pro transformaci a podílí se na ukotvení povrchových proteinů (často virulenčních faktorů) (MORONA *et al.* 2003).

2.1.2 Genetická výbava

2.1.2.1 Objev přirozené transformace

Jak již bylo zmíněno výše, měl *Streptococcus pneumoniae* významnou úlohu při zkoumání dědičnosti a DNA jako nositelky genetické informace. Těmto pokusům však předcházely experimenty dokazující proces genetické transformace, při kterých byla tato bakterie použita jako modelový organismus.

Transformace byla prvním objeveným mechanismem genetické výměny. Bylo to v roce 1928, kdy Fred Griffith objevil, že se nepatogenní forma kmene *Streptococcus pneumoniae* může přeměnit ve formu patogenní. V tomto pokusu Griffith smíchal mrtvé buňky *S. pneumoniae*, formující hladké kolonie a způsobující onemocnění, s živými buněčnými koloniemi, které naopak vytváří drsný povrch a nezpůsobují žádná onemocnění. Směsí buněk infikoval myši a zjistil, že se producenti hladkých kolonií mohou přeměnit v producenty drsných kolonií a u myši se tak rozvine smrtelná choroba. Griffith byl přesvědčený, že za tuto změnu je zodpovědná látka, která je schopná přenést informaci o utváření kolonie z mrtvých buněk na živé. Tuto látku označil jako „transformační princip“.

Až o šestnáct let později v roce 1944 Oswald Avery tuto látku izoloval a řadou pokusů prokázal, že je to právě deoxyribonukleová kyselina (DNA), která je zodpovědná za přenos informace z jedné buňky do druhé. Tímto objevem byly položeny základy molekulární genetiky. I v současné době je transformace jedním z hlavních pilířů molekulární genetiky, protože se často jedná o jediný způsob, jak vpravit experimentálně upravenou DNA do buňky.

2.1.2.2 Genom *S. pneumoniae*

Genom *S. pneumoniae* má velikost 2,1 Mb. Jsou známy sekvence tří kmenů *S. pneumoniae*: virulentního TIGR4 serotyp 4 (TETTELIN *et al.* 2001), nevirulentního laboratorního kmene R6 (HOSKINS *et al.* 2001) a virulentního kmene D39 serotyp 2 (LANIE *et al.* 2007). Sekvence těchto genomů se liší především přítomností 7,5 kb dlouhého úseku, který kóduje geny pro syntézu polysacharidového pouzdra. U virulentního kmene TIGR4 a D39 je tento úsek přítomný, u nevirulentního kmene R6 tento úsek chybí.

Genom virulentního kmene obsahuje 2 236 předpokládaných kódujících oblastí, 64% z nich má známou biologickou funkci, 5% genomu tvoří inzerční sekvence, které přispívají k přeskupení genomu během příjmu cizorodé DNA (TETTELIN *et al.* 2001).

Díky své genetické tvárnosti a významné patogenitě je *Streptococcus pneumoniae* užitečným nástrojem při výzkumu antibiotik se širokým spektrem účinku. Znalost

kompletní sekvence chromozomální DNA usnadňuje rychlou a efektivní identifikaci genů kódujících nové cílové proteiny pro antibakteriální látky (GLASS *et al.* 2002).

2.1.3 Patogeneze

Patogeneze pneumokokové infekce je výsledkem dokonalé interakce mezi virulenčními činiteli *Streptococcus pneumoniae* a imunitní odpovědí hostitelského organismu. Bylo popsáno a prostudováno velké množství virulenčních faktorů ve snaze najít mezi nimi vhodného kandidáta pro tvorbu vakcíny (GILLESPIE a BALAKRISHNAN 2000). V současnosti je dostupná polyvalentní vakcína vyrobená na základě polysacharidových pouzderých antigenů, která však chrání jen proti malé podskupině serotypů známé tím, že způsobuje velmi vážná invazivní onemocnění (ORIHUELA *et al.* 2004).

S. pneumoniae má soubor vlastností, které mu umožňují kolonizovat rozsáhlé spektrum nik. Nejčastěji tyto bakterie osidlují nosohltan, kde jsou nejvhodnější růstové podmínky. Toto místo také představuje příhodnou oblast, odkud může dojít k rozšíření invazivního onemocnění dále po těle a to zejména směrem do dolních cest dýchacích a krve (ORIHUELA *et al.* 2004). Jakmile se bakterie dostane do krevního řečiště, může infekce vyústit v sepsi či v zánět mozkových blan, které mají navzdory antibiotikové léčbě velmi často letální následky (MANDEL *et al.* 1996).

Kolonizovaný organismus je nucen rychle vyvinout imunitní odpověď. Bylo dokázáno, že u dětí trvá tento proces déle než u dospělých jedinců, proto má u dětí infekce často závažnější charakter. Dalším z faktorů, které napomáhají k selekci nejodolnějších kmenů v oblasti nosohltanu, je přítomnost různorodé mikroflóry, která vytváří symbiotické či přirozeně kompetiční prostředí.

Rozvinutí závažných onemocnění a následných komplikací je z části výsledkem přímého působení virulenčních faktorů a z části je zapříčiněno imunitní odpovědí hostitele na různé komponenty bakteriální buňky. Pneumokoková infekce a imunitní odpověď hostitele společně vytváří čtyři klíčové projevy:

(i) adhezi, (ii) invazi, (iii) zánět a (iv) šok (GILLESPIE a BALAKRISHNAN 2000).

2.1.3.1 Adheze

Bylo zjištěno, že schopnost adheze u *S. pneumoniae* úzce souvisí s vlastností, kterou nazýváme opacita (neprůhlednost). Jak již bylo zmíněno výše, byly rozeznány dvě různé morfologické fáze *S. pneumoniae* již během pokusů F. Griffitha. Později byly varianty průhledné a neprůhledné charakterizovány na základě různé morfologie. Neprůhledné

kolonie jsou větší, více zabarvené do běla, jednotné a klenuté (odpovídají morfologické fázi R). Jasně (transparentní) kolonie jsou oproti tomu hůře definovatelné, co se povrchu týče a jejich morfologie odpovídá S fázi. Bakteriální organismus střídavě používá obě fáze. Transparentní kolonie kolonizují nosohltan snadněji, což souvisí s jejich schopností snadněji přilnout k rozmanitým buňkám (př.lidské epiteliální buňky dutiny ústní, lidské epiteliální buňky plic, cévní endoteliální buňky atd.). Tyto rozdíly souvisí se zastoupením různých povrchových proteinů v buněčné stěně a celkovým fenotypem obou variant (viz tab. 2–1) (GILLESPIE a BALAKRISHNAN 2000).

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

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

2.1.3.2 *Invaze*

Nejdůležitější událostí v průběhu pneumokokové infekce je invaze bakterie do dolních cest dýchacích, protože následná pneumonie (rozvíjející se jako důsledek této invaze) je život ohrožující onemocnění a navíc se může stát ohniskem pro další rozšíření bakterie do krevního řečiště (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.

Celá populace pneumokoků zahrnuje více než 90 serotypů, ale kolonizace, popřípadě infekce je ovládána jen relativně malým počtem těchto serotypů. Pomocí sekvenční typizace se zjistilo, že některé sekvenční typy charakterizují kmeny se zvýšenou schopností způsobit invazivní onemocnění. Tyto „úspěšnější kmeny“ musí nést skupinu genů (nebo disponovat zvýšenou expresí některých genů), které posunují hostitelsko-patogenní rovnováhu ve prospěch patogenní bakterie, což usnadní přechod od kolonizace k invazi. Proteiny kódované těmito geny jsou pro bakterii velmi významné na úrovni virulence a

nazýváme je „virulenční faktory“ (GILLESPIE a BALAKRISHNAN 2000). Patří mezi ně následující proteiny:

Hyaluronátlyasa (Hyl)

Patří mezi proteiny, které degradují hostitelskou tkáň, a tím usnadňují průnik bakterie. Tento enzym je schopen degradovat jednotlivé součásti extracelulární matrix štěpením 1,4-glykosidické vazby. Je přítomná u všech virulentních kmenů. Bylo dokázáno, že kmeny se zvýšenou aktivitou Hyl jsou schopné prolomit hematoencefalickou bariéru a daleko rychleji se šíří. Proto bývá Hyl často uváděna v souvislosti s invazí zejména při zánětu mozkových blan, sepsi a pneumonii (JEDRZEJAS 2001).

Neuraminidasa

Tento protein odštěpuje sialovou kyselinu z povrchových glykolipidů a glykoproteinů hostitelských tkání. Tím jednak narušuje povrch hostitelských buněk a zároveň odhaluje další receptory pro pneumokokové adheziny, což bakterii usnadňuje jak kolonizaci, tak invazi do příslušných tkání. *S. pneumoniae* produkuje dva proteiny s neuroaminidázovou aktivitou: NanA a NanB. Oba proteiny se velmi liší jak v aminokyselinové struktuře a molekulové váze (NanA - 108 kDa, NanB - 74,5 kDa), tak v optimálních enzymatických podmínkách. Hlavně rozdílné enzymatické optimum obou proteinů umožňuje bakterii vyrovnat se s odlišnými podmínkami v průběhu kolonizace hostitelského organismu. Význam aktivity neuraminidasy ve virulenci *S. pneumoniae* potvrzuje skutečnost, že u pacientů s pneumokokovou meningitidou, jejichž mozkomíšni mok obsahoval zvýšené množství N-acetyl-neuraminové kyseliny, došlo s vyšší pravděpodobností k bakteriemii (JEDRZEJAS 2001).

Pneumokokový povrchový protein A (PspA)

PspA je cholin vazebný povrchový protein, jehož funkce není přesně známá, je však nutný pro rozvinutí plné virulence bakterie. Pravděpodobně inhibuje aktivaci komplementu hostitele a váže lidský laktoferin (GRAHAM a PATON 2006). Je jedním z hlavních kandidátních proteinů pro přípravu alternativní vakcíny (MIYAJI *et al.* 2001).

Pneumolysin (Ply)

Pneumolysin je cytoplazmatický toxin, k jehož uvolnění do hostitelské tkáně dochází v průběhu lyze (resp. autolyze) bakterie. Patří do rodiny thiol-aktivačních cytolysinů. Mechanismus aktivace sleduje obecnou dvoustupňovou dráhu: první fáze má za následek vazbu monomerního lysinu na cílovou buněčnou membránu, druhá fáze zahrnuje laterální pohyb monomerů, jejich oligomerizaci a následné vytvoření vysokomolekulárního póru. Výsledkem je masivní únik intracelulárních látek a příliv vody z okolního prostředí, což má

za následek osmotickou nerovnováhu a následnou lyzi cílové buňky. Tímto způsobem je pneumolysin schopen zničit široké spektrum eukaryotických buněk včetně bronchiálního epitelu, alveolárního epitelu a endotelu plic. Škodlivý efekt na bronchiální epitel spočívá hlavně ve zpomalení jeho samočisticí funkce, v alveolárním epitelu zase Ply rozrušuje spoje mezi jednotlivými buňkami. Společně s cytolytickým efektem vedou tato poškození k invazi *S. pneumoniae* do krevního řečiště.

2.1.3.3 Zánět a šok

Zánětlivá odpověď hostitelského organismu a přímé poškození plic také souvisí s výše zmíněným pneumolysinem. Ten totiž aktivuje fosfolipasu A, která rozkládá rozsáhlou paletu membránových fosfolipidů hostitelské buňky, což má za následek toxický efekt na hostitelské buňky a vede k zánětu a poškození plic (GILLESPIE a BALAKRISHNAN 2000).

Autolysin

Autolysiny jsou proteiny, které způsobují degradaci peptidoglykanu a podílí se tak na degradaci buněčné stěny, což vede k lyzi bakterií.

Hlavním autolysinem *S. pneumoniae* je LytA (N-acetylmuramoyl-L-alanin-amidasa), který je součástí skupiny cholin-vazebných povrchových proteinů. Přímým výsledkem působení proteinu LytA je uvolnění částí peptidoglykanu a teichoových kyselin, které vyvolávají zánět. LytA se také nepřímo podílí na virulenci bakterie, protože svojí aktivitou uvolňuje intracelulární virulenní faktory jako na příklad pneumolysin (viz výše).

2.1.3.4 Pouzdro – hlavní virulenní faktor

Polysacharidové pouzdro je nejdůležitějším virulenním faktorem *S. pneumoniae*, jelikož zabraňuje fagocytóze ze strany alveolárních makrofágů, již jsou bakterie vystavené bezprostředně po kolonizaci plic (HAMMERSCHMIDT *et al.* 2005). Za syntézu bakteriálního pouzdra jsou zodpovědné tzv. *csp* geny, z nichž tři jsou nepostradatelné. Jedná se o Tyr proteinkinasy CspD, Tyr proteinfosfatasu CspB a protein CspC, který je nezbytný pro fosforylaci proteinkinasy CspD (MORONA *et al.* 2003).

Na základě znalostí struktury polysacharidového pouzdra byla v roce 1983 vyvinuta polyvalentní 23-složková vakcína, která obsahuje 23 purifikovaných pouzderných polysacharidových antigenů, které reprezentují 85 – 90% sérotypů způsobujících invazivní infekce. Tato vakcína ovšem nevyvolává dostatečnou imunitní odpověď u nejohroženější skupiny, u novorozenců, kteří mají omezenou protilátkovou odpověď k polysacharidům (BOGAERT *et al.* 2004).

Dříve bylo polysacharidové pouzdro považováno za jediný důležitý virulenční faktor *S. pneumoniae*, protože neopouzdřené bakterie jsou prakticky neškodné v porovnání s kmeny, které pouzdro mají. Později se však ukázalo, že existuje celá řada dalších virulenčních faktorů (popsaných výše), které mohou být kandidáty na výrobu vakcíny. Jestliže se ukáže, že protilátky k těmto proteinům poskytují člověku lepší ochranu proti pneumokokovým nákazám, budou moci takové vakcíny zastoupit nebo doplnit tradiční vakcíny vyráběné na základě polysacharidového pouzdra (JEDRZEJAS 2001).

2.1.4 Kompetence

Další významnou charakteristikou *S. pneumoniae* je schopnost kompetence. Termínem kompetence označujeme přechodný fyziologický stav, ve kterém je bakterie schopna přijmout cizorodou DNA ze svého okolí. Je-li buňka schopná přijmout DNA bez předchozích chemických či jiných úprav, nazýváme tento jev přirozená kompetence. Tato vlastnost buňky je geneticky daná, nalezneme ji jen v několika málo bakteriálních kmenech. U grampozitivních bakterií jsou to například *Bacillus subtilis* a *Streptococcus pneumoniae*, mezi gramnegativními pak můžeme jmenovat *Haemophilus influenzae* a *Neisseria gonorrhoeae*.

Stav kompetence je u *S. pneumoniae* řízen *quorum sensing* systémem a je závislý na teplotě, pH, koncentraci kyslíku, fosfátu, manganatých a vápenatých iontů (CLAVERYS a HAVARSTEIN 2002). Celý proces je zajišťován *com* geny a indukován pomocí kompetenčního faktoru CSP (Competence Stimulating Peptide).

Termín *quorum sensing* je používán pro mechanismus bakteriální komunikace, který ovládá expresi genů v závislosti na hustotě bakteriální populace (SUNTHARALINGAM a CVITKOVITCH 2005). U velkého množství bakterií (včetně streptokoků) je známo, že regulují řadu vlastních fyziologických procesů právě pomocí tohoto mechanismu. U *S. pneumoniae* se *quorum sensing* systém skládá z následujících komponent:

- signálního peptidu CSP (Competence Stimulating Peptide);
- dvousložkového regulačního systému ComDE, který zahrnuje membránově vázanou histidinovou proteinkinasu ComD, na kterou se váže CSP a odpovídající vnitrobuněčný DNA vazebný regulátor ComE. Všechny tři geny, *comC*, *comD* i *comE*, jsou součástí jednoho operonu;
- ABC transportéru ComAB s proteolytickou doménou, který zajišťuje sestřih a transport CSP přes buněčnou membránu do extracelulárního prostředí (LEE a MORRISON 1999).

Přímé i nepřímé důkazy naznačují, že přirozená kompetence je v rodu *Streptococcus* rozšířená (LEE a MORRISON 1999). Pokud je přirozená kompetence v rodu *Streptococcus* opravdu univerzální vlastností, mělo by to značný dopad na porozumění epidemiologii a patogenезi těchto bakterií (LEE a MORRISON 1999).

Je zajímavé, že každý z těchto kmenů vylučuje kompetenční faktor CSP s odlišnou primární strukturou, která přesně odpovídá příslušné receptorové proteinkinase ComD. Z tohoto důvodu CSP produkované jedním druhem zpravidla nebývá cizími druhy rozpoznáno a nevyvolá u nich kompetenci (GAUSTAD 1979).

Jaký může být biologický význam takového nadbytku variant CSP? Fenotypy rozdělují streptokoky do samostatných populací, které jsou ve většině případů složeny z blízké příbuzných bakterií. Příslušník každé populace reaguje jen na signály vlastní skupiny. Z tohoto důvodu je velice pravděpodobné, že přirozená kompetence a následná transformace slouží k výměně DNA mezi danou skupinou. Genová výměna mezi méně příbuznými druhy by vedla k nefunkčním nebo mozaikovým genům, zatímco transfer genů mezi druhy příbuznými může bakterie využít ve svůj prospěch (LEE a MORRISON 1999).

Během příjmu cizorodé DNA do bakteriální buňky mohou nastat dva případy: (i) DNA může být začleněna do hostitelského genomu; k tomu dochází v případě, je-li cizorodá sekvence homologní s hostitelskou DNA procesem homologní rekombinace, nebo (ii) je-li přijímaná sekvence částečně odlišná, dojde ke vzniku tzv. mozaikových genů (geny složené z cizorodé a hostitelské DNA) (CLAVERYS *et al.* 2000). Příkladem mozaikových genů jsou geny kódující PBP proteiny (Penicilin-Binding Proteins), které umožňují vznik kmenů rezistentních k penicilinu (HAKENBECK 2000). Některé produkty mozaikových genů však mohou být nefunkční.

2.2 RNA-POLYMERASA: stavba a funkce

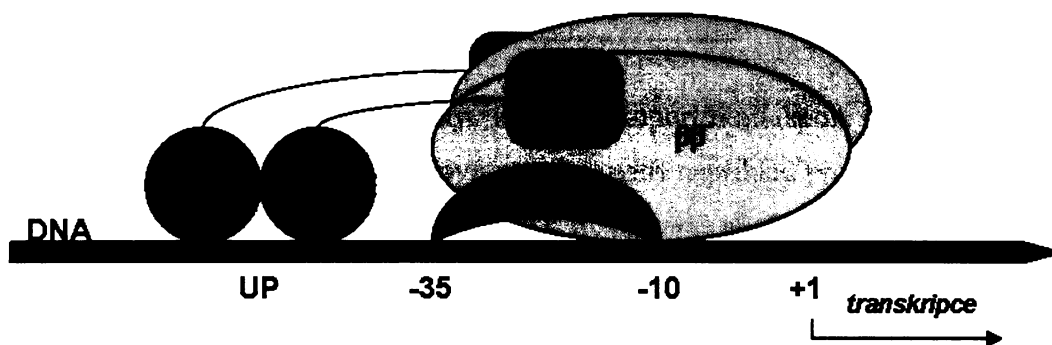
Běžná bakteriální buňka, kterou řadíme mezi „primitivní“ organismy, uchovává ve své chromozomální DNA více než 4 000 genů. Vezmeme-li v úvahu, že replikace, transkripce i translace probíhají v bakteriální buňce prakticky současně, musí být tyto reakce správně načasovány tak, aby byly příslušné geny exprimovány v příslušném čase a regulovány tak, aby bylo produkováno potřebné množství proteinů. Schopnost buňky změnit svoji zásobu proteinů a dalších makromolekulárních látek z hlediska množství a kvality se obecně označuje jako **regulace genové exprese**.

Regulace genové exprese probíhá na všech úrovních reakcí syntézy, tj. během replikace, transkripce i translace (nebo bezprostředně po nich). Regulace jako taková neudrzuje jen buněčnou syntézu v chodu, ale umožňuje buňce rychle změnit vlastní proteinovou výbavu v odpovědi na změny vnějšího či vnitřního prostředí. Tato pružná schopnost adaptace na okolí samozřejmě zahrnuje komplexní systém zaznamenávání změn a předávání potřebného signálu v rámci buňky.

Mezi možnými úrovněmi regulace hraje u bakterií centrální úlohu **regulace transkripce**. Nejdůležitějším prvkem bakteriální transkripce a jedním z cílových proteinů regulace transkripce je DNA-dependentní RNA-polymerasa (RNAP), která zodpovídá za veškerý průběh celé transkripční reakce (BROWNING a BUSBY 2004).

2.2.1 RNA-polymerasa a její podjednotky

Jak již bylo řečeno výše, je RNAP (obr. 2–2) hlavním katalytickým enzymem transkripční reakce. Poprvé byla popsána v roce 1959.



Obr. 2–2.: Model stavby RNA-polymerasy:

α CTD: C-terminální doména α podjednotky; α NTD: N-terminální doména α podjednotky; β a β' : podjednotky β a β' ; σ : podjednotky σ ; UP: „Upstream“ element; čísllice označují pozici jednotlivých párů bazí; šipka naznačuje směr transkripce

Nejdůkladněji prozkoumanou bakteriální RNA-polymerasou je RNA- polymerasa *E. coli*, která je vhodným prototypem ostatních bakteriálních RNAP, proto se následující informace budou týkat stavby RNAP *E. coli*.

V rostoucí buňce *E. coli* je přibližně 3 000 molekul RNA-polymerasy, což odpovídá 10 až 20 μM vnitrobuněčné koncentraci (při objemu bakteriální buňky 3×10^{-16} l). Volná RNAP pak zaujímá jen asi jedno procento tohoto objemu.

RNAP je multienzymatický komplex, který zahrnuje čtyři podjednotky: α , β , β' a σ (tab. 2–2). Aktivita katalyzující přepis DNA templátu je uložena v tzv. enzymatickém jádře (angl. „core enzyme“). Jádro enzymu se skládá ze dvou α podjednotek, jedné β a jedné β' podjednotky. Komplex $\alpha_2\beta\beta'$ je pak schopen zajistit běžný přepis, tak jak probíhá během transkripční elongace. Iniclace však vyžaduje komplex, jenž kromě jádra enzymu zahrnuje i podjednotku σ nebo jiné specifické faktory, které zajišťují specifickou iniciaci transkripce různých skupin genů (či regulonů) vyžadovaných za odlišných podmínek buněčného růstu (WAGNER 2000).

Tabulka 2–2.: Podjednotky RNA-polymerasy *Escherichia coli*

podjednotka	počet aminokyselin	molekulová hmotnost (kDa)
α	392	36,5
β	1342	150,6
β'	1407	155,2
σ	613	70,2
ω	91	10,1

Zvláštní postavení mají proteiny, které se kopurifikují spolu s RNAP, ale nejsou považovány za její součást. Mezi takové proteiny patří například protein δ (u *B. subtilis*, *S. pneumoniae*) (LUO a MORRISON 2003) a protein ω (u *E. coli*) (MATHEW a CHATTERJI 2006), u kterého bylo dokázáno, že je přímo navázán na β' podjednotku a pravděpodobně se účastní jejího seskupení. Funkce těchto proteinů není přesně známá.

Existuje velké množství proteinů, které interagují přímo s RNA-polymerasou nebo s nově narůstajícím vláknem RNA. Ačkoli se velká část z těchto proteinů váže přímo na RNAP, nepovažují se za součást transkripčního enzymu, ale jsou naopak zařazovány do samostatné skupiny proteinů, které se nazývají transkripční faktory.

Ne všechny RNA-polymerasy mají takto složitou stavbu. Některé fágy (např. T7 nebo SP6) disponují RNAP, která zahrnuje jediný polypeptid (o velikosti 90–100 kDa). Takové polymerasy nevyžadují k iniciaci transkripce σ podjednotku, a přesto rozeznávají fágově specifické promotory s vysokou afinitou. Jsou to velice výkonné enzymy, které jsou v průběhu elongace asi pětkrát rychlejší než polymerasy bakterií. Z těchto důvodů mají velmi rozsáhlé využití při *in vitro* transkripčních reakcích, kdy je vyžadováno velké množství RNA (NECHAEV a SEVERINOV 2003).

2.2.1.1 alfa podjednotka

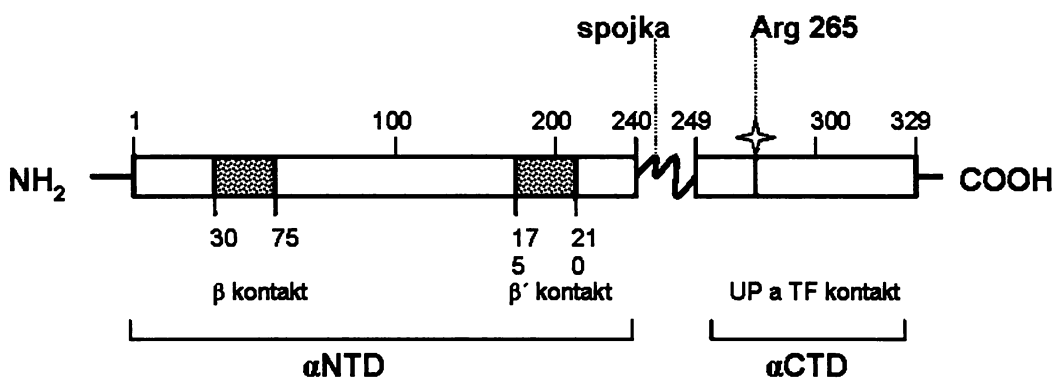
Podjednotka α je produktem genu *rpoA*, její molekulová hmotnost je 36,5 kDa a tvoří ji 329 aminokyselin. Bylo prokázáno, že tato podjednotka má významnou regulační úlohu v průběhu transkripce (ROSS *et al.* 1993).

Tento protein se skládá ze dvou nezávisle strukturovaných domén (N-terminální a C-terminální), které jsou navzájem propojeny ohebnou spojkou. N-terminální doména (α NTD), jejíž molekulová hmotnost je 28 kDa, zodpovídá za poskládání α podjednotky a celé RNAP a za propojení se zbytkem RNA-polymerasy. C-terminální doména (α CTD) o hmotnosti 8 kDa zabezpečuje u některých promotorů interakci s tzv. UP elementem (z angl. „Upstream element“), což zvyšuje až dvojnásobně základní frekvenci iniciace transkripce. UP elementy jsou AT bohaté sekvence, které byly identifikovány v oblastech předcházejících promotorové sekvenci některých genů velké řady bakterií a fágů, zároveň bylo dokázáno, že mohou fungovat s RNAP v komplexu s jakýmkoli σ faktorem (obr. 2–3) (ESTREM *et al.* 1999). α CTD také váže celou řadu transkripčních aktivátorů, jako například protein CAP (Catabolic Activating Protein), tato vazba je pro aktivaci transkripce zcela zásadní (NECHAEV a SEVERINOV 2003). α CTD nepůsobí v regulaci transkripce jen prostřednictvím transkripčních aktivátorů (např. CAP, OxyR, OmpR), ale taky prostřednictvím transkripčních represorů jako např. GalR (MURAKAMI *et al.* 1996).

Transkripční faktory, které pro svoji funkci vyžadují α CTD, byly označeny jako transkripční faktory I. třídy (TFI) (ISHIHAMA 1993). TFI se jedná váží na DNA sekvence, které předchází –35 promotorové oblasti a zároveň váží α CTD, tím usnadňují kontakt celé RNA polymerasy a promotoru. Díky tomu, že je spojka mezi α CTD a α NTD flexibilní, může α CTD vázat různě vzdálené transkripční faktory (BROWNING a BUSBY 2004), (ESTREM *et al.* 1999). Existují také transkripční faktory II. třídy (TFII), které překrývají –35 oblast a váží se na podjednotku σ , čímž umožní navedení RNAP na promotorovou sekvenci. Vazba podjednotky σ na TFII není tak přizpůsobivá jako vazba

α CTD na TFI, proto na některých promotorech váží TFII jinou součást RNAP (např. α NTD) (BROWNING a BUSBY 2004).

Aminokyselinové (AK) zbytky tvořící α CTD, které jsou pro interakci s DNA zásadní, jsou mezi bakteriemi vysoce konzervované, a proto je také konzervovaná sekvence DNA, kterou rozpoznávají (ESTREM *et al.* 1999). Celá α podjednotka se skládá z 329 AK zbytků, přičemž bylo dokázáno, že více než 94 zbytků z α CTD může být odstraněno bez zásadního vlivu na schopnost α podjednotky sestavit celý RNAP komplex (KIMURA *et al.* 1994), což ostatně potvrzuje fakt, že hlavní úloha α CTD spočívá v regulaci transkripce. Mapování mutací odhalilo, že AK zbytky α CTD, které zajišťují CRP dependentní transkripci, jsou lokalizovány mezi pozicemi 258 a 270, tato oblast je ostatně vyžadována i při odpovědi na OxyR transkripční aktivátor (OZOLINE *et al.* 2001). Ukázalo se, že mezi těmito AK zbytky má nejvýznamnější funkci Arg265 (obr. 2–3), který je nezbytný jak pro odpověď na CRP a OxyR, tak pro stimulaci UP element-dependentních promotorů (MURAKAMI *et al.* 1996).



Obr. 2–3.: Strukturální mapa α podjednotky RNAP:

Číslice označují pozici jednotlivých aminokyselin; NH_2 a COOH označují N- a C-terminální konec proteinu; černá vlnovka vyznačuje pozici flexibilní spojky; tečkované obdélníky vyznačují konzervované sekvence; α CTD: C-terminální doména; α NTD: N-terminální doména; UP: „upstream element“; TF: transkripční faktory; Arg265: arginin v pozici 265

2.2.1.2 beta podjednotka

β podjednotka je produktem genu *rpoB*, který je společně s genem pro β' podjednotku (*rpoC*) v jednom operonu. Geny *rpoB* a *rpoC* jsou v rámci operonu odděleny krátkou nekódující oblastí. Oba geny mohou *in vivo* a *in vitro* fúzovat a exprimovat komplex β - β' , který je schopen funkčního začlenění do RNA polymerasy. Tento výsledek prokázal, že je C-terminální konec podjednotky β a N-terminální konec podjednotky β' v průběhu celého transkripčního cyklu v úzkém kontaktu (SEVERINOV *et al.* 1997).

β podjednotka je druhá největší komponenta RNAP, tvoří ji 1 342 aminokyselin (150,6 kDa) a společně s β' podjednotkou tvoří katalytické centrum enzymu. Pokud se na ní naváže rifampicin, není schopna své katalytické funkce a dojde k inhibici transkripce. Rifampicin se váže do katalytického centra do blízkosti oblasti, kde dochází k přidání nukleotidu do fosfodiesterové kostry, proto nemůže v případě vazby rifampicinu dojít k elongaci RNA vlákna a transkripce je ukončena.

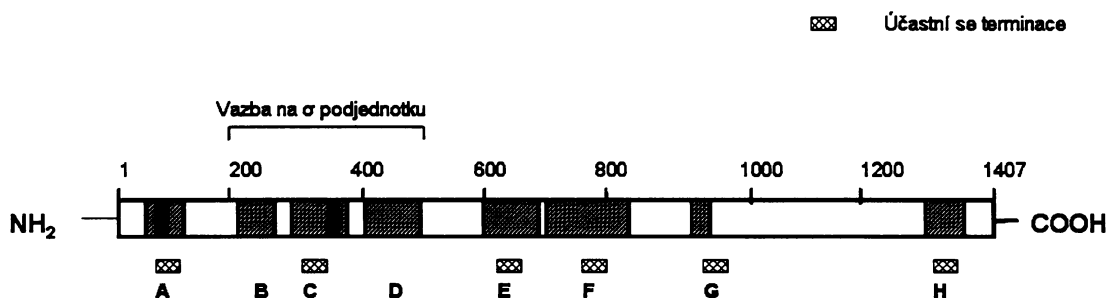
Bylo popsáno několik mutací β podjednotky, jež ovlivňují jeden z hlavních regulačních mechanismů bakterie, kterým je stringentní odpověď. K aktivaci tohoto regulačního okruhu dochází při nedostatku aminokyselin, příslušná odpověď zahrnuje působení malého nukleotidového efektoru guanosin tetrafosfátu (ppGpp). Na základě těchto mutací se předpokládá, že β podjednotka přímo interaguje s ppGpp a je tedy součástí regulačního systému, který zprostředkovává stringentní odpověď (JENSEN a PEDERSEN 1990).

2.2.1.3 *beta' podjednotka*

Největší podjednotka RNAP se skládá z 1 407 aminokyselin (155,2 kDa). Byla nalezena značná homologie mezi β' podjednotkou a největšími podjednotkami všech eukaryotických polymeras. Celkem bylo rozpoznáno sedm segmentů s konzervovanou sekvencí, které vykazují s eukaryotickými polymerasami průměrnou podobnost aminokyselin okolo 70%. Tyto konzervované oblasti byly označeny písmeny A až H (obr. 2–4).

Analýzy míst účastnících se na rezistenci vůči některým antibiotikům, která výrazně ovlivňují průběh transkripce, značně prohloubily znalosti o vzájemném působení funkčních a strukturních vlastností β' podjednotky. Další studie prokázaly, že se β' podjednotka podílí na složení katalytického centra RNAP (WAGNER 2000).

Mutace, které mají vliv na pozastavení nebo úplnou terminaci transkripce, jsou rozšířeny po celé délce sekvence β' podjednotky (na úsecích C, E, F, G a H). Z toho vyplývá, že se β' podjednotky účastní také terminace transkripce. Její C-konec hraje také významnou úlohu při antiterminaci transkripce. Na β' podjednotce byla také identifikována oblast (úseky B a D), která se účastní interakce s σ^{70} faktorem při procesu vytváření celého holoenzymu.



Obr. 2–4.: Strukturální mapa β' podjednotky RNAP:

Číslice označují pozici jednotlivých aminokyselin; NH₂ a COOH označují N- a C- terminální konce proteinu; šrafované jsou označené vysoce konzervované sekvence A-H; obdélníčky pod jednotlivými úseky značí jejich účast na terminaci

2.2.1.4 sigma podjednotka

Specifickým faktorem pro iniciaci transkripce většiny standardních genů exponenciální fáze růstu (tzv. „housekeeping“ geny), je σ^{70} - produkt genu *rpoD*. Molekulová hmotnost tohoto proteinu je 70,2 kDa a tvoří jej 613 aminokyselin. Kromě tohoto primárního σ faktoru je u *E. coli* známo nejméně šest dalších specifických σ faktorů (HENGGE-ARONIS 2002).

Specifická interakce mezi RNAP a promotorovou sekvencí na DNA vždy vyžaduje přítomnost σ faktoru. Srovnání několika bakteriálních druhů ukázalo, že existuje celá řada homologních proteinů k σ^{70} podjednotce *E. coli*. Na základě společné aminokyselinové struktury je všechny řadíme do rodiny proteinů σ^{70} . Kromě rodiny σ^{70} , která zajišťuje přepis genů v exponenciální fázi růstu, existuje celá řada dalších alternativních σ faktorů, které rozpoznávají alternativní sekvence. Alternativní faktory jsou využívány například při transkripci genů teplotního šoku, genů stacionární fáze růstu, genů kódujících flagelární struktury, genů sporulace, genů pro kompetenci apod. (BROWNING a BUSBY 2004).

Obecnou funkcí všech σ faktorů je: (i) vazba na katalytické centrum RNAP, (ii) vazba na DNA (rozeznání promotorových oblastí -10 a -35), (iii) rozvolnění DNA v průběhu transkripce, (iv) interakce s některými transkripčními aktivátory.

2.3 PRŮBĚH TRANSKRIPCE A JEJÍ REGULACE

2.3.1 Iniclace transkripce

2.3.1.1 Průběh iniciace transkripce

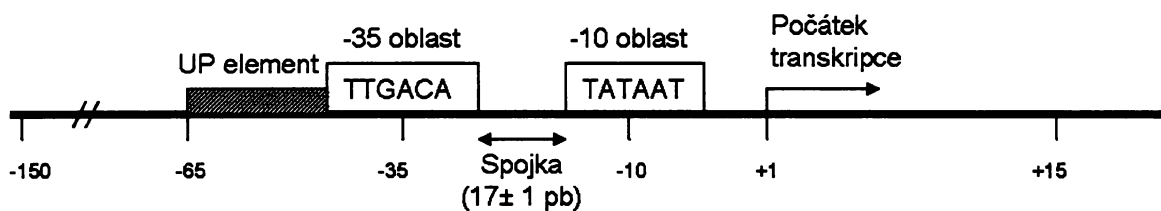
Iniclace transkripce a vazba RNAP na DNA je omezená na definovaná místa, která nazýváme **promotory**, ty jsou charakteristické konzervovanou DNA sekvencí.

Některé skupiny genů se společnými regulačními rysy vyžadují zvláštní promotorovou strukturu. Takové promotorové sekvence pak bývají rozlišovány specifickými alternativními faktory, které se přidávají k RNAP, aby společně vytvořily enzym schopný iniciace transkripce.

Obecná struktura promotorů zodpovědných za přepis „housekeeping“ genů může být odvozena na základě jejich konzervované primární sekvence.

Standardní promotor zahrnuje tři hlavní strukturní oblasti (obr. 2–5):

- Vysoce konzervovanou oblast, která je typická hexamerickou sekvencí 5'-TATAAT-3' na nekódujícím vlákně. Tato sekvence se obvykle nachází 10 pb před počátkem transkripce a nazývá se „**Pribnowův box**“ nebo také „**-10 oblast**“.
- Druhou rozpoznávací oblastí je oblast lokalizována 35 pb před počátkem transkripce, která je charakterizována konzervovanou sekvencí 5'-TTGACA-3' (opět na nekódujícím vlákně) a je označovaná jako „**-35 oblast**“.
- Poslední oblastí promotoru je nekonzervovaný úsek mezi -10 a -35 oblastí. Vzdálenost mezi těmito oblastmi má charakteristickou velikost 17 ± 1 pb. Tato oblast se nazývá „**spojovací oblast**“ (angl. „spacer region“). Zatímco změna velikosti této oblasti významně ovlivňuje chování promotoru, pořadí nukleotidů této sekvence nemá na chování promotoru výrazný vliv. Z toho vyplývá, že jednotlivé nukleotidy spojovací oblasti nejsou na RNA-polymerasu přímo vázány, ale jejich počet (tj. velikost spojovací oblasti) zajišťuje správnou pozici, vzdálenost a úhel pro kontakt -10 a -35 oblasti povrchu DNA s RNAP (ESTREM *et al.* 1999).



Obr. 2–5.: Stavba promotoru:

Číslice označují pozici jednotlivých párů bází na DNA; UP šrafovane „Upstream“ element; v obdélnících konzervovaná sekvence -35 a -10 oblasti; oboustranná šipka označuje spojovací oblast

Tyto oblasti jsou spolu s UP oblastí (20 pb dlouhý úsek, který předchází -35 oblasti) zásadní pro rozpoznání promotoru RNA-polymerasou.

Promotory řídí transkripci všech genů. Iniciace transkripce vyžaduje nejen vazbu RNAP na promotorovou sekvenci DNA, ale také vytvoření „otevřeného komplexu“, při kterém dochází k rozvolnění dvouvláknové DNA v oblasti počátku transkripce. Vytvořením první fosfodiesterové vazby mezi prvním a sousedícím nukleosid trifosfátem začíná syntéza RNA vlákna, které se prodlužuje, a iniciační komplex se přeměňuje v komplex elongační (BROWNING a BUSBY 2004).

2.3.1.2 Regulace iniciace transkripce

Základním pilířem regulace genové exprese je dostupné množství RNA-polymerasy a σ faktorů. Rozdělování RNAP mezi kompetující promotory je zřejmě zajišťováno pěti různými molekulárními mechanismy: promotorovou sekvencí DNA, σ faktory, malými ligandy, transkripčními faktory a strukturou bakteriálního chromozomu (BROWNING a BUSBY 2004).

Promotorová sekvence

RNAP je v bakteriální buňce vystavena působení cca 2 000 promotorových sekvencí a právě strukturální rozdíly mezi těmito sekvencemi jsou rozhodující při nerovném rozmístění RNAP mezi různé operony. Je známo, že promotory se sekvencí nejbližší standardní promotorové sekvenci (viz kap. 2.3.1.1) fungují s vyšší efektivitou. Bylo však zjištěno, že se převážná většina promotorů vyznačuje sekvencí, která se od standardní sekvence značně liší, čímž je udržována rovnováha mezi jednotlivými promotory. Mnoho silných promotorů využívá vysoce účinných UP elementů, které váže α CTD RNAP a tím poskytuje promotoru výhodu před ostatními (ESTREM *et al.* 1999, BROWNING a BUSBY 2004).

σ faktory

Jak bylo řečeno výše, rodina σ^{70} rozpoznává většinu promotorů, *E. coli* však obsahuje dalších šest alternativních σ faktorů, které v případě potřeby kompetují o volnou RNAP. Regulace alternativních σ faktorů je velmi komplikovaná a zahrnuje transkripční, translační i post-translační kontrolu. V mnoha případech bývá aktivita sigma faktoru regulována pomocí anti-sigma faktoru, který jej odstraňuje z RNAP (BROWNING a BUSBY 2004).

Na rozdíl od *E. coli* byl v rámci genomu *S. pneumoniae* objeven jediný alternativní σ faktor, který byl pojmenován σ^X . σ^X je specifický sigma faktor, který zajišťuje průběh kompetence (viz kap.2.1.4). σ^X je produktem genů *comX1* a *comX2*, jejichž exprese závisí na indukci pomocí CSP. Exprese ComX umožňuje aktivaci celé řady genů, které kódují složky kompetenčního mechanismu pro příjem cizorodé DNA a rekombinaci. Všechny ComX-závislé geny mají na svém promotoru 8 pb specifickou sekvenci tzv. „cin-box“, která je vyžadována pro specifický kontakt promotoru a komplexu σ^X -RNAP (SUNG a MORRISON 2005).

Malé ligandy

Malé vazebné ligandy představují alternativní mechanismus, kterým může RNAP rychle a efektivně zareagovat na změny okolního prostředí. Nejlepším příkladem je ppGpp (BROWNING a BUSBY 2004).

Jak bylo zmíněno výše, dochází během stringentní odpovědi k modifikaci RNAP. Tento proces zajišťuje malý nukleotidový efektor ppGpp, který se váže přímo na podjednotku β RNAP v odpovědi na nutriční stres a tím moduluje její aktivitu. ppGpp zprostředkovává aktivitu RNAP na promotorech kontrolovaných regulačním procesem stringentní odpovědi. Modifikace aktivity RNAP je způsobena jednak hladověním na aminokyseliny a jednak změnami v rychlosti růstu bakteriální populace.

Transkripční faktory (TF)

Genom *E. coli* obsahuje více než 300 genů kódující TF, které jsou schopné vazby na promotorovou sekvenci, čímž zajišťují pozitivní či negativní regulaci transkripce. Většina z těchto proteinů se váže na specifickou sekvenci DNA a tím umožňuje cílenou transkripci příslušných genů. Některé z těchto proteinů zajišťují přepis velkého počtu genů, sedm TF (CRP, FNR, IHF, Fis, ArcA, NarL a Lrp) kontroluje 50% všech regulovaných genů v *E. coli*. Jiné TF kontrolují jen jeden nebo dva geny.

TF spojují expresi genů se signály z vnějšího prostředí, a proto musí být jejich aktivita a exprese přísně regulována. Kontrola TF může být zprostředkována následujícími mechanismy. (i) Afinita daného TF k příslušnému promotoru může být modulována pomocí

malého ligandu, jehož koncentrace se mění v závislosti na stresu nebo dostupnosti potravních zdrojů. (ii) Aktivita TF může být regulována pomocí kovalentní modifikace. Některé z regulátorů bývají například fosforylovány prostřednictvím příbuzné senzorové kinasy. Tyto kinasy jsou umístěny v membráně bakteriální buňky, a proto jsou schopné reagovat na extracelulární signály. (iii) Některé TF jsou regulovány vlastní koncentrací. Ta je určována jednak regulací genové exprese a jednak proteolýzou (BROWNING a BUSBY 2004).

Struktura bakteriálního chromozomu

Bakteriální chromozom je vysoce zhuštěný díky nadšroubovicovému vinutí a interakci s proteiny a RNA. Existuje celá řada proteinů, které se na topologii chromozomu podílí. Tyto tzv. nukleoidové proteiny (Fis, IHF, H-NS, HU, Dps apod.) jsou v buňce velmi hojně zastoupené, ačkoli koncentrace některých z nich kolísá v závislosti na podmínkách růstu. Nukleoidové proteiny se účastní regulace iniciace tím, že pomáhají zpřístupnit nebo nezpřístupnit příslušné promotory, čímž vyvolávají aktivaci popřípadě represi transkripce (BROWNING a BUSBY 2004).

2.3.2 Elongace

Proces elongace nastává v okamžiku, kdy začne narůstat vlákno RNA a RNAP holoenzym uvolní σ podjednotku. Nejdůležitějším rysem elongačních transkripčních komplexů (ETK) je vysoká výkonnost a stabilita, kterou zajišťuje především uzavřená prstencovitá struktura RNAP pokrývající příslušný úsek DNA. ETK jsou také charakterizovány mnohočetnými interakčními místy, která umožňují spojení mezi RNAP, DNA a narůstajícím RNA vláknem. Pohyb ETK podél templátového vlákna DNA je píd'alkovitého charakteru, což je důsledkem střídavé vazby předního a zadního okraje RNAP na DNA a konformačních změn enzymu. Energie, kterou ETK spotřebovává během svého pohybu, je získávána z fosfohydrolýzy začleňovaných NTP. Průměrná transkripční rychlost bakteriální RNA polymerasy *in vivo* je 50 nukleotidů za sekundu.

RNAP se nepohybuje podél DNA kontinuálně, naopak se často zastavuje a vrací zpět (ARTSIMOVITCH a LANDICK 2000). Přerušovaný pohyb RNAP způsobují: sekundární struktura RNA transkriptu, konformace a topologie DNA, koncentrace nukleotidů, efektorové molekuly (např. ppGpp) nebo transkripční faktory.

Přerušovaný pohyb RNAP je důležitým mechanismem pro regulaci transkripce, během kterého může dojít nejen k zastavení ETK, ale i k terminaci transkripce. Existují proteiny,

ktelé přerušovaný pohyb ovlivňují a tím regulují celý průběh elongace. Mezi takové proteiny patří například GreA, GreB, NusA, Mfd (BORUKHOV *et al.* 2005).

GreA a GreB stimulují nukleázovou aktivitu RNAP a tím umožňují uvolnění zablokovaného ETK a pokračování elongace. NusA je multifunkční elongační transkripční faktor, který je schopen stimulovat pausy během elongace, zároveň je schopen vyvolat terminaci i antiterminaci. Protein Mfd je schopen rozpoznat a reaktivovat pozastavené RNAP (BORUKHOV *et al.* 2005).

2.3.3 Terminace transkripce

Exprese mnoha genů je regulovaná prostřednictvím úpravy terminačních míst a efektivitou terminace (BROWNING a BUSBY 2004).

Bakteriální buňka má obecně dvě možnosti, jak transkripci ukončit. Za prvé může k ukončení transkripce dojít v důsledku přítomnosti speciální signální sekvence na DNA templátu, která způsobí, že transkript zaujme strukturu schopnou terminace. Transkript se uvolní a RNA-polymerasa opustí templátovou DNA. Za druhé je transkripční proces ukončen pomocí proteinu nazývaného „transkripční terminační faktor“. Nejvýznamnějším terminačním faktorem je v bakteriální říši ρ (Rho) protein. Žádný z terminačních proteinů není strukturní součástí RNAP. Mezi terminační regulační faktory často řadíme elongační faktory, protože některé z nich jsou schopné vyvolat terminaci (BORUKHOV *et al.* 2005).

2.3.4 Modifikace RNA-polymerasy v průběhu transkripce

Z výše uvedeného vyplývá, že transkripce může být modulována pomocí interakce RNAP s některými proteiny. Je to jeden z hlavních způsobů regulace transkripce. Dalším limitním faktorem pro průběh transkripce je samotná koncentrace RNAP. Z celkového množství 2 500–3 000 molekul na buňku se jich asi 50% aktivně účastní právě probíhající transkripce, zhruba stejná část je nescificky navázána na DNA a jen asi 1% je volné pro novou iniciaci transkripce.

Kromě výše zmíněných mechanismů může regulace transkripce také souviset se změnou aktivity enzymu. Modifikace aktivity RNAP nevyžaduje vždycky působení proteinových faktorů. V biologických systémech je regulace často zajišťována chemickou modifikací, ve většině případů se jedná o fosforylaci.

Ačkoli je regulace pomocí fosforylace nejvíce spojována s eukaryotními systémy, hraje tento proces významnou úlohu i v průběhu regulace transkripce u prokaryot. Je známo mnoho příkladů, ve kterých fosforylace prokazatelně ovlivňuje funkci transkripčních faktorů.

Bylo dokázáno, že se aktivita RNAP může měnit při přechodu z logaritmické do stacionární fáze růstu. Předpokládá se, že k takové změně v chování enzymu dochází vlivem specifické modifikace a pomocí fosfocelulózové chromatografie se podařilo izolovat různé izoformy RNAP lišící se nábojem. *In vitro* transkripční analýzy pak prokázaly, že různé izoformy RNAP dávají přednost odlišným promotorům. Dále bylo zjištěno, že RNAP izolované v průběhu stacionární fáze růstu mají vyšší negativní náboj, což ukazuje na modifikaci enzymu pomocí fosforylace. Přechod odlišných izoform RNAP může být realizován *in vitro* inkubací s ADP či ATP, fosfatasa nemá na změnu enzymu žádný vliv. Proto se předpokládá, že fosforylace RNAP není důsledkem enzymové reakce. Jelikož nebyl prokázán vliv žádné proteinkinasy, přechod izoform je pravděpodobně zajišťován polyfosfáty nebo oligofosfáty (WAGNER 2000).

Přímý důkaz kovalentní modifikace jako způsob regulace aktivity bakteriálních RNAP byl popsán pouze v souvislosti s bakteriofágovou infekcí. Bakteriofágy často využívají hostitelskou RNAP pro přepis vlastních genů a její aktivitu ovlivňují prostřednictvím kovalentní modifikace nebo RNAP-vazebných proteinů. Příkladem kovalentní modifikace RNAP je její fosforylace proteinkinásou kódovanou genem *pg0.7* bakteriofága T7. Tato proteinkinasa fosforyluje β' podjednotku RNAP na threoninu. Tato modifikace zvyšuje frekvenci transkripce (NECHAEV a SEVERINOV 2003).

Jedním z takových bakteriofágů je i bakteriofág T4, který modifikuje hostitelskou RNAP, aby si zajistil časově regulovanou expresi vlastních genů. Na vypnutí transkripce hostitelských genů se podílí dva základní mechanismy: ADP ribozylace α podjednotky hostitelské RNAP a aktivita bakteriofágového proteinu Alc (NECHAEV a SEVERINOV 2003). ADP ribozylace α podjednotky je realizována bezprostředně po časné infekci a zřejmě hraje roli při přepnutí hostitelské transkripce na transkripci časných virových genů. Na ADP-ribozylaci se zřejmě podílí dva fágové enzymy. První enzym Alt je přenášen společně s virovou DNA do hostitelské buňky, kde způsobuje ADP ribozylaci Arg265 jedné z α CTD. Druhý enzym Mod je produkován 2–4 minuty po infekci a způsobuje ADP ribozylaci Arg265 na obou α CTD. Zatímco Alt protein je poměrně nespecifický (s nízkou účinností způsobuje ADP ribozylaci na dalších místech RNAP), je protein Mod vysoce specifický. RNAP, která je ADP ribozylovaná výhradně na Arg265, je neúčinná při transkripci závislé na UP elementech a CAP proteinu, zůstává však nedotčená pro bazální hladinu iniciace, elongace a terminace transkripce. Arg265 tedy plní úlohu antiaktivátoru (GOLDFARB a PALM 1981, GOFF 1984). Transkripce závislá na UP oblastech zahrnuje více než 60% veškeré RNA syntézy v rostoucích buňkách *E. coli* a vyžaduje aktivitu obou

α CTD. Proto ADP ribozylace Arg265 α CTD vyústí v rozsáhlý pokles transkripce hostitelských genů a nárůst volné RNAP přístupné pro T4 transkripci (NECHAEV a SEVERINOV 2003).

2.4 PŘENOS SIGNÁLU U *S. PNEUMONIAE*

Streptococcus pneumoniae jako každý patogenní organismus musí co nejrychleji zaznamenávat změny okolního hostitelského prostředí a příslušně na ně odpovídat, tak aby neustále odolával a unikal hostitelskému imunitnímu systému. Zaznamenávání signálů a zprostředkování příslušné odpovědi je v bakteriální buňce zajišťováno pomocí fosforylace a defosforylace proteinů, které jsou klíčovým mechanismem regulace buněčných procesů. Fosforylace je reverzibilní kovalentní posttranslační modifikace katalyzovaná proteinkinasami. Mikroorganismy vyvinuly různé systémy pro realizaci fosforylace proteinů:

(i) Fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferázový systém (PTS)

V rámci PTS je donorem fosfátové skupiny fosfoenolpyruvát a k fosforylaci proteinů dochází na jejich histidinových zbytcích. Hlavní funkční oblastí PTS je skupinová translokace, která umožňuje přenos sacharidů přes buněčnou membránu spojený se současnou fosforylací sacharidů.

(ii) Dvousložkové systémy (viz kap. 2.4.1)

(iii) Prokaryotní ATP dependentní Ser/Thr a Tyr proteinkinasy

ATP dependentní Ser/Thr a Tyr proteinkinasy fosforylují proteiny na Ser, Thr a Tyr, patří mezi ně například izocitrátdehydrogenasa kinasa/fosfatasa. Většina z nich se podílí na regulaci metabolických drah, proto jsou často regulovány prostřednictvím buněčných metabolitů (např. isocitrát, oxalacetát apod).

(iv) Ser/Thr a Tyr Proteinkinasy eukaryotního typu (viz kap. 2.4.2)

2.4.1 Dvousložkové systémy

Běžný dvousložkový systém se skládá ze dvou typově odlišných proteinů: (i) membránově vázaný sensorový protein, (ii) cytoplazmatický regulační protein. Rodina sensorových proteinů je charakteristická C-terminální histidinovou kinázovou doménou, která čítá přibližně 200 aminokyselinových zbytků a vyznačuje se pěti specifickými konzervovanými úseky (H, N, D, F, a G boxy). N-terminální část sensorového proteinu je velmi variabilní, většinou však zahrnuje jeden nebo více transmembránových úseků a slouží jako receptor (LANGE *et al.* 1999).

Stimul z okolí vede k autofosforylaci konzervovaného histidinového zbytku uvnitř kinázové domény, ve většině případů je fosfátová skupina dále přenesena na N-terminální část odpovídajícího regulátoru (STOCK a MOWBRAY 1995). Tato fosforylace změní

povahu regulačního proteinu, což vyvolá změnu chování (př. chemotaxe) nebo změnu genové exprese.

Srovnáním různých regulačních proteinů byla v rámci N-terminální části odhalena vysoce konzervovaná oblast tzv. „přijímací doména“ (angl. receiver domain). C-terminální doména regulátoru odpovídá efektoru nebo výstupní aktivující části. V mnoha případech má právě tato doména DNA vazebné vlastnosti a bylo dokázáno, že mnoho regulátorů vyvolávajících odpověď hraje úlohu transkripčních regulátorů (LANGE *et al.* 1999).

Dvousložkové systémy byly nalezeny u archebakterií, nižších i vyšších eukaryotních organismů. Mimo to hrají dvousložkové systémy úlohu virulenčních faktorů s rozhodujícím vlivem na patogenitu velké skupiny bakterií. Celkově vzato je tato rodina proteinů vhodným cílem pro rozvoj nových antibakteriálních látek. Současné studie totiž dokazují, že inhibitory dvousložkových systémů mají pozitivní antibakteriální aktivitu (BARRETT *et al.* 1998).

U *S. pneumoniae* bylo identifikováno 13 dvousložkových systémů, jejichž více či méně známé funkce jsem shrnula do následující tabulky (tab. 2–3):

Tabulka 2–3.: Dvosložkové systémy *S. pneumoniae*:

číslo TCS	název TCS	geny	číslo genu	I.D.	předpokládaná regulační funkce	citace
1		<i>hk01</i>	spr1473	AAK00277.1	???	-
		<i>rr01</i>	spr 1474	AAK00278.1		
2	MicA/B	<i>hk02</i>	spr1106	AAK99909.1	limitace kyslíkem, kompetence, oxidativní stres	(ECHENIQUE a TROMBE 2001)
		<i>rr01</i>	spr1107	AAK99910.1		
3		<i>hk03</i>	spr0343	AAK99147.1	???	-
		<i>rr03</i>	spr0344	AAK99148.1		
4	CiaR/H	<i>hk07</i>	spr0708	AAK99512.1	virulence, kompetence	(IBRAHIM <i>et al.</i> 2004)
		<i>rr07</i>	spr0707	AAK99511.1		
5	PnpR/S	<i>hk05</i>	spr1893	AAK00695.1	lyze, kompetence, regulace koncentrace fosfátů	(NOVAK <i>et al.</i> 1999)
		<i>rr05</i>	spr1894	AAK00696.1		
6		<i>hk06</i>	spr1997	AAK00799.1	virulence, adheze	(STANDISH <i>et al.</i> 2005)
		<i>rr06</i>	spr1998	AAK00800.1		
7		<i>hk07</i>	spr0153	AAK98957.1	???	-
		<i>rr07</i>	spr0154	AAK98958.1		
8		<i>hk08</i>	spr077	AAK98881.1	metabolismus sacharidů, virulence	(MCKESSAR a HAKENBECK 2007)
		<i>rr08</i>	spr0076	AAK98880.1		
9		<i>hk09</i>	spr0579	AAK99383.1	kompetence, příjem cukrů	(HENDRIKSEN <i>et al.</i> 2007)
		<i>rr09</i>	spr0578	AAK99382.1		
10	VncR/S	<i>hk09</i>	spr0529	AAK99333.1	lyze, buněčná smrt, vankomycinový stres	(NOVAK <i>et al.</i> 2000)
		<i>rr10</i>	spr0528	AAK99332.1		
11		<i>hk11</i>	spr1815	AAK00618.1	vankomycinový stres	(NOVAK <i>et al.</i> 2000)
		<i>rr11</i>	spr1814	AAK00617.1		
12	ComD/E	<i>hk12</i>	spr2042	AAK00844.1	kompetence	(LEE a MORRISON 1999)
		<i>rr12</i>	spr2041	AAK00843.1		
13	BlpR/H	<i>hk13</i>	spr0464	AAK99268.1	<i>Quorum-sensing</i> systém, produkce peptidů	(DE SAIZIEU <i>et al.</i> 2000)
		<i>rr13</i>	spr0463	AAK99267.1		

TCS: dvousložkový systém; ID: identifikační číslo genu v GenBank; ???: funkce daného systému není známá

2.4.2 Proteinkinyasy eukaryotního typu

V bakteriální říši byla prokázána přítomnost proteinkinas, které obsahují všechny konzervované domény charakteristické pro eukaryotní proteinkinyasy (HANKS *et al.* 1988). Pojem proteinkinyasy eukaryotního typu zahrnuje sekvenčně homologní proteinkinyasy, které fosforylují proteiny na serinu, threoninu nebo tyrosinu.

Zjistilo se, že tyto proteinkinyasy jsou mezi mikroorganismy poměrně hojné, i když ne univerzálně rozšířené. Všechny dosud objevené proteinkinyasy eukaryotního typu se vyskytují většinou u skupin bakterií, které podléhají buněčné diferenciaci a mají složitý buněčný cyklus (*Streptomyces coelicolor*, *Myxococcus xanthus*) nebo jsou patogenní (např. *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus*

pneumoniae). Tyto proteinkinasy regulují rozličné buněčné procesy jako například vývoj, diferenciaci, sekundární metabolismus, biosyntézu nukleotidů, odpověď na stres, virulenci a další. U mikroorganismů, které mají složitý buněčný cyklus a podléhají diferenciaci, odhalila analýza sekvence genomu velký počet proteinkinas eukaryotního typu (*Myxococcus xanthus*, *Streptomyces coelicolor*), který se blíží k počtu proteinkinas jednobuněčných eukaryotních organismů. U patogenních bakterií analýza genomu prokázala přítomnost menšího počtu proteinkinas (*Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*).

2.4.2.1 Proteinkinasa StkP

V sekvenci genomu *S. pneumoniae* R6 byl identifikován pouze jeden gen (*stkP*) homologní s geny kódujícími eukaryotní Ser/Thr proteinkinasy (ESTPK). Tento gen se nachází v těsné blízkost genu *phpP* homologního se Ser/Thr proteinfosfatasou typu PP2C.

Inaktivace genu *stkP* inzerční mutagenezí vedla v nevirulentním kmeni *S. pneumoniae* ke ztrátě schopnosti přirozené kompetence a k předčasné lyzi. Ve virulentních kmenech měla inaktivace *stkP* za následek potlačení virulence a invaze bakterií přes epiteliální bariéru (ECHENIQUE *et al.* 2004).

Vzhledem k tomu, že *S. pneumoniae* kóduje pouze jedinou proteinkinasu eukaryotního typu a fenotypový projev mutace *stkP* je velmi výrazný, je tato bakterie vhodným modelem pro studium ESTPK.

V naší laboratoři byla proteinkinasa StkP spolu s přílehlou fosfatasou PhpP detailně biochemicky charakterizována (NOVAKOVA *et al.* 2005). Bylo zjištěno, že StkP je membránová mangan-dependentní proteinkinasa schopná autofosforylace a podléhá defosforylaci ze strany fosfatasy PhpP. Pomocí fosfoproteomické analýzy byly identifikovány *in vivo* dva potenciální substráty StkP: (i) fosfoglukosaminmutasa (GlmM), která se účastní biosyntézy komponent buněčné stěny, (ii) α podjednotka RNA polymerasy, která se účastní regulace iniciace transkripce. Ukázalo se, že GlmM je substrátem StkP také *in vitro* (NOVAKOVA *et al.* 2005).

Další analýzy fenotypového projevu kmene s inaktivovaným genem *stkP* odhalily citlivost tohoto kmene k různým stresovým podmínkám: zvýšené teplotě, působení oxidačních činidel, osmotickému tlaku a sníženému pH (SASKOVA *et al.* 2007). Porovnáním hladiny genové exprese kmenů *S. pneumoniae* Δ *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. Geny regulované pomocí proteinkinasy StkP se účastní tvorby buněčné stěny, biosyntézy pyrimidinů, kompetence, opravy DNA, příjmu železa, oxidativního stresu a dalších (SASKOVA *et al.* 2007).

3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Vzhledem k tomu, že *Streptococcus pneumoniae* kóduje jedinou proteinkinasu eukaryotního typu StkP, je vhodným modelovým organismem pro studium funkce proteinkinas v rámci bakteriální buňky. Srovnáním fosfoproteomických map kmene *S. pneumoniae* Cp1015 a *S. pneumoniae* Δ stkP byly identifikovány *in vivo* dva potenciální substráty proteinkinasy StkP: fosfoglukosaminmutasa (GlmM) a α podjednotka RNAP (RpoA) (NOVAKOVA *et al.* 2005). Cílem této diplomové práce bylo určit, zda je RpoA přímým substrátem proteinkinasy StkP.

Za tímto účelem byly stanoveny následující cíle:

1. Příprava vhodného vektoru pro expresi genu *rpoA*, který kóduje α podjednotku RNAP, v *E. coli*
2. Exprese a izolace rekombinantního proteinu RpoA z *E. coli*
3. *In vitro* fosforylace α podjednotky za přítomnosti StkP a určení optimálních podmínek této reakce
4. Příprava kmene *S. pneumoniae* WT a *S. pneumoniae* Δ stkP exprimujících α podjednotku RNAP fúzovanou s histidinovou kotvou
5. Izolace a *in vitro* fosforylace nativního proteinu RpoA v komplexu RNAP z *S. pneumoniae*
6. Příprava vzorků pro analýzu fosforylačních míst pomocí hmotnostní spektrometrie

4 MATERIÁL A METODY

4.1 MATERIÁL

4.1.1 Bakteriální kmeny

ESCHERICHIA COLI

E. coli BL21(DE3) (Novagen): (F⁻ 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

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

S. pneumoniae Cp1015 (Rx derivát, str1 hexA)

Použití: výchozí nevirulentní experimentální kmen

S. pneumoniae Cp1016 (rif-23): nevirulentní kmen nese chromozomálně kódovanou rezistenci k rifampicinu

Použití: zdroj DNA pro testování přirozené kompetence

4.1.2 Vektory

pET28b (Novagen) je komerčně dostupný vektor o velikosti 5368 pb. Má kanamycinovou rezistenci, T7lac indukibilní promotor (pod ním dochází k expresi cílových proteinů) a sekvenci kódující histidinovou kotvu. Tento vektor byl použit pro expresi rekombinatních proteinů s histidinovou kotvou v *E. coli*.

pBluescript II KS⁻ (Stratagene) je komerčně dostupný klonovací fágemid se syntetickým polylinkerem a ampicilinovou rezistencí. Může existovat ve formě dvouřetězcové i jednořetězcové v závislosti na podmínkách kultivace, pro replikaci může být využíván buď ColE1 nebo f1 počátek replikace.

4.1.3 Půdy a média

Množství jednotlivých přísadků jsou udávána na 1 litr kultivačního média, pokud není udáno jinak, doplňují se do celkového objemu destilovanou vodou a sterilizují se. Do pevných půd byl přidán 1,5% agar (Becton, Dickinson and company, dále jen BD company).

Selekční půdy byly získány přidáním příslušného antibiotika v potřebné koncentraci (tab. 4–1.) do média vychladlého na cca 45° C.

Tabulka 4–1.: Používané koncentrace příslušných antibiotik

antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>S. pneumoniae</i>
Rifampicin	400 µg/ml	1 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml	-
Chloramfenikol	10 µg/ml	2,5 µg/ml
Spektinomycin	100 µg/ml	25 µg/ml
Ampicilin	100 µg/ml	-

KULTIVACE E. COLI

LB (Luria-Bertani médium):

trypton (BD company) 10 g; yeast extract (BD company) 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 MgCl₂ 10 ml; 1 M MgSO₄ 10 ml

KULTIVACE S. PNEUMONIAE

CAT médium:

casitone (BD company) 10 g; trypton 5 g; yeast extract 1g; NaCl 5 g

CATcomplet médium (CATc médium):

na 1 litr CAT média bylo přidáno: 0,5 M K₂HPO₄ 34 ml; 20% glukosa 10 ml;

pH 7,5

CTM médium:

na 1 litr CATcomplet média bylo přidáno: 0,1 M CaCl₂ 10 ml; 8% BSA (hovězí sérový albumin V frakce) (P-lab) 25 ml; pH 7,8

GELOSA G (pevné médium):

glukosa 1 g; NaCl 5 g; neopeptone (Difco) 5 g; Tris-base 1,25 g; casitone 10 g; agar 10 g

KREVNÍ AGAR:

na 200 ml gelosy G (ochlazené na 50° C) bylo přidáno 5 ml defibrinované beraní krve

4.1.4 Pufry a roztoky

Agarózová gelová elektroforéza

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

*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

*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

Příprava kompetentních buněk:

TB pufr: 10 mM PIPES; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl; sterilizace filtrací, poté přidáno MnCl₂ (výsl. konc. 55 mM); pH 6.7

Přenos proteinů a imunodetekce

Blotovací pufr: 48 mM Tris base; 39 mM glycin; 0,0375% SDS; 20% methanol

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

Detekční roztok: 10 ml TBS-T, 3 mg DAB (3,3'diaminobenzidin) rozpustit v kapce DMSO; 0,01% H₂O₂

Purifikace proteinů

Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (*Roche*) (Proteázové inhibitory):

1 tableta na 50 ml vzorku

Dialyzační pufr 10x: 500mM Tris base; 1M NaCl; 1mM EDTA; 10mM DTT; pH 7,5

TALON[™] Metal Affinity Resin (Clontech):

Pufr A: 20 mM Tris pH 8; 100 mM NaCl

Pufr B: 20 mM Tris pH 8; 100 mM NaCl; 100 mM imidazol

Glutathione Resin (Clontech)

Extrakční pufr: 140 mM NaCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄

Eluční pufr (vždy čerstvý): 10 mM glutathione v 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)

Ni-NTA Resin (QIAGEN)

Promývací pufr I.:	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM NaCl
Promývací pufr II.:	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM NaCl; 20 mM imidazol; pH 8
Eluční pufr:	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM NaCl; 250 mM imidazol; pH 8

SDS-PAGE

Elektroforetický pufr:	0,025 M Tris; 0,192 M glycin; 0,1% SDS; pH 8,3
SDS (STOP) pufr 5x:	350mM Tris-HCl pH 6,8; 20% glycerol; 15% SDS; 25% β-merkptoethanol
SDS vzorkový pufr:	0,125 M Tris, pH 6.8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% β- merkptoethanol; 0,02% BPB
Barvicí roztok:	0,5 g Coomassie blue; 450 ml methanol; 100 ml kyselina octová; 450 ml destilovaná voda

4.1.5 Chemikálie

Chemikálie	Firma	Zkratka
Agarosa	Sevac	
Agarosa LE Analytical Grade	Promega	
Akrylamid 2 x krystalický	Amersham	
Ampicilin	USB	Amp
Bacto-agar	BD company	
Bacto-casitone	BD company	
Bromfenolová modř	Sigma	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
Deoxycholát sodný	Merck	DCNa
3,3'- Diaminobenzidin	Sigma	DAB
Dimethylsulfoxid	Sigma	DMSO
Dithiotreitol	Promega	DTT
Dodecylsulfát sodný	Serva	SDS

Ethidium bromid, p.a.	Sigma	EtBr
D-Glukosa	Lachema	
Glycin	Serva	
Glutathion	Clontech	
Hovězí sérový albumin frakce V	Exbio	BSA
Chloramfenikol	USB	Cm
Imidazol	Lachema	
Kanamycin	USB	Kan
Kys. ethylenaminotetraoctová, dvojsodná sůl, p.a.	Serva	EDTA
6x Loading Dye Solution	Fermentas	
Maltosa vazebný protein	Fermentas	MBP
N,N'-methylenbisakrylamid 2 x kryst.	Serva	bisAA
Neopepton	Difco	
Penicilin G	Sigma	PenG
Peroxosíran amonný, p.a.	Lachema	APS
Proteinasa K	Boehringer	
Rifampicin	Sigma	Rif
RNasa A	Promega	
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin	Serva	TEMED
Spektinomycin	USB	Spc
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma	Tris base
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, hydrochlorid	Sigma	Tris-HCl
Tryptone Peptone	Difco	
Tween 20 (polyoxyethylene-sorbitan monolaurate)	Sigma	
Yeast extract	BD company	YE

4.1.6 Radiochemikálie

Adenosin-5 [γ - 32 P]trifosfát	ICN	[γ - 32 P]ATP
Adenosin-5 [α - 32 P]trifosfát	ICN	[α - 32 P]ATP

4.1.7 Enzymy

Modifikační enzymy

LA DNA polymerasa:	TopBio
Pfu DNA polymerasa:	Stratagene
T4 DNA ligasa:	Fermentas
Benzonasa:	MERCK
Alkalická fosfatasa :	USB

Restrikční enzymy

Bam HI	New England BioLabs (dále jen NEB)
Eco RI	NEB
Hind III	NEB
Nde I	NEB
Xba I	NEB
Xho I	NEB

4.1.8 Protilátky

Mouse monoclonal anti-His (Sigma):	primární myší monoklonální protilátka proti histidinové kotvě
Sheep anti-mouse IgG-HRP (Amersham):	sekundární ovčí protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou proti myším IgG
Protilátky proti StkP	králičí polyklonální protilátka (NOVAKOVA 2004)
Goat Anti-rabbit IgG (Pierce):	sekundární kozí protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou proti králičím IgG

4.1.9 Komerční soupravy a standardy

QIAprep [®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN):	izolace plazmidové DNA <i>E. coli</i>
Gel Extraction Spin Kit (QIAGEN):	izolace DNA z agarosového gelu
BCA Protein Assay Reagent (Pierce):	měření koncentrace proteinů
Minielute [™] Reaction Cleanup Kit (QIAGEN):	přečištění DNA
1 kb DNA Ladder Plus (DNA 1 kb standard):	Fermentas
Prestained Protein Marker (Proteinový standard):	NEB

4.1.10 Počítačová analýza

Clone manager Version 4.01 (Scientific & Educational Software): sestavování map klonovacích vektorů

Aida-Advantage Image Data Analyzer Version 3.28: analýza radiogramů

Multalin version 5.4.1: srovnání jednotlivých sekvencí

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

4.1.11 Použité oligonukleotidy

název	sekvence 5' - 3'	použití
LN1 F	GGCCCGCATATGATCGAGTTTGAAAAA	exprese <i>RpoA</i> (<i>Nde</i> I)
LN2 R	CCGCTCGAGTTATTTATCTTTTAATCC	exprese <i>RpoA</i> (<i>Xho</i> I)
LN5 F	CGGCAAGCTTATGCATCACCATCACCATCACCA TACCATCACATCGAGTTTGAAAAACCAATAT AAC	vkládání his-kotvy před <i>RpoA</i> (<i>Hind</i> III)
LN6 R	CGGCCTCGAGATGTTCTGTCAAAATACGIGCTG	vkládání his-kotvy před <i>RpoA</i> (<i>Xho</i> I)
LN7 R	CGGCAAGCTTACTCCCTCTTAAACGAAA	vkládání his-kotvy před <i>RpoA</i> (<i>Hind</i> III)
LN8 F	CGGCGGATCCTCAAGAAGATGCTATCCG	vkládání his-kotvy před <i>RpoA</i> (<i>Bam</i> HI)
LN11 F	GTGCTCGTCCTCCAAAACG	ověření his-sekvence na <i>RpoA</i>
LN12 F	CATCACCATCACCATCAC	ověření his-sekvence na <i>RpoA</i>
LN17 F	AAGCTTATGCATCACCATCAC	ověření integrace His kotvy před <i>RpoA</i>
LN18 R	AAAGCCCTAAAGCATCTTCTG	ověření integrace His kotvy před <i>RpoA</i>
LN19 R	TTACGGTAAGCCATGATATCC	ověření integrace His kotvy před <i>RpoA</i>
LN24 R	CGCGAATICTTATACACGGCGACGTTT	vnesení <i>Eco</i> RI místa za účelem vlození <i>Spc</i> kazety (<i>Eco</i> RI)
LN25 F	CGCGAATICTCATCGCATTACACTGCT	vnesení <i>Eco</i> RI místa za účelem vlození <i>Spc</i> kazety (<i>Eco</i> RI)
LN26 F	CGCGAATICCCCGTTTGATTTTAAATGGT	amplifikace <i>Spc</i> kazety; vložení His kotvy na <i>RpoA</i> (<i>Eco</i> RI)
LN27 R	CGCGAATICTTATAATTTTAAATCTGTT	amplifikace <i>Spc</i> kazety; vložení His kotvy na <i>RpoA</i> (<i>Eco</i> RI)
LN28 F	GGTATCGGACTTGCAACATC	ověření správnosti rekombinace na chromozomu <i>S. pneumoniae</i>
LN29 R	AAAATACGGTCGTCA	ověření správnosti rekombinace na chromozomu <i>S. pneumoniae</i>
LN30 R	GTACCGTAGCCACGTTTCAAG	ověření správnosti rekombinace na chromozomu <i>S. pneumoniae</i>
LN31 F	AGCTATTCGTGCGCTTGCTG	ověření správnosti rekombinace na chromozomu <i>S. pneumoniae</i>
STK2-r	TGCCCCGGGGCGTTGTTAATTTATTTA	ověření delece <i>stkP</i>
UFKFP	CGCGAATTCCGCAAGATATCGGATTAGGAA	ověření delece <i>stkP</i>

4.2 METODY

4.2.1 Manipulace s DNA

4.2.1.1 Agarózová gelová elektroforéza

Agarózová gelová elektroforéza patří mezi nejpraktičtější a nejvýkonnější metody používané pro dělení makromolekul. Separace molekul je založená na elektroforetické pohyblivosti separovaných látek.

Rychlost pohybu fragmentů DNA v agarózovém gelu závisí na molekulové hmotnosti DNA, koncentraci gelu, konformaci DNA, použitím napětí a složení elektroforetických roztoků. Velikost fragmentů DNA lze poté určit prostým srovnáním se standardem.

Mezi nesporné výhody této metody patří i přímá detekce DNA fragmentů v ultrafialovém světle pomocí barvení např. EtBr.

Analytická DNA elektroforéza

Pro analýzu DNA byla použita horizontální agarózová elektroforéza a pufr TAE. Hustota agarózového gelu byla upravena podle velikosti dělených fragmentů. Do gelu byl přidán EtBr pro detekci DNA fragmentů v UV světle. Vzorky DNA byly nanášeny rozpuštěné v 6x Loading Dye Solution (*Fermentas*). Jednotlivé DNA fragmenty byly separovány při napětí 5 V/cm² a velikost určena podle standardu.

Preparativní DNA elektroforéza

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

4.2.1.2 Polymerázová řetězová reakce – PCR

PCR je metoda, která umožňuje rychle a vysoce selektivně namnožit konkrétní 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 polymerasy.

PCR zahrnuje tři na sebe navazující kroky: (1) „denaturace“: oddělení dvou řetězců DNA od sebe, což vyžaduje krátké zvýšení teploty; (2) „hybridizace primerů“: nasednutí primerů na komplementární sekvence DNA, vyžaduje ochlazení reakčního roztoku; (3)

„elongace“: syntéza požadovaného úseku DNA z obou primerů za přítomnosti DNA polymerasy a deoxyribonukleosidtrifosfátů.

Celá technika je založená na využití DNA polymerasy izolované z termofilní bakterie, která nepodléhá denaturaci v kroku (1) a může tedy podstoupit větší počet třífázových cyklů za sebou. Pro správnou termodynamiku nasedání primerů na DNA a pro zabránění vzniku nespecifických produktů je nutné zvolit vhodnou teplotu (T_m) v kroku (2), kterou odvozujeme od sekvence obou oligonukleotidů:

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

PCR s LA polymerasou

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 polymerasy (TopBio).

PCR s Pfu polymerasou

Pfu polymerasa byla využita pro PCR, kdy byla vyžadována co nejpřesnější amplifikace daného fragmentu pro další použití (klonování plazmidu, transformace buněk). Pfu polymerasa byla použita pro amplifikaci genu *rpoA* popřípadě jeho fragmentů za účelem vložení sekvence kódující histidinovou kotvu a spektinomycinové kazety. Reakční podmínky byly stanoveny podle pokynů výrobce (*Stratagene*).

PCR na koloniích

Tuto reakci jsme použili pro ověřování vložení požadovaného DNA fragmentu na určené místo ve správné orientaci. Reakční podmínky jsme zachovali stejné jako pro PCR s LA polymerasou, navíc jsme do reakce přidali tween podle pokynů výrobce LA polymerasy (Top Bio). V reakci jsme použili jednotlivé kolonie *S. pneumoniae* narostlé na pevném agarovém médiu, které jsme pomocí sterilního párátko vypíchlí a rozpustili v 10 μ l média CATc s přídavkem glycerolu o finální 5% koncentraci. Kolonie byly uchovávány v -80°C .

4.2.1.3 Ligace

DNA ligasy jsou enzymy, které umožňují tvorbu vazeb mezi jednotlivými fragmenty DNA za spotřeby ATP.

Ligace byla standardně prováděna ve 20 μ l reakční směsi při pokojové teplotě (přes noc) pomocí enzymu T4 DNA ligasy. Reakční podmínky byly dodrženy podle pokynů výrobce (*Fermentas*).

4.2.1.4 Štěpení DNA restrikčními endonukleasami

Restrikční endonukleasy (RE) jsou enzymy, které rozeznávají specifické sekvence dsDNA a štěpí DNA v obou vláknech za vzniku definovaných fragmentů. Pro svou činnost nevyžadují přítomnost ATP a kromě štěpení specifických sekvencí DNA nijak nemodifikují.

Při použití RE byly dodrženy pokyny výrobce (*NEB*) a používány doporučené pufrы. Pokud nemohl být při štěpení dvěma různými enzymy použit stejný pufr, byla DNA naštipána postupně. Mezi jednotlivými štěpeními byla DNA precipitována izopropanolem a bylo-li to nutné přečištěna pomocí sady MinieluteTM Reaction Cleanup Kit (*QIAGEN*).

4.2.2 Manipulace s proteiny

4.2.2.1 SDS-polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)

K analýze proteinů byla využita vertikální SDS-PAGE. Vzorek proteinů byl před nanesením inkubován s SDS vzorkovým pufrem (10 min, 100° C). Vysoký negativní náboj SDS překrývá vlastní náboj proteinu, takže proteiny pokryté SDS mají shodné poměry počtu nábojů na jednotku hmoty, následkem toho se SDS proteiny dělí v elektrickém poli na základě své molekulové hmotnosti.

Elektroforéza probíhala v SDS elektroforetickém pufru, v 4% zaostřovacím gelu při napětí 10 V/cm², v 10% nebo 12% separačním gelu při napětí 15 V/cm² (tab. 4–2).

Tabulka 4–2.: Příprava polyakrylamidového gelu

	30% akrylamid	1,5M Tris pH 8,8	0,5M Tris pH 6,8	10% SDS	H ₂ O	TEMED	10% APS	celk. objem
zaostřovací gel 4%	0,4 ml	-	1 ml	40 μ l	2,5 ml	5 μ l	50 μ l	4 ml
separační gel 10%	4,7 ml	3,5 ml	-	140 μ l	5,6 ml	14 μ l	100 μ l	14 ml
separační gel 12%	5,6 ml	3,5 ml	-	140 μ l	4,7 ml	8 μ l	80 μ l	14 ml

4.2.2.2 Barvení proteinů na separačním gelu

Proteiny byly barveny barvou Coomassie blue R-250 tímto způsobem:

1. barvení gelu v barvicím roztoku (0,5 g Coomassie blue; 450 ml methanol; 100 ml kyselina octová; 450 ml destilovaná voda), 20 min
2. odbarvení gelu odbarvovacím roztokem (20% methanol, 10% kyselina octová)
3. sušení gelu (ve vakuu), 30 min, 55° C

4.2.2.3 Měření koncentrace proteinů

Pro stanovení koncentrace proteinů byla použita komerční souprava BCA Protein Assay Reagent (*Pierce*). Jedná se o metodu, která umožňuje kolometricky stanovit koncentraci proteinů. Při přípravě vzorků pro měření koncentrace byly dodrženy pokyny výrobce, reakce probíhala 30 min při 37° C.

Pro vytvoření kalibrační křivky byl použit zásobní roztok proteinu BSA (2 mg/ml), z kterého byla připravena ředící řada (0-20-40-60-80-100 µg proteinu). Míra vzniklého modrofialového zabarvení byla měřena jako absorbance při vlnové délce 562 nm. Kalibrační křivka byla vytvořena dle standardu ze získaného grafu závislosti absorbance na koncentraci. Pomocí regresní rovnice byla z kalibrační přímky stanovena koncentrace proteinů ve vzorcích.

4.2.2.4 Přenos proteinů na membránu („Western blotting“)

K přenosu proteinů (za účelem imunodetekce) z SDS-PAGE gelu na PVDF membránu Immobilon-P (*Millipore*) byl používán přístroj zhotovený podle přístroje The Mini Trans-Blot® (*Bio-Rad*). Při sestavování aparatury bylo postupováno dle pokynů originálního výrobce. Membrána byla nejprve smočena v methanolu a poté ekvilibrována v blotovacím pufru (viz kap. 4.1.4). Přenos probíhal 23 min při 360 mA, pokud probíhal přenos správně, byly vidět přenesené proužky proteinového standardu.

4.2.2.5 Imunodetekce proteinů

Pro imunodetekci epitopem značených proteinů byla používána monoklonální myší protilátka proti histidinové kotvě a sekundární protilátka proti myším IgG konjugovaná s křenovou peroxidasou. V případě StkP jsme používali králičí polyklonální protilátku (NOVAKOVA 2004) a sekundární kozí protilátku konjugovanou s křenovou peroxidasou proti králičím IgG. Křenová peroxidasa katalyzuje reakci, při níž se bezbarvý diaminobenzidín (DAB) mění v přítomnosti H₂O₂ na barevný produkt. Barevný komplex

prim.protilátka-sek.protilátka-enzym pak identifikuje polohu hledaného proteinu popřípadě přítomnost epitopu.

Při imunodetekci byl dodržován následující postup:

1. Blokace proteinů na membráně, 1 hod v 3% BSA v 10 ml TBS-T
2. Inkubace s primární protilátkou (ředění 1:2000) v 1% BSA/TBS-T, přes noc při 4° C
3. Promytí 3 x 10 minut v TBS-T
4. Inkubace se sekundární protilátkou (ředění 1:5000) v TBS-T
5. Promytí 3 x 10 minut v TBS-T
6. Barevná detekce: inkubace v detekčním roztoku do zbarvení
7. Ukončení reakce přidáním destilované vody

4.2.3 Manipulace s *E. coli*

4.2.3.1 Kultivace

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 agarem, kulturu jsme inkubovali také při 37° C. Selektce jsme dosáhli přidáním ATB v příslušné koncentraci.

4.2.3.2 Příprava kompetentních buněk

Kompetentní buňky 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 Izolace plazmidové DNA

Princip 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.

1,5 ml LB média s příslušným ATB jsme inokulovali izolovanou bakteriální kolonií a inkubovali přes noc při 37° C. Narostlou kulturu jsme centrifugovali (3 min, 13 000 rpm) a resuspendovali ve 100 µl roztoku PEBI. Dále jsme přidali 200 µl roztoku PII, vše šetrně zamíchali a inkubovali 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 přidali k němu 1x objem isopropanolu. Po další centrifugaci (10 min, 13 000 rpm) jsme pelet promyli 80% ethanolem a vysušili ve vakuu. Takto izolovanou DNA jsme rozpustili ve 20 µl TE pufru s RNAsou A (20 µg/ml).

Pro izolaci plazmidové DNA ve vysoké čistotě (DNA určená pro transformaci, apod.) byla využita komerční souprava QIAprep® Spin Miniprep kit (*QIAGEN*) a dodrženy pokyny výrobce.

4.2.3.4 Transformace buněk plazmidovou DNA

Tato metoda transformace je založena na využití teplotního šoku, který usnadní průchod plazmidové DNA bakteriální buněčnou stěnou.

Kompetentní buňky jsme rozmrazili na ledu a přidali k nim 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 4x objem předeřátého 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 Exprese a purifikace proteinů

Exprese proteinu

200 ml LB média s kanamycinem (50 µg/ml) jsme zaočkovali čerstvým inokulem kmene *E. coli* BL21 nesoucím plazmid pET28b s příslušným genem na výslednou OD₆₀₀ = 0,05. Buňky jsme kultivovali při 37° C do OD₆₀₀ = 0,6 (byl odebrán vzorek kultury před indukcí). V kultuře byla následně indukována exprese proteinu přidáním IPTG na výslednou 2mM koncentraci. Kultura byla inkubována další 3–4 hodiny při 37° C (odebrán vzorek po indukcí) a po ukončení kultivace stočena (5 min, 6 000 rpm). Získaný buněčný pelet byl 2 x promyt 10 ml pufru (10mM Tris-HCl; pH 7,5) s proteázovými inhibitory (*Roche*).



V případě exprese proteinu StkP-GST probíhala veškerá kultivace při 30° C (NOVAKOVA 2004).

Purifikace proteinu

Purifikace proteinů probíhala na ledě a byly používány vychlazené roztoky s proteázovými inhibitory, tak aby během purifikace nedocházelo k degradaci proteinů. Hlavní metodou využívanou v průběhu purifikace byla afinitní chromatografie. Tato metoda umožňuje z roztoku s velkým množstvím proteinů připoutat zvolený protein na nosič pomocí kotvy (např. námi zvolené histidinové) a ostatních proteinů se během jednotlivých promývacích kroků zbavit. Protein je pak možné z nosiče uvolnit a tím získat roztok obsahující z většinové části příslušný protein.

Buněčný pelet jsme resuspendovali v příslušném pufru (dle způsobu afinitní chromatografie) a buňky rozbili pomocí přístroje mini French® 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 (TALON^(TM) Metal Affinity Resin (*Clontech*)). Při purifikaci byly dodrženy pokyny výrobce. Navázání na nosič probíhalo v pufru A (viz kap.4.1.4), navázaný protein jsme odmyli pomocí pufru B (viz kap.4.1.4) Purifikované proteiny jsme dialyzovali proti dialyzačnímu pufru a zamrazili po přidání 5% glycerolu v -20°C.

Protein StkP fúzovaný s GST kotvou byl izolován pomocí nosiče s glutathionem (GST Bind TM Resin (*Clontech*)) dle pokynů výrobce. Navázání na nosič probíhalo v extrakčním pufru a navázaný protein jsme z nosiče odmyli elučním puftrem. Proteiny byly dialyzovány proti dialyzačnímu pufru přes noc při 4° C a zakoncentrovány. Purifikované proteiny byly uchovávány v 5% glycerolu v -20°C.

4.2.4 Manipulace s *S. pneumoniae*

4.2.4.1 Kultivace

S. pneumoniae se kultivuje stacionárně při 37° C v minimálním nebo komplexním médiu. Konzervy *S. pneumoniae* jsme připravovali následujícím způsobem: do 10 ml média

CATc jsme zaočkovali 200 μ l kultury *S. pneumoniae* ($OD_{400} = 0,5$) a nechali růst do $OD_{400} = 0,5$, poté jsme kulturu rozdělili po 1 ml a zamrazili po přidání 15% glycerolu v $-80^{\circ} C$.

4.2.4.2 Izolace chromozomální DNA

10 ml média CATc jsme inokulovali 200 μ l kultury *S. pneumoniae* a inkubovali při $37^{\circ} C$ do $OD_{400} = 0,5$ (exponenciální fáze). Po centrifugaci (10 min, 10 000 rpm, $4^{\circ} C$) jsme buňky promyli pufrém (10mM Tris-HCl, pH 7,5) a opět centrifugovali (10 min, 6 500 rpm, $4^{\circ} C$). Buňky jsme resuspendovali v roztoku SEDS a inkubovali při $37^{\circ} C$ dokud nedošlo k lyzi kultury. K lyzátu jsme přidali proteinasu K (2 mg/ml), buněčnou suspenzi jsme inkubovali 15 min při $56^{\circ} C$. Přidali jsme 1x objem TE pufru a následovala extrakce směsí fenol-chloroform-isoamylalkohol (v poměru 25:24:1). Směs jsme centrifugovali (20 min, 6 500 rpm, LT). Odebrali jsme horní (vodnou) fázi. Počet extrakcí závisel na množství mezifáze. Nakonec jsme suspenzi extrahovali samotným chloroformem. Chromozomální DNA jsme precipitovali přidáním 0,1x objemu 3 M NaOAc a 0,6x objemu isopropanolu (několikanásobná inverze). Chromozomální DNA se v roztoku vysrážela ve formě vlákna, které jsme namotali na sterilní kličku, promyli 80% ethanolem a nechali oschnout na vzduchu do zbělení. Chromozomální DNA jsme nechali přes noc rozpouštět v TE pufru s RNasou (20 μ g/ml).

4.2.4.3 Transformace za použití CSP

Při transformaci za použití CSP jsme postupovali podle původního návodu (LUO a MORRISON 2003). Princip spočívá v navození kompetence v kultuře *S. pneumoniae* pomocí CSP, tak aby mohlo dojít k následné transformaci.

Do 10 ml média CTM jsme zaočkovali 200 μ l kultury *S. pneumoniae* ($OD_{400} = 0,5$) a inkubovali při $37^{\circ} C$ do $OD_{400} = 0,05$. Z této kultury jsme odebrali 1ml, ke kterému jsme přidali 250 ng CSP a 1 μ g DNA (určené k transformaci). Celou směs jsme inkubovali 30 min při $30^{\circ} C$ a 1,5 hod při $37^{\circ} C$. Kulturu jsme naředili a vyseli na misky s gelosou a příslušným ATB. Jako pozitivní kontrolu a pro testování transformační účinnosti jsme použili chromozomální DNA z kmene Cp1016, která nese resistenci na rifampicin. Vyseli jsme ředění 10^{-2} a 10^{-3} na gelosu s rifampicinem a 10^{-5} na gelosu 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 Purifikace RNAP

Při izolaci RNA polymerasy ze *Streptococcus pneumoniae* bylo využito postupu popsaného v (LUO a MORRISON 2003).

Do 800 ml média CATcomplet jsme zaočkovali 16 ml kultury kmene *S. pneumoniae* RpoA(His), *S. pneumoniae* RpoC(His), *S. pneumoniae* RpoA(His) Δ stkP OD₄₀₀ = 0,5. Buňky byly stacionárně kultivovány při 37° C do OD₄₀₀ = 0,5. Potom jsme kultivaci přerušili a buňky stočili 15 min při 6 000 rpm. Buněčný pelet jsme následně promyli v pufru (10 mM Tris, pH 7,5).

Purifikace probíhala pomocí Ni-NTA agarózové afinitní kolony (*Qiagen*), která specificky váže proteiny s histidinovou kotvou. Během purifikace byly dodrženy pokyny výrobce. Buněčný pelet jsme rozpustili v promývacím pufru s proteázovými inhibitory bez imidazolu a buňky rozbili tlakem pomocí přístroje mini French® Pressure Cell Press (*SLM instruments, Inc.*). Poté jsme suspenzi inkubovali 15 min při 37° C s benzonasou (rozkládá nukleové kyseliny, aby se mohla uvolnit veškerá navázaná RNAP). Suspenze jsme smíchali s 2 ml 50% Ni-NTA resinu a mírně promíchávali 60 min při 4° C. K promytí jsme použili promývací pufr s 20 mM imidazolem a navázaný protein jsme eluovali elučním puftrem s 250 mM imidazolem. Získaný protein jsme dialyzovali proti dialyzačnímu pufru minimálně 3 hodiny při 4° C a uchovávali v 5% glycerolu při -20° C.

4.2.5 Kinázová reakce *in vitro*

Fosforylační reakce *in vitro* byly realizovány ve 20 μ l základní reakční směsi o složení: 25 mM Tris-HCl pH 7,5; 25 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; ATP 10 μ M (obsahující 1 μ Ci [γ -³²P]ATP nebo [α -³²P]ATP) a 5 mM MnCl₂. Pro charakterizování optimálních podmínek *in vitro* fosforylace RpoA pomocí StkP byly použity různé koncentrace MnCl₂ a další ionty (MgCl₂, CaCl₂, ZnCl₂). Kinázová reakce byla zahajována přidáním radioaktivního ATP, poté byla reakční směs inkubována 30 min při 37° C a přidáním 5 x SDS-vzorkového pufru byla reakce zastavena. Pro testování kinázové aktivity v buněčných lyzátech bylo použito 30 μ g proteinů, při práci s purifikovaným proteinem cca 2 μ g proteinu. Proteiny byly separovány na 10% nebo 12% SDS-PAGE, gel byl usušen a exponován na citlivou fólii.

V případě testování nescifické fosforylace byly gely exponovány 6–7 dní, v případě specifické kinázové reakce 3–4 dny. Radioaktivní proteiny byly vizualizovány na přístroji Molecular Imager Fx (*BioRad*) a analyzovány programem Aida Image Analyzer.

4.2.6 Dvourozměrná gelová elektroforéza (2D SDS-PAGE)

2D separace proteinů proběhla podle O'Farella (O'FARRELL 1975). V prvním rozměru proběhla izoelektrická fokusace 48 hod při pH 3-5,6 (ImmobilineTM Drystrip; pH 3-5,6; NL; 18 cm; *GE Healthcare*). Ve druhém rozměru proběhla separace podle molekulové váhy ve 12,5% SDS-PAGE na přístroji Investigator TM 2-D Electrophoresis system (*Oxford Gycosystems*). Gely byly barveny koloidní Coomassie blue (NEUHOFF *et al.* 1988). Za účelem vysušení byly gely saturovány 15 min ve 2% roztoku glycerolu, vloženy mezi dvě celofánové fólie, napnuty do rámečku a sušeny při pokojové teplotě přes noc.

Všechny dvourozměrné gelové elektroforézy realizovala Sylvie Bezoušková z laboratoře Mikrobiální proteomiky MBÚ AV ČR, za všestrannou pomoc jí tímto velmi děkuji.

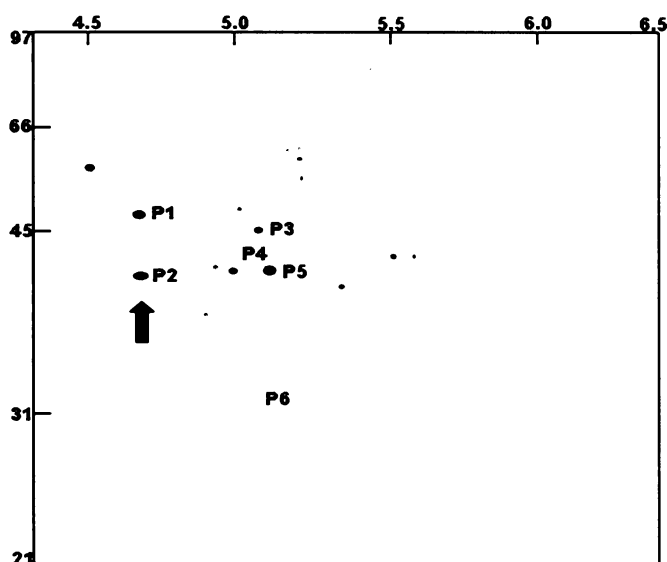
4.2.7 Hmotnostní spektrometrie

Vzorky na hmotnostní spektrometrii jsme připravovali následujícím způsobem (JENSEN *et al.* 1999). Skvrny jsme separovali pomocí vhodného SDS-PAGE gelu. Příslušnou skvrnu jsme z gelu vyřízli a smočili ve vodě v 500 μ l umělohmotných zkumavkách. Pomocí pipety jsme odstranili vodu ze vzorku a přidali 50 μ l promývacího pufu (50% acetonitril, 100 mM NH_4HCO_3). Směs jsme inkubovali 5 min při LT. Dále jsme odstranili ze vzorku supernatant a vzorek opět promyli pomocí promývacího pufu. Opět jsme odstranili supernatant a přidali jsme 50 μ l acetonitrilu. Acetonitril jsme odstranili pipetou a vzorek dosušili ve vakuu (cca 15 min).

Takto připravené vzorky jsme odeslali na analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie, kterou prováděl Jiří Adamec, Ph.D., Purdue University, Bindley Bioscience Center, USA.

5 VÝSLEDKY

Srovnáním fosfoproteomických map divokého kmene *Streptococcus pneumoniae* a mutantního kmene Δ *stkP* byly identifikovány dva potencionální substráty proteinkinasy StkP (obr. 5–1), (tab. 5–1). Jedním z nich byla α podjednotka RNA-polymerasy, která hraje významnou úlohu při regulaci iniciace transkripce (NOVAKOVA *et al.* 2005).



Obr. 5–1.: Fosfoproteomová mapa *S. pneumoniae* CP1015:

Proteiny fosforylované *in vivo* identifikované srovnáním fosfoproteomových map divokého a mutantního kmene Δ *stkP*. Svislá osa určuje molekulovou hmotnost (kDa) a vodorovná osa izoelektrický bod (pI). Červená šipka označuje skvrnu odpovídající α podjednotce RNAP. Proteiny P1-P6 viz tab. 5–1 (NOVAKOVA *et al.* 2005).

Tabulka 5–1.: Identifikované proteiny fosforylované *in vivo*:

číslo skvrny	název proteinu	hmotnost (kDa)	pI	název genu	funkce
P1	fosfoglukosaminmutasa	48,1	4,6	spr 1417	stavba buněčné stěny
P2	alfa podjednotka RNAP	34,3	4,6	spr 0215	transkripce
P3	ribosomální protein S1	43,9	5,1	spr 0764	proteosyntéza
P4	fosfoglycerátkinasa	41,9	4,9	spr 0441	glykolýza
P5	fosfodeoxyribomutasa	47	5,2	spr 0732	pentózový cyklus
P6	fruktosa-1,6-bisfosfátmutasa	31,5	5	spr 0530	glykolýza

Proteiny byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Dva z těchto fosforylovaných proteinů nebyly v mutantním kmeni Δ *stkP* přítomny (označeny červeně), a proto byly označeny jako potencionální substráty proteinkinasy StkP.

5.1 Exprese RpoA v *E. coli*

5.1.1 Příprava vektoru

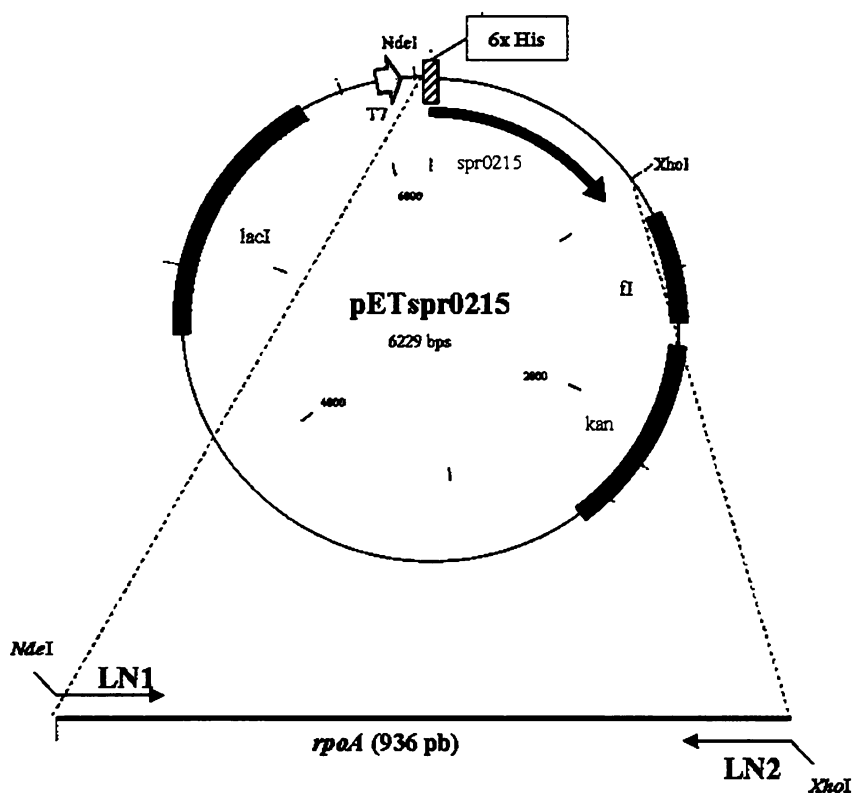
Abychom mohli určit, zda je α podjednotka RNA-polymerasy (protein RpoA) skutečným substrátem proteinkinasy StkP, rozhodli jsme se vytvořit vektor, který by nám umožnil expresi a izolaci proteinu RpoA.

Za tímto účelem jsme se rozhodli klonovat gen *rpoA* do expresního plazmidu pET28b, který umožňuje připojení histidinové kotvy na N-konec proteinu a tím umožňuje izolaci proteinu pomocí afinitní chromatografie.

Gen *rpoA* jsme amplifikovali pomocí PCR s Pfu polymerasou a použili jsme oligonukleotidy LN1 a LN2 (obr. 5–2).

Získaný amplifikovaný fragment jsme vložili prostřednictvím *NdeI* a *XhoI* restrikčních míst do plazmidu pET28b pod inducibilní T7 promotor tak, že na N-konci byla k proteinu připojena histidinová kotva (6x His) (obr. 5–2).

Získaný vektor jsme pojmenovali pETspr0215 (obr. 5–2) a transformovali jsme jej do *E. coli* JM109. Pozitivní kolonie nesoucí vektor pETspr0215, jsme ověřili pomocí PCR na plazmidové DNA, správnost sekvence jsme ověřili sekvenováním.

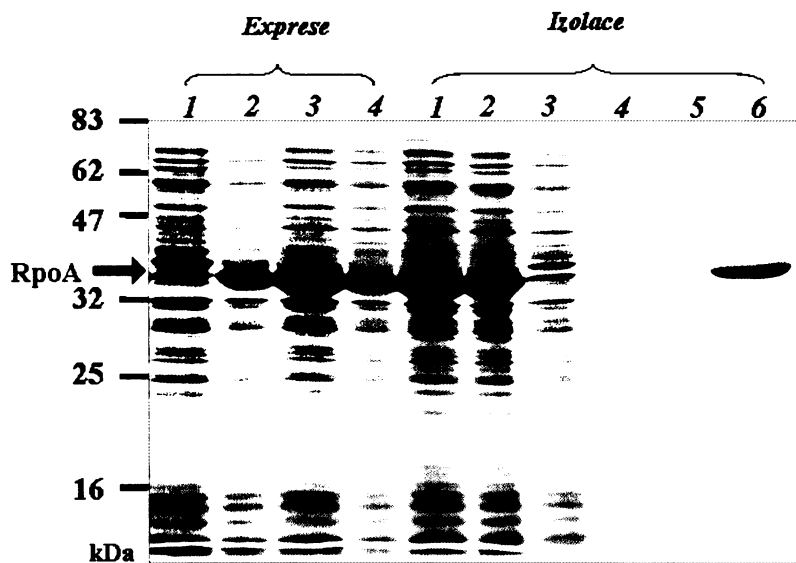


Obr. 5–2.: Mapa expresního vektoru pETspr0215:

T7: inducibilní promotor T7; *kan*: gen pro kanamycinovou rezistenci; *f1*: počátek replikace; *lacI*: *lac* represor; *NdeI* a *XhoI*: použitá restrikční místa; *spr0215* lokus genu *rpoA*; černé šipky označují použití oligonukleotidy; šrafovane sekvence kódující His

5.1.2 Exprese genu *rpoA* v *E. coli* BL21 (DE3)

Vektorem pETspr0215 jsme transformovali expresní kmen *E. coli* BL21(DE3), který jsme zaočkovali do LB média s kanamycinem. Po indukci IPTG nastala silná exprese RpoA(His). Během kultivace jsme odebírali vzorky kultury a poté je analyzovali na SDS-PAGE. Zjistili jsme, že dostatečné množství proteinu je obsaženo v rozpustné frakci. Za použití afinitní chromatografie se nám podařilo protein z rozpustné frakce izolovat s vysokou účinností a ve vysoké čistotě (obr. 5–3).



Obr. 5–3.: Exprese a purifikace RpoA:

Exprese: 1) vzorek kultury před indukcí; 2) 1 hod po indukci; 3) 2 hod po indukci; 4) 3 hod po indukci;

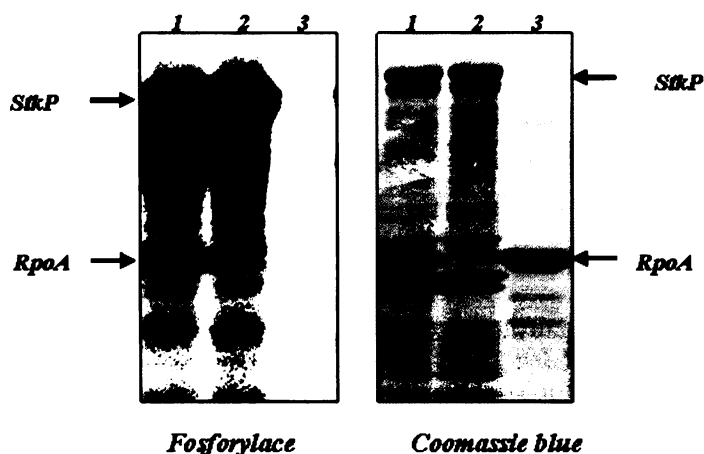
Izolace: 1) celkový lyzát buněk; 2) rozpustná frakce; 3) nenavázané proteiny; 4) 1. promytí; 5) 3. promytí; 6) čistý protein RpoA (36,4 kDa)

5.2 *In vitro* fosforylace RpoA pomocí StkP

Fosforylační aktivita StkP je jako u většiny proteinkinás eukaryotního typu stimulována manganatými a hořečnatými ionty, jejichž koncentrace se pohybuje v rozmezí mezi 0,5 mM a 5 mM (NOVAKOVA *et al.* 2005).

Z toho důvodu jsme pro *in vitro* fosforylaci proteinu RpoA použili standardní podmínky kinázové reakce s přidavkem manganatých a hořečnatých iontů (viz kap. materiál a metody). Zjistili jsme, že α podjednotka je za přítomnosti proteinkinasy StkP *in vitro* fosforylována a intenzita fosforylace sejevila jako velmi významná (obr. 5–4).

V kinázové reakci jsme používali protein StkP fúzovaný s GST- kotvou (NOVAKOVA 2004), která nám umožnila jeho izolaci. Protein jsme purifikovali pomocí GST BindTM Resin (Clontech) viz kapitola 4.2.3.5.



Obr. 5–4.: Fosforylace RpoA prostřednictvím proteinkinasy StkP:

1) StkP + RpoA; 2) StkP; 3) RpoA

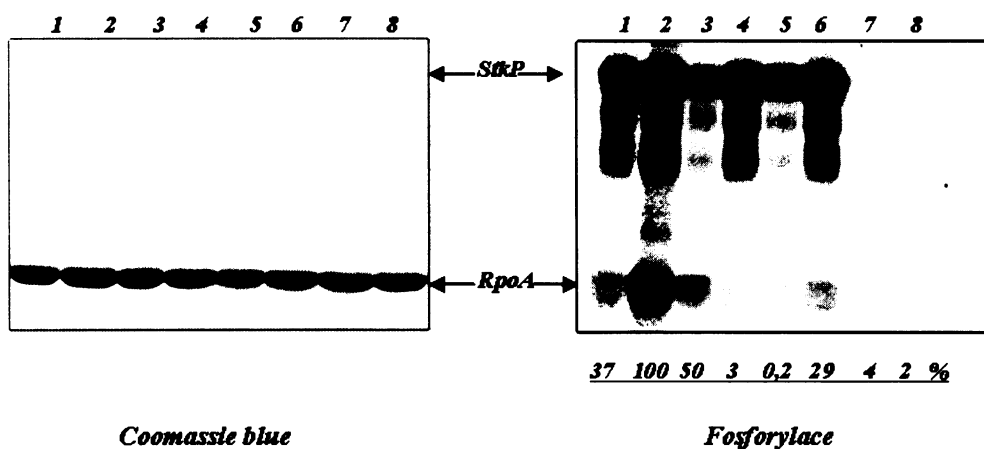
Jakmile jsme ověřili, že je α podjednotka v přítomnosti StkP *in vitro* fosforylována, chtěli jsme určit optimální podmínky pro tuto kinázovou reakci.

První optimum, které nás zajímalo, byl vliv různých dvojmocných iontů na fosforylaci RpoA prostřednictvím StkP. Za tímto účelem jsme vyzkoušeli vliv iontů manganatých, hořečnatých, vápenatých a zinečnatých. U Mn^{2+} a Mg^{2+} iontů, u kterých jsme předpokládali výrazný vliv na kinázovou reakci, jsme zkoušeli různé koncentrace (1–10 mM).

Největší intenzitu fosforylace jsme zaznamenali u 5 mM koncentrace $MnCl_2$ (obr. 5–5a). O více než polovinu nižší intenzitu fosforylace jsme zaznamenali u 10 mM $MnCl_2$, 1 mM $MnCl_2$ a u 10 mM $MgCl_2$. U ostatních iontů byla intenzita velmi nízká, proto jsme usoudili, že tyto ionty fosforylaci RpoA prostřednictvím StkP neovlivňují (obr. 5–5a).

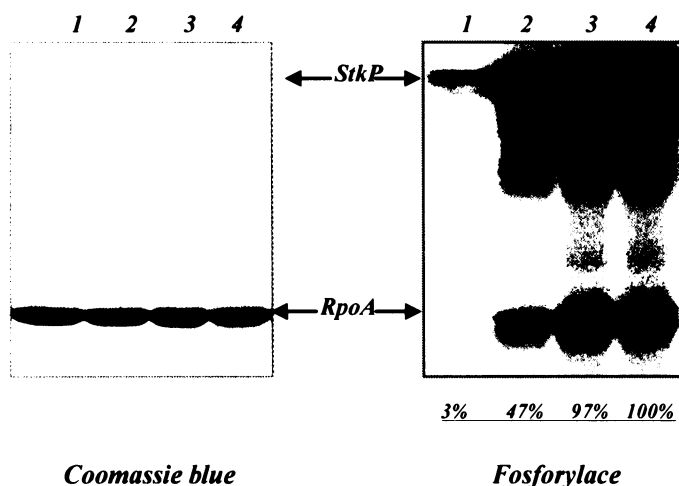
Dále nás zajímal vliv teploty na průběh fosforylace RpoA pomocí StkP. Testovali jsme teploty 0° C, 21° C, 37° C a 42° C. Největší intenzitu fosforylace jsme zaznamenali u teplot 37° C a 42° C, což odpovídá teplotám hostitelského organismu (přirozeného prostředí), ve kterém se *Streptococcus pneumoniae* jako endogenní patogenní bakterie běžně pohybuje (obr. 4–5 b.).

Analyzovali jsme také vliv času na průběh kinázové reakce. Kinázovou reakci jsme nechali probíhat 1 min, 15 min, 30 min a 60 min. Nejvyšší intenzitu fosforylace jsme zaznamenali, pokud kinázová reakce trvala 30 minut (obr. 4–5 c.).



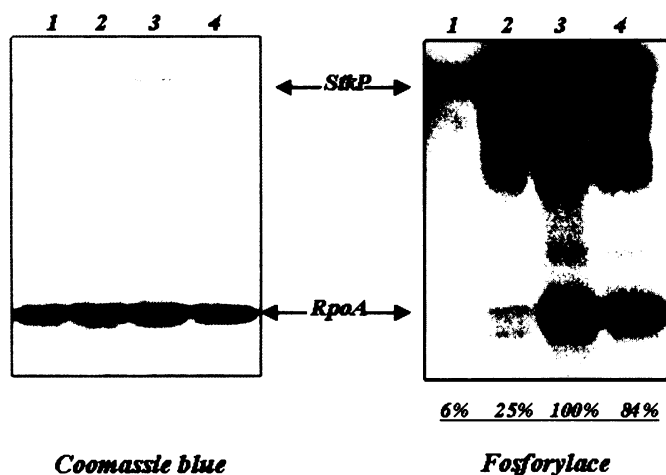
Obr. 5–5. a: Vliv iontů na *in vitro* fosforylaci RpoA pomocí StkP:

1) 1mM MnCl₂; 2) 5 mM MnCl₂; 3) 10 mM MnCl₂; 4) 1 mM MgCl₂; 5) 5mM MgCl₂; 6) 10 mM MgCl₂; 7) 5 mM CaCl₂; 8) 5 mM ZnCl₂; podtržená čísla udávají relativní intenzitu fosforylace, nejvyšší intenzitu jsme zaznamenali u 5 mM MnCl₂ a označili ji jako 100%



Obr. 5–5. b: Vliv teploty na *in vitro* fosforylaci RpoA pomocí StkP:

1) 0° C; 2) 21° C; 3) 37° C; 4) 42° C; podtržené číslice udávají intenzitu fosforylace v procentech



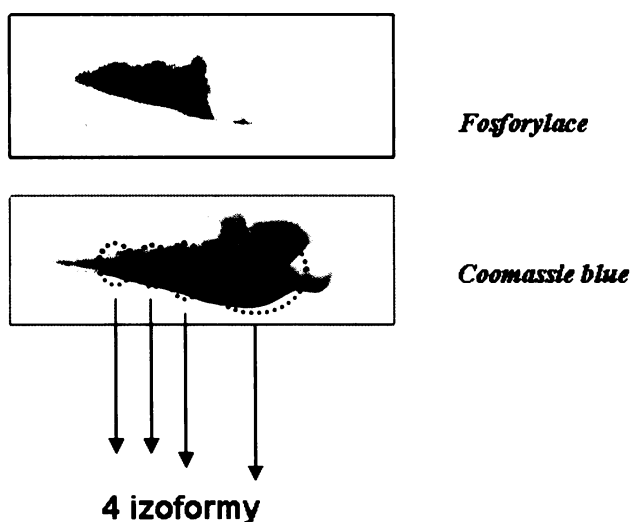
Obr. 5–5. c: Vliv času na *in vitro* fosforylaci RpoA pomocí StkP:

1) 1 min; 2) 15 min; 3) 30 min; 4) 60 min; podtržené číslice udávají intenzitu fosforylace v procentech

5.3 Identifikace fosforylačních míst a podjednotky RNAP

Určit, na kterých aminokyselinových zbytcích je α podjednotka RNA-polymerasy fosforylována je nezbytné k pochopení funkce modifikace v průběhu regulace transkripce. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli separovat fosforylované izoformy proteinu RpoA na dvourozměrné elektroforéze (2D SDS-PAGE).

Díky dvourozměrné elektroforéze jsme identifikovali čtyři odlišné izoformy α podjednotky RNAP, z nichž celkem tři byly fosforylované (obr. 5–6). Odlišné izoformy jsme izolovali a nechali analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie. Aminokyselinové zbytky, na kterých k fosforylaci dochází, se zatím nepodařilo identifikovat.



Obr. 5–6.: Izoformy RpoA oddělené pomocí 2D SDS-PAGE:

šipky označují jednotlivé izoformy

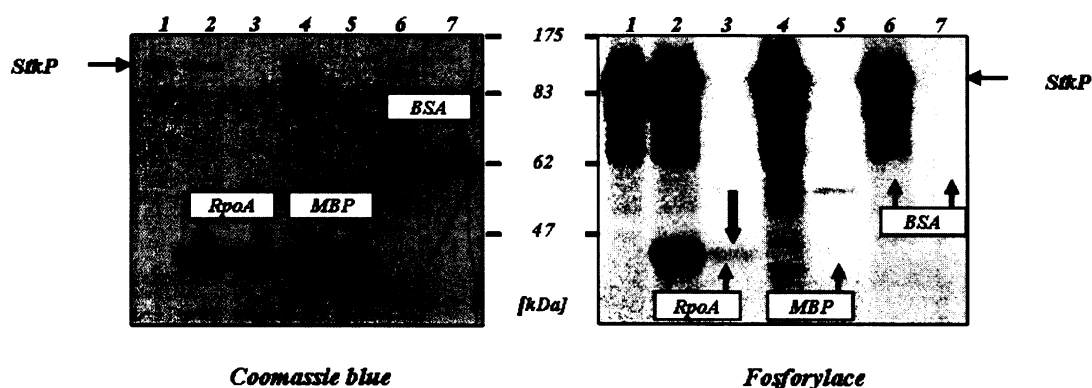
5.4 Substrátová specifita StkP

Samotný fakt, že je testovaný protein v přítomnosti kinasy fosforylován ještě nutně neznamená, že je jejím substrátem. O substrátové specifitě kinasy k příslušnému proteinu můžeme mluvit až za předpokladu, že daný protein: (i) je kinasou fosforylován více než protein, který není běžně fosforylován (př. BSA, 66 kDa); (ii) je kinasou fosforylován více nebo stejně jako univerzální substrát (př. MBP, 44 kDa) (PECK 2006).

Abychom dokázali substrátovou specifitu proteinkinasy StkP k α podjednotce RNAP, využili jsme výše zmíněných zásad a použili jsme při testování *in vitro* fosforylací protein BSA jako negativní kontrolu a obecný substrát MBP jako pozitivní kontrolu (obr. 5–7).

Zjistili jsme, že při stejných reakčních podmínkách je intenzita fosforylace nejvýznamnější u RpoA v přítomnosti StkP, zatímco u proteinu BSA a MBP není fosforylace žádná nebo velmi malá (obr. 5–7).

Zároveň jsme si povšimli fosforylace, ke které překvapivě dochází ve vzorku, kde je přítomný samotný protein RpoA (viz červená šipka na obr. 5–7).



Obr. 5–7.: Substrátová specifita:

1) StkP (98,2 kDa); 2) StkP + RpoA; 3) RpoA (34,2 kDa); 4) StkP + MBP; 5) MBP (42,5 kDa); 6) StkP + BSA; 7) BSA (66 kDa); červená šipka označuje fosforylaci na RpoA

5.5 Nespecifická fosforylace RpoA

Pozorovaná nespecifická fosforylace (obr. 5–7, červená šipka) je výrazně slabší než specifická fosforylace RpoA, ke které s vysokou účinností dochází za přítomnosti StkP. Přesto jsme se chtěli pokusit určit, jaký podíl pozorované fosforylace může být způsoben fosforylací nespecifickou a za jakých podmínek, popřípadě z jakých důvodů k ní dochází.

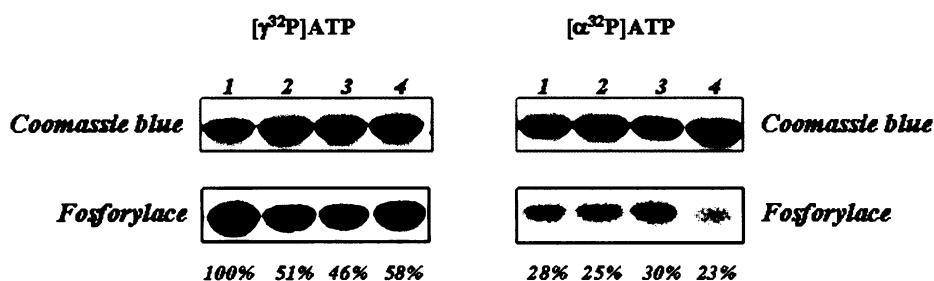
Vycházeli jsme z úvahy, že pozorovaná nespecifická fosforylace může být důsledkem: (i) enzymatické fosforylace způsobené kopurifikovaným proteinem; (ii) autofosforylace; (iii) chemické reakce.

5.5.1 *In vitro* kinázová reakce v přítomnosti [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP a [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP

Z těchto důvodů jsme se rozhodli provést fosforylaci proteinu RpoA za použití [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP a [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP.

Vycházeli jsme ze skutečnosti, že v případě [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP je radioaktivně značená první (α) fosfátová skupina, která se výměny fosfátů během enzymatické fosforylace neúčastní. V případě [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP je radioaktivně značena třetí (γ) fosfátová skupina, která je v průběhu enzymatické fosforylace předávána z ATP na proteinkinasu a z ní následně na substrát. Pokud by se projevila fosforylace RpoA při použití [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP, jednalo by se o nescifickou chemickou vazbu. Zatímco kdyby se projevila fosforylace při použití [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP, mohli bychom fosforylaci označit jako enzymatickou. V průběhu tohoto pokusu jsme použili různé podmínky kinázové reakce (měnili jsme koncentraci iontů), abychom blíže určili, kdy k nescifické fosforylaci dochází (obr. 5–8).

Jak je vidět na obr. 5–8, při použití [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP jsme pozorovali silný signál, který naznačil, že by se mohlo jednat o enzymatickou fosforylaci. Zároveň jsme však zjistili, že se slabý signál objevil i ve vzorcích s [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP, z čehož vyplývá, že pozorovaná fosforylace je výsledkem chemické reakce či nescifické vazby ATP.



Obr. 5–8.: Fosforylace RpoA pomocí [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP a [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP :

Ve všech vzorcích je RpoA (4 μg): 1) + Mn²⁺; 2) bez Mn²⁺; 3) + Mg²⁺; 4) bez iontů; podtržené číslice udávají intenzitu fosforylace v procentech

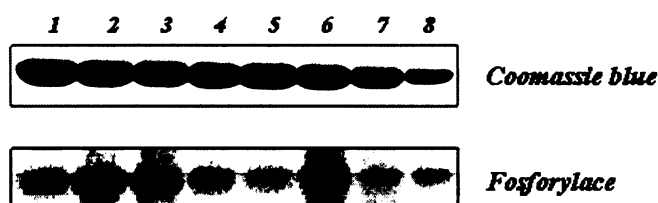
5.5.2 Fosforylace denaturovaného proteinu RpoA

Jelikož předchozí pokus nevyločil možnost nescifické chemické vazby [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP na RpoA, rozhodli jsme se protein RpoA denaturovat pomocí močoviny, zvýšené teploty a precipitací v trichloroctové kyselině. Fosforylaci jsme prováděli za různých testovacích podmínek (obr. 5–9).

Pokud by se jednalo o enzymatickou fosforylaci proteinu RpoA, neměla by se za denaturačních podmínek projevit. V případě nescifické chemické vazby by intenzita

fosforylace měla zůstat stejná, to znamená, že by se neměla lišit od intenzity fosforylace za běžných podmínek.

Zjistili jsme, že RpoA je v přítomnosti denaturačních činidel fosforylován, což ukazuje na nespecifickou chemickou vazbu ATP nebo fosfátové skupiny na protein RpoA. Fosforylace patrně nesouvisí s enzymatickou aktivitou proteinu RpoA či jiného kopurifikovaného proteinu (obr. 5–9).



Obr. 5–9.: Fosforylace denaturovaného proteinu RpoA:

1) kontrola s DTT; 2) kontrola bez DTT; 3) močovina; 4) 60° C; 5) 70° C; 6) 80° C; 7) 90° C; 8) precipitace v TCA

5.6 Příprava kmene *Streptococcus pneumoniae* pro izolaci proteinu RpoA

Vzhledem k tomu, že jsme všechny fosforylační reakce testovali na rekombinantním proteinu exprimovaném v *E. coli*, bylo naším dalším cílem pokusit se izolovat nativní protein RpoA přímo z mateřského organismu *S. pneumoniae*. Bylo dokázáno, že z kultury *S. pneumoniae* lze izolovat RNA-polymerasu pomocí histidinové kotvy na jedné z podjednotek tohoto vícepodjednotkového enzymu (LUO a MORRISON 2003).

U nativního proteinu jsme chtěli zjistit, zda *in vitro* fosforylace RpoA pomocí proteinkinasy StkP probíhá stejně jako u proteinu rekombinantního a potvrdit nebo vyvrátit, že protein RpoA v komplexu RNAP funguje jako substrát kinasy StkP. Dále jsme chtěli RpoA izolovaný za nativních podmínek podrobit analýze míst fosforylace, která může být odlišná od rekombinantního proteinu RpoA.

Proto jsme se rozhodli vložit sekvenci kódující histidinovou kotvu za ATG startovací kodón genu *rpoA* pomocí homologní rekombinace, tak aby se exprimoval protein s histidinovou kotvou (10x His), který bychom mohli následně izolovat pomocí afinitní chromatografie. Aby byl zásah do chromozomální DNA mateřského organismu co nejšetrnější, nespojili jsme vložení sekvence kódující histidinovou kotvu s přítomností selekčního znaku. Gen *rpoA* se nachází uvnitř operonu spr0210 – spr0216 a proto by vložení genu pro antibiotickou rezistenci mohlo interferovat s expresí sousedních genů.

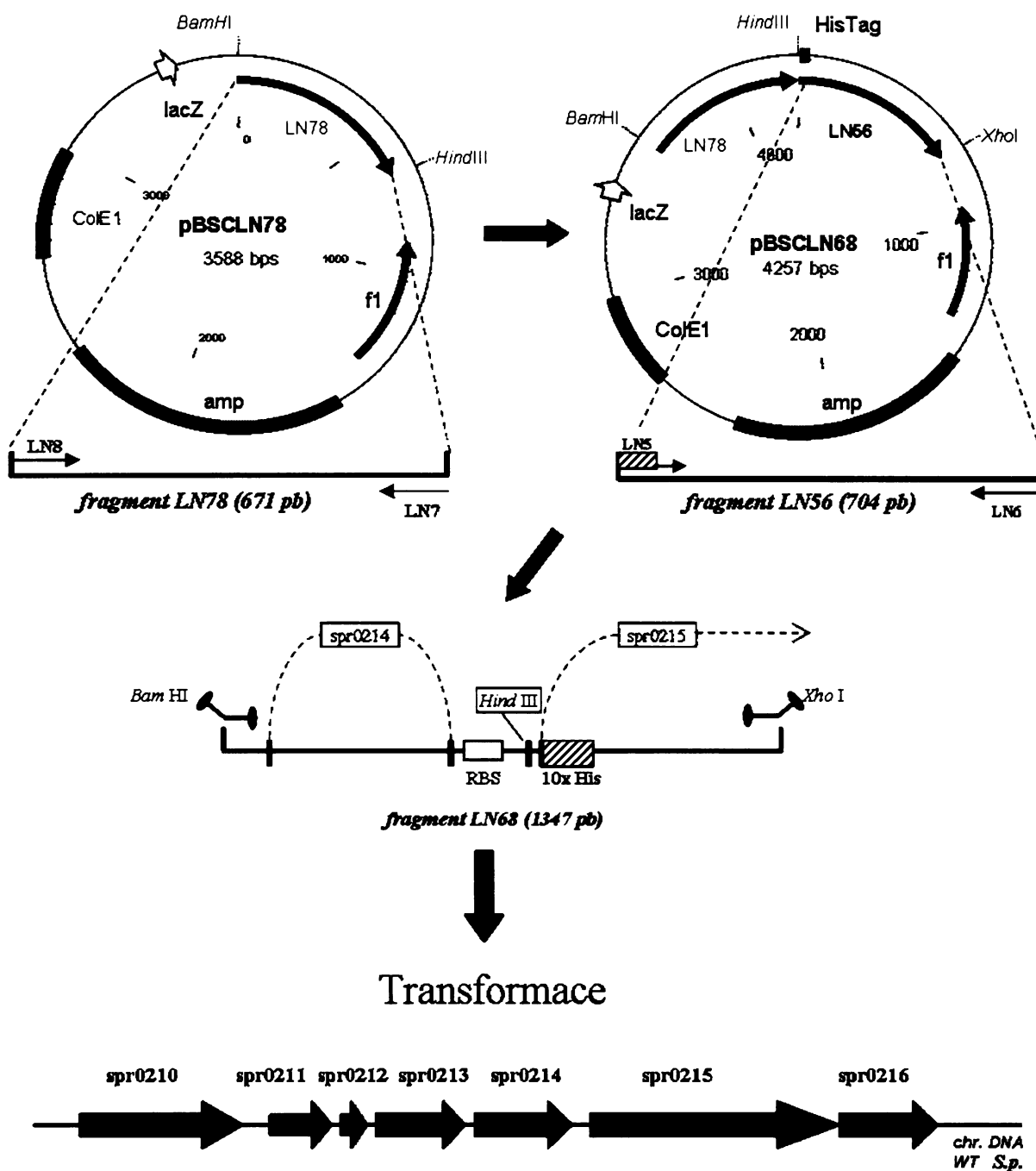
Pozitivní klony jsme chtěli hledat pomocí PCR se specifickými oligonukleotidy. Tato strategie byla v naší laboratoři dříve úspěšně použita (SASKOVA *et al.* 2007).

5.6.1 Příprava kmene *S. pneumoniae* exprimujícího RpoA s histidinovou kotvou

Pro přípravu vektoru jsme syntetizovali 671 pb dlouhý úsek předcházející lokusu spr0215 pomocí oligonukleotidů LN8 a LN7 (obr. 5–10). Oligonukleotid LN7 nám umožnil do amplifikovaného fragmentu začlenit *Hind*III restrikční místo. Získaný fragment jsme nazvali LN78. Fragment LN78 jsme prostřednictvím *Bam*HI a *Hind*III restrikčních míst vložili do plazmidu pBluescript II KS⁻. Vzniklý vektor jsme nazvali pBSCLN78 (obr. 5–10) a transformovali jej do *E. coli* JM109. Pozitivní kolonie jsme seletovali na miskách s IPTG a XGal na základě tzv. modrobílé selekce a testovali pomocí PCR.

Dále jsme amplifikovali fragment dlouhý 704 pb pokrývající lokus spr0215 pomocí oligonukleotidů LN6 a LN5 (obr. 5–10). Oligonukleotid LN5 nám umožnil vložit sekvenci kódující histidinovou kotvu (10x His) a *Hind*III restrikční místo do amplifikovaného fragmentu, který jsme nazvali LN56 (obr. 5–10). Fragment LN56 jsme poté vložili prostřednictvím *Xho*I a *Hind*III restrikčních míst do vektoru pBSCLN78 a vzniklý produkt jsme pojmenovali pBSCLN68 (obr. 5–10).

Vektor pBSCLN68 jsme transformovali do kompetentních buněk *E. coli* JM109 a správné vložení úseku LN68 jsme testovali pomocí PCR na plazmidové DNA. Správnost sekvence jsme ověřili sekvenováním. Výsledný vektor pBSCLN68 jsme štěpili pomocí restrikčních enzymů *Bam*HI a *Xho*I a následně izolovali fragment LN68.



Obr. 5–10.: Schéma přípravy fragmentů a vektorů:

amp: ampicilinová rezistence; **lacZ:** laktamasa; **f1:** počátek replikace; červeně vložené fragmenty a příslušná restrikční místa; šipky označují použité oligonukleotidy; šrafované His sekvence; **RBS:** ribozom vazebné místo; **spr** označují čísla genů; zelené plné šipky značí umístění genu v operonu

Fragmentem LN68 jsme poté transformovali *Streptococcus pneumoniae* Cp1015. Pozitivní klony jsme hledali pomocí PCR na koloniích za použití oligonukleotidů komplementárních k sekvenci kódující histidinovou kotvu. Celkem jsme testovali 400 kolonií *S. pneumoniae*. Mezi nimi se nám podařilo identifikovat 4 pozitivní kolonie

s vloženou sekvencí kódující histidinovou kotvu. Jakmile jsme však z těchto kolonií vyizolovali chromozomální DNA, zjistili jsme, že neobsahuje specifickou sekvenci kódující histidinovou kotvu. Tuto skutečnost si vysvětlujeme tím, že *Streptococcus pneumoniae* vyrůstá především ve dvojicích koků, které však nemusí mít shodný genotyp, a proto růst pozitivního klonu může být potlačen růstem klonu nesoucího genotyp původního divokého kmene.

5.6.2 Příprava kmene *S. pneumoniae* RpoA(His) se selekčním znakem

Protože se nám předchozí metoda neosvědčila, rozhodli jsme se vložení sekvence kódující histidinovou kotvu spojit s vložení antibiotické kazety, což by nám usnadnilo následnou selekci pozitivních kolonií.

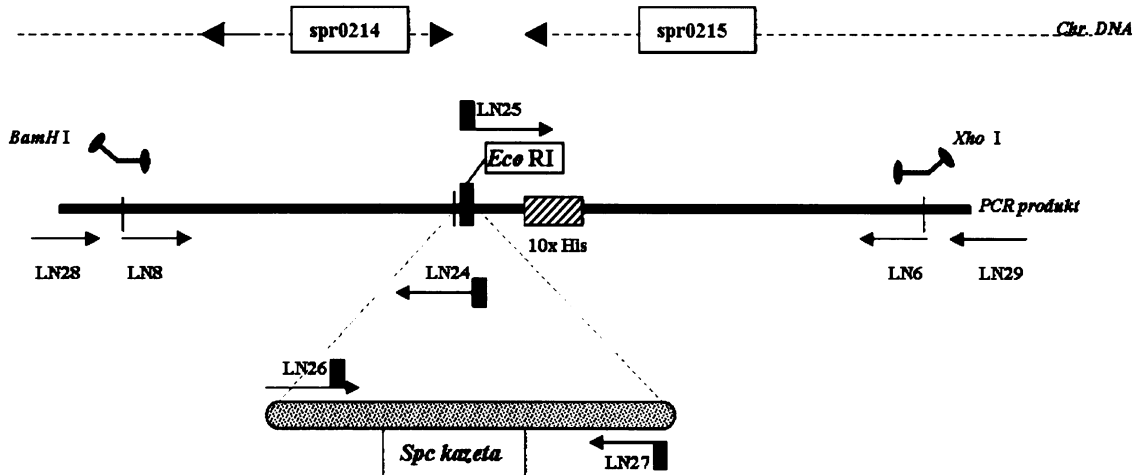
Z těchto důvodů jsme spojili vložení sekvence kódující histidinovou kotvu přes nově zavedené *EcoRI* místo mezi geny spr0214 a spr0215 s vložení spektinomycinové kazety (s vlastním promotorem, stop kodónem a bez terminátoru)(obr. 5–11). Použili jsme spektinomycinovou kazetu bez terminátoru, abychom operon nepřerušili a vyhnuli se negativní interferenci při expresi proteinu RpoA.

Nejprve jsme syntetizovali úsek spr0214 pomocí oligonukleotidů LN8 a LN24. Jako templát jsme použili plazmidovou DNA z pBSCLN68. Oligonukleotid LN24 nám umožnil do výsledného fragmentu začlenit *EcoRI* restrikční místo (obr. 5–11) mezi geny spr0214 a spr0215 před ribozom vazebné místo genu spr0215. Amplifikovaný fragment jsme klonovali do plazmidu pBluescript II KS⁻ prostřednictvím restrikčních míst *Bam*HI a *Eco*RI, vzniklý vektor jsme nazvali pLN824.

Dále jsme amplifikovali úsek spr0215 pomocí oligonukleotidů LN25 a LN6, který jsme prostřednictvím restrikčních míst *Eco*RI a *Xho*I vložili do plazmidu pLN824. Nově vzniklý vektor jsme nazvali pLN68Eco. Nakonec jsme amplifikovali spektinomycinovou kazetu (840pb) jako templát jsme použili plazmidovou DNA z pR414, která nese spektinomycinovou kazetu (LUO *et al.* 2003). Antibiotickou kazetu jsme prostřednictvím *Eco*RI místa vložili do pLN68Eco. Vektorem pLN68Eco jsme transformovali kompetentní buňky *E. coli* JM109, pozitivní kolonie jsme ověřili pomocí PCR.

Z pozitivních klonů jsme izolovali plazmidovou DNA, kterou jsme štěpili restrikcemi *Bam*HI a *Xho*I, čímž jsme získali fragment nesoucí (i) úsek spr0214, (ii) spektinomycinovou kazetu, (iii) sekvenci kódující histidinovou kotvu a (iv) gen *rpoA*. Získaný fragment jsme pojmenovali LN68/Eco/Spc.

Fragmentem LN68/Eco/Spc jsme transformovali *S. pneumoniae* Cp1015, pozitivní kolonie jsme selektovali na spektinomycinu. Chromozomální DNA ze dvou různých pozitivních klonů jsme retransformovali *S. pneumoniae*. Získané klony (celkem 6) jsme testovali pomocí PCR (obr. 5–11). Získaný kmen jsme nazvali *S. pneumoniae* RpoA(His).



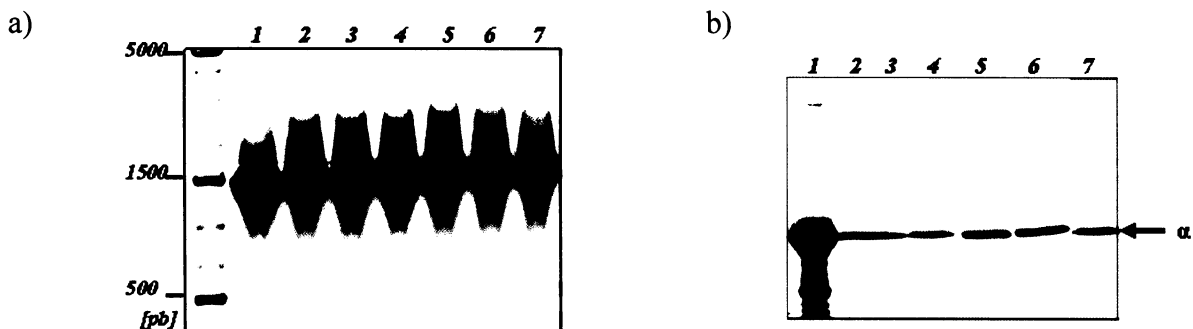
Obr. 5–11.: Schéma vložení sekvence kódující histidinovou kotvu spolu s spc kazetou: Červený obdélník označuje vložené *EcoRI* restrikční místo; šrafovaný obdélník označuje His sekvenci; modrou barvou jsou vyznačena použitá restrikční místa; plné šipky označují oligonukleotidy; světle zeleně spektinomycinová kazeta

K ověření klonů pomocí PCR jsme použili oligonukleotidy LN28 a LN29, které leží mimo rekombinační oblast a pokrývají úseky spr0214 a spr0215, spektinomycinovou kazetu a sekvenci kódující histidinovou kotvu. Amplifikovaný produkt má 1500 pb u divokého typu a 2650 pb u *S. p.* RpoA(His). Na kontrolní PCR se ukázalo, že všechny produkty dosahují velikosti předpokládané pro divoký typ (obr. 5–12a).

Proto jsme použili další sadu oligonukleotidů (obr. 5–13), abychom zjistili jak rekombinovaný úsek na chromozomální DNA *S. p.* RpoA(His) vypadá. Díky druhé kontrolní PCR jsme zjistili, že se sekvence kódující histidinovou kotvu vložila na předpokládané místo (tj. mezi úseky spr0214 a spr0215), avšak spektinomycinová kazeta se vložila na neznámé místo chromozomu (obr. 5–13).

U všech 6 testovaných klonů se vyskytovala sekvence kódující histidinovou kotvu na 5'konci genu *rpoA* a Spc kazeta na jiném neznámém místě (obr. 5–13). Vložení sekvence kódující histidinovou kotvu jsme ověřili imunodetekcí pomocí monoklonální protilátky proti histidinové kotvě (obr. 5–12b). Na základě těchto výsledků jsme došli k závěru, že antibiotiková kazeta vložená před gen *rpoA* negativně interferuje s expresí tohoto esenciálního genu. Proto podléhá selekčnímu tlaku a vyštěpuje se z původního místa na

chromozomu a vkládá se do jiného rekombinačního místa. Vliv této genetické změny na fenotypový projev kmene je nepředvídatelný.



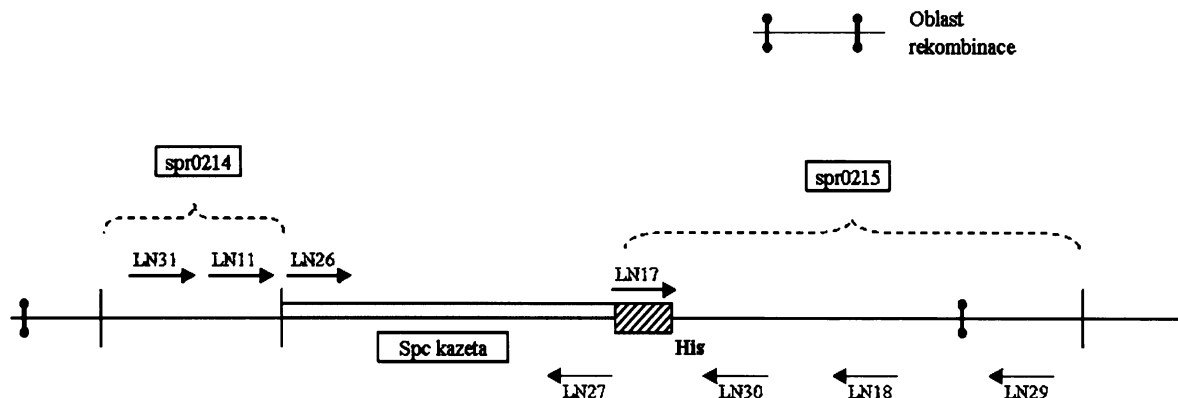
Obr. 5–12.: Ověření vložení His kotvy

a) Kontrolní PCR na chromozomální DNA WT a RpoA(His) kmene:

1) chromozomální DNA WT; 2–7) jednotlivé klony RpoA(His)

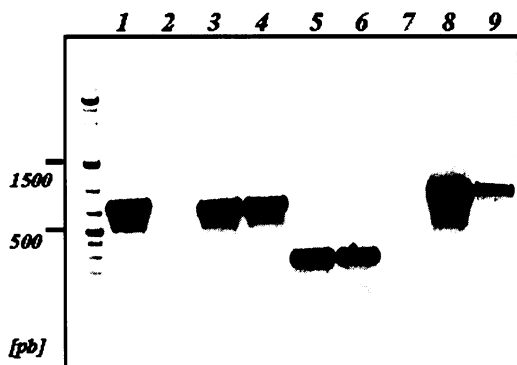
b) Imunodetekce:

1) rekombinantní RpoA s histidinovou kotvou (4 µg); 2-7) jednotlivé klony RpoA(His)



Obr. 5–13. a) Schéma předpokládané chromozomální DNA kmene RpoA(His):

Spc kazeta: spektinomycinová kazeta; šrafovaně His sekvence; šipky označují použité oligonukleotidy; červeně ohraničená rekombinační oblast



předpokládaná velikost fragmentů (pb):

	WT	RpoA(His)
LN29+17	0	800
LN11+18	752	1572
LN30+31	272	1094
LN26+27	0	840

Obr.5-13. b: Kontrolní PCR na chr. DNA WT a RpoA(His):

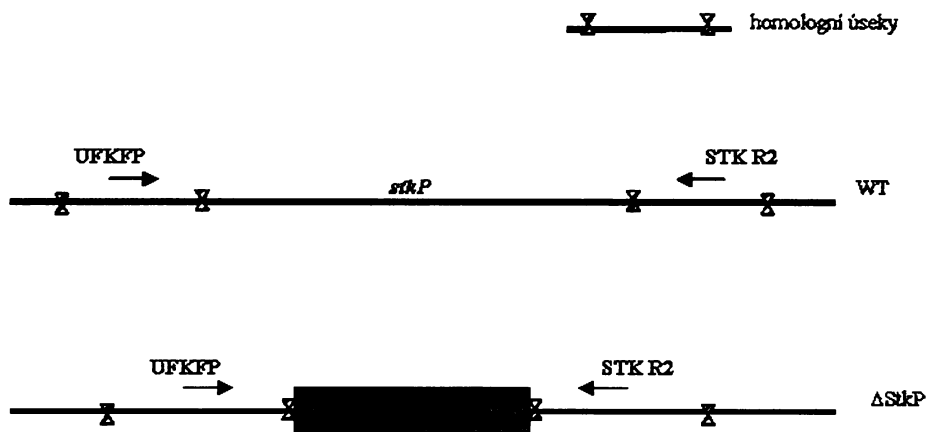
1)RpoA(His): LN29+LN17; 2)WT: LN29+LN17; 3)RpoA(His): LN11+LN18; 4)WT: LN11+LN18;
 5)RpoA(His):LN30+LN31; 6)WT: LN30+LN31; 7) WT: LN26+LN27; 8)pR414 - vektor nesoucí Spc kazetu:
 LN26+LN27; 9)RpoA(His): LN26+LN27

5.7 Příprava RpoA(His) kmene s inaktivovaným genem *stkP*

Další možností jak dokázat, že je daný protein substrátem příslušné kinasy je provést cílenou inaktivaci v genu kódujícím kinasu a porovnat rozdíly mezi fosforylací RNAP izolované z kmene s funkční StkP a RNAP izolované z kmene s inaktivní StkP.

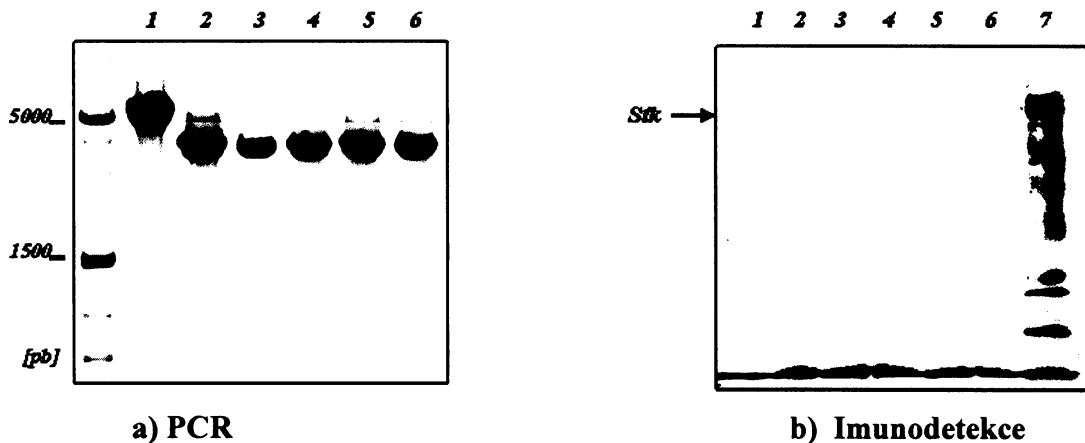
S tímto záměrem jsme se rozhodli inaktivovat gen pro StkP v kmeni *S. pneumoniae* RpoA(His) homologní rekombinací pomocí plazmidu AkCmDk, který nese chloramfenikolovou rezistenci (SASKOVA 2007). Na základě homologní rekombinace se gen pro proteinkinasu StkP vymění za chloramfenikolovou kazetu z vektoru AkCmDk a tím je v daném kmeni gen pro proteinkinasu StkP inaktivován (obr. 5–14).

Buňky kmene *S. pneumoniae* RpoA(His) jsme transformovali vektorem AkCmDK a pozitivní kolonie selektovali na miskách s chloramfenikolem. Získaný kmen jsme pojmenovali *S. pneumoniae* RpoA(His) Δ *stkP*. Inaktivaci proteinkinasy StkP jsme ověřili pomocí PCR a imunodetekce (obr. 5–15). V kontrolní PCR jsme využili oligonukleotidů UFKFP (NOVAKOVA *et al.* 2005) a StkP-R2 (PALLOVA 2003). U divokého kmene jsme očekávali amplifikovaný fragment o velikosti 4700 pb u mutantního kmene fragment o velikosti 3800 pb (obr. 5–15 a). Pomocí PCR (obr. 5–15 a) a imunodetekce (obr. 5–15 b) jsme dokázali, že v kmeni *S. pneumoniae* RpoA(His) Δ *stkP* byl gen pro StkP inaktivován.



Obr. 5–14.: Schéma inaktivace proteinkinasy StkP:

Plné černé šipky označují oligonukleotidy; Cm kazeta: chloramfenikolová kazeta.



Obr. 5–15.: Ověření inaktivace proteinkinasy StkP:

a) pomocí PCR

1) *S. pneumoniae* WT: očekávaná velikost 4700 pb; 2) *S. pneumoniae* Δ stkP: očekávaná velikost 3800 pb; 3-6) *S. pneumoniae* RpoA(His) Δ stkP klony očekávaná velikost 3800 pb; použité oligonukleotidy: UFKFP a STK 2R;11

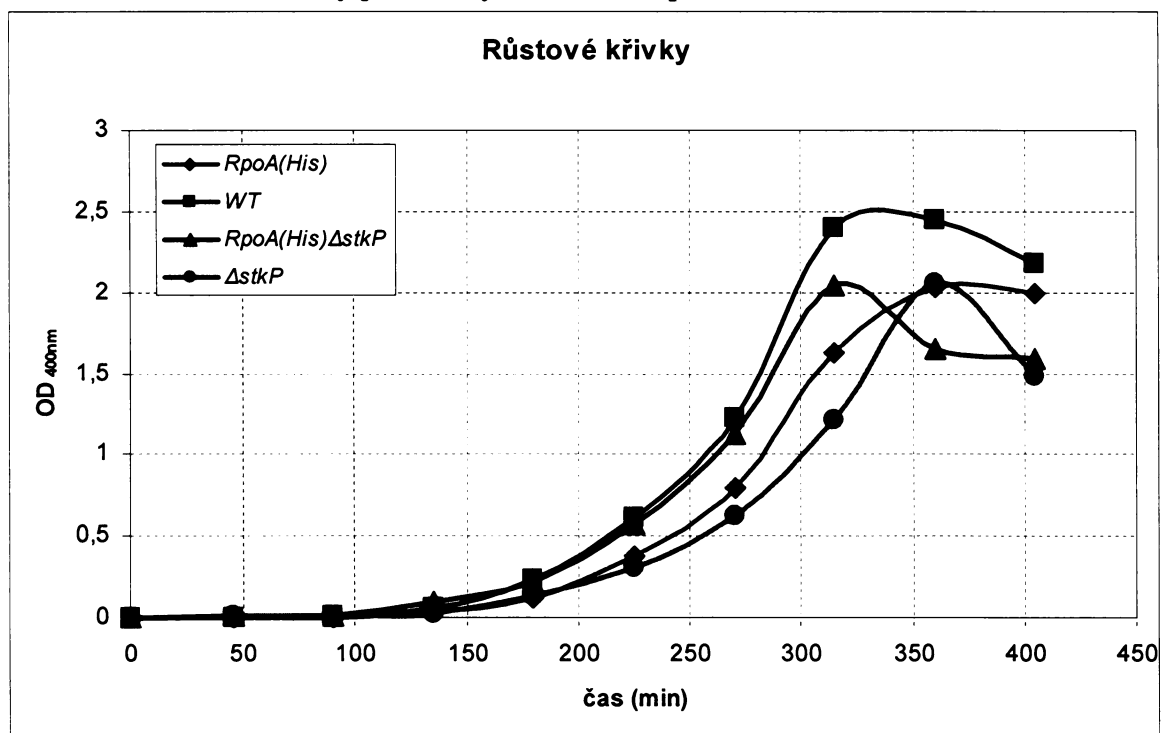
b) pomocí imunodetekce

Použitá protilátka detekuje přítomnost proteinu StkP; 1) *S. pneumoniae* WT: celkový lyzát; 2) *S. pneumoniae* Δ stkP: celkový lyzát; 3-6) jednotlivé klony *S. pneumoniae* RpoA(His) Δ stkP: celkový lyzát; 7) *E. coli* RpoA(His): celkový lyzát

Dále jsme testovali růstové charakteristiky obou kmenů *S. pneumoniae* RpoA(His) a *S. pneumoniae* RpoA(His) Δ stkP. Zjistili jsme, že ani u jednoho kmene růstová křivka neodpovídá předpokládaným růstovým projevům (graf 4–1). U kmene *S. pneumoniae* RpoA(His) je růstová rychlost nižší než u divokého kmene. U kmene *S. pneumoniae* RpoA(His) Δ stkP je naopak růstová rychlost kmene stejná jako u kmene divokého, což neodpovídá dříve popsané růstové rychlosti kmene *S. pneumoniae* Δ stkP (LUO a

MORRISON 2003, SASKOVA *et al.* 2007). Předpokládáme, že tyto odlišné růstové charakteristiky obou kmenů jsou výsledkem neočekávaných genetických změn, ke kterým došlo v důsledku přeskupení spektinomycinové kazety a vložení sekvence kódující histidinovou kotvu. Tyto pokusy prokázaly, že je fenotypový projev obou kmenů významně ovlivněn a proto tyto kmeny nelze pro další experimenty využít.

Graf 4–1.: Růstové křivky jednotlivých kmenů *S. pneumoniae*:

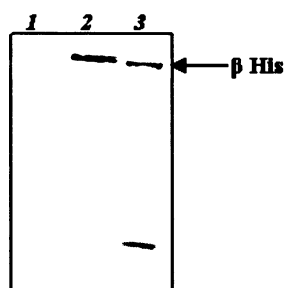


červeně kmen *S. pneumoniae* *RpoA(His)*; černě kontrolní kmen *S. pneumoniae* WT; modře kmen *S. pneumoniae* *RpoA(His)ΔstkP*; zeleně *S. pneumoniae* *ΔstkP*

5.8 Příprava kmene *Streptococcus pneumoniae* RpoC(His)

Vzhledem k tomu, že se nám zatím nepodařilo získat použitelný kmen pro izolaci nativního proteinu RpoA, rozhodli jsme se pro izolaci RNAP použít jinou strategii. Jak bylo zmíněno výše, podařilo se kolektivu Morrison *et al.* úspěšně izolovat RNAP pomocí afinitní chromatografie prostřednictvím kotvy na β' podjednotce RNAP. Tato genetická modifikace neměla na fenotypový projev kmene žádný patrný vliv. Proto jsme autory článku požádali o zaslání chromozomální DNA z kmene *S. pneumoniae* CPM1, který nese sekvenci kódující histidinovou kotvu na 3' konci genu *rpoC* a chloramfenikolovou rezistenci. Za použití této DNA pro transformaci *S. pneumoniae* WT se nám podařilo získat kmen *S. pneumoniae* RpoC(His) použitelný pro izolaci nativní RNAP pomocí afinitní chromatografie. Expresi proteinu RpoC s histidinovou kotvou na C-konci jsme ověřili pomocí imunodetekce (obr. 5–16).

Vzhledem k tomu, že v tomto kmeni je histidinová kotva na β' podjednotce RNAP, je pro nás výhodnější než kmene předchozí, protože α podjednotka zůstává v tomto kmeni v nezměněné podobě. Nevýhodou tohoto kmene je, že nese jako selekční znak chloramfenikolovou kazetu, tedy stejnou rezistenci, kterou používáme pro inaktivaci StkP.

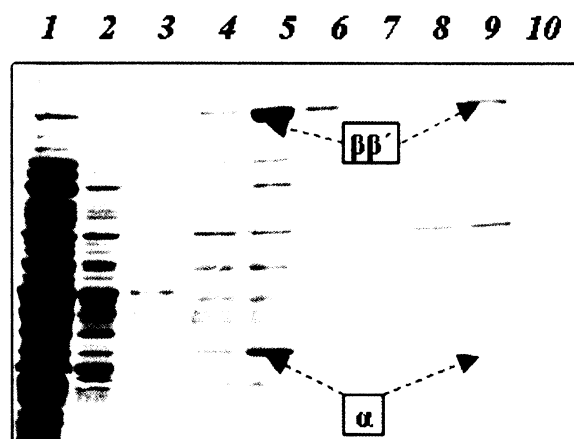


Obr. 5–16.: Imunodetekce His sekvence v kmeni *S. pneumoniae* RpoC(His):

Použitá protilátka detekuje přítomnost histidinové kotvy; 1) WT: celkový lyzát; 2) RpoC(His) *S. pneumoniae*: rozpustná frakce; 3) *S. pneumoniae* RpoC(His): celkový lyzát

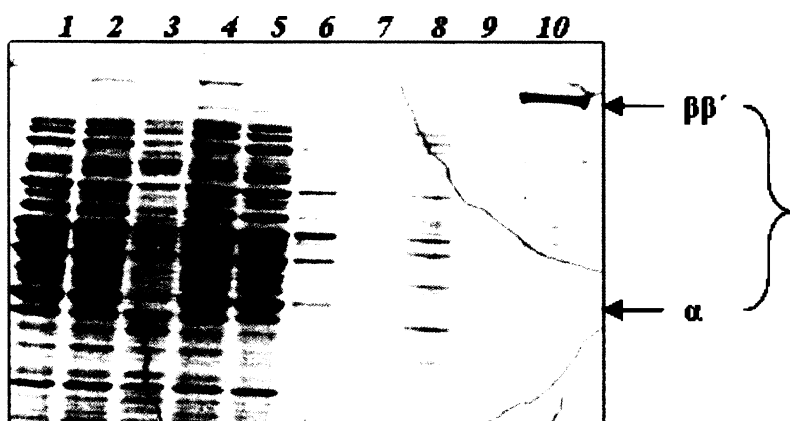
5.9 Izolace a fosforylace RNAP-His ze *Streptococcus pneumoniae*

Všechny tři kmene s histidinovou kotvou na α respektive β' podjednotce jsme použili pro izolaci RNA-polymerasy podle postupu popsaného v (LUO a MORRISON 2003). Ve všech třech případech jsme RNAP izolovali z rozpustné frakce pomocí afinitní chromatografie (obr. 5–17 a-b). V eluční frakci ze všech tří kmenů jsme zaznamenali dobře viditelné podjednotky α a $\beta\beta'$ vytvářející komplex RNAP a celou řadu dalších kopurifikovaných proteinů, kterou se nám bez porušení komplexu RNAP nepodařilo odstranit.



Obr. 5–17. a: Expresse a izolace RNAP z kmenů *S. pneumoniae* RpoA(His) a *S. pneumoniae* RpoA(His)ΔstkP:

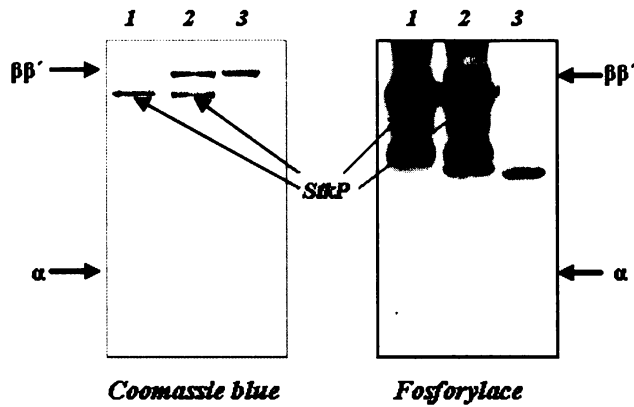
1) RpoA(His): celkový lyzát; 2) RpoA(His)ΔstkP: celk. lyzát; 3) RpoA(His) rozpustná frakce; 4) RpoA(His)ΔstkP rozpustná frakce; 5–7) RpoA(His): eluovaná frakce 1, 2, 3; 8–10) RpoA(His)ΔstkP: eluovaná frakce 1, 2, 3.



Obr. 5–17. b: Expresse a izolace RNAP z kmene *S. pneumoniae* RpoC(His):

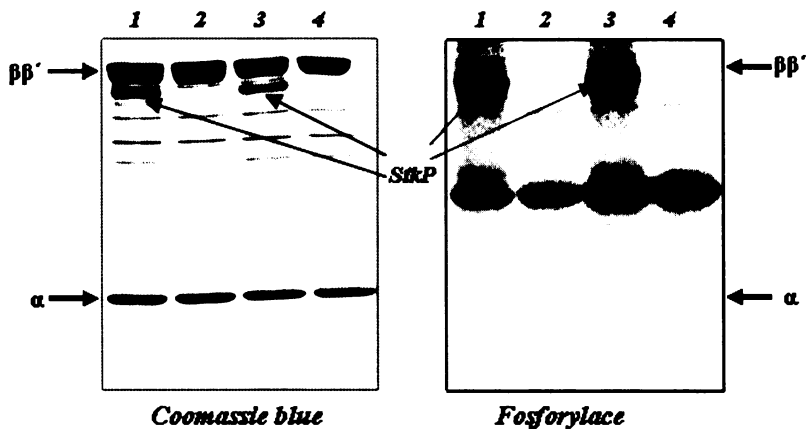
1) celkový lyzát; 2) celk. lyzát po stočení nerozbitých buněk; 3) nenávané proteiny; 4) rozpustná frakce; 5–7) promytí 1, 2, 3; 8–10) eluovaná frakce

Izolované RNAP jsme použili ve standardní kinázové reakci s proteinkinásou StkP a bez proteinkinasy, abychom mohli zaznamenat případnou nespécifickou fosforylací. Fosforylace nativního proteinu RpoA v komplexu RNAP se v žádném ze vzorků neprojevila (obr. 5–18).



Obr. 5–18.: Fosforylace komplexu RNAP:

a) Izolace z *S. pneumoniae* RpoC(His):
1) StkP; 2) StkP+ RNAP; 3) RNAP



Obr. 5–18.: Fosforylace komplexu RNAP:

b) Izolace z *S. pneumoniae* RpoA(His) a z *S. pneumoniae* RpoA(His) Δ stkP:
S. pneumoniae RpoA(His) Δ stkP: 1) RNAP+ StkP; 2) RNAP; *S. pneumoniae* RpoA(His): 3) RNAP+ StkP; 4) RNAP

6 DISKUZE

α podjednotka RNA-polymerasy *S. pneumoniae* jako substrát proteinkinasy StkP

Tato práce se zabývá studiem vztahu proteinkinasy StkP a α podjednotky RNA polymerasy patogenní bakterie *Streptococcus pneumoniae*. V genomu *S. pneumoniae* byla identifikována jediná Ser/Thr proteinkinasa eukaryotního typu StkP. V sousedství genu *stkP* se nachází gen *phpP*, který kóduje Ser/Thr proteinfosfatasu eukaryotního typu. Inaktivace *stkP* v nevirulentních kmenech *S. pneumoniae* způsobuje předčasnou buněčnou lyzi a výrazné snížení schopnosti kompetence pro následnou genetickou transformaci. Ve virulentních kmenech *S. pneumoniae* se inaktivace *stkP* projevuje snížením virulence (ECHENIQUE *et al.* 2004). StkP je membránový protein schopný autofosforylace, jehož aktivita je *in vitro* stimulována manganatými a hořečnatými ionty a inhibována staurosporinem (NOVAKOVA *et al.* 2005). Proteinfosfataza PhpP je schopna katalyzovat defosforylaci autofosforylované kinasy StkP *in vitro*. Proteinkinasa StkP obsahuje ve své C-terminální části 4 PASTA domény (z angl. Penicilin biding proteins and Ser/Thr kinase associated domains), které pravděpodobně váží volné konce peptidoglykanu v buněčné stěně (YEATS *et al.* 2002). StkP zřejmě hraje roli v biosyntéze buněčné stěny a je nezbytná pro udržení její integrity ve stresových podmínkách (NOVAKOVA 2004). Proteinkinasa StkP působí v bakteriální buňce jako globální regulátor genové exprese, jelikož se účastní regulace exprese nejméně 4% genů z genomu *S. pneumoniae* (SASKOVA *et al.* 2007). Porovnáním fosfoproteomických map kmene *S. pneumoniae* Cp1015 a *S. pneumoniae* Δ *stkP* byly identifikovány *in vivo* dva potenciální substráty proteinkinasy StkP: fosfoglukosaminmutasa (GlmM) a α podjednotka RNAP (RpoA) (NOVAKOVA *et al.* 2005). Bylo dokázáno, že GlmM, která se účastní biosyntézy komponent buněčné stěny, je *in vitro* fosforylována prostřednictvím StkP (NOVAKOVA *et al.* 2005).

Snížení genové exprese vlivem inaktivace genu *stkP* bylo zaznamenáno u několika skupin genů (SASKOVA *et al.* 2007). (i) Geny, které kódují proteiny účastnící se **regulace biosyntézy buněčné stěny**. (ii) Geny kódující proteiny, které se účastní **de novo biosyntézy pyrimidinů**. (iii) Některé geny, jejichž produkty se účastní **opravy DNA**. (iv) Geny kódující proteiny, které se účastní **transportu železa**. (v) Geny, které zprostředkovávají **rezistenci k oxidativnímu stresu**. (vi) Geny kódující proteiny s **neznámou nebo domnělou funkcí**. Do této skupiny patří například gen *spr1320*, který kóduje druhý pravděpodobný pneumokokový hemolysin, zodpovědný za β -hemolýzu (CANVIN *et al.* 1997).

Zvýšení genové exprese vlivem inaktivace genu *stkP* bylo zaznamenáno u těchto skupin genů (SASKOVA *et al.* 2007). (i) **Časné kompetenční geny**, tato skupina zahrnuje geny *comCDE*, *comAB*, *comX* a *comW*, které jsou klíčovou součástí kompetenční regulační kaskády, protože jsou nezbytně důležité k indukci kompetence. (ii) **Pozdní kompetenční geny** kódující proteiny, které se účastní příjmu DNA a procesu rekombinace. (iii) **Geny indukované pomocí CSP**, jejichž úloha v průběhu kompetence není přesně známá. (iv) Geny, jejichž produkty se účastní **metabolismu riboflavinu**. (v) Geny, které kódují proteiny jejichž funkce je domnělá nebo není přesně známá (SASKOVA *et al.* 2007).

Geny, jejichž exprese je prostřednictvím StkP nějakým způsobem ovlivněna, patří do různých regulonů a podléhají různým regulačním mechanismům. (i) **ComE závislé geny** neboli časné kompetenční geny jsou součástí operonů *comAB* a *comCDE*, zároveň zahrnují geny *comX* a *comW*. Operony *comAB* a *comCDE* kódují jednotlivé složky *quorum sensing* systému a jsou exprimovány na bazální úrovni i v nekompetentních buňkách. K jejich silné pozitivní regulaci dojde v odpovědi na peptidový signál ve formě CSP (PESTOVA *et al.* 1996), ((LEE a MORRISON 1999). Úlohu pozitivního transkripčního faktoru zde hraje regulační protein ComE, který se váže na přímá repetiční místa sousedící s promotory genů *comX* a *comW* a dvou výše zmíněných operonů, a proto se předpokládá, že zprostředkovává stimulaci jejich transkripce jako odpověď na peptidový signál (WEEN *et al.* 1999). Bylo zjištěno, že ComE-závislým genem je také *comX*, jehož produkt funguje jako alternativní sigma faktor, který způsobuje aktivaci transkripce tzv. pozdních kompetenčních genů (Lee and Morrison, 1999). V kmeni *S. pneumoniae* Δ *stkP* je hladina exprese genu kódujícího regulátor ComE silně zvýšená. (ii) **ComX (σ^X) závislé geny** neboli pozdní kompetenční geny mají ve svém promotoru konzervovanou sekvenci tzv. „cin-box“, která je rozeznávána RNA polymerasou asociovanou s alternativním transkripčním faktorem ComX (CAMPBELL *et al.* 1998, PESTOVA a MORRISON 1998). Mezi tyto geny patří například *cclA*, *coiA*, *dalA*, *cflAB*, *cinA*, *recA*, *celA* (LEE a MORRISON 1999). Jejich proteiny se účastní příjmu a rekombinace cizorodé DNA. Hladina exprese *comX* je v kmeni *S. pneumoniae* Δ *stkP* zvýšená. (iii) **VicR závislé geny**: do této skupiny patří geny *spr0096*, *spr0709*, *lytB* a *pcsB*. Analýzy genové exprese *S. pneumoniae* Δ *vicR* (NG *et al.* 2003) a *S. pneumoniae* Δ *stkP* (SASKOVA *et al.* 2007) ukázaly, že je hladina exprese genů *spr0096*, *spr0709*, *lytB* a *pcsB* v obou případech silně snížena. Regulátor VicR se váže do oblastí předcházejících těmto genům (NG *et al.* 2003) a jejich exprese je tak regulována pomocí dvousložkového systému VicR/K (často uváděný pod názvem MicAB nebo YycF/g). Fosforylace VicR snižuje schopnost vazby regulátoru s poznávací sekvencí těchto oblastí.

Je možné, že aktivita regulátoru VicR může být modulována pomocí proteinkinasy StkP (SASKOVA *et al.* 2007). Hladina exprese genu kódujícího regulační protein VicR není v kmeni *S. pneumoniae* Δ stkP nijak ovlivněna (SASKOVA *et al.* 2007). (iv) Geny, které jsou regulovány pomocí **mechanismu atenuace transkripce**: jedná se o geny kódující proteiny, které se účastní *de novo* biosyntézy pyrimidinů. U *B. subtilis* bylo dokázáno, že se regulace transkripce operonu *pyr* uskutečňuje pomocí atenuace transkripce. Regulační protein PyrR se váže na vysoce konzervované sekvence a sekundární struktury na mRNA a zabraňuje tvorbě antiterminační smyčky, čímž umožňuje zahájení terminace transkripce (SWITZER *et al.* 1999). Bylo zjištěno, že všechny geny regulonu PyrR *S. pneumoniae* obsahují vysoce konzervovanou sekvenci, která naznačuje, že mechanismus regulace genové exprese *pyr* genů (SASKOVA *et al.* 2007) by mohl u *S. pneumoniae* probíhat stejně jako u *B. subtilis*. Skutečnost, že je hladina genové exprese všech genů regulonu *pyr* (včetně genu *pyrR*) v kmeni *S. pneumoniae* Δ stkP silně snížena naznačuje, že tato supina genů podléhá dalšímu alternativnímu mechanismu regulace transkripce. (iv) Velká skupina **genů, o jejichž regulaci genové exprese nejsou žádné údaje**: vzhledem k tomu jaký regulační potenciál StkP má, musí existovat další nebo několik dalších regulačních proteinů, jejichž aktivitu StkP moduluje a tím kontroluje hladinu exprese dalších zmíněných genů. Eventualita, že by aktivita α podjednotky RNAP byla modifikována fosforylací pomocí proteinkinasy StkP, by znamenala, že právě α podjednotka RNAP je oním prostředníkem, který poskytuje proteinkinase StkP funkci globálního regulátoru genové exprese.

Podjednotka α RNAP *S. pneumoniae* je produktem genu *rpoA* a její molekulová hmotnost je 34,2 kDa. Podjednotka α má významnou regulační úlohu v průběhu iniciace transkripce (ROSS *et al.* 1993) a skládá se ze dvou nezávisle strukturovaných domén N-terminální (α NTD) a C-terminální (α CTD). α NTD odpovídá za poskládání α podjednotky a celé RNAP a za propojení se zbytkem RNA-polymerasy. α CTD má funkci regulační, svoji aktivitou zajišťuje průběh iniciace transkripce. α CTD váže řadu transkripčních faktorů (např. CAP, OxyR, GalR) (MURAKAMI *et al.* 1996) a DNA UP elementy (z angl. „Upstream element“) předcházející promotorové oblasti některých genů, což zvyšuje až dvojnásobně základní hladinu iniciace transkripce (ESTREM *et al.* 1999). Aminokyselinové (AK) zbytky α CTD, které jsou pro interakci s DNA zásadní, jsou mezi bakteriemi vysoce konzervované (obr. 6–1) (ESTREM *et al.* 1999). Mapování mutací α CTD *E. coli* odhalilo, že AK zbytky, které zajišťují CAP-dependentní transkripci, lze rozdělit do tří hlavních skupin (BENOFF *et al.* 2002) (obr. 6–1). (i) „Faktor 265“, který zahrnuje Arg265, Asn268, Asn294, Gly296, Lys298, Ser299, Glu302 a zajišťuje interakci

mezi α CTD a DNA, účastní se jak CAP-dependentní transkripce tak transkripce závislé na UP elementech (GAAL *et al.* 1996, MURAKAMI *et al.* 1996). (ii) „Faktor 261“, který zahrnuje Val257, Asp258, Asp259, Glu261 a není vyžadován pro interakci α CTD s DNA, ale účastní se jak CAP dependentní tak UP element dependentní transkripce (BUSBY a EBRIGHT 1999). (iii) „Faktor 287“, který je tvořen Thr285, Glu286, Val287, Glu288, Leu289, Gly315, Arg317, Leu318. Tento faktor není vyžadován pro interakci α CTD s DNA a neúčastní se UP element dependentní transkripce, proto se předpokládá, že zajišťuje protein-protein interakci mezi CAP a α CTD (SAVERY *et al.* 1998). Vzhledem k tomu jak jsou výše zmíněné AK zbytky významné pro CAP a UP element dependentní transkripci, dá se předpokládat, že některý z nich by mohl být cílovým místem fosforylace zprostředkované StkP. Modifikací jednoho nebo více AK zbytků by se mohla následně změnit vazebná schopnost celé α CTD k některým promotorovým oblastem. Modifikace jediného AK zbytku α CTD může mít na aktivitu celého komplexu RNAP rozsáhlý vliv. Například v průběhu T4 fágové infekce způsobí ADP ribozylace Arg265 pokles transkripce všech hostitelských genů a nárůst volné RNAP přístupné pro T4 transkripci (NECHAEV a SEVERINOV 2003)(více viz kap. 2.3.4).

Vzhledem k tomu, že StkP patří mezi Ser/Thr proteinkinasy, jsou pravděpodobnými cílovými místy fosforylace seriny a threoniny, kterých je v rámci α CTD *S. pneumoniae* celkem devět, pouze dva z nich (Ser260 a Ser293) jsou v rámci různých bakteriálních rodů vysoce konzervované (obr. 6–1).

analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie. Aminokyselinové zbytky, na kterých k fosforylaci dochází, se však zatím nepodařilo identifikovat.

V průběhu pokusů jsme zaregistrovali slabou nescifickou fosforylaci, ke které docházelo ve vzorku se samotným proteinem RpoA. Předpokládali jsme, že nescifická fosforylace může být důsledkem: (i) enzymatické fosforylace způsobené kopurifikovaným proteinem, (ii) autofosforylace RpoA, (iii) chemické reakce. Abychom rozlišili enzymatickou fosforylaci od chemické reakce, provedli jsme fosforylaci RpoA v přítomnosti [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP a [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP. Fosforylaci jsme pozorovali jak v přítomnosti [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP tak v přítomnosti [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP, nedalo se tedy určit, zda je pozorovaná nescifická fosforylace výsledkem chemické či enzymatické reakce. Proto jsme se rozhodli rekombinantní protein RpoA denaturovat. Zjistili jsme, že v denaturovaném stavu je protein RpoA fosforylován, což prokázalo, že pozorovaná nescifická fosforylace je důsledkem chemické vazby ATP nebo fosfátové skupiny na protein. Nevíme, o jakou chemickou vazbu se jedná a z jakých důvodů k ní dochází. Pozorovaná fosforylace však patrně nesouvisí s enzymatickou aktivitou proteinu RpoA či jiného kopurifikovaného proteinu.

Vzhledem k tomu, že všechny předchozí pokusy byly prováděny s rekombinantním proteinem RpoA exprimovaném v *E. coli*, bylo naším dalším cílem pokusit se izolovat nativní protein přímo z mateřského organismu *S. pneumoniae*. Bylo dokázáno, že z kultury *S. pneumoniae* je možné izolovat RNA-polymerasu pomocí histidinové kotvy na β' podjednotce tohoto enzymu (LUO a MORRISON 2003). U nativního proteinu RpoA jsme chtěli zjistit, zda *in vitro* fosforylace prostřednictvím proteinkinasy StkP probíhá stejně jako u rekombinantního proteinu. Také jsme si uvědomovali, že protein RpoA je součástí komplexu RNAP, ve kterém může být jeho konformace zcela odlišná od konformace, kterou zaujímá, pokud je z tohoto komplexu vytržen. Proto jsme chtěli potvrdit či vyvrátit, zda i nativní protein RpoA v komplexu RNAP funguje jako substrát proteinkinasy StkP. Dále jsme chtěli protein RpoA izolovaný za nativních podmínek podrobit analýze míst fosforylace, jenž by se mohly od rekombinantního proteinu RpoA lišit.

Abychom mohli izolovat nativní protein RpoA pomocí afinitní chromatografie, připravili jsme kmen *S. pneumoniae* RpoA(His) exprimující protein RpoA s histidinovou kotvou na N-konci. Vzhledem k tomu, že α CTD RNAP má důležitou regulační funkci, mohla by histidinová kotva na C-konci ovlivnit funkci celé α podjednotky a případně životaschopnost kmene. Jelikož se gen *rpoA* nachází uvnitř operonu spr0210 – spr0216, rozhodli jsme se nespojovat vložení sekvence kódující histidinovou kotvu s vložení

antibiotikové kazety, jejíž přítomnost by mohla negativně ovlivnit expresi sousedních genů. Během ověřování přítomnosti sekvence kódující histidinovou kotvu na chromozomální DNA kmene *S. pneumoniae* RpoA(His), jsme zjistili, že se specifická sekvence kódující histidinovou kotvu na chromozomu nenachází. Tuto skutečnost si vysvětlujeme tím, že *S. pneumoniae* vyrůstá především ve dvojicích koků, které však nemusí mít shodný genotyp. Růst pozitivního klonu tak může být potlačen růstem klonu nesoucího genotyp původního kmene. Z těchto důvodů se nám nepodařilo získat stabilní kmen s vloženou sekvencí kódující histidinovou kotvu.

Protože se předchozí strategie neosvědčila, rozhodli jsme se spojit vložení sekvence kódující histidinovou kotvu s přítomností selekčního znaku v podobě spektinomycinové kazety. Abychom operon spr0210-0216 narušili co nejméně, použili jsme antibiotikovou kazetu bez terminátoru. Dále jsme chtěli provést cílenou inaktivaci genu kódujícího proteinkinasu a porovnat rozdíly mezi fosforylací RNAP izolované z kmene s funkční StkP a RNAP izolované z kmene s inaktivní StkP. S tímto záměrem jsme se rozhodli připravit kmen *S. pneumoniae* RpoA(His) Δ stkP. Při ověřování sekvence získaných klonů jsme však zjistili, že se sice u všech kolonií sekvence kódující histidinovou kotvu vyskytuje na 5' konci genu *rpoA*, ale Spc kazeta se vložila na jiné neznámé místo. Při testování růstových charakteristik obou kmenů *S. pneumoniae* RpoA(His) a *S. pneumoniae* RpoA(His) Δ stkP jsme zjistili, že ani u jednoho kmene růstová křivka neodpovídá předpokládaným projevům. U kmene *S. pneumoniae* RpoA(His) byla růstová rychlost nižší než u divokého typu. U kmene *S. pneumoniae* RpoA(His) Δ stkP byla naopak růstová rychlost kmene stejná jako u kmene divokého, což neodpovídá popsané růstové rychlosti kmene *S. pneumoniae* Δ stkP (SASKOVA *et al.* 2007). Předpokládáme, že odlišné růstové charakteristiky obou kmenů jsou výsledkem neočekávaných genetických změn, ke kterým došlo v důsledku přeskupení spektinomycinové kazety nebo v důsledku integrace histidinové kotvy na protein RpoA. Protože byl fenotyp obou kmenů významně změněn, nemohli jsme kmeny pro další experimenty využít.

Vzhledem k tomu, že se nám zatím nepodařilo získat použitelný kmen pro izolaci nativního proteinu RpoA, rozhodli jsme se pro izolaci RNAP použít jinou strategii a podařilo se nám vytvořit kmen *S. pneumoniae* RpoC(His). Vzhledem k tomu, že v tomto kmeni je histidinové kotva na β' podjednotce RNAP, je pro nás výhodnější než kmeny předchozí, protože α podjednotka zůstává v tomto kmeni v nezměněné podobě. Nevýhodou tohoto kmene je, že nese jako selekční znak chloramfenikolovou kazetu, tedy stejnou rezistenci, kterou používáme pro inaktivaci StkP. V současnosti je v naší laboratoři

připravován konstrukt, který umožní fúzi β' podjednotky s histidinovou kotvou a jiným selekčním znakem. Ze všech tří kmenů *S. pneumoniae* RpoA(His), *S. pneumoniae* RpoA(His) Δ stkP a *S. pneumoniae* RpoC(His) se nám podařilo pomocí afinitní chromatografie izolovat komplex RNAP, který jsme použili ve standardní kinázové reakci s proteinkinásou StkP a bez proteinkinasy. Fosforylace se v žádném ze vzorků neprojevila. Pro vysvětlení této skutečnosti máme tři možné hypotézy:

- (i) RpoA v komplexu RNAP **není *in vitro* substrátem** proteinkinasy StkP, k její fosforylaci dochází před zapojením do komplexu RNAP. Pro tuto hypotézu mluví skutečnost, že se nám podařilo prokázat fosforylaci rekombinantního proteinu RpoA prostřednictvím StkP. Proti této hypotéze stojí fakt, že se v bakteriální buňce nachází jen asi 1% volných RNAP (viz kap. 2.2.1), u kterých by přicházely v úvahu modifikační změny α CTD před zapojením do funkčního komplexu RNAP, proto považujeme tuto hypotézu za málo pravděpodobnou.
- (ii) Protein RpoA není přímým substrátem proteinkinasy StkP. **StkP je součástí fosforylační kaskády**, která vede k fosforylaci RpoA. Bylo dokázáno, že u některých bakterií dochází k fosforylaci proteinů prostřednictvím fosforylační kaskády, v rámci které je signál předáván z jedné kinasy na druhou, z nichž až poslední kinasa fosforyluje cílový substrát. Taková kaskáda byla objevena například u *Myxococcus xanthus*, kdy proteinkinasa Pkn8 způsobí fosforylaci proteinkinasy Pkn14, která fosforyluje cílový substrát, jímž je transkripční faktor MrpC (NARIYA a INOUE 2006). Exprese proteinu MrpC je navíc regulována dvousložkovým systémem MrpA(kinasa)/MrpB(regulátor). Zdá se tedy, že transkripční aktivátor MrpC je ovlivňován složitou regulační kaskádou, která zahrnuje jak dvousložkový systém tak proteinkinasu eukaryotního typu (LUX a SHI 2005). Podobný mechanismus fosforylace byl objeven také u *S. agalactiae*, kde proteinkinasa eukaryotního typu Stk1 pozitivně reguluje transkripci β -hemolysinu/cytolysinu (β -H/C) za přítomnosti dvousložkového regulátoru CovR. Bylo prokázáno, že Stk1 *in vitro* fosforyluje regulátor CovR a tím pravděpodobně ovlivňuje expresi CovR-dependentních genů (RAJAGOPAL *et al.* 2006). Vzhledem k tomu, že *S. pneumoniae* kóduje celkem třináct dvousložkových systémů, je množství možných kombinací fosforylačních kaskád docela rozsáhlé. Vzhledem k fenotypu a transkripčnímu profilu kmene *S. pneumoniae* Δ stkP (SASKOVA *et al.* 2007) se zdá nejpravděpodobnější, že by případná regulační kaskáda mohla zahrnovat dvousložkové systémy CiaR/H, ComD/E, PnpR/S nebo VicR/K, u kterých bylo prokázáno, že souvisí s kompetencí případně s virulencí.

(iii) Nepodařilo se nám určit **vhodné podmínky**, za kterých k fosforylaci RpoA v komplexu RNAP prostřednictvím StkP dochází. Vzhledem k tomu, že α podjednotka RNAP byla identifikována *in vivo* jako potenciální substrát srovnáním fosfoproteomických map kmene *S. pneumoniae* Cp1015 a *S. pneumoniae* Δ stkP (NOVAKOVA *et al.* 2005), je možné že je skutečně substrátem StkP a nám se nepodařilo zajistit *in vitro* podmínky, za kterých *in vivo* k fosforylaci dochází. StkP je membránový protein, a proto je pravděpodobné, že *in vivo* realizuje fosforylaci RpoA až v odpovědi na aktivační signál z okolního prostředí, který umožňuje bakterii flexibilně reagovat na aktuální změny okolního prostředí modulací genové exprese. V *in vitro* podmínkách však nejsme schopni tento aktivační signál zajistit, a proto k fosforylaci nedochází. Další možností je, že k fosforylaci RpoA dochází až po navázání komplexu RNAP na DNA, a proto v *in vitro* podmínkách k fosforylaci RpoA bez vazby na DNA nedochází.

Proteinkinasy eukaryotního typu regulují v bakteriální buňce celou řadu procesů: morfologickou a fyziologickou diferenciaci, odpověď na stres, metabolické procesy, tvorbu biofilmu a virulenci. Přestože byla popsána řada proteinkinás eukaryotního typu a prozkoumány jejich funkce, bylo objeveno jen velmi málo jejich cílových substrátů. Dopad fosforylace substrátu na jeho funkci byl popsán jen v několika málo případech (tab. 6–1).

Tabulka 6–1.: Substráty proteinkinasy eukaryotního typu

organismus	kinasa	substrát	funkce substrátu	způsob detekce	funkce modifikace	citace
<i>M. xanthus</i>	Pkn8	Pkn14	kinasa	<i>in vitro</i> fosforylace	přenos signálu	(NARIYA a INOUYE 2005)
<i>M. xanthus</i>	Pkn14	MrpC	transkripční faktor: exprese <i>fruA</i>	<i>in vitro</i> fosforylace	regulace exprese <i>mrpC</i>	(NARIYA a INOUYE 2005)
<i>M. xanthus</i>	Pkn4	PFK	glykolýza	<i>in vitro</i> fosforylace	využití glykogenu	(NARIYA a INOUYE 2005)
<i>S. agalactiae</i>	Stk1	CovR	regulátor TCS	<i>in vitro</i> fosforylace	???	(RAJAGOPAL et al. 2006)
<i>S. agalactiae</i>	Stk1	PpaC	hydrolyza PPI: buněčný metabolismus	<i>in vitro</i> fosforylace	???	(RAJAGOPAL et al. 2003)
<i>S. pneumoniae</i>	StkP	GlmM	biosyntéza buněčné stěny	<i>in vivo</i> fosforylace <i>in vitro</i> fosforylace	???	(NOVÁKOVÁ et al. 2005) Pallová (ústní sdělení)
<i>M. tuberculosis</i>	PknB	GarA	regulace degradace glykogenu	<i>in vitro</i> fosforylace, hmotnostní spektrometrie	???	(VILLARINO et al. 2005)
<i>M. tuberculosis</i>	PknA/PknB	Wag31	dělení buňky	<i>in vivo</i> fosforylace <i>in vitro</i> fosforylace	fosforylace Wag31 ovlivňuje tvar buňky	(KANG et al. 2005)
		Rv1422	???			
<i>M. tuberculosis</i>	PknH	Rv0681	transkripční faktor	<i>in vitro</i> fosforylace	???	(ZHENG et al. 2007)
		DacB1	PBP			
<i>M. tuberculosis</i>	STPK	mtFabD	biosyntéza mykolytických kyselin	<i>in vitro</i> fosforylace, <i>in vivo</i> fosforylace	modulace aktivity při syntéze mykolytických kyselin	(MOLLE et al. 2006)
KasA						
KasB						
<i>M. tuberculosis</i>	PknA	FtsZ	tvorba buněčné přepážky	<i>in vitro</i> fosforylace	regulace buněčného dělení	(THAKUR a CHAKRABORTI 2006)
<i>M. tuberculosis</i>	PknF	RV1747	rozvinutí virulentní infekce	<i>in vitro</i> fosforylace	???	(CURRY et al. 2005)
<i>S. coelicolor</i>	AfsL/PkaG/AfsK	AfsR	transkripční faktor, regulace sek. metabolismu	<i>in vitro</i> fosforylace	transkripce genu <i>afsS</i>	(UMEYAMA et al. 2002)

M. xanthus: *Mycococcus xanthus*; ***M. tuberculosis***: *Mycobacterium tuberculosis*; ***S. agalactiae***: *Streptococcus agalactiae*; **PFK**: fosfofruktokinasa; **TCS**: dvousložkový systém; **PPi** anorganický pyrofosfát; **PBP**: Penicilin-binding protein

Většina z cílových substrátů byla identifikována pomocí *in vitro* fosforylace rekombinantního proteinu, zůstává však otázkou, zda je taková identifikace postačující a zda se všechny takto identifikované substráty podaří potvrdit. V případě identifikace cílových substrátů pomocí *in vitro* fosforylace jsou simulovány podmínky, ke kterým v živé bakteriální buňce nemusí nikdy dojít. V *in vitro* podmínkách je možné realizovat interakci dvou proteinů, které mohou být za normálních okolností v bakteriální buňce odděleny

v prostoru i čase. Pozorovaná fosforylace tak může být výsledkem nescifické modifikace substrátu. V případě identifikace substrátů pomocí *in vivo* fosforylace může zase být pozorovaná fosforylace výsledkem přenosu fosfátové skupiny kaskádou proteinů. Při identifikaci substrátů proteinkinás je tedy nutné ověřit fosforylaci jak *in vitro* tak *in vivo*.

7 SOUHRN

Výsledky této diplomové práce můžeme shrnout do následujících bodů:

- Připravili jsme vektor vhodný pro expresi genu *rpoA* v *E. coli* a pomocí afinitní chromatografie jsme izolovali rekombinantní protein RpoA.
- Zjistili jsme, že rekombinantní α podjednotka RNA-polymerasy je v přítomnosti proteinkinasy StkP *in vitro* fosforylována. Stanovili jsme optimální podmínky této fosforylační reakce: 5 mM koncentrace $MnCl_2$, teplota 37° C a doba trvání reakce 30 min.
- Pomocí dvourozměrné elektroforézy jsme připravili vzorky pro analýzu fosforylačních míst rekombinantního proteinu RpoA. Fosforylační místa se zatím nepodařilo identifikovat.
- Připravili jsme kmen *S. pneumoniae* RpoA(His) a *S. pneumoniae* RpoA(His) Δ *stkP* exprimující α podjednotku RNAP s histidinovou kotvou, ze kterých jsme izolovali nativní protein RpoA v komplexu RNAP pomocí afinitní chromatografie. Jelikož došlo u obou kmenů k nepředpokládaným fenotypovým změnám, nemohli jsme tyto kmeny pro další experimenty využít.
- Připravili jsme kmen *S. pneumoniae* RpoC(His) exprimující β' podjednotku RNAP s histidinovou kotvou, ze kterého jsme izolovali nativní protein RpoA v komplexu RNAP pomocí afinitní chromatografie.
- Zjistili jsme, že nativní protein RpoA v komplexu RNAP není v přítomnosti proteinkinasy StkP fosforylován.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Artsimovitch, I. and Landick, R.** (2000): Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7090-7095.
- Barrett, J. F., Goldschmidt, R. M., Lawrence, L. E., Foleno, B., Chen, R., Demers, J. P., Johnson, S., Kanojia, R., Fernandez, J., Bernstein, J. et al.** (1998): Antibacterial agents that inhibit two-component signal transduction systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5317-5322.
- Benoff, B., Yang, H., Lawson, C. L., Parkinson, G., Liu, J., Blatter, E., Ebright, Y. W., Berman, H. M. and Ebright, R. H.** (2002): Structural basis of transcription activation: the CAP-alpha CTD-DNA complex. *Science* **297**, 1562-1566.
- 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.
- Borukhov, S., Lee, J. and Laptenko, O.** (2005): Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Mol Microbiol* **55**, 1315-1324.
- Browning, D. F. and Busby, S. J.** (2004): The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* **2**, 57-65.
- Busby, S. and Ebright, R. H.** (1999): Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**, 199-213.
- Campbell, E. A., Choi, S. Y. and Masure, H. R.** (1998): A competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* revealed by genomic analysis. *Mol Microbiol* **27**, 929-939.
- 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.
- Claverys, J. P. and Havarstein, L. S.** (2002): Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Biosci* **7**, d1798-1814.
- Claverys, J. P., Prudhomme, M., Mortier-Barriere, I. and Martin, B.** (2000): Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity? *Mol Microbiol* **35**, 251-259.
- Curry, J. M., Whalan, R., Hunt, D. M., Gohil, K., Strom, M., Rickman, L., Colston, M. J., Smerdon, S. J. and Buxton, R. S.** (2005): An ABC transporter containing a forkhead-associated domain interacts with a serine-threonine protein kinase and is required for growth of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Infect Immun* **73**, 4471-4477.

- de Saizieu, A., Gardes, C., Flint, N., Wagner, C., Kamber, M., Mitchell, T. J., Keck, W., Amrein, K. E. and Lange, R.** (2000): Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *J Bacteriol* **182**, 4696-4703.
- 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.
- Echenique, J. R. and Trombe, M. C.** (2001): Competence repression under oxygen limitation through the two-component MicAB signal-transducing system in *Streptococcus pneumoniae* and involvement of the PAS domain of MicB. *J Bacteriol* **183**, 4599-4608.
- Estrem, S. T., Ross, W., Gaal, T., Chen, Z. W., Niu, W., Ebright, R. H. and Gourse, R. L.** (1999): Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *Genes Dev* **13**, 2134-2147.
- Gaal, T., Ross, W., Blatter, E. E., Tang, H., Jia, X., Krishnan, V. V., Assa-Munt, N., Ebright, R. H. and Gourse, R. L.** (1996): DNA-binding determinants of the alpha subunit of RNA polymerase: novel DNA-binding domain architecture. *Genes Dev* **10**, 16-26.
- Gaustad, P.** (1979): Genetic transformation in *Streptococcus sanguis*. Distribution of competence and competence factors in a collection of strains. *Acta Pathol Microbiol Scand [B]* **87B**, 123-128.
- 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.
- Goff, C. G.** (1984): Coliphage-induced ADP-ribosylation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Methods Enzymol* **106**, 418-429.
- Goldfarb, A. and Palm, P.** (1981): Control of promoter utilization by bacteriophage T4-induced modification of RNA polymerase alpha subunit. *Nucleic Acids Res* **9**, 4863-4878.
- 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.
- Hakenbeck, R.** (2000): Transformation in *Streptococcus pneumoniae*: mosaic genes and the regulation of competence. *Res Microbiol* **151**, 453-456.
- 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.

- 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.
- Hendriksen, W. T., Silva, N., Bootsma, H. J., Blue, C. E., Paterson, G. K., Kerr, A. R., de Jong, A., Kuipers, O. P., Hermans, P. W. and Mitchell, T. J.** (2007): Regulation of gene expression in *Streptococcus pneumoniae* by response regulator 09 is strain dependent. *J Bacteriol* **189**, 1382-1389.
- Hengge-Aronis, R.** (2002): Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter sigmaS-selective? *Curr Opin Microbiol* **5**, 591-595.
- 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.
- Ibrahim, Y. M., Kerr, A. R., McCluskey, J. and Mitchell, T. J.** (2004): Control of virulence by the two-component system CiaR/H is mediated via HtrA, a major virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **186**, 5258-5266.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H.** (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Ishihama, A.** (1993): Protein-protein communication within the transcription apparatus. *J Bacteriol* **175**, 2483-2489.
- Jedrzejewski, M. J.** (2001): Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**, 187-207 ; first page, table of contents.
- Jensen, K. F. and Pedersen, S.** (1990): Metabolic growth rate control in *Escherichia coli* may be a consequence of subsaturation of the macromolecular biosynthetic apparatus with substrates and catalytic components. *Microbiol Rev* **54**, 89-100.
- Jensen, O. N., Wilm, M., Shevchenko, A. and Mann, M.** (1999): Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2-DE gels. *Methods Mol Biol* **112**, 513-530.
- 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.
- Kimura, M., Fujita, N. and Ishihama, A.** (1994): Functional map of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. Deletion analysis of the amino-terminal assembly domain. *J Mol Biol* **242**, 107-115.
- Lange, R., Wagner, C., de Saizieu, A., Flint, N., Molnos, J., Stieger, M., Caspers, P., Kamber, M., Keck, W. and Amrein, K. E.** (1999): Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* **237**, 223-234.

- Lanie, J. A., Ng, W. L., Kazmierczak, K. M., Andrzejewski, T. M., Davidsen, T. M., Wayne, K. J., Tettelin, H., Glass, J. I. and Winkler, M. E.** (2007): Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J Bacteriol* **189**, 38-51.
- Lee, M. S. and Morrison, D. A.** (1999): Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *J Bacteriol* **181**, 5004-5016.
- Lopez, R.** (2004): *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages: one long argument. In *Int Microbiol*, vol. 7, pp. 163-171.
- Luo, P., Li, H. and Morrison, D. A.** (2003): ComX is a unique link between multiple quorum sensing outputs and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **50**, 623-633.
- Luo, P. and Morrison, D. A.** (2003): Transient association of an alternative sigma factor, ComX, with RNA polymerase during the period of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **185**, 349-358.
- Lux, R. and Shi, W.** (2005): A novel bacterial signalling system with a combination of a Ser/Thr kinase cascade and a His/Asp two-component system. *Mol Microbiol* **58**, 345-348.
- Mandel, E. M., Casselbrant, M. L., Rockette, H. E., Bluestone, C. D. and Kurs-Lasky, M.** (1996): Efficacy of antimicrobial prophylaxis for recurrent middle ear effusion. *Pediatr Infect Dis J* **15**, 1074-1082.
- Mathew, R. and Chatterji, D.** (2006): The evolving story of the omega subunit of bacterial RNA polymerase. *Trends Microbiol* **14**, 450-455.
- McKessar, S. J. and Hakenbeck, R.** (2007): The two-component regulatory system TCS08 is involved in cellobiose metabolism of *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Bacteriol* **189**, 1342-1350.
- 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., 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., Morona, R., Miller, D. C. and Paton, J. C.** (2003): Mutational analysis of the carboxy-terminal (YGX)₄ repeat domain of CpsD, an autophosphorylating tyrosine kinase required for capsule biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **185**, 3009-3019.

- Morona, J. K., Paton, J. C., Miller, D. C. and Morona, R.** (2000): Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **35**, 1431-1442.
- Murakami, K., Fujita, N. and Ishihama, A.** (1996): Transcription factor recognition surface on the RNA polymerase alpha subunit is involved in contact with the DNA enhancer element. *Embo J* **15**, 4358-4367.
- 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**, 1205-1217.
- Nechaev, S. and Severinov, K.** (2003): Bacteriophage-induced modifications of host RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol* **57**, 301-322.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W.** (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262.
- Ng, W. L., Robertson, G. T., Kazmierczak, K. M., Zhao, J., Gilmour, R. and Winkler, M. E.** (2003): Constitutive expression of PcsB suppresses the requirement for the essential VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae* R6. *Mol Microbiol* **50**, 1647-1663.
- Novak, R., Cauwels, A., Charpentier, E. and Tuomanen, E.** (1999): Identification of a *Streptococcus pneumoniae* gene locus encoding proteins of an ABC phosphate transporter and a two-component regulatory system. *J Bacteriol* **181**, 1126-1133.
- Novak, R., Charpentier, E., Braun, J. S. and Tuomanen, E.** (2000): Signal transduction by a death signal peptide: uncovering the mechanism of bacterial killing by penicillin. *Mol Cell* **5**, 49-57.
- Novakova, L.** (2004): Úloha Ser/Thr proteinkinas v diferenciaci *Streptomyces granaticolor* a StkP a PhpP, unikátní signalizační proteiny *Streptococcus pneumoniae*. UK Praha. Dizertační práce.
- 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.
- O'Farrell, P. H.** (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**, 4007-4021.

- Orihuela, C. J., Radin, J. N., Sublett, J. E., Gao, G., Kaushal, D. and Tuomanen, E. I.** (2004): Microarray analysis of pneumococcal gene expression during invasive disease. *Infect Immun* **72**, 5582-5596.
- Ozoline, O. N., Fujita, N. and Ishihama, A.** (2001): Mode of DNA-protein interaction between the C-terminal domain of *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit and T7D promoter UP element. *Nucleic Acids Res* **29**, 4909-4919.
- Pallova, P.** (2003): Buněčná lokalizace serin/threoninové proteinkinasy *Streptococcus pneumoniae* a analýza funkce senzorové domény. UK Praha. Dizertační práce.
- Peck, S. C.** (2006): Analysis of protein phosphorylation: methods and strategies for studying kinases and substrates. *Plant J* **45**, 512-522.
- Pestova, E. V., Havarstein, L. S. and Morrison, D. A.** (1996): Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol* **21**, 853-862.
- Pestova, E. V. and Morrison, D. A.** (1998): Isolation and characterization of three *Streptococcus pneumoniae* transformation-specific loci by use of a lacZ reporter insertion vector. *J Bacteriol* **180**, 2701-2710.
- 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.** (2006): Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signalling mechanisms in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol* **62**, 941-957.
- Ross, W., Gosink, K. K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K. and Gourse, R. L.** (1993): A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* **262**, 1407-1413.
- Saskova, L.** (2007): Signalizační proteiny eukaryotického typu a jejich vztah ke kompetenci a virulenci *Streptococcus pneumoniae*. UK Praha. Dizertační práce.
- 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*.
- Savery, N. J., Lloyd, G. S., Kainz, M., Gaal, T., Ross, W., Ebright, R. H., Gourse, R. L. and Busby, S. J.** (1998): Transcription activation at Class II CRP-dependent promoters: identification of determinants in the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *Embo J* **17**, 3439-3447.
- Severinov, K., Mooney, R., Darst, S. A. and Landick, R.** (1997): Tethering of the large subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Biol Chem* **272**, 24137-24140.

- Standish, A. J., Stroecher, U. H. and Paton, J. C.** (2005): The two-component signal transduction system RR06/HK06 regulates expression of *cbpA* in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7701-7706.
- Stock, A. M. and Mowbray, S. L.** (1995): Bacterial chemotaxis: a field in motion. *Curr Opin Struct Biol* **5**, 744-751.
- Sung, C. K. and Morrison, D. A.** (2005): Two distinct functions of ComW in stabilization and activation of the alternative sigma factor ComX in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **187**, 3052-3061.
- Suntharalingam, P. and Cvitkovitch, D. G.** (2005): Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. *Trends Microbiol* **13**, 3-6.
- Switzer, R. L., Turner, R. J. and Lu, Y.** (1999): Regulation of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic operon by transcriptional attenuation: control of gene expression by an mRNA-binding protein. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **62**, 329-367.
- Tettelin, H., Nelson, K. E., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Read, T. D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R. T., Haft, D. H., Dodson, R. J. et al.** (2001): Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**, 498-506.
- 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**, 40107-40113.
- Umeyama, T., Lee, P. C. and Horinouchi, S.** (2002): Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**, 419-425.
- Villarino, A., Duran, R., Wehenkel, A., Fernandez, P., England, P., Brodin, P., Cole, S. T., Zimny-Arndt, U., Jungblut, P. R., Cervenansky, C. et al.** (2005): Proteomic identification of *M. tuberculosis* protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions. *J Mol Biol* **350**, 953-963.
- Wagner, R.** (2000): *Transcription Regulation in Prokaryotes*. New York,, Oxford University Press.
- Ween, O., Gaustad, P. and Havarstein, L. S.** (1999): Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **33**, 817-827.
- Yeats, C., Finn, R. D. and Bateman, A.** (2002): The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends Biochem Sci* **27**, 438.
- 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.