

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

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Mikrobiologie  
Studijní obor: Mikrobiologie



Mgr. Nela Holečková

**Analýza signální dráhy proteinkinasy StkP u *Streptococcus pneumoniae*  
Analysis of signaling cascade of proteinkinase StkP in *Streptococcus  
pneumoniae***

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Školitel: RNDr. Linda Doubravová, Ph.D.**

**Praha 2020**

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

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Lindy Doubravové, Ph.D. s použitím pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury. Tato práce ani podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

.....  
Mgr. Nela Holečková

Práce vznikla v letech 2012 - 2020 v rámci grantových projektů P204/07/082 a P302/12/0256 za podpory Grantové agentury České republiky.

## **Poděkování:**

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu laboratoře Pavlu Brannymu za to, že mi dal příležitost pracovat v jeho laboratoři.

Obrovské poděkování patří mé školitelce Lindě Doubravové. Děkuji ji nejen za její odborné vedení a rady, které mi vždy ráda předala, ale také hlavně za její neskutečnou zapálenost do vědy i v období rodičovské dovolené, ve kterém byla dokončována jedna z uvedených publikací. Velice si všeho vážím a děkuji.

Dále bych chtěla poděkovat všem minulým i stávajícím kolegům z Laboratoře buněčné signalizace i ostatním kolegům z dalších laboratoří za velmi přátelské prostředí, všestrannou pomoc, podporu a kamarádství.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé rodině. Svému manželovi Jakobovi za neskutečně velkou podporu, důvěru a lásku jak při samotném studiu, tak hlavně také v období sepisování této disertační práce. Dále své dceři Jindřišce za to, že je tak šťastným a pozitivním dítětem a věnovala mi čas a prostor k samotnému sepisování disertace. A velké díky patří také všem rodičům a prarodičům, kteří se vždy ochotně Jindřišce věnovali a vždy mě podporovali.

## **Analýza signální dráhy proteinkinasy StkP u *Streptococcus pneumoniae***

*Streptococcus pneumoniae* je nejen významný lidský patogen, ale také vhodný modelový organismus ke zkoumání buněčného dělení u ovoidních bakterií. Tato bakterie postrádá oba systémy výběru místa buněčného dělení Min a NO, a tedy mechanismus, jakým určuje místo, ve kterém nastane buněčné dělení, je neznámý. Navíc ve svém genomu kóduje jedinou serin/threoninovou proteinkinasu eukaryotického typu nazývanou StkP a jedinou serin/threoninovou proteinfosfatasu PP2C typu nazývanou PhpP. StkP je jedním z hlavních regulátorů buněčného dělení a pravděpodobně ovlivňuje průběh buněčného dělení i fosforylací svých substrátů, mezi které mimo jiné patří proteiny buněčného dělení FtsZ, FtsA, DivIVA, MacP, Jag/KhpB/EloR a LocZ/MapZ.

První projekt této disertační práce se zabývá určením funkce proteinu LocZ v rámci buněčného dělení. Souhrnně, *locZ* sice není esenciální, ale účastní se procesu výběru místa dělení u *S. pneumoniae* a naše výsledky napovídají, že patří mezi pozitivní regulátory umístění Z-kruhu. Buňky s deplecí LocZ jsou schopny tvořit Z-kruh, ale ten je prostorově špatně umístěn, což má za následek defekty v buněčném dělení, deformity buněčného tvaru a tvorbu nerovnoměrně rozdělených dceřiných buněk, které občas neobsahují žádnou DNA. LocZ má unikátní lokalizační vzor. Do buněčného středu přichází časně, ještě dříve než FtsZ a FtsA. Stejně tak i z buněčného středu odchází, časně a dříve než FtsZ a FtsA, přičemž putuje s ekvatoriálními kruhy, které značí budoucí místo buněčného dělení. Domníváme se, že za tuto lokalizaci je zodpovědná extracelulární doména proteinu. Zajímavé je, že homology proteinu LocZ se vyskytují pouze u streptokoků, enterokoků a laktokoků, což naznačuje, že tato skupina fylogeneticky blízkých bakterií si vyvinula unikátní mechanismus, jak určit buněčný střed.

Druhý projekt této disertační práce se zabývá esencialitou a funkcí proteinfosfatasy PhpP v neopouzřené kmeni *S. pneumoniae* Rx1, ve kterém byl gen *phpP* dříve postulován jako esenciální. Přípravou životaschopného kmene  $\Delta phpP$  a následným testem transformační kinetiky jsme vyvrátili esencialitu *phpP*. Demonstrujeme, že PhpP negativně řídí úroveň fosforylace u *S. pneumoniae* a to přímou defosforylací svých substrátů a současně defosforylací kinasy StkP. Nepřítomnost anebo katalytická inaktivace PhpP má za následek hyperfosforylací substrátů StkP a fenotypové změny včetně citlivosti k určitým environmentálním stresům. Morfologicky se deplece PhpP projevuje tvorbou menších kulatých buněk, což reflektuje fenotyp pozorovaný u buněk kmene nadprodukcujícího StkP. A naopak nadprodukce PhpP má za následek elongaci

buněk, což mimikuje fenotyp  $\Delta stkP$  kmene. Naše výsledky dokazují, že PhpP a StkP společně regulují buněčné dělení u *S. pneumoniae*.

**Klíčová slova:** LocZ, MapZ, Spr0334, serin/threoninová proteinkinasa, StkP, serin/threoninová proteinfosfátasa, PhpP, buněčné dělení, *Streptococcus pneumoniae*, fosforylace.

## **Analysis of signaling cascade of protein kinase StkP in *Streptococcus pneumoniae***

*Streptococcus pneumoniae* is not only an important human pathogen but also an appropriate model organism to investigate cell division in ovoid bacteria. This bacterium lacks both, NO and Min systems for selection of cell division site. Thus, the mechanism which determines the site of cell division is unknown. Additionally, the genome of *S. pneumoniae* encodes a single gene for eukaryotic-like serine/threonine protein kinase StkP and a single gene for eukaryotic-like serine/threonine protein phosphatase of PP2C type called PhpP. StkP is one of the main regulators of cell division. Cell division is probably affected by the phosphorylation of its substrates, which include, among others, cell division proteins FtsZ, FtsA, DivIVA, MacP, Jag/KhpB/EloR, and LocZ/MapZ.

The aim of the first project of this dissertation thesis is determination of the function of protein LocZ in the cell division. In summary, *locZ* is not essential, however, it is involved in proper septum placement in *S. pneumoniae* and our data suggest that it is a positive regulator of Z-ring placement. Cells lacking LocZ are able to form Z-ring, but the Z-ring is spatially misplaced resulting in cell division defects, shape deformation, and generation of unequally sized, occasionally anucleated daughter cells. LocZ has a unique localization pattern. It arrives early at midcell, before FtsZ and FtsA. Likewise, it also leaves the septum early, apparently moving along with the equatorial rings that mark the future division sites. We propose that the extracellular domain of the protein LocZ is responsible for this localization. Interestingly, homologs of LocZ are found only in streptococci, enterococci and lactococci, indicating that these phylogenetically closely related bacteria evolved a unique mechanism to find their middle.

The second project of this thesis is concerned with the essentiality of protein phosphatase PhpP in the *S. pneumoniae* Rx1 unencapsulated strain, in which the gene *phpP* was previously postulated as essential. We prepared a viable  $\Delta phpP$  strain and excluded selection of suppressor mutation by transformation kinetic analysis, thus confirming that *phpP* gene is not essential. We demonstrate that PhpP negatively controls the level of protein phosphorylation in *S. pneumonaie* both by direct dephosphorylation of its substrates and by dephosphorylation of its cognate kinase, StkP. Absence or catalytic inactivation resulted in the hyperphosphorylation of StkP substrates and specific phenotypic changes, including sensitivity to certain environmental stresses. Morphologically is depletion PhpP manifested by the formation of smaller spherical cells that reflect phenotype of StkP overexpression. Conversely, the overproduction of PhpP

resulted in cell elongation mimicking the *stkP* null phenotype. Our results suggest that PhpP and StkP cooperatively regulate cell division of *S. pneumoniae*.

**Keywords:** LocZ, MapZ, Spr0334, serine/threonine protein kinase, StkP, serine/threonine protein phosphatase, PhpP, cell division, *Streptococcus pneumoniae*, phosphorylation.



# OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Literární přehled .....</b>	<b>15</b>
2.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	15
2.2	Výběr místa dělení u různých bakterií .....	17
2.2.1	Negativní regulační systémy Min a NO u <i>Escherichia coli</i> a <i>Bacillus subtilis</i> .....	18
2.2.2	Negativní regulátor MipZ u <i>Caulobacter crescentus</i> .....	20
2.2.3	Systém pozitivní regulace SsgAB a SepG u <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	21
2.2.4	Systém pozitivní regulace PomXYZ u <i>Myxococcus xanthus</i> .....	22
2.2.5	Pozitivní regulátor PldP u <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	23
2.3	Buněčné dělení u <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	23
2.3.1	Segregace chromosomů u <i>S. pneumoniae</i> .....	24
2.3.2	Syntéza buněčné stěny u <i>S. pneumoniae</i> .....	26
2.4	Funkční signalizační pár: proteinkinasa StkP a proteinfosfataza PhpP .....	30
2.4.1	Substráty StkP a PhpP .....	33
<b>3</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>40</b>
3.1	Bakteriální kmeny a vektory .....	40
3.2	Půdy a média .....	41
3.3	Manipulace s DNA .....	44
3.3.1	Izolace chromozomální DNA <i>S. pneumoniae</i> .....	44
3.3.2	Elektroforetická separace DNA a izolace DNA fragmentu z agarózového gelu .....	45
3.3.3	PCR amplifikace a použité oligonukleotidy .....	45
3.3.4	Mutagenní PCR a použité oligonukleotidy .....	47
3.3.5	Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i> .....	47
3.3.6	Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> plazmidovou DNA .....	48
3.3.7	Transformace DNA do buněk <i>S. pneumoniae</i> pomocí syntetického CSP .....	48
3.4	Manipulace s RNA .....	49
3.4.1	Izolace celkové RNA ze <i>S. pneumoniae</i> .....	49
3.4.2	Reverzní transkripce .....	50
3.4.3	qRT-PCR .....	50
3.5	Manipulace s proteiny .....	51
3.5.1	Izolace proteinů z buněk <i>S. pneumoniae</i> .....	51

3.5.2	SDS-PAGE .....	52
3.5.3	Westernový přenos („Western blotting“).....	52
3.5.4	Imunodetekce.....	52
3.5.5	Exprese a purifikace rekombinantních proteinů.....	53
3.5.6	Příprava polyklonální králičí protilátky $\alpha$ -LocZ .....	54
3.6	Defosforylační reakce <i>in vitro</i> .....	55
3.7	Testy citlivosti k různým druhům stresů.....	55
3.8	Mikroskopie .....	56
3.8.1	Příprava fixovaných preparátů <i>S. pneumoniae</i> .....	56
3.8.2	Příprava živých preparátů <i>S. pneumoniae</i> .....	57
3.8.3	Příprava živých preparátů buněk obarvených fluorescenčním vankomycinem (VanFL) .....	57
3.8.4	Příprava živých preparátů buněk exprimujících proteiny s fluorescenčním tagem.....	57
3.8.5	Časoběrná mikroskopie .....	58
3.8.6	Transmisní elektronová mikroskopie (TEM).....	58
3.8.7	Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) .....	58
3.8.8	Super-rezoluční mikroskopie .....	59
3.9	Měření velikosti buněk a statistická analýza.....	59
3.9.1	Analýza obrazu pro vytvoření fluorescenčního profilu.....	60
3.10	Příprava plazmidů a jejich využití v přípravě bakteriálních kmenů .....	60
3.11	Příprava kmenů <i>S. pneumoniae</i> $\Delta$ locZ pomocí Cheshire kazety .....	62
3.12	Příprava kmenů <i>S. pneumoniae</i> pomocí Janus kazety .....	63
3.12.1	Příprava kmene $\Delta$ locZ v kmeni R6 <i>S. pneumoniae</i> .....	63
3.12.2	Příprava kmenů exprimujících varianty proteinu LocZ pod nativním promotorem na genetickém pozadí divokého kmene <i>S. pneumoniae</i> R6 .....	63
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuze .....</b>	<b>66</b>
4.1	Projekt: LocZ je nový protein buněčného dělení určující správné umístění septa u <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	66
4.1.1	Inaktivace genu <i>locZ</i> u <i>S. pneumoniae</i> .....	69
4.1.2	Absence proteinu LocZ u <i>S. pneumoniae</i> ovlivňuje umístění dělicí přepážky a způsobuje defekty buněčného dělení .....	72
4.1.3	Lokalizace proteinu LocZ v průběhu buněčného dělení <i>S. pneumoniae</i> .....	81
4.1.4	LocZ je časným proteinem buněčného dělení.....	84
4.1.5	Lokalizace FtsZ a FtsA v mutantovi $\Delta$ locZ .....	88
4.1.6	Lokalizace dalších proteinů buněčného dělení v mutantovi $\Delta$ locZ.....	89

4.1.7	LocZ je fosforylován <i>in vivo</i> na pozicích T67 a T78 .....	91
4.1.8	Analýza funkce jednotlivých domén proteinu LocZ.....	94
4.1.9	Diskuze .....	97
4.2	Projekt: Esencialita a funkce Ser/Thr proteinfosfatasy PhpP u <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	109
4.2.1	Esencialita <i>phpP</i> v kmeni <i>S. pneumoniae</i> Rx1 .....	109
4.2.2	PhpP katalyzuje defosforylaci substrátů StkP .....	110
4.2.3	Mutantní kmen $\Delta phpP$ je citlivý k působení teplotního a oxidativního stresu.....	112
4.2.4	PhpP reguluje buněčné dělení u <i>S. pneumoniae</i> .....	113
4.2.5	Konzervované aminokyseliny D192 a D231 jsou pro aktivitu PhpP <i>in vivo</i> esenciální .....	117
4.2.6	Diskuze .....	120
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>126</b>
<b>6</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>128</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
AMK	aminokyselina
ATP	adenosintrifosfát
CFP	modrozelený fluorescenční protein (Cyan Fluorescent Protein)
bp	páry bazí
GTP	guanosintrifosfát
CTD	C-terminální doména
CSP	peptid stimulující kompetenci (Competence Stimulating Peptide)
D192	kyselina asparagová na pozici 192
D231	kyselina asparagová na pozici 231
DNA	deoxyribonukleová kyselina
IPO	invazivní pneumokokové onemocnění
ESTK	Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu
ESTP	Ser/Thr proteinfosfátasy eukaryotického typu
Flag tag	flagová kotva
GFP	zelený fluorescenční protein (Green Fluorescent Protein)
His tag	histidinová kotva
HMM	vysoká molekulová hmotnost
LMM	nízká molekulová hmotnost
mRNA	mediátorová RNA
MTS	sekvence cílicí do membrány (Membrane Targeting Sequence)
NO	chromosomální okluze (Nucleoid Occlusion)
NTD	N-terminální doména
OD	optická densita (číslo uvedené u zkratky označuje při jaké vlnové délce byla OD měřena)
PASTA	domény nacházející se u penicilin vazebných proteinů a některých Ser/Thr proteinkinás
PBPs	penicilin vazebné proteiny (Penicillin-Binding Proteins)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PG	peptidoglykan
PP <sub>i</sub>	anorganický pyrofosfát
pThr	fosforylovaný threonin
PVDF	polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
RFP	červený fluorescenční protein (Red Fluorescent Protein)
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu (Revolutions Per Minute)
RT-PCR	reverzní transkripce
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS
SRL	na serin bohatý linker (Serine Rich Linker)
ssDNA	jedno vláknová DNA (Single-Stranded DNA)
ssRNA	jedno vláknová RNA (Single-Stranded RNA)
T67	threonin na pozici 67
T78	threonin na pozici 78
TCS	dvoukomponentové systémy (Two-Component System)
VanFL	fluorescenčně značený vankomycin
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
WT	divoký kmen (Wild Type)

# 1 Úvod

Jedním ze základních mechanismů k zachování každého organismu je buněčné dělení. Aby mohlo probíhat buněčné dělení, musí se buňka, ať už prokaryotní či eukaryotní, nacházet ve vhodném prostředí pro růst a musí velmi rychle reagovat na změny vnějšího prostředí. Za tímto účelem bakterie vyvinuly celou řadu sofistikovaných mechanismů pro přenos signálu a vzájemnou komunikaci.

Jedním z klíčových mechanismů přenosu signálu z vnějšího prostředí do buňky a uvnitř buňky je reverzibilní kovalentní posttranslační modifikace proteinů nazývaná fosforylace. Ta je zprostředkována pomocí enzymů proteinkinasy. Opačný proces neboli defosforylace je zprostředkován pomocí proteinfosfatas, které jsou nezbytné nejen pro regulaci samotné kinasy, ale také zajišťují reverzibilitu signalizační dráhy. Primárně se předpokládalo, že za přenos signálu u prokaryot zodpovídají dvoukomponentové systémy složené z histidinové proteinkinasy a příslušného regulačního proteinu. Nicméně před více než 20 lety byla u prokaryot prokázána přítomnost ATP dependentních Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu (ESTK). ESTK společně se Ser/Thr proteinfosfatasami eukaryotického typu (ESTP) jsou v bakteriální říši široce rozšířené a působí v paralelních nebo stejných signalizačních kaskádách. ESTK byly v porovnání s ESTP hojně studovány a bylo zjištěno, že regulují četné buněčné funkce jako je růst, buněčné dělení, syntéza buněčné stěny, diference, sekundární metabolismus či patogenita. Naproti tomu fyziologická funkce ESTP byla zatím jen málo zkoumána, částečně z toho důvodu, že některé z nich byly postulovány jako esenciální. Nicméně se ukazuje, že ESTP pro životaschopnost některých bakterií esenciální nejsou a hrají roli např. ve virulenci, stavbě buněčné stěny a segregaci buněk.

*Streptococcus pneumoniae* je nejen významným patogenem, ale i velmi dobrým modelovým organismem pro studium Ser/Thr proteinkinasy a proteinfosfatas eukaryotického typu, protože ve svém genomu kóduje jedinou Ser/Thr proteinkinasu StkP a jedinou Ser/Thr proteinfosfatasu PhpP. Bylo prokázáno, že StkP a PhpP tvoří funkční pár (Nováková et al., 2005). Nicméně StkP byla oproti PhpP hojně studována. StkP je transmembránový protein složený z cytoplazmatické kinázové domény a extracelulární receptorové domény, která obsahuje 4 kopie PASTA domény (Yeats et al., 2002). Tyto PASTA domény jsou schopné vázat peptidoglykanové prekurzory a u *S. pneumoniae* je jejich navázání na StkP signálem pro její aktivaci a pravděpodobně i lokalizaci do míst nově vznikající buněčné přepážky. Zde StkP reguluje

buněčné dělení fosforylací svých substrátů (Beilharz et al., 2012). Mezi doposud určené substráty StkP patří proteiny syntézy buněčné stěny GlmM a MurC, pyrofosfatasa PpaC, transkripční regulátor RR06, osiřelý transkripční regulátor RitR, kofaktor MacP, protein kompetence ComE, proteiny buněčného dělení FtsZ, FtsA, DivIVA, Jag/KhpB/EloR a LocZ/MapZ a pravděpodobný protein buněčného dělení Spr0175.

Naproti tomu PhpP je cytoplazmatický protein, který je v časně exponenciální fázi růstu obohacen v buněčném středu v závislosti na přítomnosti aktivní StkP (Beilharz et al., 2012). Dlouho přetrvávala teze, že PhpP je pro životaschopnost *S. pneumoniae* esenciální (Thanassi, 2002; Osaki et al., 2009; Fleurie et al., 2012). Nicméně ve studii Agarwal et al. (2012) se u dvou opouzdrěných kmenů podařilo připravit životaschopný mutantní kmen  $\Delta phpP$ . Charakterizace těchto mutantů ukázala kmenově specifickou roli této fosfatasy. Pro pochopení dějů, které ESTK a ESTP řídí, je nezbytným krokem nejen jejich vlastní charakterizace, ale i charakterizace jejich substrátů.

Předkládaná disertační práce je ve své výsledkové části z důvodu přehlednosti a srozumitelnosti rozdělena na dva projekty. První z nich se zabývá charakterizací jednoho ze substrátů StkP, a to proteinem LocZ (Spr0334), nazvaným též MapZ. Tento projekt navazuje na předchozí výsledky laboratoře, které byly shrnuty v mé diplomové práci (Štekerová, 2012). Druhý projekt se zabývá otázkou esenciality a funkcí proteinfofatasy PhpP.

V rámci projektu „LocZ je nový protein buněčného dělení určující správné umístění septa u *Streptococcus pneumoniae*“ byly stanoveny následující cíle.

1. Určit přesnou funkci proteinu LocZ v rámci buněčného dělení.
2. Charakterizovat vztah mezi StkP a jejím substrátem.
3. Objasnit vliv fosforylace a defosforylace na lokalizaci a funkci či aktivitu proteinu LocZ.
4. Určit funkci jednotlivých domén proteinu LocZ.

V rámci projektu „Esencialita a funkce Ser/Thr proteinfofatasy PhpP u *Streptococcus pneumoniae*“ byly stanoveny následující cíle.

1. Objasnit, zda je PhpP pro životaschopnost neopouzdrěného kmene Rx1 esenciální.
2. Charakterizovat případný životaschopný kmen  $\Delta phpP$ .
3. Objasnit vztah mezi katalytickou aktivitou a buněčnou lokalizací PhpP *in vivo*.

## 2 Literární přehled

### 2.1 *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae*, též označovaný jako pneumokok či diplokok (obr. 2-1), je dle Světové zdravotnické organizace (WHO) čtvrté nejčastější mikrobiální agens způsobující fatální infekce a také nejčastější příčinou bakteriální pneumonie a meningitidy (WHO, 2014; Engholm et al., 2017). Pneumokoky se vyskytují v horních cestách dýchacích jako součást běžné mikroflóry, nicméně za vhodných podmínek často způsobují, kromě závažných onemocnění, jako je pneumonie, meningitida či sepse, také infekce spojené s dýchacími cestami, jako je zánět středního ucha, sinusitida a bronchitida (Bogaert et al., 2004; Brown et al., 2015). Mezi nejvíce ohrožené skupiny patří děti mladší 5 let, lidé starší 65 let a osoby s oslabeným imunitním systémem (ACIP, 1997). Z odhadovaných 14,5 milionu případů pneumokokového onemocnění u dětí připadají 2/3 na Afriku a Asii a statistika z roku 2013 uvádí, že téměř milion dětí mladších 5 let zemřelo na pneumonii (O'Brien et al., 2009; WHO 2014).

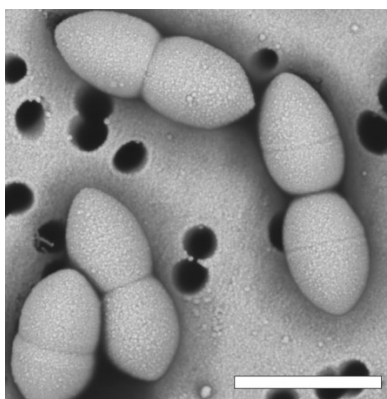
V České republice v roce 2017, v porovnání s rokem 2016, případů invazivního pneumokokového onemocnění (IPO) přibylo, a to hlavně ve skupině dětí do 1 roku a lidí starších 65 let. Nicméně data shromažďovaná od roku 2000 ukazují, že počet případů IPO v ČR nepřibývá, pouze kolísá v určitém rozmezí, stejně tak jako počet případů pneumokokové meningitidy, jejíž výskyt je sledován již od roku 1997 (Kozáková et al., 2018).

Přestože se nacházíme v době, kdy je možné výše zmíněným onemocněním předcházet vakcínami či nemocného léčit antibiotiky, je stále počet nemocných i úmrtí velmi vysoký, a to ze dvou hlavních důvodů. Pokud dojde k pneumokokovému onemocnění, je léčeno antibiotiky. *S. pneumoniae* je ale zářným příkladem lidského patogenu, u kterého bylo prokázáno, že se rychle vyvíjí a stává se odolným vůči působení antibiotik (Tomasz, 1997). Mezi hlavní hnací síly v získávání rezistence hrají důležitou roli dvě skutečnosti. Za prvé, snadná cesta přenosu, se kterou souvisí pravidelné vystavování pneumokokových populací lékům. Za druhé, pneumokoky patří mezi bakterie se schopností rozvinout stav přirozené kompetence (Chewapreecha et al., 2014). Přičemž bylo prokázáno, že jsou-li pneumokoky inhibovány určitými antibiotiky, nespouštějí klasickou SOS odpověď, ale naopak přecházejí do stavu kompetence (Prudhomme et al., 2006; Slager et al., 2014).

Dalším z problémů v cestě za vymýcením pneumokokových nákaz je příprava vakcíny, která by chránila před všemi sérotypy pneumokoka a zároveň vyvolávala protektivní účinky u obou nejohroženějších skupin (děti do 5 let a lidé starší 65 let). Sérotypů *S. pneumoniae* je více než 90 a rozlišují se dle polysacharidového pouzdra, které je zároveň hlavním virulencním faktorem (Morona et al., 2000). Dnešní vakcíny jsou založeny právě na těchto pouzderných polysacharidech a je tedy nemožné připravit vakcínu, která by obsáhla všechny sérotypy. Vakcíny obsahují omezený počet sérotypů a vzájemně se liší v závislosti na daném geografickém výskytu sérotypů *S. pneumoniae* (Hausdorff et al., 2000). Také byl pozorován jev, kdy dochází k záměně sérotypů *S. pneumoniae* ve prospěch těch, které nejsou ve vakcíně obsaženy a jsou schopné vyvolat onemocnění, což snižuje protektivní účinek vakcíny (Giefing et al., 2008).

Všechna výše zmiňovaná negativa vedou k potřebě vytvořit novou alternativní pneumokokovou vakcínu. Mezi alternativy patří vakcíny založené na (i) vysoce konzervovaných proteinech *S. pneumoniae*, které jsou zároveň schopné navodit imunitní odpověď, (ii) kombinaci již používaných konjugovaných pneumokokových vakcín s proteiny PhtD a pneumolysinem (Ply) či (iii) vakcíny obsahující atenuovaný kmen *S. pneumoniae* (Feldman a Anderson, 2014).

Právě Ser/Thr proteinkinasa StkP je vysoce konzervovaný protein, který je součástí proteinové vakcíny složené z pneumokokového povrchového lipoprotieny PsaA, hydrolasy PcsB a StkP. Tato vakcína prošla testovací fází 1 (Feldman a Anderson, 2014; Lagousi et al., 2019), nicméně k jejímu možnému použití je ještě dlouhá cesta. Pro vývoj jak nového chemoterapeutika, tak vakcíny proti pneumokoku je nezbytné zkoumat jeho fyziologii a procesy, jako je buněčné dělení, jehož regulátorem je StkP, na molekulární úrovni.



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

Snímek byl pořízen pomocí elektronového mikroskopu FEI Nova NanoSem 450 v Laboratoři charakterizace molekulární struktury Mikrobiologického ústavu v Praze (Oldřich Benada a Olga Kofroňová). Měřítko 1  $\mu\text{m}$ .



## 2.2 Výběr místa dělení u různých bakterií

Základem života, tak jak ho známe, je růst buněk a jejich následné dělení. Buněčné dělení je přísně regulovaným procesem a to jak v čase, tak prostorově. Přísná regulace zajišťuje vznik dceřiných buněk o stejné velikosti, ale i správné rozdělení genetického materiálu. Důležitou otázkou stále zůstává, jak bakteriální buňky identifikují místo, ve kterém následně probíhá buněčné dělení.

Prvním proteinem, který lokalizuje v místě buněčného dělení u bakterií, je vysoce konzervovaný tubulinu podobný protein FtsZ. Ten v místě buněčného dělení polymerizuje a vytváří tzv. Z-kruh, ke kterému se následně váží všechny další známé dělicí proteiny a společně tvoří proteinový komplex neboli divisom. Divisom zajišťuje stavbu dělicí přepážky syntézou peptidoglykanu a společně v koordinaci s hydrolasami dochází k oddělení nově vzniklých dceřiných buněk (Adams a Errington, 2009; Haeusser a Margolin, 2016). Důležité je, že Z-kruh označuje místo buněčného dělení, a tedy proteiny, o nichž je známo, že ovlivňují jak výběr místa buněčného dělení u bakterií, tak činí právě pomocí regulace vzniku Z-kruhu.

Prostorová regulace buněčného dělení u bakterií je předmětem výzkumu již několik desetiletí. Velice dobře byla zkoumána u dvou modelových organismů tyčinkovitého tvaru, *E. coli* a *B. subtilis*, z čehož vznikl obecný předpoklad, že místo dělení je určeno pomocí dvou negativních regulačních systémů, Min a chromosomální okluze NO (Nucleoid Occlusion). Tyto systémy brání vzniku Z-kruhu kdekoli jinde v buňce vyjma jejího středu (obr. 2-2). Nicméně další výzkumy ukazují, že nejen u modelových organismů, *E. coli* a *B. subtilis*, je místo buněčného dělení regulováno i dalšími mechanismy (Monahan et al., 2014; Rowlett a Margolin, 2015), ale dokonce bylo zjištěno, že u mnoha bakterií se vyvinuly odlišné systémy výběru místa dělení, které reflektují jejich specifický tvar či životní cyklus.

V následujících podkapitolách budou uvedeny systémy nebo jednotlivé proteiny, označované také jako regulátory, které regulují vznik Z-kruhu u různých bakterií. Systémy i regulátory rozdělují na negativní či pozitivní, dle jejich účinku na vznik Z-kruhu. Negativní regulátory obecně brání vzniku Z-kruhu v celé buňce kromě buněčného středu a naopak pozitivní regulátory označují místo buněčného dělení či dokonce bylo prokázáno, že svou vazbou s FtsZ podporují jeho polymeraci a tedy vznik Z-kruhu.

### 2.2.1 Negativní regulační systémy Min a NO u *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*

Chromosomální okluze (NO) zabraňuje sestavení Z-kruhu přes nukleoid nebo chromosom (obr. 2-2) (Wu a Errington, 2012). NO je zprostředkována přinejmenším částečně nehomologními proteiny Noc u *B. subtilis* (Wu a Errington, 2004; Wu et al., 2009) a SlmA u *E. coli* (Bernhardt a De Boer, 2005; Cho et al., 2011; Tonthat et al., 2011, 2013), přičemž každý z nich se váže k DNA přes odlišná specifická vazebná místa a zprostředkovává NO jiným mechanismem. Nutno podotknout, že vazebná místa pro Noc i SlmA se nevyskytují nebo pouze zřídka na chromosomu v oblasti terminu (Wu et al., 2009; Cho et al., 2011; Tonthat et al., 2011), přičemž toto místo se nachází uprostřed buňky během pozdní fáze replikace chromosomů a jejich segregace. Segregace chromosomů tedy vytváří oblast bez NO, což umožňuje vytvoření Z-kruhu v buněčném středu (obr. 2-2).

DNA vazebný protein SlmA *E. coli* se ke specifickým DNA sekvencím váže jako orientovaný dimer, který interaguje s konzervovanou C-terminální doménou (CTD) proteinu FtsZ, čímž zabraňuje tvorbě protofilament a svazků FtsZ (Tonthat et al., 2013; Du a Lutkenhaus, 2014; Schumacher a Zeng, 2016). Studie ternárního komplexu SlmA-DNA-CTD FtsZ překvapivě odhalila, že CTD FtsZ s proteinem SlmA neinteraguje v prostorovém uspořádání helixu, ale ve formě rozšířené konformace v úzké, povrchově exponované kapse. V této konformaci se CTD FtsZ vyskytuje pouze ve stavu vázaném se SlmA-DNA. Toto pozorování podtrhuje schopnost CTD FtsZ přijímat širokou škálu konformací, což vysvětluje jeho schopnost vázat se s různými regulačními proteiny u různých bakterií (Schumacher a Zeng, 2016). Zajímavé je, že zvýšená fragmentace FtsZ vlivem působení SlmA nijak neovlivňuje jeho GTPasovou aktivitu (Cabré et al., 2015).

Protein Noc u *B. subtilis* se podobně jako SlmA váže ke specifickým sekvencím DNA, nicméně mechanismus působení je odlišný. Noc se prostřednictvím svého N-terminálního amfipatického helixu váže na buněčnou membránu, kam současně rekrutuje specifické sekvence DNA za tvorby nukleoproteinových komplexů. Ty fyzicky brání sestavení divisomu (Adams et al., 2015).

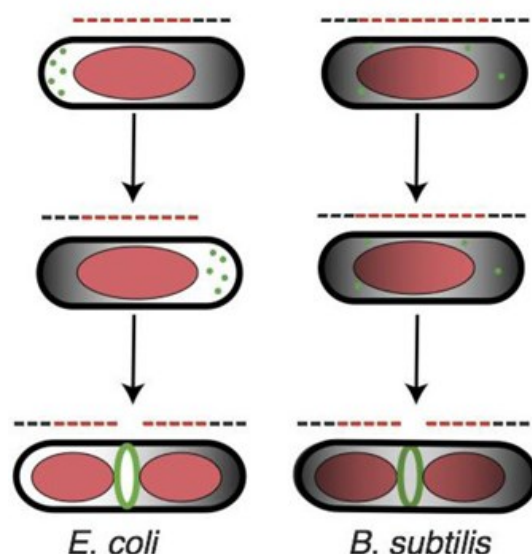
Min systém brání sestavení Z-kruhu na pólech buněk inhibicí polymerace FtsZ (obr. 2-2). V případě, kdy jsou proteiny tohoto systému deletovány nebo jsou nefunkční, může dojít k tvorbě Z-kruhu jak ve středu buňky, tak i na buněčných pólech, což vede k tvorbě minibuněk a buněk různých délek (de Boer et al., 1989; Yu a Margolin, 1999). Protein MinD patří do rodiny ParA

ATPas. Po navázání ATP dimerizuje a váže se k cytoplazmatické membráně. Po navázání na MinD, MinC dimerizuje, zároveň se aktivuje a interaguje s FtsZ. Přičemž MinC antagonizuje podélné interakce podjednotek FtsZ v protofilamentu, laterální interakce mezi FtsZ protofilamenty a také brání interakcím FtsZ se stabilizačními proteiny FtsA a ZipA (Arumugam et al., 2014). Aby nedošlo k sestavení Z-kruhu na buněčných pólech, je zapotřebí topologického faktoru, který prostorově omezí inhibiční komplex MinCD a jeho funkci právě na buněčné póly.

V buňkách *E. coli*, které postrádají protein MinE, se komplex MinCD váže na membránu a inhibuje tvorbu Z-kruhu ve všech místech buňky, což vede k letální filamentaci (de Boer et al., 1989). MinE na svém N-konci obsahuje amfipatický helix, který slouží jako sekvence cílicí do membrány neboli MTS (Membrane Targeting Sequence). Pro funkci MTS je důležitá přímá membránová interakce (Ma et al., 2003; Hsieh et al., 2010). Jakmile dimery MinE rozpoznají MinD, změni konformaci, váží se s MinD, uvolňují MinC z komplexu MinCD a stimuluji ATPasovou aktivitu MinD. Ta způsobí monomerizaci MinD a jeho uvolnění z membrány (Park et al., 2011; Bonny et al., 2013). Po uvolnění z membrány se MinD-ADP regeneruje na MinD-ATP a následně se váže do membrány (Huang et al., 2003). Má však tendenci se vázat do membrány co nejdále od původního místa, protože MinE může díky MTS zůstat navázaný v membráně na původním místě (Loose et al., 2011; Park et al., 2011). Zde, předtím než změní svou konformaci a bude migrovat na opačný pól, může MinE odstranit další komplexy MinCD, včetně těch, které se opětovně navázaly (Park et al., 2011). Výzkumy konformační dynamiky MinE naznačují, že právě MTS umožňuje MinE interagovat s membránou dynamicky a reverzibilně, což vytváří a zajišťuje oscilaci Min systému u *E. coli* (Park et al., 2017). A zatímco Min proteiny oscilují mezi buněčnými póly, proteiny, které jsou součástí divisomu v časném stádiu buněčného dělení, FtsZ, ZipA, ZapA a ZapB, také oscilují se stejnou periodou, ale v opačném směru než Min proteiny. Nicméně tento jev je pravděpodobně způsoben periodickým sestavováním a rozkládáním Z-kruhu v odezvě na oscilační vlny MinC a faktu, že lokalizace ZipA, ZapA a ZapB je závislá na lokalizaci FtsZ (Bisicchia et al., 2013).

U *B. subtilis* se místo proteinu MinE nachází protein DivIVA. DivIVA preferenčně lokalizuje v buněčných pólech na základě schopnosti rozpoznat specifické zakřivení membrány v těchto místech, a to jak u široké škály druhů bakterií, tak i u kvasinek (Edwards et al., 2000; Lenarcic et al., 2009). Mezi polárně vázaným DivIVA a komplexem MinCD působí jako adaptorový protein MinJ. MinJ se efektivně váže s MinD a rekrutuje ho do buněčného pólu, kde

je již navázaný DivIVA. MinC vázaný na MinD působí jako inhibitor Z-kruhu, podobně jako u *E. coli*, s tím rozdílem, že u *B. subtilis* jsou Min proteiny staticky vázány do buněčného pólu pomocí DivIVA (Bramkamp et al., 2008; Patrick a Kearns, 2008; Eswaramoorthy et al., 2011). DivIVA i Min proteiny také lokalizují v dělicí přepážce před septací a tvorbou buněčných pólů. Přičemž se předpokládá, že zde brání vytvoření více než jednoho Z-kruhu a hrají roli při vytváření nového bipolárního gradientu v dceřiných buňkách (Gregory et al., 2008; van Baarle a Bramkamp, 2010).



**Obr. 2-2: Schématické znázornění regulace vzniku Z-kruhu u *E. coli* a *B. subtilis* negativními systémy NO a Min.**

Převzato z Haeusser a Margolin, 2016. černá barva: **Min systém** oscilující u *E. coli* nebo vázaný u *B. subtilis*; červená barva: **NO**; (-): oblast negativní regulace vzniku Z-kruhu.

### 2.2.2 Negativní regulátor MipZ u *Caulobacter crescentus*

*Caulobacter crescentus* je gram-negativní bakterie, která stejně jako mnoho jiných bakteriálních druhů postrádá NO i Min systém. Tvorba Z-kruhu u této bakterie je řízena tzv. bipolárním gradientem inhibitoru FtsZ nazývaným MipZ (obr. 2-3). MipZ patří do stejné rodiny ATPas jako MinD, ale na rozdíl od MinD je schopen přímo s FtsZ interagovat a tím inhibovat sestavení Z-kruhu. MipZ je konzervovaný u všech  $\alpha$ -proteobakterií, které postrádají orthology MinCD (Thanbichler a Shapiro, 2006).

Bipolární gradient MipZ vzniká v závislosti na interakci s chromosomálním dělicím proteinem ParB, který lokalizuje na buněčném pólu prostřednictvím asociace s počátkem

replikace *oriC*. Interakce s ParB spouští tvorbu dimerů MipZ, které difundují pryč a nespecificky se vážou na chromosom. Tím vzniká klesající gradient MipZ směrem od buněčného pólu, kde je koncentrace MipZ největší. Zajímavé je, že ATPasová aktivita MipZ uvolňuje z chromosomu monomery MipZ, které jsou schopné se opětovně vázat s ParB (Kiekebusch et al., 2012).

Nutno podotknout, že MipZ poskytuje jak prostorové, tak časové signály k tvorbě Z-kruhu bez nutnosti odděleného systému NO. U nově vzniklých dceřiných buněk *C. crescentus*, které obsahují pouze jeden počátek replikace, je tvořen klesající gradient pouze z jednoho buněčného pólu, což udává polohu FtsZ na druhý pól, nejdále od MipZ (obr. 2-3). Po replikaci chromosomu migruje duplikovaný *oriC* na opačný buněčný pól a vytváří bipolární gradient MipZ, který uvolňuje FtsZ z pólu a omezuje tvorbu Z-kruhu na buněčný střed (obr. 2-3) (Kiekebusch et al., 2012).



**Obr. 2-3: Schématické znázornění regulace vzniku Z-kruhu u *C. crescentus* proteinem MipZ.**

Převzato z Monahan et al., 2014, fialová barva: **MipZ**; zelená barva **FtsZ**.

### 2.2.3 Systém pozitivní regulace SsgAB a SepG u *Streptomyces coelicolor*

Ve sporulujících buňkách *Streptomyces coelicolor*, jenž také postrádá oba systémy Min a NO, je do místa dělení protein FtsZ lokalizován a vázán pomocí membránově asociovaného proteinu SsgB (obr. 2-4) (Willemse et al., 2011). SsgB podporuje polymeraci FtsZ *in vitro* a pravděpodobně stimuluje sestavení Z-kruhu i u buněk *S. coelicolor*. Lokalizace SsgB v buňce je zprostředkována pomocí vazby s proteinem SsgA (Traag a van Wezel, 2008; Willemse et al., 2011). Studie provedené u *S. coelicolor* ukazují, že lokalizace proteinů SsgAB je nezávislá na proteinu FtsZ (McCormick et al., 1994; Willemse et al., 2011). Zajímavostí je, že systém SsgAB byl prvním objeveným pozitivním mechanismem, který určuje pozici Z-kruhu (Willemse et al., 2011). Nicméně oba proteiny SsgAB se vyskytují pouze u Aktinomycet.

Ačkoliv systém SsgAB pozitivně reguluje vznik Z-kruhu, stále přetrvávala otázka, jakým mechanismem je dosaženo vysoce symetrické vzdálenosti mezi jednotlivými sporulačními septy a tedy, jak je lokalizace samotného SsgB řízena. Ve studii Zhang et al. (2016) ukazují, že membránový protein SepG (YlmG) je nezbytný pro lokalizaci SsgB v budoucích místech dělení,

kam SsgB následně lokalizuje FtsZ. Zatímco SsgB a FtsZ zůstávají součástí divisomu, SepG z tohoto místa odchází, přičemž další data naznačují, že se přemísťuje a stává se součástí komplexu zajišťujícího syntézu buněčné stěny. SepG má ještě další funkci, kdy v pozdějším stádiu vývoje spor pomáhá udržovat tvar nukleoidu.

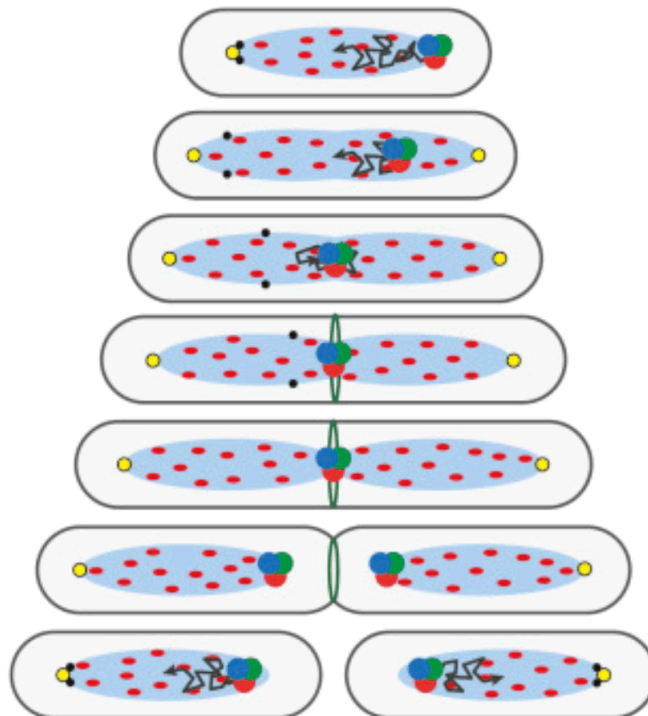


**Obr. 2-4:** Schématické znázornění regulace vzniku Z-kruhu u sporulujících buněk *S. coelicolor* pozitivním systémem SsgAB.

Převzato z Monahan et al., 2014, tmavě modrá barva: SsgB; zelená barva: FtsZ.

#### 2.2.4 Systém pozitivní regulace PomXYZ u *Myxococcus xanthus*

*Myxococcus xanthus* patří mezi tyčinkovité  $\delta$ -proteobakterie, které postrádají všechny známé regulátory Z-kruhu. U bakterie *M. xanthus* byl identifikován soubor tří proteinů PomX, PomY a PomZ, které zodpovídají za správnou lokalizaci FtsZ a tvorbu Z-kruhu ve středu buňky (Treuner-Lange et al., 2013; Schumacher a Søgaard-Andersen, 2017; Schumacher et al., 2017). PomZ je ATPasa, která patří do rodiny ParA/MinD ATPas (Lutkenhaus, 2012). Ve svém dimerním, ATP-vázaném stavu se nespecificky váže k DNA a jeho aktivita je stimulována interakcí s PomX, PomY a DNA. PomX a PomY, zjednodušeně modelově, tvoří jediný klastr, který je k nukleoidu vázán právě pomocí dimerů PomZ. Počínaje polohou mimo buněčný střed, blízko jednoho pólu nukleoidu, se klastr pohybuje směrem ke středu nukleoidu, který se shoduje se středem buňky (Schumacher et al., 2017). Když klastr dojde do středu buňky, vytvoří se na tomto místě Z-kruh a buňka se rozdělí. Během buněčného dělení se klastr rozděluje na dvě poloviny, takže každá polovina je umístěna na jednom pólu nukleoidu každé dceřiné buňky a cyklus se opakuje (obr. 2-5). Zajímavé je, že všechny tři proteiny PomXYZ lokalizují ve středu buňky před příchodem FtsZ, ale i v jeho nepřítomnosti (Treuner-Lange et al., 2013; Schumacher et al., 2017).



**Obr. 2-5: Schématické znázornění regulace vzniku Z-kruhu u *M. xanthus* pozitivním systémem PomXYZ.**

Převzato z Schumacher et al., 2017; trojice kruhů z tmavě modré, zelené a červené barvy: **PomXYZ**; červený ovál: **PomZ vázaný k nukleoidu**; zelená elipsa: **Z-kruh**; žlutý bod: ParB/parS (*oriC*); černý bod: **počátek replikace**; světle modrá barva: **nukleoid**; černá čára ukončená šipkou: **trajektorie PomXYZ**

### 2.2.5 Pozitivní regulátor PlpP u *Corynebacterium glutamicum*

Ačkoliv tyčinkovitá aktinobakterie *Corynebacterium glutamicum* postrádá oba systémy Min a NO, produkuje homolog proteinu ParA, PlpP, který pravděpodobně hraje úlohu v lokalizaci Z-kruhu. PlpP v časně fázi buněčného cyklu lokalizuje v buněčném středu. Jeho inaktivace má za následek zvýšenou variabilitu délky buněk, které jsou buď příliš krátké nebo příliš dlouhé, a tvorbu minibuněk (Donovan et al., 2010).

## 2.3 Buněčné dělení u *Streptococcus pneumoniae*

Buněčné dělení vyžaduje koordinaci mnoha procesů, jako je replikace a segregace chromosomů, výběr místa buněčného dělení a nakonec syntéza a remodelace peptidoglykanu v buněčné stěně (Engholm et al., 2017).

*S. pneumoniae* patří mezi gram-pozitivní bakterie a vyznačuje se specifickým, tzv. ovoidním tvarem buněk, stejně jako ostatní streptokoky, enterokoky či laktokoky. Ovoidní bakterie se vždy dělí ve stejné rovině kolmé k dlouhé ose buňky, podobně jako tyčinkovité bakterie. Avšak patří do skupiny bakterií, které postrádají oba systémy Min a NO, a proto způsob, jakým určují místo vzniku buněčné přepážky, nebyl dosud plně objasněn (Zapun et al., 2008). Přesto některé základní cytotkinetické mechanismy probíhající u streptokoků jsou podobné těm, které byly a jsou i nadále zkoumány u dvou hlavních modelových organismů tyčinkovitého tvaru, *E. coli*, jakožto zástupce gram-negativních bakterií a *B. subtilis*, jakožto zástupce gram-pozitivních bakterií (Xiang et al., 2019). Navíc *S. pneumoniae* obsahuje ve svém genomu jedinou Ser/Thr proteinkinasu StkP, která je regulátorem buněčného dělení. Z těchto důvodů se *S. pneumoniae* stal vhodným modelovým organismem ke zkoumání mechanismu buněčného dělení u ovoidních bakterií.

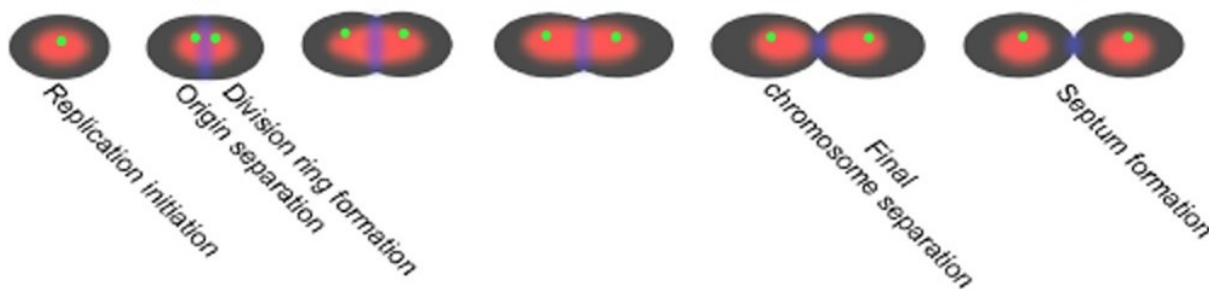
### 2.3.1 Segregace chromosomů u *S. pneumoniae*

Dosud není zcela jasné, jak ovoidní bakterie, jako je *S. pneumoniae*, *E. faecalis* či *L. lactis*, organizují a segregují své chromosomy. U *S. pneumoniae* je segregace chromosomů postupným procesem, který trvá dvě třetiny buněčného cyklu, a konečné oddělení chromosomů nastává těsně před uzavřením dělicí přepážky (Kjos a Veening, 2014). To potvrzuje pozorovaný jev, kdy dochází k sestavování Z-kruhu nad nesegregovanými chromosomy (obr. 2-6) (Land et al., 2013).

U *S. pneumoniae* se na segregaci chromosomů podílejí následující dosud objevené systémy a proteiny: ParB-*parS* nukleoproteinový komplex, systém SMC-ScpAB, protein RocS, FtsK a rekombinasa XerD. ParB je DNA vazebný protein, který specificky rozeznává *parS* místa vyskytující se v blízkosti počátku replikace. SMC (Structural Maintenance of Chromosome) kondensin tvoří komplex se dvěma dalšími proteiny, ScpA a ScpB (Mascarenhas et al., 2002). Předpokládá se, že tento komplex přispívá k segregaci chromosomů zhuťováním a organizováním DNA, ačkoliv přesný mechanismus nebyl zatím objasněn. SMC-ScpAB je rekrutován k *parS* místům pomocí ParB (Minnen et al., 2011). Také se ukazuje, že SMC hraje důležitou roli v organizaci a rozdělení počátků replikace a dokonce brání formování septa v oblasti nesegregovaných chromosomů (Kjos a Veening, 2014). Oproti *B. subtilis* není pro *S. pneumoniae* ParB ani SMC kondensin esenciální. Delece *parB* či *smc* způsobuje defekty



v segregaci chromosomů, přičemž je pozorováno 1 – 4 % anukleovaných buněk (Minnen et al., 2011; Kjos a Veening, 2014). Nedávno objevený membránový protein RocS interaguje jak s chromosomální DNA, tak s proteinem ParB. Delece *rocS* vede ke vzniku buněk, které vykazují defekty v segregaci chromosomů nebo jsou zcela anukleované. Navíc RocS interaguje s proteinem buněčného dělení FtsZ a brání buněčnému dělení (Mercy et al., 2019). Mezi další interakční partnery RocS patří tyrosinová kinasa CpsD (Mercy et al., 2019), která hraje úlohu v syntéze polysacharidového pouzdra. Nefosforylovaná forma CpsD způsobuje defekty v syntéze pouzdra v místě buněčného dělení, elongaci buněk a defekty v segregaci chromosomů. Také bylo zjištěno, že je CpsD strukturně homologní s ParA ATPasou, která u pneumokoka nebyla identifikována. CpsD interaguje s ParB a moduluje jeho mobilitu. Tato pozorování naznačují, že CpsD funguje jako signální systém koordinující syntézu polysacharidů pouzdra se segregací chromosomů, čímž je zajištěno, že dceřiné buňky jsou řádně chráněny (Nourikyan et al., 2015). Konečné rozštěpení chromosomálních dimerů zajišťuje rekombinasa XerD v interakci s FtsK. FtsK je membránově vázaná ATP-dependentní DNA translokasa, která zajišťuje rychlý usměrněný pohyb chromosomu. Jedná se o vysoce konzervovaný protein u různých druhů bakterií (Bigot et al., 2004; Stouf et al., 2013). U *L.lactis* lokalizuje do místa buněčného dělení (Le Bourgeois et al., 2007) a u *S. pneumoniae*, podobně jako u *E. coli* či *B. subtilis*, je řazen též mezi proteiny buněčného dělení (Massidda et al., 2013). Nicméně se ukazuje, že segregace chromosomů je mnohem komplexnější děj, jehož správný průběh je závislý dokonce i na transkripci, ačkoliv přesný mechanismus není zatím znám (Kjos a Veening, 2014).



**Obr. 2-6: Schématické znázornění tvorby septa přes nesegregované chromosomy u *S. pneumoniae* v průběhu buněčného cyklu.**

Převzato z Kjos a Veening, 2014. zelený bod: *oriC*; červená barva: **chromosom**; modrofialová barva: **dělicí přepážka**.

### 2.3.2 Syntéza buněčné stěny u *S. pneumoniae*

Buněčná stěna zastává tři hlavní funkce, které jsou nezbytné k přežití všech bakterií s buněčnou stěnou. Za prvé udává a udržuje tvar buňky. Dále chrání buňky před lyzí v důsledku vnitřního turgoru a nakonec ukotvuje povrchové proteiny a pouzdrné polysacharidy (Vollmer a Bertsche, 2008). Hlavní komponentou buněčné stěny je peptidoglykan (PG). Jedná se o heteropolymer složený z dlouhých glykanových řetězců spojených krátkými peptidy (Barreteau et al., 2008). Za polymeraci PG zodpovídají tzv. penicilin vazebné proteiny (PBPs) a jejich mutace má za následek rozvoj rezistence k antibiotikům (Hakenbeck et al., 2012). *S. pneumoniae* kóduje šest PBPs. PBP1a, PBP1b a PBP2a s glykosyltransferasovou a transpeptidasovou aktivitou patří do skupiny A HMM (High Molecular Mass). PBP2b a PBP2x patří do skupiny B HMM a mají pouze transpeptidasovou aktivitu. Poslední PBP3 (DacA) samostatně vytváří skupinu C LMM (Low Molecular Mass). PBP3 je na rozdíl od ostatních D, D-karboxypeptidasou a lokalizuje rovnoměrně po celém buněčném povrchu (obr. 2-7) (Barendt et al., 2011).

V průběhu buněčného dělení dochází nejen k syntéze buněčné stěny, ale také k její remodelaci, za kterou u pneumokoka zodpovídají mimo jiné peptidoglykanové hydrolasy PcsB (Sham et al., 2011) a LytB (De Las Rivas et al., 2002). Tyto dvě hydrolázy zajišťují oddělení dceřiných buněk ve správnou dobu (obr. 2-7). Pro správnou funkci PcsB je nezbytná interakce s komplexem proteinů buněčného dělení FtsEX (Sham et al., 2011; Bartual et al., 2014).

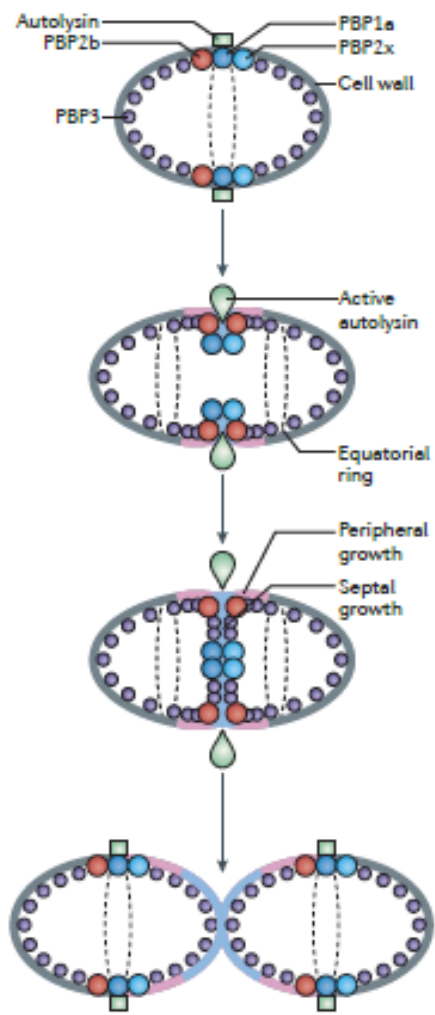
*S. pneumoniae* dosahuje svého specifického tvaru pomocí dvou proteinových komplexů syntetizujících PG. První, nazývaný elongasom, zodpovídá za syntézu periferního PG a tedy za vlastní elongaci buňky. Druhý komplex, zvaný divisom, zodpovídá za stavbu buněčné přepážky. U tyčinkovitých bakterií tyto dva proteinové komplexy nekolokalizují, zatímco u ovoidních bakterií se ukazuje, že s největší pravděpodobností kolokalizují v místě tvorby buněčné přepážky (Zapun et al., 2008; Massidda et al., 2013; Pinho et al., 2013; Engholm et al., 2017). Místo buněčného dělení u *S. pneumoniae* je označeno doposud jedinou známou strukturou nazývanou ekvatoriální kruh (Higgins a Shockman, 1970), který se v nově vzniklé dceřině buňce nalézá uprostřed buňky, tedy v místě s největším průměrem. Brzy poté, co je započato buněčné dělení, dojde po stranách původního kruhu k vytvoření dvou nových ekvatoriálních kruhů, které se od sebe navzájem začnou oddalovat v závislosti na syntéze periferního PG. Jakmile dojde k vytvoření nových hemisfér buněk, ekvatoriální kruhy se opět nalézají ve středu každé z buněk,

kde značí místo budoucího buněčného dělení (obr. 2-7) (Higgins a Shockman, 1970; Wheeler et al., 2011). Divisom a elongasom *S. pneumoniae* je stručně popsán v následujících odstavcích. Přehled jednotlivých proteinů buněčného dělení a jejich funkce je uveden v tabulce 2-1.

Sestavení divisomu se skládá přinejmenším ze dvou fází - rané a pozdní. V první fázi dochází k sestavení a stabilizaci Z-kruhu. Z-kruh vzniká polymerací vysoce konzervovaného, eukaryotickému tubulinu podobného proteinu FtsZ, který se díky své GTPasové aktivitě skládá do kruhové struktury (Bi a Lutkenhaus, 1991). Dále s FtsZ interaguje další časný protein buněčného dělení FtsA (Lara et al., 2005). Ten tvoří protofilamenta podobná aktinu (Szwedziak et al., 2012) a pomocí amfipatického helixu v C-koncové doméně se váže k cytoplazmatické membráně, čímž Z-kruh stabilizuje (van den Ent a Löwe, 2000; Pichoff a Lutkenhaus, 2005). Z-kruh je u *S. pneumoniae* dále stabilizován pomocí proteinů EzrA (Massidda et al., 2013; Rued et al., 2017), ZapA (Maggi et al., 2008), ZapB (Massidda et al., 2013) a SepF (Fadda et al., 2003). V druhé fázi nasedají na stabilizovaný Z-kruh další proteiny divisomu, a to regulátor buněčného dělení StkP (Beilharz et al., 2012) a následně pozdní proteiny buněčného dělení DivIB (FtsQ), DivIC (FtsB), FtsL, FtsW, PBP2x, PBP1a (Morlot et al., 2003, 2004; Noirclerc-Savoye et al., 2005) a DivIVA (Fadda et al., 2007). Důležité je zmínit, že časný proteiny buněčného dělení FtsZ, FtsA a stabilizační protein EzrA přecházejí do budoucích míst dělení značených ekvatoriálními kruhy již během konstriktce septa, ve kterém zároveň zůstávají až do jeho uzavření (Morlot et al., 2003; Lara et al., 2005; Perez et al., 2018).

Na rozdíl od tyčinkovitých bakterií, *S. pneumoniae*, stejně tak jako většina ovokoků, postrádají protein MreB a elongasom je složen z následujících proteinů MreC, MreD (Land a Winkler, 2011), PBP2b, PBP1a (Morlot et al., 2004), RodA, RodZ (Massidda et al., 2013) a GpsB (Massidda et al., 1998). Avšak oba proteinové komplexy, elongasom i divisom, sestávají i z dalších proteinů, jejichž charakterizace probíhají nebo ještě nebyly identifikovány. Dokonce se ukazuje, že některé proteiny jsou důležité pro správnou funkci obou proteinových komplexů, jako např. adaptorový protein GpsB, který pravděpodobně spolu s StkP funguje jako “přepínač“ mezi septální a periferní syntézou PG (Beilharz et al., 2012; Rued et al., 2017) či protein DivIVA, který je proteinem divisomu, ale je potřebný pro správnou lokalizaci elongasomu (Straume et al., 2017). Protein PBP1a je dokonce uváděn jako součást obou proteinových komplexů (Land a Winkler, 2011), což naznačuje, že elongasom a divisom nejen kolokalizují v místě buněčné

přepážky, ale tvoří společný multiproteinový komplex. Přehled proteinů elongasomu a divisomu je v tabulce 2-1.



**Obr. 2-7:** Schématické znázornění buněčného dělení u *S. pneumoniae*.

Převzato z Pinho et al., 2013

<b>Protein</b>	<b>Funkce</b>	<b>Lokalizace</b>	<b>Citace</b>
<b><i>Divisom</i></b>			
FtsZ	strukturní homolog tubulinu tvořící Z-kruh, GTPasa	septum, v pozdější fázi buněčného dělení septum a ekvatoriální kruhy	Lara et al., 2005; Perez et al., 2018
FtsA	strukturní homolog aktinu, vazbou do membrány stabilizuje Z-kruh	septum, v pozdější fázi buněčného dělení septum a ekvatoriální kruhy shodně s FtsZ	Lara et al., 2005; Mura et al., 2017; Perez et al., 2018
ZapA	stabilizační protein Z-kruhu	nedefinováno	Massidda et al., 2013
ZapB	stabilizační protein Z-kruhu	nedefinováno	Massidda et al., 2013
SepF (YlmF)	stabilizační protein Z-kruhu, jehož funkce se překrývá s funkcí FtsA	septum	Fadda et al., 2003; Mura et al., 2017
EzrA	stabilizační protein Z-kruhu, který moduluje frekvenci a pozici formování Z-kruhu	septum, v pozdější fázi buněčného dělení septum a ekvatoriální kruhy shodně s FtsZ	Rued et al., 2017; Perez et al., 2018
FtsE, X	ABC transportér, vyžadován pro správnou lokalizaci a aktivaci PcsB	septum	Sham et al., 2011, 2013
FtsK (SpoIIIE)	koordinace buněčného dělení se segregací chromosomů	septum	Massidda et al., 2013
DivIB (FtsQ)	stabilizace či podpora sestavení dělicího komplexu	septum	Le Gouëllec et al., 2008; Masson et al., 2009; Noirclerc-Savoie et al., 2013
DivIC (FtsB)	stabilizace či podpora sestavení dělicího komplexu	septum	Masson et al., 2009; Noirclerc-Savoie et al., 2013
FtsL	pravděpodobná úloha v septální syntéze PG	septum	Masson et al., 2009; Noirclerc-Savoie et al., 2013
FtsW	PG glykosyltransferasa, septální syntéza PG	septum	Morlot et al., 2004; Meeske et al., 2016
PBP2x (FtsI)	PG transpeptidasa, remodelace a septální syntéza PG	septum	Morlot et al., 2004; Tsui et al., 2014; Sharifzadeh et al., 2017
PBP1a	PG glykosyltransferasa a transpeptidasa, syntéza septálního a periferního PG	septum	Morlot et al., 2004; Land a Winkler, 2011
PBP2a	PG glykosyltransferasa a transpeptidasa, syntéza septálního PG?	septum	Rued et al., 2017; Fenton et al., 2018
MacP	membránově vázaný kofaktor PBP2a	septum	Fenton et al., 2018
DivIVA	protein divisomu, vyžadován pro správnou lokalizaci elangosomu mezi septální a laterální buněčnou stěnou	septum a buněčné póly	Fadda et al., 2003, 2007; Straume et al., 2017
PcsB	PG hydrolasa, remodelace PG a rozdělení dceřiných buněk	septum	Sham et al., 2011; Bartual et al., 2014
LytB	PG hydrolasa, rozdělení dceřiných buněk	buněčné póly	De Las Rivas et al., 2002; Zucchini et al., 2018

Pmp23	hydrolasa buněčné stěny, pravděpodobně důležitá pro správnou lokalizaci Z-kruhu a LocZ/MapZ	septum	Jacq et al., 2018
<b><i>Elongasom</i></b>			
MreC, D	regulace periferní syntézy PG, kontrola lokalizace a aktivity PBP1a	septum, v pozdější fázi buněčného dělení septum a ekvatoriální kruhy	Land a Winkler, 2011; Stamsås et al., 2017
RodZ	periferní syntéza PG, kontrola aktivity PBP1a a MltG	nedefinována	Tsui et al., 2016; Stamsås et al., 2017
RodA	PG glykosyltransferasa, periferní syntéza PG	septum	Meeske et al., 2016; Stamsås et al., 2017
PBP2b	PG transpeptidasa, periferní syntéza PG	septum	Morlot et al., 2004; Sharifzadeh et al., 2017; Straume et al., 2017
PBP1a	PG glykosyltransferasa a transpeptidasa, syntéza septálního a periferního PG	septum	Morlot et al., 2004; Land a Winkler, 2011
GpsB	adaptorový protein, balancuje syntézu periferního a septálního PG	septum	Massidda et al., 2013; Rued et al., 2017
CozE	usměrňuje aktivitu PBP1a do středu buňky	septum	Fenton et al., 2016
MltG	funkční homolog endolytické transglykolasy <i>E. coli</i> účastníci se periferní syntézy PG	septum, v pozdější fázi buněčného dělení septum a ekvatoriální kruhy shodně s MreCD	Tsui et al., 2016
<b><i>Signalizace/regulace</i></b>			
StkP	Ser/Thr proteinkinasa, regulátor buněčného dělení	septum, v poslední fázi buněčného dělení septum a ekvatoriální kruhy shodně s FtsZ	Giefing et al., 2010; Beilharz et al., 2012; Fleurie et al., 2012
PhpP	Ser/Thr proteinfosfataza, regulátor buněčného dělení	septum	Osaki et al., 2009; Ulrych et al., 2016
EloR/KhpB/Jag	regulace elongace	cytoplazma - obohacen v septu a v pozdější fázi buněčného dělení v septu a ekvatoriálních kruzích	Ulrych et al., 2016; Jarošová 2017; Stamsås et al., 2017
PBP3 (DacA)	D,D-karboxypeptidasa, substrátem jsou pentapeptidy PG	celý buněčný povrch	Morlot et al., 2004, 2005
DacB	L,D-karboxypeptidasa, substrátem jsou tetrapeptidy PG	celý buněčný povrch	Barendt et al., 2011

**Tab. 2-1: Přehled proteinů elongasomu a divisomu u *S. pneumoniae***

Převzato a upraveno z Massidda et al., 2013 a Xiang et al., 2019.

## 2.4 Funkční signalizační pár: proteinkinasa StkP a proteinfosfataza PhpP

Prokaryota často využívají reverzibilní proteinové fosforylace zprostředkované pomocí proteinkinasy a proteinfosfatas k přenosu signálu v průběhu buněčného cyklu a odpovědi na změny v prostředí. Nejobvyklejším typem bakteriálních signalizačních systémů jsou

dvoukomponentové systémy (TCS) složené z histidinové kinasy a příslušného regulačního proteinu (Stock et al., 2000). Avšak Ser/Thr proteinkinasy (ESTK) a fosfatasy (ESTP) eukaryotického typu byly prokázány u mnohých bakteriálních druhů, ve kterých regulují různé buněčné děje, jako je větvení hyf u *S. coelicolor* (Hempel et al., 2012), germinace spor u *B. subtilis* (Shah et al., 2008), antimikrobiální rezistence u *E. faecalis* (Kristich et al., 2007) či formování plodnic u *M. xanthus* (Muñoz-Dorado et al., 1991). U tyčinkovitých bakterií, které ve svém genomu nekódují hlavní regulátor periferní syntézy PG MreB jako např. *M. tuberculosis* nebo *C. glutamicum*, regulují ESTK elongaci buněk (Fiuza et al., 2008; Mir et al., 2011). Stejně tak většina ovoidních bakterií postrádá protein MreB, ale kódují přinejmenším jednu ESTK, zatímco u koků jsou ESTK méně běžné (Pinho et al., 2013).

*S. pneumoniae* ve svém genomu obsahuje jediný gen pro Ser/Thr proteinkinasu eukaryotického typu StkP a jediný gen pro Ser/Thr proteinfosfatasu eukaryotického typu PhpP. Tyto geny se s čtyř nukleotidovým přesahem překrývají a jsou transkribovány ve formě jediné mRNA (Nováková et al., 2005). Proto je *S. pneumoniae* výborným modelovým organismem vhodným ke zkoumání funkce těchto enzymů a jejich signalizačních drah.

StkP patří do konzervované rodiny transmembránových Ser/Thr proteinkinasy eukaryotického typu s PASTA (Penicillin-binding protein And Serine/Threonine kinase Associated) doménami (Yeats et al., 2002). StkP je transmembránovou doménou rozdělena na cytoplazmatickou část, která obsahuje katalytickou doménu, a senzorem extracelulární část složenou ze čtyř opakování PASTA domén (Nováková et al., 2005). PASTA domény jsou nezbytné pro vlastní aktivitu StkP, její schopnost autosfosforylace a následnou fosforylaci substrátů *in vivo*, ale i pro lokalizaci v buněčném středu (Pallová et al., 2007; Nováková et al., 2010). Bylo prokázáno, že PASTA domény vážou *in vitro* i *in vivo* podjednotky peptidoglykanu, přičemž je tato vazba druhově specifická (Maestro et al., 2011; Beilharz et al., 2012). V recentní studii Zucchini et al. (2017) ukázali, že PASTA domény StkP modulují tloušťku stěny septa i stupeň aktivace StkP. Také navrhli model, ve kterém jsou první tři PASTA domény vyžadovány k aktivaci StkP a zároveň nutné ke správnému umístění nejvzdálenější čtvrté PASTA domény, která zodpovídá za lokalizaci StkP v septu a řídí konečnou separaci dceřiných buněk v interakci s hydrolasou LytB.

Pro životaschopnost *S. pneumoniae* není StkP esenciální, ačkoliv je zařazena mezi proteiny s globální regulační funkcí (Sasková et al., 2007). Ve virulentních kmenech má

inaktivace *stkP* za následek atenuaci virulence a u nevirulentních kmenů vede ke snížení kompetence a lyzi buněk (Echenique et al., 2004). Mutantní kmen  $\Delta$ *stkP* je citlivý k působení antibiotik a environmentálních stresů (teplotní, oxidativní, osmotický a nízké pH) (Sasková et al., 2007). Nicméně se ukazuje, že StkP je jedním z důležitých regulátorů buněčného dělení, který koordinuje syntézu buněčné přepážky s elongací buňky, což zajišťuje pneumokokovi jeho typický ovoidní tvar (Beilharz et al., 2012). Morfologicky se delece *stkP* projevuje tvorbou dlouhých buněk s četnými neuzavřenými Z-kruhy a naopak nadprodukce StkP vede k produkci malých kulatých buněk (Giefing et al., 2008; Beilharz et al., 2012). Pomocí různých mikroskopických technik bylo prokázáno, že StkP společně s fosfatou PhpP lokalizuje v buněčném středu jako součást dělicího proteinového komplexu (Giefing et al., 2010; Beilharz et al., 2012). Zde lokalizuje až po vytvoření a stabilizaci Z-kruhu, ale zároveň dříve než pozdní dělicí protein DivIVA a v tvořící se dělicí přepážce zůstává až do jejího uzavření a rozdělení dceřiných buněk (Beilharz et al., 2012; Zucchini et al., 2018).

Proteinfosfatasa PhpP patří do rodiny PPM (Metal-dependent Protein Phosphatases) fosfatasa, které jsou homologní s eukaryotickými fosfatami typu PP2C (Shi, 2009). PP2C fosfatasy jsou mangan- nebo hořčík-dependentní enzymy. Obsahují 11 konzervovaných motivů a pro jejich funkci jsou nezbytné invariantní aspartátové zbytky v doménách 8 a 11, které se právě podílejí na vazbě kovových iontů (Das et al., 1996), což bylo *in vitro* prokázáno i v případě PhpP (Nováková et al., 2005). PP2C tvoří velkou rodinu vysoce konzervovaných proteinfosfat. V lidském genomu jich je kódováno 16 (Lammers a Lavi, 2007). U modelových zástupců rostlin jich bylo identifikováno mnohem více, 80 u *Arabidopsis thaliana* a 78 u rýže (Xue et al., 2008). Zdá se, že jejich primární funkcí je regulace stresové odpovědi, nicméně svou roli hrají v dalších dějích, jako je buněčný růst a diferenciaci, apoptosa a metabolismus (Lu and Wang, 2008). Homology PPM fosfatasa byly objeveny i u bakterií a jejich strukturní analýza ukázala, že jsou téměř identické s hlavní doménou lidské PP2C fosfatasy. Nicméně bakteriální PPM fosfatasy v porovnání s lidskou PP2C fosfatou vykazují odlišnosti. Vyžadují tři kovové ionty (eukaryotické pouze dva) a nad aktivním místem obsahují smyčku, která pravděpodobně usnadňuje navázání substrátu a katalýzu (Shi, 2009). Oproti eukaryotům prokaryota velmi často obsahují v chromosomu pouze jediný gen pro ESTK a jediný gen pro ESTP, přičemž jsou tyto geny přepisovány společně v rámci jediné mRNA (Burnside a Rajagopal, 2011). Avšak vyskytují se i výjimky, jako např. bakterie *M. tuberculosis*, jejíž genom kóduje 11 ESTK a pouze jedinou



ESTP (Dworkin, 2015). Většina bakteriálních ESTK jsou membránově vázané proteiny, zatímco ESTP se nacházejí v cytoplazmě.

PhpP je mangan-dependentní cytoplazmatický protein, který je v časně exponenciální fázi růstu obohacen v buněčném středu. Tato lokalizace je závislá na přítomnosti aktivní autofosforylované StkP (Beilharz et al., 2012). Rovněž bylo prokázáno, že autofosforylovaná StkP je defosforylována právě PhpP a mnoho substrátů StkP náleží i mezi substráty PhpP, což značí, že tvoří funkční pár *in vivo* (Nováková et al., 2005). Vzhledem k dlouho přetrvávajícímu předpokladu, že je PhpP pro životaschopnost *S. pneumoniae* esenciální (Sasková et al., 2007)(Sasková, 2007), nebylo možné blíže objasnit její funkci ani charakterizovat její další substráty. V roce 2012, ve studii Agarwal et al., zveřejnili postup přípravy mutantního kmene  $\Delta phpP$  u dvou opouzdrěných kmenů 6A a D39. Charakterizace mutantů odhalila kmenově specifickou roli PhpP.

U virulentních kmenů  $6A\Delta phpP$  a  $D39\Delta phpP$  dochází ke zvýšené agregaci buněk, tvorbě dlouhých řetízků a stěna buněk je v porovnání s divokým kmenem tlustší, avšak další defekty buněčného dělení pozorovány nebyly. Kmenová specifita delece *phpP* se projevila při adhezi, tvorbě biofilmu a v reakci na environmentální stresy. Kmen  $6A\Delta phpP$  efektivně adhezuje na hltanové buňky a vykazuje zvýšenou tvorbu biofilmu v porovnání s kmenem  $D39\Delta phpP$ , který se chová podobně jako divoký kmen. V případě reakce na stresové podmínky je kmen  $6A\Delta phpP$  citlivý ke zvýšené teplotě, nízkému pH, oxidativnímu a osmotickému stresu. Kmen  $D39\Delta phpP$  je z uvedených stresů citlivý pouze na osmotický (Agarwal et al., 2012).

Vzhledem k tomu, že z předchozích výsledků naší laboratoře vyplývalo, že je PhpP v námi používaném neopouzdrěném kmeni Rx1 pravděpodobně esenciální (Sasková, 2007), rozhodli jsme se pro přípravu mutantu  $\Delta phpP$  v divokém kmeni Rx1, jeho případnou další charakterizaci a objasnění funkce PhpP v buněčném dělení. Některé výsledky naší laboratoře jsou uvedeny ve výsledkové části v kapitole 4.2 Projekt: Esencialita a funkce Ser/Thr proteinfosfatasy PhpP u *Streptococcus pneumoniae* a souhrnně všechny dosažené výsledky jsou obsaženy v publikaci naší laboratoře Ulrych et al. (2016).

#### 2.4.1 Substráty StkP a PhpP

ESTK s PASTA doménami a jejich přidružené ESTP jsou u gram-pozitivních bakterií vyžadovány pro správné umístění a tvorbu septa a následnou separaci buněk. Tuto funkci

vykonávají prostřednictvím fosforylace a defosforylace svých substrátů (Pereira et al., 2011). Proto je pro pochopení dějů, které ESTK a ESTP řídí, nezbytným krokem nejen jejich vlastní charakterizace, ale i charakterizace jejich substrátů.

Mezi doposud určené substráty StkP patří proteiny syntézy buněčné stěny GlmM a MurC, pyrofosfatasa PpaC, transkripční regulátor RR06, osiřelý transkripční regulátor RitR, kofaktor MacP, transkripční regulátor ComE, proteiny buněčného dělení FtsZ, FtsA, DivIVA, Jag/KhpB/EloR a LocZ/MapZ a pravděpodobný protein buněčného dělení Spr0175, přičemž proteiny MurC, RitR, RR06, DivIVA, Jag/KhpB/EloR a LocZ/MapZ byly prokázány též jako substráty PhpP. Dalším substrátem PhpP je autofosforylovaná StkP.

### **GlmM**

Fosfoglukosaminmutasa, zkráceně označovaná jako GlmM, byla identifikována *in vivo* i *in vitro* jako substrát StkP (Nováková et al., 2005). GlmM katalyzuje první krok v biosyntetické dráze vedoucí k tvorbě UDP-N-acyetylglukosaminu, prekursoru buněčných komponent peptidoglykanu, lipopolysacharidů a teichoových kyselin. *In vitro* fosforylace GlmM proteinkinasou StkP stimuluje její specifickou aktivitu. Avšak význam fosforylace GlmM *in vivo* nebyl doposud plně objasněn (Pallová, 2007).

### **MurC**

MurC neboli UDP-N-acetylmuramoyl:L-alanin ligasa byla *in vitro* prokázána jako další substrát StkP a její fosforylovaná forma jako substrát PhpP. MurC syntetizuje esenciální intermediát v dráze biosyntézy peptidoglykanu, ve které katalyzuje navázání L-alaninu na UDP-N-acetylmuramovou kyselinu (Falk a Weisblum, 2013).

### **PpaC**

Mangan-dependentní anorganická pyrofosfatasa PpaC je dalším, ale pouze *in vivo* prokázaným substrátem StkP. Fosforylace *in vitro* nebyla zatím prokázána pravděpodobně z důvodu absence interakčního partnera či potřeby specifických reakčních podmínek (Nováková et al., 2010).

Pyrofosfatasy jsou esenciální enzymy katalyzující hydrolýzu anorganického pyrofosfátu (PP<sub>i</sub>). PP<sub>i</sub> se tvoří během různých biosyntetických reakcí vyžadujících ATP, přičemž většinou

působí jako inhibitor (Lahti, 1983). Nejvíce prozkoumanou pyrofosfatase je PpaC *S. agalactiae* (PpaC<sub>Sa</sub>), která se účastní procesu virulence (Rajagopal et al., 2003). PpaC<sub>Sa</sub> je proteinkinasou Stk1 fosforylována na serinovém zbytku. Nicméně přesná pozice aminokyseliny ani význam fosforylace není znám (Silvestroni et al., 2009). PpaC *S. pneumoniae* je pravděpodobně fosforylována na threoninovém zbytku, ale stejně jako u PpaC<sub>Sa</sub>, není pozice ani význam fosforylace znám (Nováková et al., 2010).

### **RR06**

RR06 je regulačním proteinem dvoukomponentového systému TSC06, jedním ze 13 dvoukomponentových systémů vyskytujících se u *S. pneumoniae*. Bylo zjištěno, že kromě fosforylace na aspartátovém zbytku histidinovou kinasou HK06 je RR06 *in vitro* i *in vivo* fosforylován proteinkinasou StkP na threoninových zbytcích a defosforylován pomocí PhpP. Posttranslační modifikace RR06 systémem StkP/PhpP je důležitým a efektivním alternativním mechanismem pro regulaci exprese pneumokokového povrchového adhesinu CbpA/PspC (Agarwal et al., 2012).

### **RitR**

“Osířelý“ regulační protein RitR patří mezi společné substráty StkP a PhpP. Jako “osířelý“ se označuje z důvodu chybějící histidinové kinasy (Ulijasz et al., 2004, 2009).

Ačkoliv je RitR řazen mezi globální regulátory, jeho hlavní funkcí je zajištění homeostázy železa v buňce. RitR se skládá z C-terminální DNA vazebné domény a N-terminální regulační domény. Ve svém defosforylovaném stavu se pomocí DNA vazebné domény váže na *piu* promotor, kde reprimuje transkripci genů pro transportéry železa PiuA a PiuB. *In vitro* bylo prokázáno, že za defosforylaci je zodpovědná PhpP. Naopak StkP protein RitR fosforyluje, čímž dojde ke změně jeho konformace a RitR se uvolňuje z *piu* promotoru (Ulijasz et al., 2004, 2009). V recentní studii Glanville et al. (2018) ukázali, že RitR také působí jako sensor redoxního potenciálu. V reakci na koncentraci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v buňce reguluje hladinu železa prostřednictvím svého jediného cysteinu (Cys128). Při vysoké intracelulární koncentraci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dochází k oxidaci RitR na Cys128, která mění jeho konformaci a RitR se váže a inhibuje *piu* promotor.

### **MacP**

MacP je membránově vázaný kofaktor PBP2a. Lokalizuje do místa buněčného dělení, kde tvoří komplex s PBP2a. MacP je *in vivo* fosforylován proteinkinasou StkP, přičemž fosforylovaná forma MacP je pro aktivitu PBP2a nezbytná. MacP je tedy *in vivo* prvním proteinem, který ukazuje, že StkP je nejen regulátorem buněčného dělení, ale fosforylací svého substrátu ovlivňuje i samotnou syntézu peptidoglykanu (Fenton et al., 2018).

### **ComE**

ComE je regulačním proteinem dvoukomponentového systému ComDE (TCS12), který *in vitro* i *in vivo* podléhá fosforylaci proteinkinasou StkP. Za příhodných podmínek je ComE fosforylován histidinovou kinasou ComD na aspartátovém zbytku, což způsobí konformační změnu ComE, jeho navázání do promotorové oblasti *ceb* pro časné geny kompetence a jejich přepis. Avšak v kyselém prostředí podléhá ComE fosforylaci proteinkinasou StkP na threoninu v pozici 128. Tato fosforylace zvyšuje jeho dimerizační aktivitu a způsobuje konformační změny v DNA vazebné doméně, která mu umožňuje ovlivnit transkripci 104 genů zapojených v různých buněčných procesech, jako je produkce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> či tolerance vůči oxidačnímu stresu. Signalizační dráha StkP/ComE reguluje odpověď na stres vyvolaný nízkým pH a zajišťuje intracelulární přežití *S. pneumoniae* v pneumocytech (Piñas et al., 2018). Tyto výsledky osvětlují důvod citlivosti kmene  $\Delta$ *stkP* ke kyselému pH (Sasková et al., 2007).

### **FtsZ**

V bakteriální říši široce konzervovaný protein FtsZ byl jako substrát StkP prokázán pouze *in vitro* (Giefing et al., 2010). FtsZ je homologem eukaryotického tubulinu s GTPasovou aktivitou. Řadí se mezi časné proteiny buněčného dělení a v buněčném středu tvoří kruhovitou strukturu označovanou jako Z-kruh. Po vytvoření a stabilizaci Z-kruhu se k němu váže i StkP (Beilharz et al., 2012). Nicméně význam fosforylace FtsZ *in vivo* zatím není znám.

### **FtsA**

Společně s FtsZ interaguje i další časný protein buněčného dělení FtsA (Lara et al., 2005), který ale oproti FtsZ náleží mezi *in vitro* i *in vivo* určené substráty StkP (Beilharz et al., 2012; Kubincová, 2017). Bylo prokázáno, že v *in vivo* podmínkách je FtsA proteinkinasou StkP

fosforylován na Thr v pozici 404. Nicméně se ukazuje, že T404 není jediným fosforylačním místem (Kubincová, 2017)

FtsA tvoří protofilamenta podobná aktinu (Szwedziak et al., 2012) a u *S. pneumoniae* se řadí mezi esenciální proteiny (Lara et al., 2005). Ačkoliv se jedná o cytoplazmatický protein, díky svému amfipatickému helixu v C-terminální části je schopen se vázat do membrány, a tak stabilizovat Z-kruh (van den Ent a Lowe, 2000; Pichoff a Lutkenhaus, 2005). Jeho lokalizace do Z-kruhu je závislá na proteinu FtsZ (Addinall a Lutkenhaus, 1996), se kterým kolokalizuje ve všech fázích buněčného dělení (Mura et al., 2017). V nedávné době bylo zjištěno, že částečná delece genu *ftsA* způsobuje u *S. pneumoniae* prodloužení až filamentaci buněk s vícečetnými neuzavřenými Z-kruhy. Při úplné depleci FtsA dochází k delokalizaci FtsZ, tvorbě balónovitých buněk a buněčné lyzi. Naopak nadprodukce FtsA se projevuje tvorbou menších buněk pravděpodobně zapříčiněnou zrychleným procesem tvorby septa (Mura et al., 2017).

### **DivIVA**

DivIVA je adaptorový protein, který se účastní buněčného dělení. Fosforylace proteinkinasou StkP byla prokázána *in vivo* i *in vitro* (Nováková et al., 2010). Defosforylace proteinfosfátasou PhpP byla doposud prokázána pouze *in vivo* (Beilharz et al., 2012).

DivIVA je široce zastoupen u gram-pozitivních bakterií, kdežto gram-negativní bakterie kódují na místo proteinu DivIVA protein MinE (Errington et al., 2003). U bakterie *B. subtilis* je DivIVA součástí Min systému, který brání buněčnému dělení v oblasti buněčných pólů (detailní popis viz kapitola 2.2.1 Negativní systémy Min a NO u *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*) (Marston a Errington, 1999).

Imunofluorescenční mikroskopií bylo prokázáno, že DivIVA *S. pneumoniae* lokalizuje jak v buněčných pólech, tak i v dělicí přepážce. Do tvořící se dělicí přepážky přichází v pozdní fázi buněčného dělení, kdy v ní již lokalizuje StkP (Beilharz et al., 2012). Inaktivace *divIVA* má za následek tvorbu řetízků obsahujících morfologicky odlišné buňky s nedokončenou přepážkou, přičemž jsou buňky často anukleované. Tento fenotyp naznačuje, že DivIVA má svou úlohu v segregaci chromosomů, sestavení a uzavření buněčné přepážky a v určení buněčného tvaru (Fadda et al., 2003, 2007). Ve studii Fleurie et al. (2012) *in vivo* prokázali, že DivIVA je proteinkinasou StkP fosforylován na aminokyselinovém zbytku T201, který je pravděpodobně jediným fosforylačním místem. Buňky neopouzředeného kmene *S. pneumoniae* R800 exprimující

fosfoablativní formu DivIVA-T201A jsou morfologicky deformované. Mají protáhlý tvar s polárním vydutím. Na základě těchto pozorování v této studii autoři vyslovili hypotézu, že fosforylace DivIVA na pozici T201 neovlivňuje všechny jeho potenciální funkce, ale je důležitá především pro kontrolu buněčného tvaru a určení míst peptidoglykanové syntézy. Naproti tomu v kmenech Rx1 a D39 exprese DivIVA-T201A pouze komplementuje fenotyp delece *divIVA* a nezpůsobuje žádný další fenotypový defekt (Massidda et al., 2013).

### **Jag/KhpB/EloR**

Jedním z nově identifikovaných a zkoumaných substrátů proteinkinasy StkP je protein Jag (spoIIIJ Associated Gene) též označovaný jako KhpB nebo EloR. *In vivo* je protein Jag fosforylován na threoninu v pozici 89 a ještě dalším blíže neurčeném aminokyselinovém zbytku. Defosforylace pomocí PhpP byla prokázána pouze *in vitro* (Ulrych et al., 2016).

Jag protein je cytoplazmatický protein obohacený v oblasti septa. Obsahuje tři domény, přičemž Jag\_N doména je pravděpodobně zodpovědná za obohacení v septu (Jarošová, 2017). KH doména je schopná vazby s RNA a R3H doména váže ssDNA nebo ssRNA, což napovídá, že protein Jag náleží mezi RNA vazebné proteiny. Avšak delece genu pro Jag protein má za následek tvorbu menších buněk v porovnání s divokým kmenem, a naopak jeho nadprodukce vede k elongaci, což naznačovalo jeho funkci v procesu buněčného dělení (Ulrych et al., 2016). Následně bylo zjištěno, že se účastní regulace syntézy periferního peptidoglykanu, a byl nazván jako EloR (Stamsås et al., 2017). V další studii bylo prokázáno, že Jag tvoří komplex s dalším RNA vazebným proteinem KhpA, a byl označen jako KhpB. KhpB/Jag/EloR společně s KhpA tvoří heterodimer, který reguluje množství FtsA v buňce na posttranskripční úrovni. Další experimenty odhalili, že systém KhpB/KhpA neovlivňuje pouze hladinu FtsA, ale i dalších proteinů, což jim připisuje roli pleiotropního RNA chaperonu kontrolujícího buněčné dělení u pneumokoka (Zheng et al., 2017).

### **Spr0175**

Spr0175 je *in vitro* i *in vivo* nově identifikovaný substrát proteinkinasy StkP, který je fosforylován na jediném threoninu v pozici 7 (Kleinová, 2019).

Spr0175 je malý protein o velikosti 10,3 kDa, jehož funkce nebyla zatím objasněna. Delece *spr0175* v kmeni Rx1 a R6 vede k heterogenitě velikosti buněk a zdá se, že je protein lokalizován v cytoplasmě (Kleinová, 2019).

### **LocZ/MapZ**

LocZ patří mezi *in vitro* i *in vivo* určené substráty proteinkinasy StkP (Nováková et al., 2010). Jedná se o membránový protein účastnící se buněčného dělení u *S. pneumoniae* doposud neznámým mechanismem. Hlavními místy fosforylace byly určeny threoniny v pozici 67 a 78, které se nacházejí v N-terminální intracelulární doméně (Štekerová, 2012). Defosforylace LocZ proteinfosfátasou PhpP byla prokázána *in vitro* reakcí cytoplazmatické domény LocZ s PhpP (Fleurie et al., 2014). Jelikož tato práce navazuje na předchozí výsledky týkající se proteinu LocZ shrnuté v diplomové práci Štekerová (2012) a zabývá se další charakterizací funkce a významu fosforylace proteinu LocZ, je detailnější popis proteinu uveden v kapitole 4.1 Projekt: LocZ je nový protein buněčného dělení určující správné umístění septa u *Streptococcus pneumoniae* (Výsledky a diskuze). Mnoho z uvedených výsledků tohoto projektu je součástí publikace Holečková et al. (2014).

### 3 Materiál a metody

Některé z uvedených metod jsou popsány v diplomové práci s názvem Spr0334, nový protein buněčného dělení u *Streptococcus pneumoniae* (Štekerová, 2012), která vznikla na stejném pracovišti, a tato disertační práce na ní navazuje. Z tohoto důvodu budou již dříve použité metody řádně ocitovány.

#### 3.1 Bakteriální kmeny a vektory

Bakteriální kmeny a vektory použité v této disertační práci jsou shrnuty v tabulce 3.1.

Kmeny *S. pneumoniae* a *E. coli* jsme uchovávali v 15 % glycerolu při -80°C.

Bakteriální kmeny <i>S. pneumoniae</i>	Genotyp nebo popis	Zdroj nebo reference
Sp1 (Rx1)	divoký kmen bez pouzdra, <i>str1</i> ; <i>hexA</i>	Morrison et al., 1983
Sp4 (D39)	divoký kmen s pouzdrém, serotyp 2	Avery et al., 1944
Sp10	Rx1, <i>cm</i> , <i>stkP</i> :: <i>cm</i>	Nováková et al., 2005
Sp57	Rx1, <i>locZ</i> :: <i>lox72</i>	Štekerová, 2012
Sp58	Rx1, <i>cm</i> , <i>stkP</i> :: <i>cm</i> , <i>bgaA</i> ::P <sub><i>czcD</i></sub> - <i>gfp-locZ</i>	Štekerová, 2012
Sp60	Rx1, <i>locZ</i> :: <i>lox72</i> , <i>bgaA</i> ::P <sub><i>czcD</i></sub> - <i>his-locZ</i>	Štekerová, 2012
Sp100	Rx1, <i>kan</i> , <i>phpP</i> :: <i>kan rpsL</i>	Ulrych et al., 2016
Sp113	Rx1, $\Delta$ <i>phpP</i>	Ulrych et al., 2016
Sp120	Rx1, <i>Tet</i> , $\Delta$ <i>phpP</i> <i>bgaA</i> ::P <sub><i>czcD</i></sub> - <i>phpP</i>	Ulrych et al., 2016
Sp140	Rx1, <i>tet</i> , $\Delta$ <i>phpP</i> <i>bgaA</i> ::P <sub><i>czcD</i></sub> - <i>gfp-phpP</i>	Ulrych et al., 2016
Sp174	Rx1, <i>erm</i> , $\Delta$ <i>divIVA</i> pMU-P96- <i>divIVA-flag</i>	Ulrych et al., 2016
Sp188	Rx1, <i>erm</i> , $\Delta$ <i>locZ</i> pMU-P96- <i>flag-locZ</i>	tato práce
Sp208 (R6)	divoký kmen bez pouzdra	Hoskins et al., 2001
Sp222	Rx1, divoký kmen (revertovaný kmen z Sp113)	Ulrych et al., 2016
Sp225	R6, <i>str</i> , <i>rpsL</i>	tato práce
Sp227	R6, <i>str</i> , <i>locZ</i> :: <i>janus kazeta</i>	tato práce
Sp228	R6, <i>str</i> , <i>rfp-locZ</i>	tato práce
Sp229	R6, <i>str</i> , <i>gfp-locZ</i>	tato práce
Sp234	R6, <i>str</i> , <i>locZ-T67A/T78A</i>	tato práce
Sp235	R6, <i>str</i> , <i>locZ-T67E/T78E</i>	tato práce
Sp239	R6, <i>str</i> , $\Delta$ <i>locZ</i>	tato práce
Sp240	R6, <i>str</i> , <i>tet</i> , pBCSMH036	tato práce
Sp242	R6, <i>str</i> , <i>tet</i> , <i>rfp-locZ</i> , pBCSMH036	tato práce
Sp243	R6, <i>str</i> , <i>tet</i> , $\Delta$ <i>locZ</i> , pBCSMH036	tato práce
Sp246	R6, <i>str</i> , <i>tet</i> , <i>bgaA</i> ::P <sub><i>czcD</i></sub> - <i>gfp-stkP</i>	tato práce
Sp248	R6, <i>str</i> , <i>tet</i> , <i>rfp-locZ</i> , <i>bgaA</i> ::P <sub><i>czcD</i></sub> - <i>gfp-stkP</i>	tato práce
Sp249	R6, <i>str</i> , <i>tet</i> , $\Delta$ <i>locZ</i> , <i>bgaA</i> ::P <sub><i>czcD</i></sub> - <i>gfp-stkP</i>	tato práce
Sp250	R6, <i>str</i> , <i>tet</i> , <i>bgaA</i> ::P <sub><i>czcD</i></sub> - <i>divIVA-gfp</i>	tato práce
Sp253	R6, <i>str</i> , <i>tet</i> , $\Delta$ <i>locZ</i> , <i>bgaA</i> ::P <sub><i>czcD</i></sub> - <i>divIVA-gfp</i>	tato práce
Sp254	R6, <i>str</i> , <i>tet</i> , <i>bgaA</i> ::P <sub><i>czcD</i></sub> - <i>gfp-ftsA</i>	tato práce
Sp256	R6, <i>str</i> , <i>tet</i> , <i>rfp-locZ</i> , <i>bgaA</i> ::P <sub><i>czcD</i></sub> - <i>gfp-ftsA</i>	tato práce
Sp257	R6, <i>str</i> , $\Delta$ <i>locZ</i> , <i>bgaA</i> ::P <sub><i>czcD</i></sub> - <i>gfp-ftsA</i>	tato práce
Sp267	D39, <i>locZ</i> :: <i>lox72</i>	tato práce
Sp275	R6, <i>str</i> , <i>locZ</i> :: <i>gfp-locZ-<math>\Delta</math>CTD<sub>95AMK</sub></i>	tato práce
Sp277	R6, <i>str</i> , <i>locZ</i> :: <i>gfp-locZ-<math>\Delta</math>CTD</i>	tato práce



Sp279	R6, <i>str</i> , <i>locZ::gfp-locZ-ΔNTD</i>	tato práce
Sp292	Rx1, <i>tet</i> , $\Delta$ <i>phpP bga::P<sub>czcD</sub>-gfp-phpP-D192A</i>	Ulrych et al., 2016
Sp293	Rx1, <i>tet</i> , $\Delta$ <i>phpP bga::P<sub>czcD</sub>-gfp-phpP-D231A</i>	Ulrych et al., 2016
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	<i>F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen™
BL21 (DE3)Star	<i>F- ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm rne131 (DE3)</i>	Invitrogen™
<b>Vektory</b>		
pJWV25	<i>Amp, tet, bgaA, P<sub>czcD</sub>-gfp+</i>	Eberhardt et al., 2009
pJWV25-GFP-StkP	<i>Amp, tet, bgaA, P<sub>czcD</sub>-gfp-stkP</i>	Beilharz et al., 2012
pJWV25-GFP-FtsA	<i>Amp, tet, bgaA, P<sub>czcD</sub>-gfp-ftsA</i>	Beilharz et al., 2012
pJWV25-DivIVA-GFP	<i>Amp, tet, bgaA, P<sub>czcD</sub>-divIVA-gfp</i>	Beilharz et al., 2012
pZn-flag-LocZ	<i>Amp, tet, bgaA, P<sub>czcD</sub>-flag-locZ</i>	tato práce
pZn-GFP-LocZ	<i>Amp, tet, bgaA, P<sub>czcD</sub>-gfp-locZ</i>	Štekerová, 2012
pZn-His6-LocZ	<i>Amp, tet, bgaA, P<sub>czcD</sub>-his6-locZ</i>	Štekerová, 2012
pZn-His6-LocZ-T67A/T78A	<i>Amp, tet, bgaA, P<sub>czcD</sub>-his6-locZ-T67A/T78A</i>	Štekerová, 2012
pZn-His6-LocZ-T67E/T78E	<i>Amp, tet, bgaA, P<sub>czcD</sub>-his6-locZ-T67E/T78E</i>	tato práce
pBCSMH036	<i>Tet, P<sub>sigA</sub>- icfp-ftsZ</i>	Henriques et al., 2013
pDELstkP	<i>Amp, kan, ΔstkP::cm</i>	Nováková et al., 2005
pMU1328	<i>Erm, empty vector</i>	Lo Sapio et al., 2012
pMU-P96-flag-locZ	<i>Erm, P96-flag-locZ</i>	tato práce
pETPHos-LocZ	<i>Amp, pETPHos, his6-locZ</i>	Nováková et al., 2010
Cheshire kazeta	<i>Erm, loxP/ermAM/P<sub>fsck</sub>/cre/loxP</i>	Weng et al., 2009
Janus kazeta	<i>Kan, kan-rpsL<sup>+</sup></i>	Sung et al., 2001

**Tab. 3.1: Bakteriální kmeny a vektory:**

*Amp*: gen pro ampicilinovou rezistenci; *Cm*: gen pro chloramfenikolovou rezistenci; *Kan*: gen pro kanamycinovou rezistenci; *Tet*: gen pro tetracyklinovou rezistenci; *Erm*: gen pro erytromycinovou rezistenci; *Str*: gen pro streptomycinovou rezistenci.

## 3.2 Půdy a média

Množství jednotlivých přísadků, pokud není uvedeno jinak, je udáváno na 1 litr média, doplňují se do celkového objemu destilovanou vodou a sterilizují se. Do pevných půd bylo přidáno 1,5 % agaru (Becton, Dickinson and Company, dále pouze jako BD).

Selekční půdy byly připraveny přidáním příslušného antibiotika v potřebné koncentraci do média vychlazeného na cca 45°C (Štekerová, 2012)

***S. pneumoniae***: erythromycin 0,05 nebo 1 μg/ml; chloramfenikol 10 μg/ml; kanamycin 200 μg/ml; streptomycin 500 μg/ml; tetracyklin 2,5 nebo 1 μg/ml; rifampicin 1 μg/ml

***E. coli***: ampicilin 100 μg/ml; spectinomycin 100 μg/ml; kanamycin 50 μg/ml; erythromycin 100 μg/ml

### **Kultivace *E. coli***

Kultivace probíhala vždy aerobně při 37°C.

**LB médium:** trypton 10 g; yeast extrakt 5 g; NaCl 10 g; pH 7,5

### **Kultivace *S. pneumoniae***

Kultivace probíhala staticky při 37°C, pokud není uvedeno jinak.

#### **CAT médium:**

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

#### **CATcomplet médium (CATc):**

na 1 litr CAT média bylo přidáno: 0,5 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 34 ml; 20% glukosa 10 ml; pH 7,5

#### **TSB médium (Oxoid):**

30 g TSB

#### **TSBcom médium:**

na 10 ml TSB média bylo přidáno: 0,1 M CaCl<sub>2</sub> 100 µl; 8 % BSA 250 µl, pH 8

**C+Y médium:** C medium (Lacks a Hotchkiss, 1960) obohacené o 0,1 % yeast extrakt

#### Příprava komponent:

*Pre-C* (na 1 l deionizované vody): L-cystein hydrochlorid 11,25 mg; octan sodný 2 g; casein hydrolyzát 5 g; L-tryptofan 6 mg; hydrogenfosforečnan draselný 8,5 g, sterilizace v autoklávu, skladovat při 4°C ve tmě.

*ADAMS I* (na 500 ml deionizované vody): biotin 75 mg; kyselina nikotinová 75 mg; pyridoxine hydrochlorid 87,5 mg; panthotenát sodný 300 mg; thiamin hydrochlorid 80 mg; riboflavin 35 mg; upravit pH na 7,0 pomocí 1M NaOH, sterilizovat varem 15 min, skladovat při 4°C

*ADAMS II – 10x*: síran železnatý heptahydrát 500 mg; síran měďnatý pentahydrát 500 mg; síran zinečnatý heptahydrát 500 mg; chlorid měďnatý tetrahydrát 200 mg; komponenty rozpustit v 90 ml deionizované vody s 10 ml 37% kyseliny chlorovodíkové, sterilizovat varem 15 min, skladovat při 4°C

*ADAMS III* (na 100 ml deionizované vody): *ADAMS I* 16 ml; *ADAMS II – 10x* 0,4 ml; L-asparagin bezvodý 0,175 g; cholin 0,02 g; chlorid vápenatý bezvodý 0,05 g; chlorid hořečnatý hexahydrát 2 g; upravit pH na 7,6 pomocí 10 M NaOH, sterilizovat filtrací přes filtr s velikostí pórů 0,22 µm, skladovat při 4°C

*Yeast extrakt (10%)*: yeast extrakt 40 g; deionizovaná voda 360 ml; 4 M kyselina chlorovodíková 25 ml; aktivní uhlí 16 g, aktivní uhlí jsme přidávali postupně cca po 4 g za důkladného promíchávání, vzniklý roztok jsme uchovávali 2 hodiny při 4°C a následně filtrovali přes celitový filtr. *Postup filtrace yeast extraktu*: Do filtrační aparatury jsme si připravili filtr z filtračního papíru Watman a navlhčili ho vodou. Smíchali jsme 30 g celitu se 100 ml deionizované vody a filtrovali nejprve bez použití vakua a následně za vakua pro dokonalé odstranění vody. Filtrát jsme vylili. Přes připravený celitový filtr jsme filtrovali roztok yeast extraktu s aktivním uhlím. Filtrát jsme uschovali a následně znovu filtrovali přes nově připravený celitový filtr. Poté jsme do filtrátu přidali cca 7 ml 10 M NaOH (pH 7,8). Došlo k vytvoření sraženiny / zakalení. Roztok se sraženinou jsme filtrovali ve filtrační aparatuře přes filtr s póry o velikosti 0,45 µm. Filtrát jsme doplnili deionizovanou vodou do objemu 400 ml. Poté jsme provedli sterilizaci pomocí filtru s póry o velikosti 0,22 µm. Sterilní roztok jsme rozdělili po 50 ml a skladovali při - 20°C. Před použitím alikvot jsme je rozmrazili při 37°C a filtrovali přes filtr s póry o velikosti 0,22 µm. Konečný roztok jsme skladovali při 4°C.

*L-glutamin (3%)*: L-glutamin 1,5 g, deionizovaná voda 50 ml, sterilizace – filtr s velikostí pórů 0,22 µm, skladovat při - 20°C

*Pyrohroznan sodný (2%)*: pyrohroznan sodný 1 g; deionizovaná voda 50 ml, sterilizace – filtr s velikostí pórů 0,22 µm, skladovat při 4°C

*BSA (8%)*: BSA 4g; deionizovaná voda 50 ml, sterilizace – filtr s velikostí pórů 0,22 µm, skladovat při 4°C

*Chlorid manganatý (0,4 mM)*: chlorid manganatý tetrahydrát 3,95 mg; deionizovaná voda 50 ml, sterilizace – filtr s velikostí pórů 0,22 µm, skladovat při 4°C

*Uridin/Adenosin*: uridin 0,1 g; adenosin 0,1 g; deionizovaná voda 50 ml, sterilizace – filtr s velikostí pórů 0,22 µm, skladovat při 4°C

*Sacharosa (1,5 M)*: sacharosa 25,65 g; deionizovaná voda 50 ml, sterilizace – filtr s velikostí pórů 0,22 µm, skladovat při 4°C

*Glukosa (20%)*: glukosa 10 g; deionizovaná voda 50 ml, sterilizace - autokláv, skladovat při 4°C

Příprava C+Y média z jednotlivých komponent max. 24 hodin před použitím:

Pre-C 300 ml; 0,4 mM chlorid manganatý 0,3 ml; 20% glukosa 3 ml; ADAMS III 7,5 ml; 3% glutamin 0,22 ml; 2% pyrohroznan sodný 4,5 ml; 1,5 M sacharóza 0,19 ml; Uridin/Adenosin 3 ml; 8% BSA 3 ml; yeast extrakt 7,5 ml, 1 M kyselina chlorovodíková 6 ml.

Pokud bychom chtěli médium využít pro navození kompetence u buněk *S. pneumoniae*, nepřidávali bychom kyselinu chlorovodíkovou do média.

**GELOSA D** (pevné médium):

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

**KREVNÍ AGAR** (LabMediaServis):

Columbia krevní agar s 5 % beraní defibrinované krve.

### 3.3 Manipulace s DNA

Veškeré restriční endonukleázy, modifikační enzymy a ligázy (většinou od firmy New England Biolabs) jsme používali dle návodu doporučeného výrobcem. Izolaci plazmidové DNA z buněk *E. coli* jsme prováděli pomocí komerční soupravy QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (Qiagen) dle pokynů výrobce.

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

10 ml TSB média jsme inokulovali 200  $\mu$ l kultury *S. pneumoniae* z konzervy a kultivovali při 37°C do OD<sub>600</sub> = 0,5. Kulturu jsme centrifugovali (10 min, 7800 g, 4°C) a buňky jsme promyli pufrém (10 mM Tris-HCl, pH 7,5) a opět centrifugovali (10 min, 4100 g, 4°C). Buňky jsme resuspendovali v 250  $\mu$ l roztoku SEDS (NaCl-EDTA + DCNa-SDS (24:1); roztok NaCl-EDTA: 150 mM NaCl; 30 mM EDTA; pH 8; roztok DCNa-SDS: 0,5% deoxycholát sodný; 0,25% SDS) a inkubovali při 37°C, dokud nedošlo k lyzi kultury. K buněčnému lyzátu jsme přidali proteinasu K (2 mg/ml) a inkubovali 15 min při 56°C. Přidali jsme 250  $\mu$ l TE pufru (10 mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH 8,0) a provedli jsme extrakci směsí fenol-chloroform (1:1). Směs jsme centrifugovali (10 min, 4100 g, při pokojové teplotě). Odebrali jsme horní (vodnou) fázi. Následně jsme provedli extrakci DNA pomocí chloroformu a centrifugovali (10 min, 4100 g, při pokojové teplotě). Chromozomální DNA obsaženou v horní vodné fázi jsme odebrali a precipitovali přidáním 0,1 objemu 3 M acetátu sodného a 0,6 objemu izopropanolu. Po centrifugaci (10 min, 4100 g, při pokojové teplotě) jsme pelet chromozomální DNA promyli 80% ethanolem a nechali oschnout na vzduchu. Chromozomální DNA jsme nechali rozpouštět v TE pufru s RNAsou (20  $\mu$ g/ml) a skladovali při -20°C (Štekerová, 2012).

### 3.3.2 Elektroforetická separace DNA a izolace DNA fragmentu z agarózového gelu

Pro separaci DNA jsme použili horizontální elektroforézu v TAE pufru (40 mM Tris base; 20 mM kyselina octová; 2 mM EDTA; pH 8,5). DNA jsme dělili v 0,8 – 1,5 TAE agarózovém gelu podle velikosti separovaných molekul DNA. Ke vzorku jsme přidávali 1/5 objemu vzorkového pufru (50 mM EDTA; 60% glycerol; 0,05% bromfenolová modř). Separace probíhala při napětí 5 V/cm. Pro vizualizaci jsme DNA barvili fluorescenční barvou GelRed (Biotium) a proužky separované DNA jsme detekovali na UV transiluminátoru InGenius LHR (Syngene) při vlnové délce 312 nm. Pro odečtení přibližné velikosti testovaných molekul DNA jsme použili DNA marker o škále 75 – 20 000 bp (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus, Fermentas).

Pro izolaci DNA fragmentů z gelu jsme použili komerční soupravu Gel Extraction Kit (Qiagen). Izolaci jsme prováděli podle návodu doporučeného výrobcem.

### 3.3.3 PCR amplifikace a použité oligonukleotidy

Oligonukleotidy jsme navrhovali a kontrolovali pomocí programu Primer design a Primer select (Lasergene). Syntetizovány byly firmou Metabion International AG. Jejich seznam je, kromě oligonukleotidů navržených pro mutagenní PCR a qRT-PCR uvedených v tabulce 3-3 a 3-4, uveden v tabulce 3-2. Pro každý oligonukleotid je uveden název, sekvence, účel použití a případné umístění navrženého restrikčního místa. Pro amplifikaci genů a účely klonování jsme používali následující polymerázy: *Pfu* DNA polymerase (Fermentas), Phusion® High-Fidelity DNA polymerase (BioLabs), KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase (Novagen). Pro kontrolní PCR reakce jsme používali následující polymerázy: LA DNA Polymerases Mix (Top-Bio), MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline). Složení reakční směsi a podmínky amplifikace jsme dodržovali dle pokynů výrobce. Bezchybnost amplifikace jsme ověřovali sekvenací.

Název	Sekvence 5'→3' (restrikční místo je vyznačeno podtržením)	Účel použití
DAM868 (MluI)	GGGG <u>ACGCGT</u> TGGCTTACCGTTCGTATAG	amplifikace Cheshire kazety
DAM869 (NcoI)	GGGG <u>CCATGG</u> TCGATACCGTTCGTATAATGT	amplifikace Cheshire kazety
JG28	CCGTTTGATTTTAAATGGATAATG	amplifikace Janus kazety
JG29	GGGCCCCTTTCCTTATGCTT	amplifikace Janus kazety
JG74	CGGTACTTTTACTTTTGGTCTCTC	amplifikace <i>rpsL</i>
JG75	TCTTTATCCCCTTTCCTTATGC	amplifikace <i>rpsL</i>
KB1	TCGTATCAAAATTATCGTAGG	amplifikace upstream oblasti genu <i>locZ</i>
KB2	ATTATCCATTA AAAATCAAACGGGAGTATCCCTTTCTA TTTTAC	amplifikace upstream oblasti genu <i>locZ</i>
KB3	GCATAAGGAAAGGGGCCCGCAGTCGTTACAAAATTCT TT	amplifikace downstream oblasti genu <i>locZ</i>
KB4	GTTTTGGAAGCACCTTGCTA	amplifikace downstream oblasti genu <i>locZ</i>
KB5	GAGTATCCCTTTCTATTTTAC	amplifikace upstream oblasti genu <i>locZ</i>
KB6	GCAGTCGTTACAAAATTCTTT	amplifikace downstream oblasti genu <i>locZ</i>
KB7	GTAAAATAGAAAGGGATACTCATGTCAGAACTTATCA AGGAA	amplifikace <i>rfp</i>
KB8	ATGACGATTTTCGTCTTTTTTTTACTGGATCCTCCAGCTTT AGCTGC	amplifikace <i>rfp</i>
KB9	AGTAAAAAAGACGAAATCGTCAT	amplifikace <i>locZ</i>
KB10	AAAGAATTTTGTAAACGACTGCTTAGTAGTCCAAGTCAT CCGC	amplifikace <i>locZ</i> ; <i>gfp-locZ</i> ; <i>locZ-ΔNTD</i> ; <i>his6-locZ-T67A/T78A</i> ; <i>his6-locZ-T67E/T78E</i>
KB11	GTAAAATAGAAAGGGATACTCATGAAACATCTTAGCA AAGGAG	amplifikace <i>gfp</i> , <i>gfp-locZ</i> ; <i>gfp-locZ-ΔCTD<sub>95AMK</sub></i> ; <i>locZ-ΔCTD</i>
KB12	GTAAAATAGAAAGGGATACTCATGAGTAAAAAAGA CGAAATCGT	amplifikace <i>his6-locZ-T67A/T78A</i> ; <i>his6-locZ-T67E/T78E</i>
KB13	AAAGAATTTTGTAAACGACTGCGAGTATCCCTTTCTATT TTAC	amplifikace upstream oblasti genu <i>locZ</i>
KB14	GTAAAATAGAAAGGGATACTCGCAGTCGTTACAAAAT TCTTT	amplifikace downstream oblasti genu <i>locZ</i>
KB15	<u>TAAGCAGTCGTTACAAAATTCTTT</u>	amplifikace downstream oblasti genu <i>locZ</i> , obsahuje stop kodon
KB16	GAATTTTGTAAACGACTGCT <u>TAAGCA</u> ACCCCTGCACTCG AGA	amplifikace <i>gfp-locZ-ΔCTD<sub>95AMK</sub></i> , obsahuje stop kodon
KB17	AAAGAATTTTGTAAACGACTGCT <u>TAACGATAGACATAA</u> TAAGCACT	amplifikace <i>gfp-locZ-ΔCTD</i> , obsahuje stop kodon
KB20	TCTAGTTCCAGCTTTAGCTGCA	amplifikace <i>gfp</i>
KB21	GCAGCTAAAGCTGGAAGTAGAGCTTTATTTTGACCGT TTTG	amplifikace <i>locZ-ΔNTD</i>
LN123	TTCGCTACTTGGAGCCACTAT	amplifikace P <sub><i>czcD</i></sub>
LN139	ATGATGATGATGGTGAAGATGTTTCATATTTGCCTCCT	amplifikace P <sub><i>czcD</i></sub>
LN140	AATATGAAACATCTTACCATCATCATCATCAC	amplifikace <i>his6-locZ</i>
LN155 (NotI)	CGGC <u>GCGGCCGCT</u> TAGTAGTCCAAGTCATCCG	amplifikace <i>locZ</i> ; <i>his6-locZ</i>
LN156 (XbaI)	CGGCT <u>CTAGA</u> AGTAAAAAAGACGAAATCGT	amplifikace <i>locZ</i>
LN157 (NotI)	ATTAG <u>GCGGCCGCT</u> TAGTAGTCCAAGTCATCCGC	amplifikace <i>locZ</i>

LN215	ATTCGAAAATTCTCCTTCTTTCTA	amplifikace P96
LN231 (EcoRI)	GTGCGTGAATTCGATGATATCAAAGACAGATTGAAA	amplifikace P96
NS1	CTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCAAGATGTTTCATATT TGCCTC	amplifikace P <sub>czcD</sub>
NS2	GATTACAAGGATGACGACGATAAGAGTAAAAAAGA CGAAATCGT	amplifikace <i>locZ</i> , oligon. obsahuje sekvenci flag tag
NS3	GGAGAATTTTCGAATATGGATTACAAGGATGACGACG AT	amplifikace <i>flag-locZ</i>
NS4 (Sall)	CGGCGTCTGACTTAGTAGTCCAAGTCATCCGC	amplifikace <i>flag-locZ</i>
PB012	CGTCGCTCTTTTGCATTTGAGG	amplifikace downstream oblasti genu <i>locZ</i>
PB013 (MluI)	CGCGACGCGTTCGTCTTTTTTTACTCATGAGTATC	amplifikace downstream oblasti genu <i>locZ</i>
PB014 (NcoI)	GCGCCCATGGGTCATGCGGATGACTTGGACTACTAA	amplifikace upstream oblasti genu <i>locZ</i>
PB015	CCAGGCATGATAGAAGGACCTTC	amplifikace upstream oblasti genu <i>locZ</i>

Tab. 3-2: Seznam použitých oligonukleotidů

### 3.3.4 Mutagenní PCR a použité oligonukleotidy

Mutagenní PCR reakci jsme použili k přípravě fosfoablativní a fosfomimetické mutace v genu *locZ*. Pro mutagenní PCR jsme použili QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) dle pokynů výrobce. Oligonukleotidy jsme navrhovali a kontrolovali pomocí programu QuikChange Primer Design ([www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp](http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp)). Syntetizovány byly firmou Metabion Internation AG. Jejich seznam je uveden v tabulce 3-3, kde je pro každý oligonukleotid uveden název, sekvence a aminokyselinová záměna v genu. Bezchybnost amplifikace jsme ověřovali sekvenací DNA.

Název	Sekvence 5' → 3' (záměna tripletu je vyznačena podtržením)	záměna
LN208	CGTCAATACAAAAAAGAGGAGTTCGTTGAAGAAACAGAGTCTGGATGATTTA ATTCAAG	
LN209	CTTGAATTAAATCATCCAGACTCTGTTCTTCAACGAACTCCTCTTTTTTGTATT GACG	<i>locZ-T78E</i>
LN210	GAAATTGAGGCGGATAAGTTTGC <del>CGAA</del> CGTCAATACAAAAAAGAGGAGTTC	
LN211	GA <del>ACTCCTCTTTTT</del> GTATTGACGTTCCGCAA <del>ACTTATCCGCCTCAATTC</del>	<i>locZ-T67E</i>

Tab. 3-3: Seznam použitých oligonukleotidů pro mutagenní PCR

### 3.3.5 Příprava kompetentních buněk *E. coli*

Kompetentní buňky *E. coli* jsme připravovali následující metodou. 100 ml LB média obohacené o síran hořečnatý (80 % roztok MgSO<sub>4</sub>\*7 H<sub>2</sub>O, 3 ml) jsme inokulovali 3 ml bakteriální kultury ve stacionární fázi a kultivovali při 37°C za intenzivního třepání (250 ot/min). Jakmile kultura dosáhla OD<sub>550</sub> = 0,48 – 0,52 byla kultivace přerušena a buňky jsme ochladili na

ledu. Po centrifugaci (10 min, 1000 g, 4°C) jsme buňky resuspendovali v 25 ml ledového pufru TFB I. Suspenzi jsme centrifugovali (10 min, 1000 g, 4°C). Buňky jsme resuspendovali v 8 ml pufru TFB II. Suspenzi jsme rozdělili po 100 µl do mikrozkušavek a zamrazili v kapalném dusíku. Kompetentní buňky jsme uchovávali při -80°C.

pufr TFB I: 1 M RbCl 7,5 ml; 1 M MnCl<sub>2</sub> 3,75 ml; 1 M KOAc 2,25 ml; 0,5 M CaCl<sub>2</sub> 0,7 ml; glycerol 11,25 ml; destilovaná voda 49,55; pH 5,8 upravené pomocí kyseliny octové; sterilizace pomocí filtru s velikostí pórů 0,22 µm

pufr TFB II: destilovaná voda 14,2 ml; 100 mM MOPS; pH 7 upraveno pomocí NaOH; 1 M RbCl 0,2 ml; 2,5 M CaCl<sub>2</sub> 0,6 ml; glycerol 3 ml; sterilizace pomocí filtru s velikostí pórů 0,22 µm

### 3.3.6 Transformace kompetentních buněk *E. coli* plazmidovou DNA

Metoda transformace buněk *E. coli* je založena na principu teplotního šoku, který usnadní průchod plazmidové DNA bakteriální buněčnou stěnou.

Kompetentní buňky *E. coli* jsme na ledu pomalu rozmrazovali a přidali k nim buď čistou plazmidovou DNA, nebo ligační směs. Vše jsme opatrně promíchali a inkubovali 30 min na ledu. Dále jsme provedli teplotní šok 1,5 min při 42°C a 1,5 min na ledu. K buněčné suspenzi jsme přidali 900 µl LB média a buňky kultivovali 1 hod při 37°C za stálého třepání. Po inkubaci jsme suspenzi vyseli na pevné LB médium s příslušným ATB a inkubovali při 37°C přes noc (Štekerová, 2012).

### 3.3.7 Transformace DNA do buněk *S. pneumoniae* pomocí syntetického CSP

Do 950 µl média TSB<sub>com</sub> nebo C+Y (bez přidané HCl a tedy vhodné pro vyvolání kompetence buněk) jsme inokulovali 50 µl kultury *S. pneumoniae* z konzervy a zároveň přidali 250 ng CSP a 1 µg chromozomální DNA nebo 200 ng plazmidové DNA (určené k transformaci). Celou směs jsme inkubovali 2 – 2,5 hod při 37°C. Kulturu jsme naředili a vyseli na misky s gelosou D a příslušným ATB. Ředění 0; 10<sup>-1</sup>; 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-3</sup> jsme vyseli do gelosy s ATB a ředění 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-5</sup> do gelosy bez ATB jako negativní kontrolu. Jako pozitivní kontrolu a pro testování transformační účinnosti jsme použili chromozomální DNA z kmene Sp5, který nese gen pro rezistenci na rifampicin. Vyseli jsme ředění 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-3</sup> na gelosu s rifampicinem a ředění 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-5</sup> na gelosu bez ATB. Z poměru získaných transformantů na miskách s ATB ku všem



narostlým koloniím na miskách bez ATB jsme vypočítali transformační účinnost. Tento způsob transformace jsme využívali hlavně k mutagenезi.

### 3.4 Manipulace s RNA

Při manipulaci a vlastní izolaci RNA je nutné pracovat tak, aby nedošlo k degradaci RNA všudypřítomnými RNasami. Z těchto důvodů jsme skleněný materiál sterilizovali 4 hod při 180°C a materiál umělohmotný přes noc při 130°C. Pro práci s RNA jsme používali RNase-free špičky s filtrem (Axygen) a RNase-free mikrozkušavky (Axygen). Pro přípravu roztoků jsme používali sterilizovanou deionizovanou vodu (sterilizace 2 x 20 min při 120°C). Pipetmany a pracovní plochu jsme ošetřili roztokem RNaseZap<sup>®</sup> (Sigma).

#### 3.4.1 Izolace celkové RNA ze *S. pneumoniae*

Izolaci celkové RNA z buněk *S. pneumoniae* jsme provedli dle Cheng et al. (1997). 50 ml TSB média jsme inokulovali 1 ml kultury *S. pneumoniae* a kultivovali při 37°C do OD<sub>400</sub> ~ 0,4. Buňky jsme centrifugovali (12000 g, 10 min, 4°C). Pelet jsme resuspendovali v 1,5 ml pufru (10 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA pH 8; 0,1% deoxycholát) a inkubovali při 37°C 5 min a následně rychle zchladili na ledu. Postup inkubace při 37°C a následné ochlazení jsme opakovali (2x – 3x) až do úplné lyze buněk. Buněčný lyzát jsme extrahovali 2x pomocí horké směsi fenol/SDS (fenol nasycený v 0,1 M citrátovém pufru, pH 4,5; 1% SDS; 0,2 M acetát sodný, pH 4,0) předeřáté na 65°C a 1x samotným horkým fenolem (pH 4,5; 65°C). Roztok jsme extrahovali směsí chloroform/isoamylalkohol (24:1). Vzorek RNA jsem precipitovali izopropanolem, inkubovali 10 min při 4°C a poté centrifugovali (15 min, 12000 g, 4°C). Následně jsme vzorek promyli 1 ml 70% ethanolu, nechali oschnout na vzduchu a poté rozpustili v 50 µl RNase-free H<sub>2</sub>O. Zbytkovou kontaminující DNA jsme ze vzorků odstranili působením DNasy I a RNA přečistili pomocí komerčního kitu RNeasy Mini Kit (Qiagen) dle pokynů výrobce. Vzorky čisté RNA jsme skladovali v -80°C.

Koncentraci izolované celkové RNA jsme určili měřením absorbance při 260 nm. Měřením poměru absorbancí A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> jsme dále ověřili čistotu izolované RNA. Kvalitu izolované RNA jsme analyzovali pomocí elektroforézy v 1,5 % TAE-agarózovém gelu: 5 µg RNA jsme smíchali s 6x Loading dye (Fermentas) a separovali při napětí 5 V/cm<sup>2</sup>. Míru degradace RNA jsme posuzovali podle ribozomálních 23S a 16S rRNA.

### 3.4.2 Reverzní transkripce

Pro syntézu cDNA (complementary DNA) ze vzorku izolované RNA jsme použili reverzní transkriptasu Superscript III (Invitrogen) dle pokynů výrobce. Pro reverzní transkripci jsme namíchali 5 µg přečištěné celkové RNA s 2 µg náhodných hexamerů (Invitrogen) a doplnili vodou do 8,8 µl. Směs jsme inkubovali 10 min při 70°C, čímž došlo k rozrušení vlásenkovitých struktur RNA. Následně jsme směs ochladili na ledu, kdy náhodné hexamery nasednou na RNA. Dále jsme do reakční směsi přidali: 3 µl 5x First-strand buffer, 0,3 µl 25 mM dNTPs (Promega), 0,4 µl RNasin (Promega), 1,5 µl 0,1 M DTT a 1 µl reverzní transkriptasy Superscript III a doplnili vodou do 20 µl. Reakční směs jsme inkubovali 10 min při 25°C a samotná reverzní transkripce probíhala 2 hod při 42°C. Následovala inaktivační reakce 15 min při 70°C. Jako negativní kontrolu jsme použili směs bez reverzní transkriptasy. Vzorky jsme uchovávali v -80°C.

### 3.4.3 qRT-PCR

Metodu kvantitativní PCR v reálném čase jsme použili ke stanovení exprese vybraných genů v blízkém okolí genu *locZ* u delečních mutant kmenů Sp57 a Sp239 a tedy ověřili, že delece genu *locZ* nezpůsobuje polární efekt.

Oligonukleotidy určené pro kvantitativní PCR v reálném čase jsme pro vybrané geny navrhli pomocí programů Primer 3 verze 0.4.0. (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) a Primer select (Lasergene). Při navrhování oligonukleotidů jsme dodrželi následující kritéria: délka oligonukleotidu 15 – 21 bp, teplota tání při 56 – 60°C a délka PCR produktu v rozmezí přibližně 80 – 200 bp. Seznam všech použitých oligonukleotidů je uveden v tabulce 3-4.

PCR reakci jsme provedli pomocí 1x koncentrované komerční soupravy SYBR<sup>®</sup> Green JumpStart<sup>™</sup> Taq ReadyMix (Sigma), která obsahovala PCR mix složený z reakčního pufru, dNTPs, DNA polymerázy a fluorescenční barvy SybrGreen I. K této směsi jsme jako referenční fluorescenční barvu přidali fluorescein ve finální koncentraci 10 nM, 20 ng cDNA a příslušné oligonukleotidy ve finální koncentraci 0,5 µM. Celkový objem reakce jsme doplnili vodou do 20 µl.

Amplifikaci cDNA jsme prováděli na cykleru iQ5 real-time PCR detection system (BioRad) vždy v triplicátech pro každý ze tří nezávislých experimentů, pouze negativní kontrolu, která představuje PCR reakci bez předešlé reverzní transkripce, jsme provedli v duplikátech. PCR reakce probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace 2 min při 94°C; následovalo

45 amplifikačních cyklů složených ze tří kroků: denaturace 15 s při 94°C, hybridizace oligonukleotidů 25 s při 56°C, elongace 25 s při 72°C.

Ze získaných dat jsme metodou relativní kvantifikace dle Pfaffla (2001) tzv.  $\Delta\Delta C_T$  metodou stanovili změnu exprese u vybraných testovaných genů, kdy jsou mezi sebou porovnávány hladiny exprese genů u mutantního a divokého kmene bakterie. Gen *gyrA* (spr1099) kódující podjednotku A DNA gyrasy u *S. pneumoniae* jsme použili jako referenční gen, jehož exprese je v průběhu buněčného dělení buněk *S. pneumoniae* konstantní a která se používá pro normalizaci výsledných dat (Saskova et al. 2007).

Název oligonukleotidu	Sekvence 5' → 3'	gen
AU7/spr0332_F	ACCTATGCTGCCTTGGTCAA	<i>spr0332</i>
AU8/spr0332_R	TGTAATTGCCGCTTCAAGGG	
AU9/spr0333_F	CTCGCATGGTGGAAATTGCT	<i>spr0333</i>
AU10/spr0333_R	ACCCCTGCATCATCTGACAA	
AU13/spr0335_F	ACCAGCTGCCTTCAACTTTG	<i>spr0335</i>
AU14/spr0335_R	TCACGCCAGATAGATGCGAT	
AU15/spr0336_F	GATGATTGCTCTGACACGCC	<i>spr0336</i>
AU16/spr0336_R	TTGTCTCGGTCGCACTTTC	

**Tab. 3-4: Seznam oligonukleotidů použitých pro qRT-PCR**

### 3.5 Manipulace s proteiny

#### 3.5.1 Izolace proteinů z buněk *S. pneumoniae*

K přípravě celkových buněčných lyzátů jsme použili postup dle Beilharz et al. (2012). Buňky jednotlivých kmenů *S. pneumoniae* jsme pěstovali v 10 ml média TSB nebo C+Y a pokud bylo potřeba, přidali jsme odpovídající množství  $Zn^{2+}$  (konečná koncentrace 0,45 mM  $ZnCl_2$  pro TSB a 0,15 mM  $ZnSO_4$  pro C+Y) a  $MnCl_2$  (konečná koncentrace 0,1 mM). Kulturu jsme pěstovali do  $OD_{600}$  0,4. 1 ml kultury jsme centrifugovali (9000 g, 5 min). Buněčný pelet jsme resuspendovali v 20  $\mu$ l SEDS lyzačním pufru (SDS 0,02%; EDTA 15 mM; deoxycholát 0,01 %; NaCl 150 mM) a inkubovali 5 min při 37°C. K buněčnému lyzátu jsme přidali 20  $\mu$ l 2x koncentrovaného SDS vzorkového pufru (140 mM Tris; 8 % glycerol; 6 % SDS; 10 %  $\beta$ -merkaptoethanol; bromfenolová modř; pH 6,8) a inkubovali při 100°C 10 min.

V případě, kdy bylo nutno buněčný lyzát rozdělit na proteiny frakce membránové a cytoplazmatické, použili jsme následující postup. Buňky jednotlivých kmenů *S. pneumoniae* jsme pěstovali ve 100 ml C+Y média a pokud bylo potřeba, přidali jsme odpovídající množství  $ZnSO_4$  a  $MnCl_2$ . Kulturu jsme pěstovali do  $OD_{600}$  0,4, centrifugovali (9000 g, 10 min, 4°C) a resuspendovali v 1 ml předchlazeného lyzačního pufru (25 mM Tris pH 7,5; 100 mM NaCl)

přidali 10  $\mu$ l inhibitoru proteas (Roche) a 1  $\mu$ l benzonasy (Merck). Buňky jsme rozbili pomocí skleněných kuliček v homogenizátoru FastPrep (ThermoScientific). Zbylý buněčný debris jsme centrifugovali (5000 g, 1 min). Celkový buněčný lyzát jsme následně frakcionovali centrifugací (100000 g, 1 h, 4°C) a tak oddělili proteiny membránové od cytoplazmatických. Koncentraci proteinů jsme stanovovali pomocí komerční soupravy BCA Protein Assay Reagent (Pierce). K alikvotu vzorku obsahujícího 30  $\mu$ g proteinu jsme přidali 1x koncentrovaný SDS vzorkový pufr (70 mM Tris; 4 % glycerol; 3 % SDS; 5 %  $\beta$ -merkaptoethanol; bromfenolová modř; pH 6,8) a inkubovali při 100°C 10 min.

### **3.5.2 SDS-PAGE**

Proteiny jsme analyzovali na vertikální SDS-polyakrylamidové gelové elektroforéze (SDS-PAGE) v SDS elektroforetickém pufru dle laboratorního manuálu (Ausubel et al., 1995). Použili jsme 4% zaostřovací gel a 8 – 12 % separační gel. Do jedné dráhy jsme nanášeli 10 – 15  $\mu$ l celkového proteinového lyzátu nebo 30  $\mu$ g proteinů. Proteiny rozdělené na SDS-PAGE jsme přenesli na PVDF membránu.

### **3.5.3 Westernový přenos („Western blotting“)**

Za účelem imunodetekce jsme přenesli proteiny z polyakrylamidového gelu na PVDF membránu Immobilon-P (Millipore). Membránu jsme aktivovali smočením v methanolu a následně v blotovacím pufru (48 mM Tris; 39 mM glycin; 0,04 % SDS; 20 % methanol). Přenos proteinů probíhal 30 min při 360 mA v blotovacím pufru. Známkou správného přenosu proteinů byly viditelné proužky standardu na membráně (Štekerová, 2012).

### **3.5.4 Imunodetekce**

Postup imunodetekce proteinů přenesených na PVDF membránu jsme rozdělili do dvou skupin dle použitých protilátek.

První je postup pro protilátky, které vyžadují použití sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou. (1) PVDF membránu jsme blokovali 30 min v 5 % BSA v pufru TBS-T (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,05 % Tween-80; pH 7,6) a (2) dále inkubovali s primární protilátkou ředěnou 1 % BSA v TBS-T přes noc při 4°C. (3) Ráno jsme PVDF membránu promyli 3 x 10 min v TBS-T. (4) Inkubovali 1 hod se sekundární protilátkou konjugovanou

s křenovou peroxidázou ředěnou 1 % BSA v TBS-T a (5) opět promyli 3 x 10 min v TBS-T. (6) Signál jsme vyvolávali použitím komerční soupravy SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) a detekovali na rentgenovém filmu CP-BU New (FOMA BOHEMIA spol. s.r.o.). Tento postup jsme používali pro imunodetekci fosforylovaných proteinů (pThr) a proteinů: LocZ, StkP, DivIVA, FtsA, FtsZ, PhpP, RpoA a proteinů fúzovaných s flagovou kotvou. Jednotlivé protilátky, jejich ředění a původ jsou uvedeny v tabulce 3-5. Jako sekundární protilátku jsme vždy použili kozí protilátku konjugovanou s křenovou peroxidovou proti králičím IgG (Sigma) v konečném ředění 1:2000 v případě detekce fosforylovaných proteinu a v ředění 1:10000 v ostatních případech imunodetekce.

Druhý postup nevyžaduje použití sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou, protože již samotná primární protilátka je konjugována s křenovou peroxidázou. Postup se odlišuje v prvním kroku, kdy je PVDF membrána blokována 3 % BSA v TBS-T přes noc, a dále se postupuje od kroku (4) viz výše. Takto upravený postup jsme používali v případě detekce proteinů fúzovaných s histidinovou kotvou či GFP. Jednotlivé protilátky, jejich ředění a původ je opět uveden v tabulce 3-5.

Primární protilátka proti	Označení	Konečné ředění protilátky	Původ
pThr	$\alpha$ -pThr	1:2 000	Cell Signalling
StkC	$\alpha$ -StkC	1:50 000	Nováková et al., 2005
LocZ	$\alpha$ -LocZ	1:50 000 – 1:20 000	Tato práce, kap. 3.5.6
DivIVA	$\alpha$ -DivIVA	1:20 000	Fadda et al., 2007
FtsA	$\alpha$ -FtsA	1:20 000	Lara et al., 2005
FtsZ	$\alpha$ -FtsZ	1:10 000	Fadda et al., 2007
PhpP	$\alpha$ -PhpP	1:20 000	Ulrych et al., 2016
RpoA	$\alpha$ -RpoA	1:10 000	Nováková et al., 2010
Flag-tagu	$\alpha$ -Flag	1:1000	Sigma-Aldrich
His-tagu	$\alpha$ -His	1:10 000	Sigma
GFP	$\alpha$ -GFP	1:1 000	Santa Cruz Biotechnology

**Tab. 3-5: Primární protilátky použité při imunodetekci proteinů**

### 3.5.5 Exprese a purifikace rekombinantních proteinů

Rekombinantní protein His-PhpP jsme purifikovali dle Nováková et al. (2005). Kmen *E. coli* BL21(DE3) nesoucí expresní plasmid pEXphpP jsme zaočkovali do LB média s ampicilinem (200  $\mu$ g/ml) na výslednou OD<sub>600</sub> = 0,05 a kultivovali při teplotě 30°C. Po dosažení

OD<sub>600</sub> = 0,6 jsme expresi proteinu His-PhpP indukovali přidáním IPTG (výsledná koncentrace 1 mM) a v kultivaci jsme pokračovali další 3 – 4 hodiny. Kulturu jsme centrifugovali (5000 g, 10 min) a buněčný pelet promyli v PBS pufru (137 mM NaCl; 3 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4) a zamrazili při -20°C. Zamražený buněčný pelet jsme resuspendovali v NiNta Lysis pufru (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 10 mM imidazol; pH 8), přidali inhibitor proteas (Roche) a benzonasu (Merck). Buňky jsme rozbili za použití French Pressu. Solubilní frakci proteinu jsme od buněčného debrisu oddělili centrifugací (9 000 g, 15 min). Solubilní protein His-PhpP jsme izolovali pomocí afinitní chromatografie dle návodu výrobce (Qiagen, Ni-NTA Agarose).

K expresi a purifikaci proteinů LocZ a DivIVA jsme použili kmeny *S. pneumoniae* exprimující daný protein fúzovaný s flag-kotvou. Bakteriální kmeny Sp174 a Sp188 jsme očkovali do C+Y media. Bakteriální kultury jsme kultivovali při 37°C staticky do OD<sub>600</sub> = 0,4. Celkové buněčné lyzáty jsme získali dle postupu uvedeného v kapitole 3.5.1 Izolace proteinů z buněk *S. pneumoniae*, druhý odstavec. Proteiny Flag-LocZ a DivIVA-Flag jsme izolovali pomocí afinitní chromatografie dle návodu výrobce (Sigma-Aldrich, ANTI-flag M2 Affinity Gel).

### 3.5.6 Příprava polyklonální králičí protilátky $\alpha$ -LocZ

Rekombinantní protein LocZ-His jsme purifikovali dle Nováková et al. (2005). Kmen *E. coli* BL21(DE3) nesoucí expresní plasmid pETPhos-linkLocZ jsme zaočkovali do LB média s ampicilinem (200  $\mu$ g/ml) na výslednou OD<sub>600</sub> = 0,05 a kultivovali při teplotě 30°C. Po dosažení OD<sub>600</sub> = 0,6 jsme expresi proteinu LocZ-His indukovali přidáním IPTG (výsledná koncentrace 1 mM) a v kultivaci jsme pokračovali další 3 – 4 hodiny. Kulturu jsme centrifugovali (5000 g, 10 min, 4°C) a buněčný pelet 2x promyli v pufru (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; pH 8) a zamrazili při -20°C. Zamražený buněčný pelet jsme resuspendovali v NiNta Lysis pufru (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 10 mM imidazol; pH 8), přidali inhibitor proteas (Roche) a benzonasu (Merck). Buňky jsme rozbili za použití French Pressu. Solubilní frakci proteinu jsme od buněčného debrisu oddělili centrifugací (5 000 g, 10 min) a další centrifugací (10 000g, 15 min) oddělili inkluzní tělíska. Solubilní protein LocZ-His jsme izolovali pomocí afinitní chromatografie dle návodu výrobce (Qiagen, Ni-NTA Agarose). Protein LocZ-His izolovaný v NiNta Elution pufru (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 250 mM imidazol; pH 8) jsme

dialyzovali pomocí pufru (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; pH 8). Následně jsme změřili koncentraci proteinů ve vzorku a pomocí SDS PAGE zkontrolovali čistotu vzorku. Takto upravený vzorek sloužil k přípravě polyklonální králičí protilátky proti LocZ. Přípravu protilátky zajistila firma Apronex, s.r.o. (Česká Republika).

### 3.6 Defosforylační reakce *in vitro*

Purifikované proteiny Flag-LocZ a Flag-DivIVA zachycené na ANTI-flag M2 Affinity Gelu jsme smíchali s 55 µl reakčního pufru (50 mM Tris, pH 7,5, 0,2 mM EDTA, 0,02% 2-merkapt ethanol, 5 mM MnCl<sub>2</sub>), přidali 4 µg purifikovaného proteinu His-PhpP a inkubovali při 37°C. Fosfatázovou reakci jsme ukončili přidávkem 5x koncentrovaného SDS vzorkového pufru (350 mM Tris; 20 % glycerol; 15 % SDS; 25 % β-merkapt ethanol; bromfenolová modř; pH 6,8) v různých časových intervalech v časovém rozmezí 0 – 90 min. Vzorky jsme inkubovali při 100°C 10 min, rozdělili pomocí SDS-PAGE a provedli imunodetekci.

### 3.7 Testy citlivosti k různým druhům stresů

Testy citlivosti jsme prováděli v 10 ml média TSB metodou měření růstové křivky (pokud není uvedeno jinak) ve třech opakujících se měřeních.

**Teplotní stres:** Citlivost buněk různých kmenů *S. pneumoniae* na teplotní stres jsme testovali vystavením kultur teplotám 37°C (kontrola) a 40°C. Médium temperované na určitou teplotu jsme vždy inokulovali 200 µl kultury o OD<sub>600</sub> = 0,4 a v půlhodinových intervalech jsme monitorovali bakteriální růst měřením optické denzity při 600 nm (Štekerová, 2012).

**Osmotický stres:** Citlivost buněk různých kmenů *S. pneumoniae* na osmotický stres jsme testovali vystavením kultur hyperosmotickému šoku. Kmeny *S. pneumoniae* jsme nejprve inokulovali do tekutého média, aby se inicioval růst. Po dosažení OD<sub>600</sub> = 0,2 jsme provedli osmotický šok přidáním NaCl k testovaným kulturám (konečná koncentrace NaCl v médiu byla 400 mM). Zároveň jsme vždy jednu kulturu z každého kmene nechali jako kontrolní (osmotický šok nebyl proveden). Kultivace probíhala při 37°C. V půlhodinových intervalech jsme bakteriální růst monitorovali měřením optické denzity při 600 nm (Štekerová, 2012).

**pH stres:** Citlivost buněk různých kmenů *S. pneumoniae* na pH stres jsme testovali pěstováním kultur v médiích o různém pH. 200 µl kultury o OD<sub>600</sub> = 0,4 jsme vždy inokulovali

klasické TSB médium (pH 7,5), médium TSB o nízkém pH (6,5) a TSB médium o vysokém pH (8). Kultivace probíhala při 37°C. V půlhodinových intervalech jsme bakteriální růst monitorovali měřením optické denzity při 600 nm (Štekerová, 2012).

**Oxidativní stres:** Určení citlivosti buněk na oxidativní stres bylo srovnání růstu jednotlivých kmenů *S. pneumoniae* v pevné půdě po vystavení oxidativnímu stresu. Kmeny *S. pneumoniae* jsme nejprve inokulovali do tekutého média TSB nebo CAT. Kultivace probíhala při 37°C. Po dosažení  $OD_{600} = 0,2$  jsme kultury vystavili na 15 min účinku 10 mM a 20 mM  $H_2O_2$  při pokojové teplotě. Poté jsme kultury naředili a vyseli do předem rozpuštěné a na 50°C vytemperované agarové půdy Gelosa D. Po vychladnutí a ztuhnutí půdy jsme kultivační misky umístili do termostatu a kultivovali přes noc při 37°C. Stejný postup jsme dodrželi i pro kultury kontrolní, které nebyly  $H_2O_2$  vystaveny. Citlivost každého kmene k účinkům  $H_2O_2$  jsme vyjádřili jako procenta přeživších buněk z celkového počtu buněk (bez oxidativního stresu).

### 3.8 Mikroskopie

Buňky kmenů *S. pneumoniae* jsme pozorovali pomocí mikroskopu Olympus IX81. Využívali jsme olejový imersní objektiv (100x O2PH-UPLFLN/1.3 N.A. Oil). Různým nastavením filtrů jsme mohli v jediném preparátu pozorovat fluorescenci GFP, RFP, CFP, DNA obarvenou DAPI i morfologii buněk ve fázovém kontrastu. Obraz jsme snímali pomocí kamery Olympus FV2T Digital B/W Fireware za použití programu Cell<sup>R</sup> Version 2.0. Obrázky jsme upravili v grafickém programu CorelDRAW X3 (Corel Corporation) (Štekerová, 2012).

#### 3.8.1 Příprava fixovaných preparátů *S. pneumoniae*

Fixované preparáty jsme používali k pozorování obarvené DNA v buňkách a pozorování lokalizace nativního proteinu v buňce pomocí imunofluorescenční mikroskopie.

Fixované preparáty jsme připravovali metodou podle (Morlot et al., 2003). Kulturu jsme pěstovali do  $OD_{600} = 0,3$ , odebrali 500  $\mu$ l do mikrozkuřavky a smíchali je s 500  $\mu$ l 2x fixačního roztoku (5% paraformaldehyd; 0,06% glutaraldehyd; 60 mM  $Na_3PO_4$ ; pH 7,5). Po fixaci buněk při pokojové teplotě 15 minut na rotátoru jsme mikrozkuřavku inkubovali 45 minut na ledu a poté centrifugovali (5 min, 900 g). Pelet jsme resuspendovali v 1 ml PBS pufru (137 mM NaCl; 3 mM KCl; 10 mM  $Na_2HPO_4 \cdot 7 H_2O$ ; 1,8 mM  $KH_2PO_4$ ; pH 7,4), centrifugovali (3 min, 900 g) a následně dvakrát promyli 1 ml PBS (centrifugace 3 min, 3200 g). Buněčný pelet jsme



resuspendovali ve 20  $\mu$ l GTE pufru (50 mM glukosa; 20 mM Tris-HCl; pH 7,5; 10 mM EDTA) s čerstvě přidaným lysozymem (0,1 mg/ml). 10  $\mu$ l buněčné suspenze jsme nanесли na PolyPrep sklíčko (Sigma) a nechali na stole zaschnout 5 min. Poté jsme odsáli přebytečnou tekutinu ze skvrny a sklíčko promyli 2x v PBS pufru, ponořili do methanolu a dali na 5 min do  $-20^{\circ}\text{C}$ . Sklíčko jsme rehydratovali v PBS pufru a na oschlé sklíčko jsme pipetovali 2  $\mu$ l Vecta Shield (Vector Laboratories) v místě, kde byly zachyceny buňky. Vecta Shield obsahuje barvivo DAPI, které specificky barví DNA. Preparát jsme přikryli krycím sklíčkem, okraje jsme zafixovali lakem, aby preparát nevysychal, a pozorovali pomocí mikroskopu Olympus IX81 (Štekerová, 2012).

### **3.8.2 Příprava živých preparátů *S. pneumoniae***

Dočasně živé preparáty jsme používali k pozorování morfologie buněk bakteriálních kmenů a následným analýzám statistiky velikosti buněk. Kulturu jsme pěstovali v tekutém médiu TSB nebo C+Y na  $\text{OD}_{600} = 0,3$ . Pokud jsme pěstovali buňky kmenů exprimujících proteiny pod inducibilním zinkovým promotorem ( $P_{czcD}$ ), přidali jsme do média  $\text{ZnCl}_2$  v konečné koncentraci 0,45 mM (TSB) nebo  $\text{ZnSO}_4$  v konečné koncentraci 0,15 mM (C+Y). Na krycí sklíčko jsme nanесли 2  $\mu$ l kultury a překryli tenkým agarózovým bločkem (1% agarosa v PBS pufru nebo C+Y médiu). Takto připravený preparát jsme upevnili do speciální komůrky a pozorovali pomocí mikroskopu Olympus IX81.

### **3.8.3 Příprava živých preparátů buněk obarvených fluorescenčním vankomycinem (VanFL)**

Dočasně živé preparáty jsme připravovali metodou podle Beilharz et al. (2012). Kulturu pěstovanou v tekutém médiu TSB narostlou na  $\text{OD}_{600} = 0,2$  jsme barvili směsí VanFL-vankomycin (směs 50:50) o koncentraci 0,1  $\mu\text{g/ml}$  5 min při  $37^{\circ}\text{C}$  a následně pozorovali pomocí mikroskopu Olympus IX81.

### **3.8.4 Příprava živých preparátů buněk exprimujících proteiny s fluorescenčním tagem**

Dočasně živé preparáty jsme připravovali metodou podle Beilharz et al. (2012). Kulturu jsme pěstovali v tekutém médiu TSB nebo C+Y na  $\text{OD}_{600} = 0,3$ . Pokud jsme pěstovali buňky kmenů exprimujících proteiny s fluorescenčním tagem pod inducibilním zinkovým promotorem

(*P<sub>czcD</sub>*), přidali jsme do média  $\text{ZnCl}_2$  v konečné koncentraci 0,45 mM (TSB) nebo  $\text{ZnSO}_4$  v konečné koncentraci 0,15 mM (C+Y). Na krycí sklíčko jsme nanесли 2  $\mu\text{l}$  kultury a překryli tenkým agarózovým bločkem (1% agarosa v PBS pufru nebo C+Y médiu). Takto připravený preparát jsme upevnili do speciální komůrky a pozorovali pomocí mikroskopu Olympus IX81. Analýzu fluorescenčního signálu v případě kolokalizace proteinů jsme provedli pomocí softwaru FluoView (Olympus).

### **3.8.5 Časoběrná mikroskopie**

Časoběrnou mikroskopii jsme provedli metodou podle Beilharz et al 2012. Kulturu jsme pěstovali v tekutém médiu C+Y do  $\text{OD}_{600} = 0,3$ . Na předem připravené podložní sklíčko se ztuženým médiem C+Y 1,5 % agarosou jsme nanесли 2  $\mu\text{l}$  kultury a nechali inkubovat 30 min při  $37^\circ\text{C}$  v předem vyhřáté mikroskopovací komoře ve tmě a následně mikroskopovali. Mikroskopické snímky byly zhotoveny každých 10 minut. Výsledné video bylo sestaveno pomocí softwaru ImageJ.

### **3.8.6 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)**

20 ml kultury v exponenciální fázi ( $\text{OD}_{600} \sim 0,4$ ) jsme centrifugovali 10 min 10 000 g a buněčný pelet jsme resuspendovali v 10 ml čerstvého média. Fixace buněk proběhla metodou podle Kellenberger et al. (1959). Bakteriální buňky jsme fixovali v 0,1 % roztoku oxidu osmičelého jednu hodinu a přes noc v 1% roztoku oxidu osmičelého. Fixovaný a dobře promytý vzorek jsme dehydratovali pomocí alkoholové řady a následně nechali zatvrdnout v pryskyřici (Vestopal). Ultratenké řezy jsme kontrastně barvili uranylacetátem a citrátem olovnatým (Reynolds ES 1963). Připravené preparáty jsme pozorovali v elektronovém mikroskopu Philips CM100 (FEI, Philips EO, Holandsko) při napětí 80 kV. Obraz jsme snímali pomocí kamery MegaViewII při zvětšení 46 000x a upravili pomocí softwaru Analysis 3.2 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Německo).

### **3.8.7 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)**

Preparáty pro skenovací elektronovou mikroskopii jsme připravili paralelně ze stejných bakteriálních kultur určených pro přípravu preparátů pro TEM. 1 ml bakteriální kultury jsme fixovali v 1,5% glutaraldehydu jednu hodinu. Následně jsme buňky promyli v kakodylátovém

pufru a fixovali v 3% glutaraldehydu v kakodylátovém pufru přes noc při 4°C. Poté jsme buňky důkladně promyli a nechali sedimentovat přes noc na SPI filtry ošetřené poly-L-lysinem (velikost pórů 0,2 μm) při 4°C. Filtry jsme dehydratovali pomocí alkoholové řady až čistým acetonem následované sušením v kritickém bodě oxidu uhličitého. Suché preparáty jsme pokryly vrstvou zlata / platiny v Polaron sputter coateru E5100 / v Q150TES sputter coateru (Quorum Technologies Ltd., Ringmer, Velká Británie). Připravené preparáty jsme pozorovali pomocí elektronového mikroskopu Tescan Vega LSU (Tescan, Brno, Česká republika) při napětí 20 kV / elektronového mikroskopu FEI Nova NanoSem 450 (FEI, Česká republika) při napětí 5 kV.

### 3.8.8 Super-rezoluční mikroskopie

Z 10 ml kultury pěstované v tekutém médiu C+Y a narostlé do  $OD_{600} \sim 0,3$  jsme odebrali 10 μl a smíchali je s 10 μl Vecta Shiel. Z takto připravené směsi jsme aplikovali 3 μl na krycí sklíčko a překryli tenkým agarózovým bločkem (1 % agarosa v C+Y médiu). Takto připravený preparát jsme upevnili do speciální komůrky a pozorovali pomocí super-rezolučního mikroskopu N-SIM (Nikon). Využívali jsme olejový imersní objektiv (CFI SR Apochromat TIRF 100 x oil N.A. 1,49) a fluorescenci GFP jsme pozorovali za využití laseru 488 nm a emisní kostky pro superrezoluci (Em: 510 - ∞), grid 3DEX V-R (405-643) pro zmíněný objektiv. Obraz jsme snímali pomocí kamery EM CCD iXon3 DU-897E (Andor Technology Ltd.) za použití programu NIS-Elements Ar V4.20 s modulem NIS-A. Rekonstruované obrázky jsme dále upravili v grafickém programu Fiji (ImageJ, <https://imagej.nih.gov/ij/>).

### 3.9 Měření velikosti buněk a statistická analýza

Mikroskopické pozorování jednotlivých kmenů *S. pneumoniae* naznačovalo rozdíly ve velikosti a morfologii buněk, proto jsme se rozhodli tyto rozdíly kvantifikovat. Pro analýzu jsme použili obrazy snímané pomocí kamery Olympus FV2T digital B/W Fireware a olejového imersního objektivu (100x O2PH-UPLFLN/1.3 N.A. Oil) v režimu fázového kontrastu. Měření velikosti buněk jsme provedli pomocí volně dostupného programu MicrobeTracker Suite (Sliusarenko et al., 2011), který umožňuje automatickou detekci buněk a následnou analýzu parametrů. Jako prvotní morfologický parametr jsme zvolili délku buňky (nejdelší rozměr buňky), jako druhotný morfologický parametr jsme zvolili šířku buňky. Počet analyzovaných

buněk se lišil dle pěstování kultur *S. pneumoniae* a přípravy preparátu. Vždy jsme ale analyzovali alespoň dvě celá mikroskopická pole z dvou na sobě nezávislých experimentů.

Získaná data jsme analyzovali ve statistickém programu GraphPad Prism (3.0). Pro soubor dat každého kmene jsme pomocí popisné statistiky určili minimální a maximální délku buňky, medián (střední hodnota), první a třetí kvartil (oddělují nejmenší a největší čtvrtinu naměřených hodnot), průměr a průměrnou šířku buňky. Tyto hodnoty jsme graficky znázornili pomocí krabicového grafu, kde jednotlivé prvky grafu (vodorovné úsečky) znázorňují postupně následující charakteristiky: minimum, dolní kvartil, medián, tj. prostřední kvartil, horní kvartil a maximum. Zastoupení buněk v různých velikostních třídách jsme znázornili v histogramech, jejichž hranice byly dány velikostí nejmenší a největší buňky. Statistickou významnost rozdílů mezi jednotlivými soubory dat jsme porovnávali pomocí neparametrického Mann-Whitneyho testu (Štekerová, 2012).

### **3.9.1 Analýza obrazu pro vytvoření fluorescenčního profilu**

Analýzu fluorescenčního signálu v případě kolokalizace proteinů jsme provedli pomocí softwaru FluoView (Olympus). Lokalizaci jednotlivých proteinů v buňce jsme hodnotili z mikroskopických snímků živých buněk. Buňky *S. pneumoniae* byly rozděleny do 6 stádií buněčného dělení na základě buněčné morfologie a lokalizačního profilu proteinů, které se účastní buněčného dělení, jako je FtsZ a FtsA (Lara et al., 2005; Morlot et al., 2005; Fadda et al., 2007). Bylo analyzováno více jak 300 buněk ze dvou na sobě nezávislých měřeních a výsledek byl stanoven jako procento buněk vyskytujících se v daném stádiu buněčného dělení. Pro každé stádium byla vybrána jedna buňka jako reprezentativní vzorek a zpracován graf intenzity fluorescence v závislosti na délce buňky.

### **3.10 Příprava plazmidů a jejich využití v přípravě bakteriálních kmenů**

**pBCSMH036** (Henriques et al., 2013): Je určen k expresi CFP-FtsZ pod kontrolou konstitutivního promotoru *sigA* ve *S. pneumoniae*. Selekcčním znakem vektoru je rezistence pro tetracyklin (1 µg/ml). Vektor jsme použili pro vytvoření kmenů Sp240, Sp242 a Sp243 a to tak, že jsme transformovali buňky *S. pneumoniae* kmene Sp208 (WT, R6), Sp228 (*rfp-locZ*) a Sp239 ( $\Delta locZ$ ) plazmidem pBCSMH036 a pozitivní transformanty selektovali v médiu s tetracyklinem.

**pMU-P96-flag-locZ:** Pro amplifikaci promotoru P96 jsme použili oligonukleotidy LN231 a LN215 a jako templát plazmid pMU1328 (Lo Sapio et al., 2012). *flag-locZ* jsme amplifikovali za pomoci oligonukleotidů NS3 a NS4 a jako templát sloužil plazmid pZn-flag-locZ. Oba amplikony jsme spojili pomocí fúzní PCR a oligonukleotidů LN231 a NS4. Výsledný PCR fragment jsme klonovali do vektoru pMU1328 pomocí restrikčních míst EcoRI a Sall. Selekčním znakem vektoru pMU1328 je rezistence pro erytromycin (1 µg/ml). Transformací kompetentních buněk kmene Sp57 ( $\Delta locZ$ ) plazmidem pMU-P96-flag-locZ jsme vytvořili kmen Sp188.

Následující plazmidy byly vytvořeny jako derivát vektoru pJWV25 (Eberhardt et al., 2009), který je určen pro expresi proteinů fúzovaných s GFP ve *S. pneumoniae*. Vektor obsahuje inducibilní zinkový promotor  $P_{czcD}$  a dvě sekvence, *gatC* a *bgaA*, homologní se sekvencemi na chromosomu *S. pneumoniae*. Díky těmto sekvencím lze vektor použít k vložení konstruktů do postradatelného lokusu *bgaA* v genomu *S. pneumoniae*. Selekčním znakem vektoru je rezistence k tetracyklinu (2,5 µg/ml). Bakteriální kmeny jsme vytvořili transformací daného kmene *S. pneumoniae* linearizovaným plazmidem, který jsme štěpili pomocí PvuI. Vzniklé transformanty jsme selektovali na půdě s tetracyklinem.

**pJWV25-DivIVA-GFP** (Beilharz et al., 2012): linearizovaný plazmid jsme použili k vytvoření kmene Sp250 a Sp253.

**pJWV25-GFP-FtsA** (Beilharz et al., 2012): linearizovaný plazmid jsme použili k vytvoření kmene Sp254, Sp256 a Sp257.

**pJWV25-GFP-StkP** (Beilharz et al., 2012): linearizovaný plazmid jsme použili k vytvoření kmene Sp246, Sp248 a Sp249.

**pZn-flag-locZ:** Pro amplifikaci *locZ* jsme použili oligonukleotidy NS2 a LN155 a jako templát chromozomální DNA kmene Sp1.  $P_{czcD}$  promotor jsme amplifikovali použitím oligonukleotidů LN123 a NS1 a jako templát sloužil plazmid pJWV25. Oba amplikony jsme spojili pomocí fúzní PCR a oligonukleotidy LN123 a LN155. Finální PCR produkt jsme klonovali do vektoru pJWV25 pomocí restrikčních míst EcoRI a NotI.

**pZn-GFP-LocZ:** Pro amplifikaci *locZ* jsme použili oligonukleotidy LN156 a LN157 a jako templát chromozomální DNA kmene Sp1. PCR produkt jsme štěpili SpeI a NotI a klonovali do vektoru pJWV25. Vzniklý pZn-GFP-LocZ jsme linearizovali a společně s dalším vektorem pDELstkP (Nováková et al., 2005) jsme je použili k vytvoření kmene Sp58 (Štekerová, 2012).

**pZn-His6-LocZ:** Pro amplifikaci *his6-locZ* jsme použili oligonukleotidy LN140 a LN155 a jako templát sloužil vektor pETPHos-LocZ (Nováková et al., 2010).  $P_{czcD}$  promotor jsme amplifikovali pomocí oligonukleotidů LN123 a LN139 z vektoru pJWV25. Následně jsme tyto dva amplikony spojili pomocí fúzní PCR za použití oligonukleotidů LN123 a LN155. Výsledný PCR fragment jsme štěpili EcoRI a NotI a klonovali do vektoru pJWV25. Vzniklý pZn-His6-LocZ jsme linearizovali a následně použili k vytvoření kmene Sp60 (Štekerová, 2012).

Všechny konstrukty byly kontrolovány za použití metody sekvenování DNA.

### 3.11 Příprava kmenů *S. pneumoniae* $\Delta locZ$ pomocí Cheshire kazety

Cheshire kazetu (Weng et al., 2009) jsme použili k přípravě kmene  $\Delta locZ$  na genetickém pozadí dvou divokých kmenů, a to Sp1 (Rx1) a Sp4 (D39).

Upstream a downstream oblasti genu *locZ* jsme amplifikovali za použití oligonukleotidových párů PB014/PB015 a PB012/PB013 a jako templát sloužila chromozomální DNA divokého kmene. Vzniklé fragmenty DNA jsme štěpili MluI a NcoI. Cheshire kazetu jsme amplifikovali použitím oligonukleotidů DAM868 a DAM869 a vzniklý PCR produkt štěpili MluI a NcoI. Všechny tři amplikony jsme spojili ligasou a amplifikovali za použití oligonukleotidů PB012 a PB015. Takto připraveným lineárním DNA konstruktem jsme transformovali kompetentní buňky divokého kmene Sp1 (Rx1) a Sp4 (D39). Cheshire kazeta nese gen pro erytromycinovou rezistenci a do genomu *S. pneumoniae* byla integrována homologní rekombinací díky sekvencím těsně přiléhajícím ke genu *locZ*. Vzniklé erytromycin rezistentní mutanty jsme pěstovali v médiu s přidavkem fukosy, čímž je aktivován přepis Cre rekombinasy z Cheshire kazety pod kontrolou inducibilního fukosového promotoru. Cre rekombinasa rozeznává dvě specifické sekvence Cheshire kazety zvané *lox* místa (*lox66* a *lox71*), které ji ohraničují. V *lox* místech dochází excizivní rekombinací k vyštěpení celé Cheshire kazety včetně erytromycinové rezistence a vzniká místo *lox72* dlouhé 24 bp jako reziduum po Cheshire kazetě. Vzniklé bakteriální kmeny byly označeny Sp57 (Rx1;  $\Delta locZ$ ) (Štekerová, 2012) a Sp267 (D39;  $\Delta locZ$ ).

### 3.12 Příprava kmenů *S. pneumoniae* pomocí Janus kazety

Janus kazeta nese gen pro kanamycinovou rezistenci, který je následovaný recesivní alelou genu *rpsL*. Kazeta funguje na principu dvou krokové strategie negativní selekce (Sung et al., 2001).

#### 3.12.1 Příprava kmene $\Delta locZ$ v kmeni R6 *S. pneumoniae*

Nejprve jsme museli geneticky modifikovat divoký kmen R6 (Sp208), který ve svém genomu nese *rpsL* gen pro streptomycinovou rezistenci, která je důležitá pro metodiku využití Janus kazety. Gen *rpsL* s jeho nejbližším okolím jsme amplifikovali použitím oligonukleotidů JG74 a JG75 jako templát sloužila chromozomální DNA Sp1 (Rx1). Amplikon jsme transformovali do kompetentních buněk kmene Sp208 (WT, R6), a tím vytvořili streptomycin rezistentní kmen označený Sp225. Tento kmen jsme dále používali jako výchozí kmen.

V prvním kroku strategie při využití Janus kazety jsme amplifikovali Janus kazetu použitím oligonukleotidů JG28 a JG29. Upstream a downstream oblasti genu *locZ* jsme amplifikovali pomocí oligonukleotidových párů KB1/KB2 a KB3/KB4 a jako templát sloužila chromozomální DNA divokého kmene Sp208 (R6). Všechny tři amplikony jsme spojili pomocí fúzní PCR za použití oligonukleotidů KB1 a KB4. Výsledný lineární PCR produkt jsme použili k transformaci kompetentních buněk kmene Sp225 a získaný kanamycin rezistentní, streptomycin senzitivní kmen jsme označili jako Sp227 (R6; *rpsL*, *locZ*::*janus kazeta*).

V druhém kroku jsme vytvořili kmen  $\Delta locZ$  bez selektovatelného markeru tak, že jsme amplifikovali upstream a downstream přiléhající oblasti *locZ* pomocí oligonukleotidových párů KB1/KB13 a KB4/KB14. Vzniklé amplikony jsme spojili pomocí fúzní PCR za použití oligonukleotidů KB1 a KB4. Výsledný PCR produkt jsme transformovali do kompetentních buněk kmene Sp227 a získaný kanamycin senzitivní, streptomycin rezistentní kmen jsme označili jako Sp239 (R6; *rpsL*,  $\Delta locZ$ ).

#### 3.12.2 Příprava kmenů exprimujících varianty proteinu *LocZ* pod nativním promotorem na genetickém pozadí divokého kmene *S. pneumoniae* R6

K přípravě bakteriálních kmenů *S. pneumoniae* exprimujících různé varianty proteinu *LocZ* pod kontrolou nativního promotoru jsme využili již připravený kmen Sp227 (R6, *rpsL*, *locZ*::*janus kazeta*). Janus kazeta byla pomocí homologní rekombinace vyměněna za *locZ*

fúzovaný na jeho N-konci s *rfp* (*mKate2*) nebo *gfp*. *rfp* jsme amplifikovali použitím oligonukleotidů KB7 a KB8 a jako templát sloužila chromozomální DNA kmene HK95 (Beilharz et al., 2012). *locZ* jsme amplifikovali použitím oligonukleotidů KB9 a KB10 a pomocí fúzní PCR spojili s *rfp* za použití oligonukleotidů KB7 a KB10. Upstream a downstream oblasti genu *locZ* jsme amplifikovali použitím oligonukleotidových párů KB1/KB5 a KB4/KB6 a následně pomocí fúzní PCR spojili s *rfp-locZ*. Výsledný amplicon jsme transformovali do kompetentních buněk kmene Sp227. Vytvořený kmen jsme označili jako Sp228 (R6; *rpsL*, *locZ::rfp-locZ*).

*gfp-locZ* jsme amplifikovali použitím oligonukleotidů KB10 a KB11 a jako templát sloužil plasmid pZn-GFP-LocZ. Upstream a downstream oblasti genu *locZ* jsme amplifikovali použitím oligonukleotidových párů KB1/KB5 a KB4/KB6 a následně pomocí fúzní PCR spojili s *gfp-locZ*. Výsledný amplicon jsme transformovali do kompetentních buněk kmene Sp227. Vytvořený kmen jsme označili jako Sp229 (R6; *rpsL*, *locZ::gfp-locZ*).

Zkrácenou variantu *gfp-locZ-ΔCTD*<sub>95AMK</sub> a *gfp-locZ-ΔCTD* jsme amplifikovali každou zvlášť použitím oligonukleotidových párů KB11/KB16 a KB11/KB17 a jako templát sloužil plasmid pZn-GFP-LocZ. Upstream a downstream oblasti genu *locZ* jsme amplifikovali použitím oligonukleotidových párů KB1/KB5 a KB4/KB15 a následně pomocí fúzní PCR spojili s *gfp-locZ-ΔCTD*<sub>95AMK</sub> nebo *gfp-locZ-ΔCTD*. Zkrácenou variantu *locZ-ΔNTD* jsme amplifikovali za použití oligonukleotidů KB10/KB21 a *gfp* za použití KB11/KB20. Jako templát sloužil plasmid pZn-GFP-LocZ. Upstream a downstream oblasti genu *locZ* jsme amplifikovali použitím oligonukleotidových párů KB1/KB5 a KB4/KB6 a následně pomocí fúzní PCR spojili s *gfp* a *locZ-ΔNTD*. Výsledné amplicony jsme každý zvlášť transformovali do kompetentních buněk kmene Sp227. Vytvořené kmeny jsme označili jako Sp275 (R6; *rpsL*, *locZ::gfp-locZ-ΔCTD*<sub>95AMK</sub>), Sp277 (R6; *rpsL*, *locZ::gfp-locZ-ΔCTD*) a Sp279 (R6; *rpsL*, *locZ::gfp-locZ-ΔNTD*).

Kmeny exprimující fosfoablativní (Sp234) nebo fosfomimetickou (Sp235) alelu genu *locZ* jsme připravili následovně: Jednotlivé varianty genu *locZ* jsme amplifikovali použitím oligonukleotidů KB10 a KB12 a jako templát sloužil plasmid pZn-His6-LocZ-T67A/T78A nebo pZn-His6-LocZ-T67E/T78E. Upstream a downstream oblasti genu *locZ* jsme amplifikovali použitím oligonukleotidových párů KB1/KB5 a KB4/KB6. Vzniklé amplicony jsme pomocí fúzní PCR spojili s ampliconem modifikované verze genu *locZ*. Výsledným PCR produktem



jsme transformovali kompetentní buňky kmene Sp227 a tak vytvořili kmen Sp234 (R6; *rpsL*, *locZ::locZ-T67A/T78A*) a Sp235 (R6; *rpsL*, *locZ::locZ-T67E/T78E*).

## 4 Výsledky a diskuze

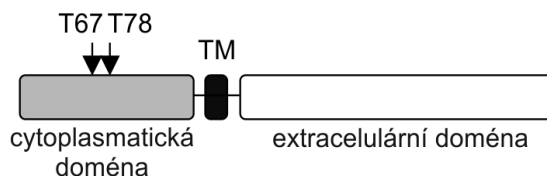
Kapitola Výsledky a diskuze bude z důvodu přehlednosti rozdělena dle jednotlivých projektů na dvě základní podkapitoly. Každá základní podkapitola bude složena z vlastních výsledků a následné diskuze.

### 4.1 Projekt: *LocZ* je nový protein buněčného dělení určující správné umístění septa u *Streptococcus pneumoniae*

Výsledky tohoto projektu zahrnují, z důvodu přehlednosti a ucelenosti, několik výsledků již dříve uvedených v diplomové práci s názvem Spr0334, nový protein buněčného dělení u *Streptococcus pneumoniae* (Štekerová, 2012). Vždy bude uvedeno, zda se jedná o původní výsledky použité v uvedené diplomové práci, či nově získané a zda tyto výsledky spolu korespondují.

*Streptococcus pneumoniae* kóduje ve svém genomu jediný gen pro Ser/Thr proteinkinasu eukaryotického typu nazývanou StkP. Mezi její substráty patří protein Spr0334 (Nováková et al., 2010), nyní známý pod názvem MapZ (Mid-cell-Anchored Protein Z) (Fleurie et al., 2014) a námi pojmenovaný jako *LocZ* (Localizing at midcell of FtsZ) (Holečková et al., 2014), v této práci dále označovaný jako *LocZ*.

*LocZ* je membránový protein účastnící se buněčného dělení u *S. pneumoniae* doposud neznámým mechanismem. Protein *LocZ* se skládá z predikované N-terminální cytoplasmatické domény (AMK 1 až 158), která obsahuje dvě fosforylační místa T67 a T78, transmembránové domény (AMK 159 až 179) a C-terminální extracelulární domény (AMK 180 až 464) (Štekerová, 2012) (obr. 4-1 a 4-2). Porovnáním sekvencí genu *locZ* s geny v ostatních organismech se ukázalo, že tento gen je konzervován pouze u streptokoků (obr. 4-2), laktokoků a enterokoků. Není homologní s žádným dalším známým proteinem a ani neobsahuje žádné anotované konzervované domény, dokonce ani v případě, kdy byly nejkonzervovanější N- a C-koncové oblasti analyzovány odděleně.



**Obr. 4-1: Schématické znázornění struktury proteinu *LocZ*:**

**T67:** Threonin 67; **T78:** Threonin 78, **TM:** transmembránová doména

Spn 1 MSKRRNR-HKKEAQEPQDFDEAKELTVGQAIRKNEVEAGVLPBESLDKYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEEFV-----ETQSLDDLIQEMREAV-----  
Sppn 1 MSKRRNR-HKKEAQEPQDFDEAKELTVGQAIRKNEVEAGVLPBESLDKYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----ETHSLLDDLIQEMREAV-----  
Smi 1 MSKRRHR-HITEHQEAQEPQDFDEAKELTVGQAIRKNEVEAGVLPBESLDKYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----ETHSLLDDLIQEMREAV-----  
Sor 1 MSKRRDR-HKKGHQEPQDFDEAKELTVGQAIRKNEVEAGVLPBESLDKYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELA-----STQNLEEMIQEVRE-----  
Ssu 1 MGEKNSH--HLPLDEEKVLDPEVAKDITTEBAVIRKHEIEAGVTEDDGLLDKYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----NHLPLVEVADEEKNQGH-----  
Sint 1 MSKDEK---HLPEQESILDFETAKEMTIGQARRKSELEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----EDQEQL-SQSDLAELIQEVHDDIQREALESTDV-----  
Sang 1 MSKDEKHL-PEQEKESILDFETAKEMTIGQARRKSELEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----EDQEQL-SQLDLAEFIQEMHVEQEAFLPAEV-----  
Scon 1 MSKDEKY---LSEQESILDFETAKEMTIGQARRKSELEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----EGQEQL-SQLDLAEFIKEMHEGVQ--EVLLEADV-----  
Ssan 1 MPEENYS-PEEKKESVLDPEEAKEMTIGQARRKSELEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----ASSDLDLDFIKRQVEVE-----  
Sgo 1 MSKENTK--PESQEQESILDFETAKEMTIGQARRKSELEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----AQKQDEKAEAEAKTEVLTDE-----  
Ssal 1 MSEDKTQ---NGYEGSQELDFQDAKEMTIGQARRKSELEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----DTSPDLFAFIQKQREFADSGLISQSMANESINST-----  
Sthe 1 MSEDKTQ---NGYEGSQELDFQDAKEMTIGQARRKSELEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----DTSPDLFAFIQKQREFADSGLISQSMANESINST-----  
Smu 1 MSEEKKNP-IENSEKSDSLDFQDAKEMTIGQARRKSELEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----DTSTLDFNIQKQREFADSGLISQSMANESINST-----  
Sinf 1 MSEEKDM---PSSEKQEGNLEEDVKNMTEBAVIRKHEIEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----DTKALDNFIKQREELVNSGVSKVDVFEETVEPK-----  
Sgal 1 MSDKKEL---PSSEKQEGNLEEDVKNMTEBAVIRKHEIEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----DTKALDNFIKQREELVNSGVSKVDVFEETVEPK-----  
Spas 1 MSDKKEL---PSSEKQEGNLEEDVKNMTEBAVIRKHEIEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----DTKALDNFIKQREELVNSGVSKVDVFEETVEPK-----  
Sag 1 MSEDQKHPFPEKKEKTEDEAKEMTIGQARRKSELEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----DTASLDDFIKQREELVNSGVSKVDVFEETVEPK-----  
Ssub 1 MSENKND--FEINQEQSILDFQDAKEMTIGQARRKSELEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----DTETLDFNIKQREELVNSGVSKVDVFEETVEPK-----  
Seqe 1 MSESska--VESEAESQNELHEAKEMTIGQARRKSELEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----DTASLDDFIKQREELVNSGVSKVDVFEETVEPK-----  
Seqz 1 MSESska--VESEAESQNELHEAKEMTIGQARRKSELEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----DTASLDDFIKQREELVNSGVSKVDVFEETVEPK-----  
Spy 1 MSESske--VEVTKESQTEGLNEAKSMTIGQARRKSELEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----DTASLDDFIKQREELVNSGVSKVDVFEETVEPK-----  
Sdy 1 MSESske--VEVTKESQTEGLNEAKSMTIGQARRKSELEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----DTASLDDFIKQREELVNSGVSKVDVFEETVEPK-----  
Sini 1 MSEEKND--FEINKDQTEGLNEAKSMTIGQARRKSELEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----DTASLDDFIKQREELVNSGVSKVDVFEETVEPK-----  
Sub 1 MSENKND--FELQNEQESILDFQDAKEMTIGQARRKSELEAGVTEEDNVLDRYLKQHRFEIADKFASTRQYKKEELV-----DTASLDDFIKQREELVNSGVSKVDVFEETVEPK-----

Spn 93 -----EKSEASSEVPSSDILLPLPLDD-----  
Sppn 93 -----EESASSEVPSSDILLPLPLDD-----  
Smi 102 -----GVTSPASEDELQFDLDELTRVSE-----  
Sor 91 -----SSESQVDDSDVVAESIEIEIEN-----  
Ssu 86 -----SABEVEANESLTVSEIAPIVE-----  
Sint 108 -----TSEESDFETVGLTSTVSEVQDI-----  
Sang 110 -----ASEESAFDETVAALAAESEAPQET-----  
Scon 107 -----ASEESAFDETVAALAAESEAPQET-----  
Ssan 101 -----SEQEIPTARLTAETAPEEPAAPN-----  
Sgo 91 -----TKEEVIASPKSPGLEAEVSAQFSD-----  
Ssal 106 TATEEVPVTFGFGATDNKADETQSHIDKQLPNAPVEPEVIAEPESQSEVIITSTNDRFITSSETEKFDLGDALADSSLTLNHPAYNDALVDNIDNNPLIANIDDPQPQNVVANI DD-----  
Sthe 106 TADETVPIITSGFGTETTKADDTQ-----APVDSIEITVKEPSESSEIITSTNDRFITSSETEKFDLGDALADSSLTLNHPAYNDALVDNIDNNPLIANIDDPQPQNVVANI DD-----  
Smu 110 ASAISAD-----TAKEQSLDITVAPAINPNQIWK-----  
Sinf 108 SEDVVEPVV-----EVAEVEVEAEPEQAEVDAEKEA-----  
Sgal 96 -----GESALKNEATPKAVDFEAEKVED-----  
Spas 96 -----GESALKNEATPKAVDFEAEKVED-----  
Sag 104 -----KLDNSVSEQDTEANAVSPKEESS-----  
Ssub 94 -----EQEIIISEEPNQTEDSGAAGAAI-----  
Seqe 96 -----EPVDEASTEKPAGETSFIEPLAA-----  
Seqz 96 -----EPVDEASTEKPAGETSFIEPLAA-----  
Spy 99 -----SABSAEQDSTLVEEVAELPAMET-----  
Sdy 99 -----ENEPATELSEPSSEGVDELASV-----  
Sini 101 -----ANETLYNEETS SVKTEEVEVPFDTL-----  
Sub 99 -----TSEEQKLETEAEEDLALSKRNDH-----

Spn 117 EQQLDPLLLDDE-----NPTMTEVEEVEEQLNSRL-----DQEDSEK-----KSKKGFILTVLALVSVIICVSAYVYRQVARSTKEIETSQSTT-----  
Sppn 117 EQQLDPLLLDDE-----TPTMTEVEEVEEQLNSRL-----DQEDSEK-----KSKKGFILTVLALVSVIICVSAYVYRQVARSTKEIETSQSTT-----  
Smi 126 -----TPLVEASETEDIPTLYRV-----TSEDGK-----SKKKWVLYGLLALVLLIGTGYYIYRQVARSTKEIETSQSTT-----  
Sor 115 EETTQFVPLQDEESTEIEPLVLTETEPKQINEEQEETYPPLSRS-----AQTEPET-----GSKKGGVI IASVVAAILVLAGTYVYRQVRSNQEIQSSQAAS-----  
Ssu 111 ELSVTMETLEETVIASTVAMEGLSSVADDSLELEDEDELDHS-----EGADRQ-----KPKFVFWASVGLSMIGVMATALVWMSNVKNSNTATSSSSTST-----  
Sint 131 LDGNHTQPLEEPEAEKVVVEVIQPKIDVIVYANPTEENSTVIAS-----NEEMETE-----TVPVYKNNKVLVSVVSVALLLALIGTWVYLSLNRKQAKPPTNSTSQTS-----  
Sang 133 SEENSTQTPLEEAEATKIMEPIQPEMDDIPVSSSTESTESYPTFTAL-----DEEMETE-----KVPFYKNNKVLVSAASVALLLALIGTWVYLSLNRKQAKPATNSTSQTS-----  
Scon 131 LEKNSTQISEESEAEKVMIAIQPEMDNIPVSSSTETMESYSTFTVS-----DEEMETE-----NVPFYKNNKVLVSAASVALLLALIGTWVYLSLNRKQAKPPTNSTSQTS-----  
Ssan 125 PLGSRSQVLEQED-----AVPVAVQKTSYGPPEPL-----DEKELQV-----PKTPFYKKAFLVPLGLLGIAGVATQGLYFALGNWGHKTVTSSSSST-----  
Sgo 115 EPEDKTQDSEPV-----APVSTPVTEDSYE-----EDDEKTV-----SGSKVIYALVALLAVAGIAATYFAMNRQAGKVTSSSSQA-----  
Ssal 226 TEPQASNPILLDDVTISDTIDLAAIASTVAGTVGKADKTEKTPKVMANVHPSAEDRISSESISPHSKSAFDGDI PVYRRKGVVIGALAVLALAIIGGSYALYKGTSHQSAKTTSTASSA-----  
Sthe 207 SEPOASKPLLEDVGVSETIDSDAIATTVAGTVGKADKTEKTPKVMANVHPSAEDRISSESISPHSKSAFDGDI PVYRRKGVVIGALAVLALAIIGGSYALYKGTSHQSAKTTSTASSA-----  
Smu 141 KDEFDVPLSDTQETAKLDTBEKSSFLTAPTSDLDDKDDVGNSEDFD-----EDDETKP-----PFYKRRKVMASFIWLLLAAGATYSYVQLSHHTAKTKRTKTS-----  
Sinf 141 AKEVKATPKVEEVAVAEPEKAPVAIPAEVKEAEKATSIALS-----ADDNKPT-----SKKKRVIIGGLAVLVVAFGAGYALHYTKDSTTTVASSSTSS-----  
Sgal 120 TQETSQEVPSVGENGASNDSTIQENVSIEIPNANSVSEPTPEAASAVVA-----DDKNSEA-----IALETADQPTYKNNKRVIIIGGLAVLVVAFVAVYGLNTEPSTVASSSTST-----  
Spas 120 TQETSQEVPSVGENGASNDSTIQENVSIEIPNANSVSEPTPEAASAVVA-----DDKNSEA-----IALETADQPTYKNNKRVIIIGGLAVLVVAFVAVYGLNTEPSTVASSSTST-----  
Sag 128 EQENSVTPVPP-----NTEAEPTATEPDSIADS-----EYKSS-----KRGVGLTLLALLLILVAFGNYFKNMNSTNSQATSSQ-----  
Ssub 118 AGAGAGIGASTLA-----SDPVVAEDKNEAVSESTESRQSIL-----ADNEKPR-----KSGKMKKILASLLALLLILVAFGMDYLGKSSSTSTKDPSTKQ-----  
Seqe 120 RADTSAATDSAS-----DFTGQLADDAVSEPAEVESIL-----SDSYASR-----RSKPKPLFALLATLTLVASAFALNHIYQLSKHKPQSKATVS-----  
Seqz 120 KAGTPALATDSAS-----DFTGQLADDAVSEPAEVESIL-----SDSYASR-----RSKPKPLFALLATLTLVASAFALNHIYQLSKHKPQSKATVS-----  
Spy 123 TAVVTGIVPEAVTVPLLDLPSERV---IPEPQMTKEPKRQFLS-----EDSHHPA-----KQNTKKGWLIALLLILVAFVGNVHFLRQDSGKTQTATSKQ-----  
Sdy 123 EAAAVTTGIVPEA---MVPVTDPEKTIPEPQVTEQPVREQFT---DTDASN---RQKRWLIALLLILVAFVGNVHFLRQDSGKTQTATSKQ-----  
Sini 125 GTADTDFPK-----ETLYDKYIPEGQTFGTV-----SRQANS-----RKKKVIPIILLALLLILVAFVGNVHFLRQDSGKTQTATSKQ-----  
Sub 123 VSHGITDEIKEDQKPV-----FDQVEVPVIVDSSREDDQVAF---DSERSGN-----KSKKKPLLALLLILVAFVGNVHFLRQDSGKTQTATSKQ-----



Fosforylované aminokyseliny T67 a T78 v *S. pneumoniae* jsou označeny šipkami.

#### 4.1.1 Inaktivace genu *locZ* u *S. pneumoniae*

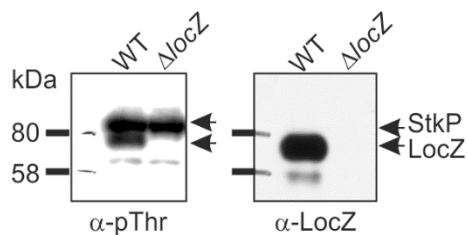
Za účelem zjištění funkce proteinu LocZ u *S. pneumoniae* jsme připravili deleční kmen označený Sp57 (Rx1;  $\Delta locZ$ ). K přípravě kmene Sp57 jsme použili Cheshire kazetu (Weng et al., 2009), která je vhodná pro delecí genu nacházejícího se uvnitř operonu (podrobněji viz kapitola 3.11, Materiál a metody a Štekerová, 2012; kapitola 4.1).

Delecí genu *locZ* jsme ověřili pomocí imunodetekce s polyklonální protilátkou proti proteinu LocZ v celkových proteinových lyzátech divokého kmene Sp1 (WT) a mutantního kmene Sp57. Z výsledků publikací Nováková et al. (2010) a Štekerová (2012) je známo, že protein LocZ je *in vitro* i *in vivo* fosforylován Ser/Thr proteinkinásou StkP na aminokyselinových zbytcích v pozici T67 a T78. Na základě těchto výsledků jsme zároveň provedli imunodetekci fosforylace pomocí anti-pThr protilátky. Z obrázku 4-3 je patrné, že LocZ je exprimován a fosforylován v divokém kmeni Sp1 (WT). V kmeni Sp57 ( $\Delta locZ$ ) protein LocZ již nelze detekovat a nelze detekovat ani jeho případnou fosforylaci. Exprese ani fosforylace samotné StkP není v mutantním kmeni Sp57 nijak ovlivněna.

Pomocí Cheshire kazety jsme provedli delecí genu *locZ* také v opouzdřeném kmeni D39 (Sp4) a deleční kmen jsme nazvali Sp267 (podrobněji viz kapitola 3.11, Materiál a metody)

Dále jsme připravili deleční kmen Sp239, kdy jsme použili Janus kazetu (Sung et al., 2001), která funguje na principu dvoukrokové strategie negativní selekce (podrobněji viz kapitola 3.12.1, Materiál a metody).

Všechny připravené deleční kmény byly používány pro další experimenty.



**Obr. 4-3: Detekce exprese a fosforylace proteinů LocZ a StkP**

**WT:** divoký kmen Sp1;  **$\Delta locZ$ :** mutantní kmen Sp57; **šipky:** označují pozici daného proteinu; **StkP:** Ser/Thr proteinkinasa StkP; **LocZ:** protein LocZ; **α-pThr:** protilátka proti p-Thr; **α-LocZ:** protilátka proti LocZ

#### 4.1.1.1 Analýza transkripce genů přilehlých ke genu *locZ* metodou qRT-PCR

Již v diplomové práci Štekerová (2012) jsme uvedli, že dle analýzy okolí genu *locZ* na chromozomu lze předpokládat, že se nachází uvnitř operonu (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>). Prvním předpokládaným genem operonu byl gen *spr0331*, který kóduje hypotetický protein o neznámé funkci, protože předcházející gen *spr0330* je přepisován v opačném směru. Dále se v okolí genu *locZ* nachází gen *spr0332* pro protein GpsB, nově gen *rnpB* kódující ribonukleasu P – komponent M1, a gen pro hypotetický protein *spr0333*. Za genem *locZ* je gen *spr0335* pro 6-fosfoglukonát dehydrogenasu, gen *spr0336* pro osiřelý transkripční regulátor RitR a gen *spr0337* pro cholin vazebný protein F. Dle databáze Comprehensive Microbial Resource (<http://cmr.jcvi.org>) byly v minulosti predikovány dva terminátory, a to za genem *spr0332* a *spr0336*. Dle nové databáze PneumoBrowse (<https://veeninglab.com/pneumobrowse>) je terminátor za genem *spr0336* zachován a terminátor predikovaný za genem *spr0332* je nově predikován za genem *rnpB*, který následuje za *spr0332*. Transkripční analýza pomocí RT-PCR ukázala, že je všech 7 genů přepisováno ve formě polycistronní mRNA, avšak tato metoda nemůže vyloučit přítomnost např. vnitřních promotorů a dalších mechanismů ovlivňujících transkripci. Dále výsledky naznačují, že delece *locZ* nezpůsobuje polární efekt (Štekerová, 2012). Protože metoda RT-PCR není tak citlivá jako metoda kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR), rozhodli jsme se pro analýzu přilehlých genů *spr0332*, *spr0333*, *spr0335* a *spr0336* touto metodou v připravených delečních kmenech Sp57 (Rx1,  $\Delta locZ$ ) a Sp239 (R6,  $\Delta locZ$ ) v porovnání s odpovídajícími divokými kmeny (Sp1 a Sp225). Z hodnot poměrů hladin exprese testovaných genů v delečním kmeni ku divokému kmeni, uvedených v tab. 4-1, vyplývá, že nedochází ke změně exprese testovaných genů *spr0332*, *spr0333*, *spr0335* a *spr0336*. Další metodou jsme tedy ověřili, že delece genu nezpůsobuje polární efekt.

	Změna exprese testovaných genů*			
	<i>spr0332</i>	<i>spr0333</i>	<i>spr0335</i>	<i>spr0336</i>
Sp57/Sp1 (Rx1)	1,42 (± 0,14)	1,03 (± 0,15)	0,81 (± 0,16)	0,83 (± 0,21)
Sp239/Sp225 (R6)	1,02 (± 0,21)	0,86 (± 0,04)	0,69 (± 0,04)	0,76 (± 0,14)

**Tab. 4-1: Analýza genů přilehlých ke genu *locZ* metodou qRT-PCR:**

\* Změna exprese testovaných genů udává poměr hladin exprese v kmeni  $\Delta locZ$  (Sp57 nebo Sp239) a kmeni divokém (Sp1 nebo Sp225).

#### 4.1.1.2 Charakterizace růstu a vliv stresů na fenotyp mutantu $\Delta locZ$

LocZ je substrátem StkP, která hraje úlohu nejen v regulaci buněčného dělení, ale také v navození stavu přirozené kompetence a rezistenci buněk k teplotnímu, oxidativnímu, osmotickému a pH stresu (Sasková et al., 2007). Abychom objasnili funkci LocZ ve zmíněných buněčných dějích, rozhodli jsme se vystavit mutantní kmen Sp57 působení různých druhů stresů a porovnat růstové vlastnosti s divokým kmenem Sp1.

Nejprve jsme porovnali růst mutantního kmene Sp57 a divokého kmene Sp1 měřením růstové křivky v komplexním médiu TSB během statické kultivace při 37°C. V půlhodinových intervalech jsme měřili optickou denzitu testovaných kultur při vlnové délce 600 nm.

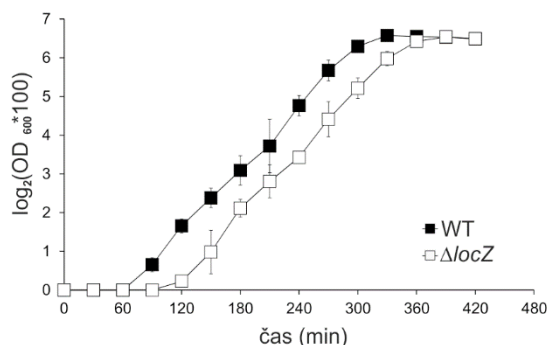
Z porovnání průběhu růstových křivek *S. pneumoniae* divokého a mutantního kmene je patrné prodloužení lag fáze mutantního kmene. Doba zdvojení i dosažení nejvyšší optické denzity je pro oba kmene stejná (obr. 4-4 A). Tato data jsou nově naměřená a korelují s daty diplomové práce (Štekerová, 2012).

Následně jsme divoký a mutantní kmen vystavili působení teplotního, oxidativního, osmotického a pH stresu. K testování teplotního, osmotického a pH stresu jsme využili metodiky měření růstové křivky a pro testování oxidativního stresu metodu kultivace na pevné půdě po působení stresu na danou bakteriální kulturu (podrobněji viz kap. 3.7, Materiál a metody).

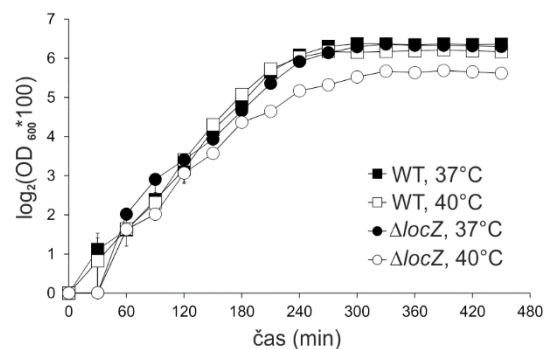
Mutantní kmen Sp57 vykazuje citlivost k teplotnímu stresu, což se projevuje přechodem bakteriální kultury pěstované při 40°C do stacionární fáze při nižších hodnotách optické denzity (obr. 4-4 B). Dále je mutantní kmen Sp57 citlivý k působení oxidativního stresu, kdy na pevném médiu po vystavení působení 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> přežívá o polovinu méně buněk, než buněk divokého kmene Sp1 (tab. 4-2). Nicméně při testování mutantního kmene Sp57 k citlivosti na osmotický a pH stres jsme žádné výrazné změny ve srovnání s průběhem růstu divokého kmene Sp1 nepozorovali (data nejsou prezentována). Naměřená data naznačují, že LocZ hraje úlohu v odpovědi na teplotní a oxidativní stres. Obecně tedy nereguluje schopnost buňky reagovat na stresové podmínky v porovnání s StkP, která se účastní odpovědi na všechny testované stresy.

Uvedená data byla nově naměřena a pro teplotní, osmotický a pH stres jsou s výsledky diplomové práce (Štekerová, 2012) ve shodě. V případě testování citlivosti mutantního kmene Sp57 k oxidativnímu stresu se výsledky nově naměřené a výsledky diplomové práce liší. A to tak, že v případě diplomové práce bylo procento přeživších buněk divokého a mutantního kmene vystaveného působení 10 mM a 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v obou případech stejné.

A/ Růstová křivka



B/ Teplotní stres

**Obr. 4-4: Charakterizace růstu a citlivost mutantního kmene  $\Delta locZ$  k teplotnímu stresu.**

**WT:** divoký kmen Sp1;  **$\Delta locZ$ :** mutantní kmen *S. pneumoniae* Sp57; **A/** Semilogaritmické vynesení růstové křivky divokého kmene (WT, černé čtverce) a mutantního kmene ( $\Delta locZ$ , bílé čtverce) v komplexním médiu (TSB) při 37°C; **B/** Semilogaritmické vynesení růstové křivky divokého kmene WT kultivovaného v komplexním médiu TSB při 37°C (černé čtverce) a při 40°C (bílé čtverce) a mutantního kmene  $\Delta locZ$  kultivovaného v komplexním médiu TSB při 37°C (černý kruh) a při 40°C (bílý kruh). Růstové křivky byly sledovány ve třech nezávislých měřeních. Body grafu znázorňují průměrné hodnoty těchto měření s danou směrodatnou odchylkou.

kmen <i>S. pneumoniae</i>	10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	kontrola
WT (Sp1)	32,19 ± 12,0 %	100 %
$\Delta locZ$ (Sp57)	16,00 ± 5,9 %	100 %

**Tab. 4-2: Citlivost mutantu  $\Delta locZ$  k oxidativnímu stresu v pevném médiu Gelosa D.**

**WT:** divoký kmen Sp1;  **$\Delta locZ$ :** mutantní kmen *S. pneumoniae* Sp57; **procenta** vyjadřují počet přeživších buněk vystavených působení 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> z celkového počtu buněk (kontrola bez oxidativního stresu). Hodnoty uvedené v tabulce představují průměrnou hodnotu vypočítanou ze tří na sobě nezávislých měření.

#### 4.1.2 Absence proteinu LocZ u *S. pneumoniae* ovlivňuje umístění dělicí přepážky a způsobuje defekty buněčného dělení

StkP, jejímž substrátem je LocZ, hraje významnou roli v buněčném dělení. Delece genu *stkP* má za následek změnu morfologie buněk, které jsou velmi protáhlé a obsahují několik neuzavřených buněčných přepážek (Nováková et al., 2010; Beilharz et al., 2012). V rámci diplomové práce (Štekerová, 2012) bylo zjištěno, že se delece genu *locZ* morfologicky projevuje tvorbou menších kulatých buněk, asymetrickým buněčným dělením a nerovnoměrným rozdělením DNA do buněk, což vede často k tvorbě minibuněk, které u *S. pneumoniae* do této



doby nebyly pozorovány. Rozhodli jsme se analýzu morfologických znaků mutantu Sp57 opakovat a určit další, které by nám pomohly blíže specifikovat funkci *LocZ* u *S. pneumoniae*.

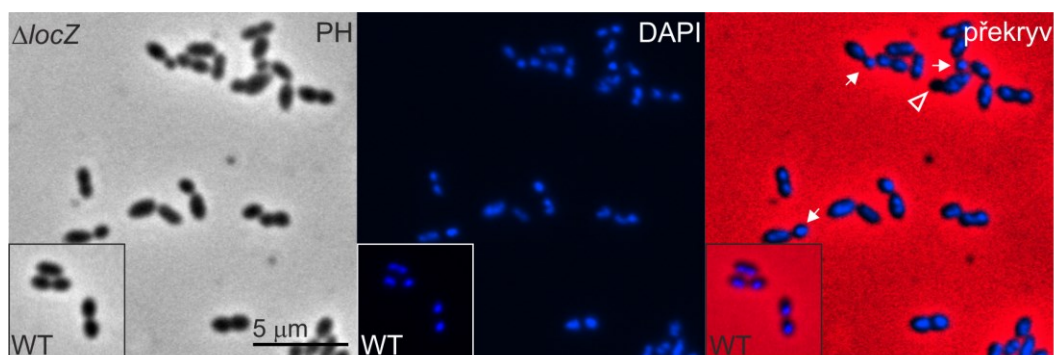
#### **4.1.2.1 Morfologie mutantního kmene $\Delta locZ$**

##### **4.1.2.1.1 Mikroskopie ve fázovém kontrastu, statistika velikosti buněk a vizualizace DNA v buňkách**

Nejprve jsme porovnali morfologii buněk živých preparátů připravených z kultur divokého (WT) a mutantního kmene ( $\Delta locZ$ ) pěstovaného v komplexním médiu TSB do  $OD_{600} \sim 0,3$ . Připravené živé preparáty jsme pozorovali mikroskopem v režimu fázového kontrastu. Mikroskopické snímky následně sloužily k analýze velikosti buněk v programu MicrobeTracker a GraphPad Prism, kdy hlavním parametrem byla délka buňky (podrobněji viz kap. 3.9, Materiál a metody).

Obě kultury jsme dále využili k přípravě fixovaných preparátů obarvených fluorescenčním barvivem DAPI, které umožňuje specifickou vizualizaci DNA v buňkách. Preparáty jsme pozorovali pomocí mikroskopu s filtrem pro pozorování fluorescenčního signálu DAPI.

Jak již bylo uvedeno, buňky mutantního kmene se dělí asymetricky. Proto jsme se rozhodli tento morfologický znak blíže kvantifikovat. Analýzou mikroskopických snímků použitých ke statistice velikosti buněk jsme určili, že 31,8% (127/400) buněk mutantního kmene se dělí asymetricky ve srovnání s divokým typem, který tvoří pravidelné lancetovité diplokoky. Z pozorování mikroskopických snímků (obr. 4-5) a analýzou velikosti buněk (tab. 4-3) jsme ověřili, že mutantní kmen tvoří menší buňky ( $1,61 \pm 0,39 \mu\text{m}$ ) ve srovnání s divokým kmenem ( $1,83 \pm 0,39 \mu\text{m}$ ), a to statisticky významně ( $P \leq 0,0001$ , neparametrický Mann-Whitney test). Výsledky rozdílu ve velikosti buněk divokého a mutantního kmene jsme znázornili pomocí histogramu ukazujícího procentuální zastoupení buněk z populace v dané velikostní třídě (obr. 4-6). Na základě těchto dat jsme zjistili, že mutantní kmen tvoří 5,5% (22/400) minibuněk, tedy buněk menších než je nejmenší buňka divokého kmene (buňka s délkou menší než  $1 \mu\text{m}$ ). Barvení DNA pomocí DAPI odhalilo, že 2,5% (10/400) buněk mutantního kmene v celé populaci zcela postrádá DNA. DNA postrádala ve všech případech minibuňka, a to v procentuálním zastoupení 45% z buněk menších než  $1 \mu\text{m}$ . Tyto buňky můžeme označovat za pravé minibuňky. Ty byly vždy pozorovány ve dvojici s větší buňkou, která DNA obsahovala, a jsou tedy produktem asymetrického buněčného dělení (obr. 4-5, tab. 4-3).



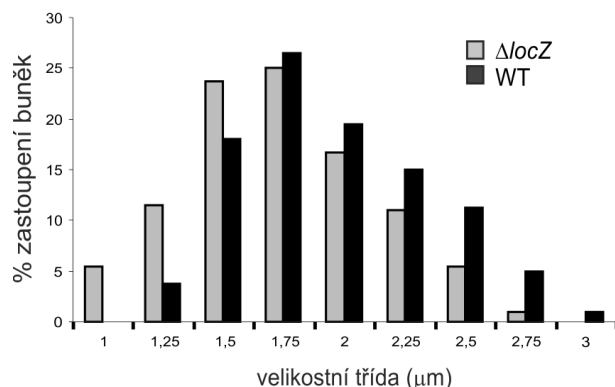
**Obr. 4-5: Morfologie buněk a vizualizace DNA v buňkách divokého kmene (WT) a kmene  $\Delta locZ$**

**WT:** divoký kmen *Sp1*;  **$\Delta locZ$ :** mutantní kmen *S. pneumoniae Sp57*; **PH:** fázový kontrast; **DAPI:** fluorescenční signál DAPI; **překryv:** překryv fázového kontrastu a signálu DAPI; **bílá šipka:** označuje minibuňku obsahující DNA; **otevřená šipka:** označuje minibuňku bez DNA.

Označení kmene	Min	První kvartil	Medián	Třetí kvartil	Max	Průměr	SD	Šířka	Asymetrické dělení (%)	Minibuňky (%)
<i>Sp1</i> (WT)	1,00	1,53	1,77	2,08	2,81	1,83	0,39	0,67	0,00	0,00
<i>Sp57</i> ( $\Delta locZ$ )	0,66	1,34	1,59	1,88	2,66	1,61	0,39	0,66	31,80	5,50

**Tab. 4-3: Popisná statistika velikosti buněk divokého kmene (WT) a mutantu  $\Delta locZ$ :**

Velikosti buněk jsou uvedeny v  $\mu\text{m}$ . Pro každý kmen byl statisticky zpracován soubor 400 buněk. Délka buněk byla naměřena pomocí programu MicrobeTracker a analýza velikosti buněk byla provedena v programu GraphPad Prism 3.0 (sloupec 2 až 8). **Min:** minimální délka buňky; **Max:** maximální délka buňky; **SD:** směrodatná odchylka. Procento asymetricky dělicích se buněk bylo kvantifikováno z mikroskopických snímků v režimu fázového kontrastu. Minibuňky představují všechny buňky menší než  $1 \mu\text{m}$ . Tato hodnota odpovídá nejmenší délce buněk divokého kmene *Sp1*.

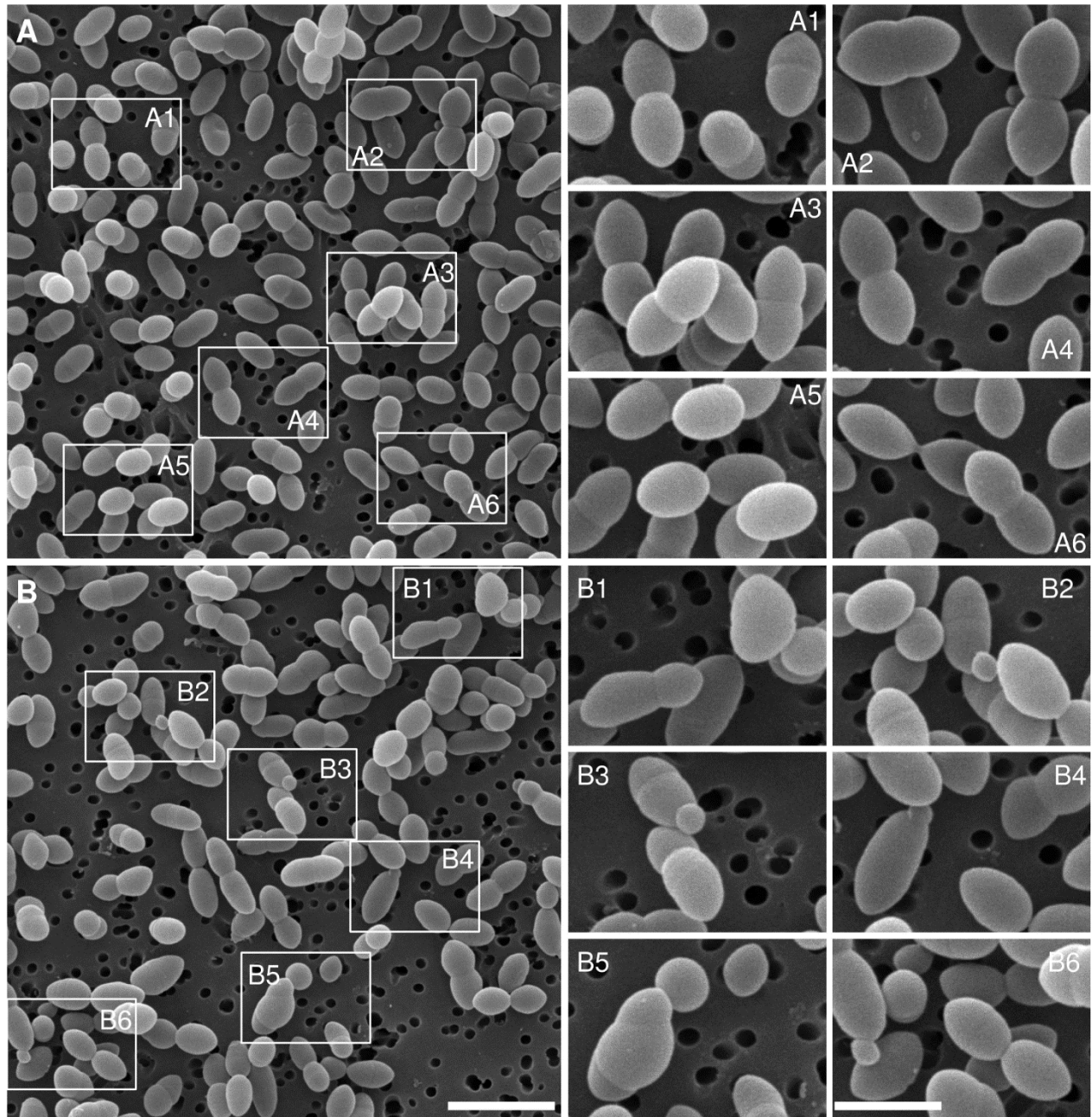


**Obr. 4-6: Histogram – procentuální zastoupení buněk z populace divokého a mutantního kmene v dané velikostní třídě.**

WT: divoký kmen Sp1 (černé sloupce);  $\Delta locZ$ : mutantní kmen *S. pneumoniae* Sp57 (šedé sloupce)

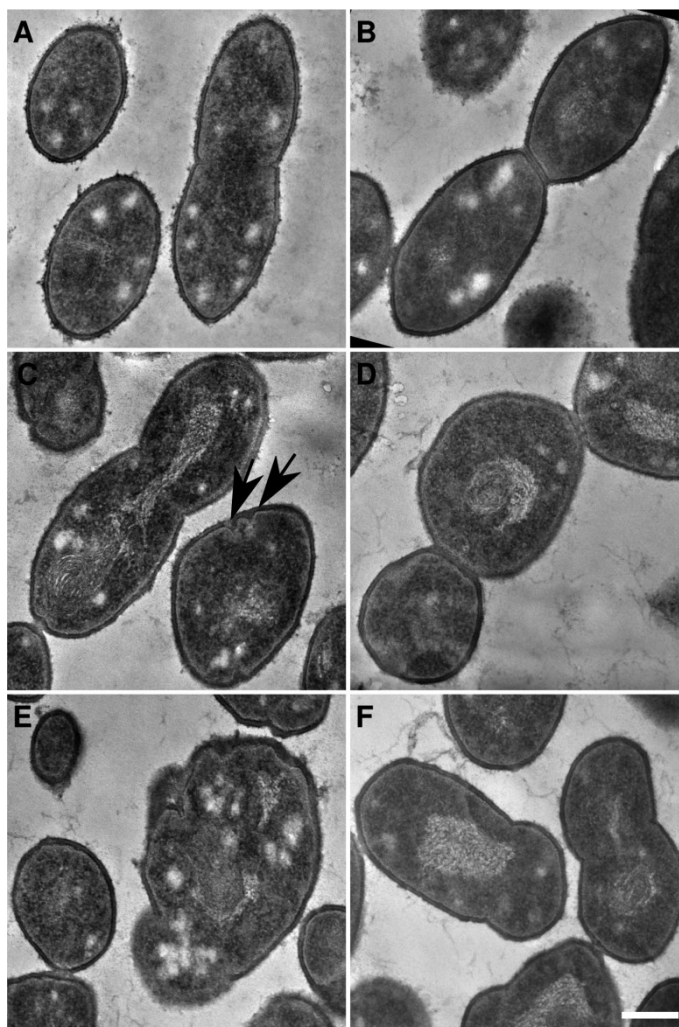
#### 4.1.2.1.2 Skenovací a transmisní elektronová mikroskopie

Za účelem detailnějšího obrazu morfologie mutantního kmene  $\Delta locZ$  jsme se rozhodli provést skenovací a transmisní elektronovou mikroskopii. Kultury jsme pěstovali v médiu TSB do exponenciální fáze a dále byly zpracovány v Laboratoři charakterizace molekulární struktury Mikrobiologického ústavu v Praze (Oldřich Benada a Olga Kofroňová). Na obrázku 4-7A, snímek ze skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a na obrázku 4-8 A a B, snímek z transmisní elektronové mikroskopie (TEM), můžeme v různých stádiích buněčného dělení pozorovat divoký kmen Sp1 (WT), jehož buňky tvoří charakteristické ovoidní diplokoky. Na druhé straně, analýzou obrázku 4-7B (SEM), jsme zjistili, že 75% buněk mutantního kmene Sp57 ( $\Delta locZ$ ) vykazuje deformity buněčného tvaru, dceřiné buňky mají rozdílnou velikost a dochází k tvorbě minibuněk. Navíc mnoho buněk, nezávisle na jejich velikosti, má nepravidelný „bramborovitý“ tvar s abnormálně zaoblenými póly jako možný důsledek tvorby dělicí přepážky mimo střed buňky v závislosti na její dlouhé ose (obr. 4-7B1 a obr. 4-8F). Občas v populaci pozorujeme buňky s více než jednou buněčnou přepážkou (obr. 4-7B5). TEM taktéž ukázala, že některé buňky mutantního kmene obsahují dvě invaginace buněčné stěny, které představují dvě vznikající dělicí přepážky v těsné blízkosti (obr. 4-8C), nebo buňky obsahující dvě septa v různé fázi uzavření (obr. 4-8D). Nicméně navzdory těmto abnormalitám stále pozorujeme mnoho buněk s kompletně uzavřenými septy.



**Obr. 4-7: Skenovací elektronová mikroskopie divokého kmene a mutantu  $\Delta locZ$ .**

**Panel A a A1-A6: divoký kmen *Sp1* (WT); Panel B a B1-B6: mutantní kmen *Sp57* ( $\Delta locZ$ ).** Měřítka v panelu A a B odpovídá 2  $\mu\text{m}$ . Obrazy v panelech A1-A6 a B1-B6 jsou 2x zvětšeny a měřítko odpovídá 1  $\mu\text{m}$ .



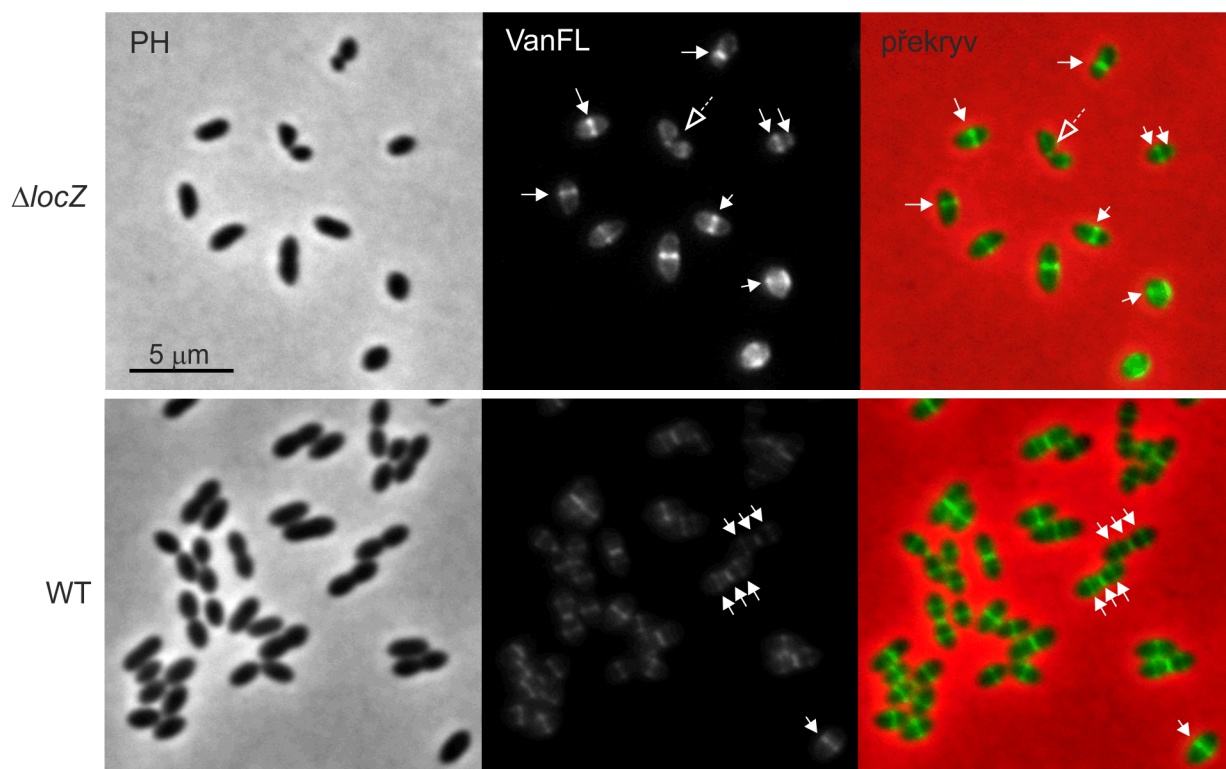
**Obr. 4-8: Transmisní elektronová mikroskopie divokého kmene a mutantu  $\Delta locZ$ .**

**A až B: divoký kmen Sp1 (WT); A:** buňka vpravo v počáteční fázi tvorby dělicí přepážky; **B:** buňka s již téměř uzavřenou dělicí přepážkou, těsně před rozdělením dceřiných buněk; **C až F: změny v ultrastruktuře buňky mutantního kmene Sp57 ( $\Delta locZ$ ); C:** příklad buňky se dvěma invaginacemi buněčné stěny blízko sebe – označeny šipkami; **D:** příklad stále spojených tří buněk v různých fázích uzavírání dělicí přepážky; **E:** příklad buněčné lyze; **F:** buňky nerovnoměrně se dělicí, podobně jako buňky na obr. 4-7B1. Měřítko: 0,2  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.2.1.3 Vizualizace nově syntetizované buněčné stěny

Na základě všech výše popsaných defektů buněčného dělení u mutantního kmene Sp57 ( $\Delta locZ$ ) jsme se rozhodli vizualizovat místa aktivní syntézy buněčné stěny v divokém a mutantním kmeni pomocí značení fluorescenčním vankomycinem (VanFL), který se váže na nascentní peptidoglykan (PG) (Daniel a Errington, 2003). Na mikroskopickém snímku divokého kmene Sp1 (WT) pozorujeme typický vzor tvorby nového PG, a to v dělicí přepážce a na pozicích ekvatoriálních kruhů, což jsou místa, která označují budoucí místo dělení v každé nově

vznikající dceřiné buňce (obr. 4-9). Na druhou stranu, ačkoli u buněk mutantního kmene ( $\Delta locZ$ ) také pozorujeme syntézu nascentního PG, z mikroskopického snímku je patrné, že dělicí přepážka je umístěna zcela mimo střed buňky anebo není umístěna kolmo k vodorovné ose buňky (obr. 4-9, bílé šipky). Navíc fluorescenčně značený vankomycin není zcela pozorovatelný v pozicích ekvatoriálních kruhů. Nakonec jsme u několika buněk s abnormálním tvarem pozorovali rozptýlený fluorescenční signál, který nebyl jasně lokalizován v žádné určité oblasti (obr. 4-9, otevřená šipka). Tato zjištění odrážejí morfologii buněk pozorovanou pomocí mikroskopie ve fázovém kontrastu a elektronovou mikroskopií a naznačují, že protein LocZ by mohl být důležitou součástí divizomu, která je zodpovědná za správné umístění dělicí přepážky.



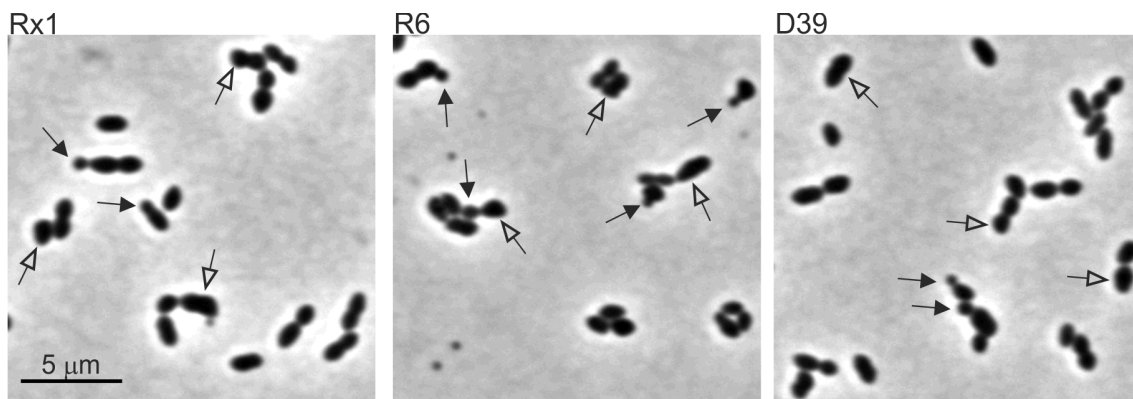
**Obr. 4-9: Vizualizace syntézy nascentního peptidoglykanu (PG) pomocí fluorescenčně značeného vankomycinu (VanFL) u divokého kmene (WT) a mutantu ( $\Delta locZ$ ):**

**WT:** divoký kmen Sp1;  **$\Delta locZ$ :** mutantní kmen *S. pneumoniae* Sp57; **PH:** fázový kontrast; **VanFL:** signál fluorescenčního vankomycinu; **překryv:** překryv fázového kontrastu a fluorescenčního vankomycinu; **bílá šipka:** místa syntézy PG; **otevřená šipka:** narušená syntéza PG. Měřítko: 5  $\mu$ m



#### 4.1.2.1.4 Morfologie mutantu $\Delta locZ$ na různých genetických pozadích *S. pneumoniae*

Mutace nebo delece genů kódujících proteiny buněčného dělení u *S. pneumoniae* se mohou projevat různým fenotypem v závislosti na daném kmeni *S. pneumoniae* (Massidda et al., 2013). Abychom se přesvědčili, že pozorovaný fenotyp delece genu *locZ* v neopouzdrěném kmeni *S. pneumoniae* Rx1 není omezen na dané genetické pozadí, rozhodli jsme se připravit mutantu  $\Delta locZ$  v dalších kmenech, a to v neopouzdrěném kmeni R6 a opouzdrěném kmeni D39 (příprava kmenů je popsána podrobněji v kap. 3.11 a 3.12.1, Materiál a metody). Oba výsledné mutantní kmeny, Sp239 (R6,  $\Delta locZ$ ) a Sp267 (D39,  $\Delta locZ$ ), vykazují naprosto stejný fenotyp nerozeznatelný od fenotypu mutantního kmene Sp57 (Rx1,  $\Delta locZ$ ) (obr. 4-10). Můžeme tedy tvrdit, že pozorovaný fenotyp způsobený delecí genu *locZ* není závislý na genetickém pozadí kmene *S. pneumoniae* a ve všech testovaných kmenech se projevoval zcela stejně, a to tvorbou asymetrických dělicích se buněk „bramborovitého“ tvaru a minibuněk.



**Obr. 4-10: Morfologie mutantu  $\Delta locZ$  na různých genetických pozadích:**

**Rx1:** mutant  $\Delta locZ$  na genetickém pozadí divokého kmene *S. pneumoniae* Rx1 bez pouzdra; **R6:** mutant  $\Delta locZ$  na genetickém pozadí divokého kmene *S. pneumoniae* R6 bez pouzdra; **D39:** mutant  $\Delta locZ$  na genetickém pozadí divokého kmene *S. pneumoniae* D39 s pouzdrzem; **černé šipky:** označují minibuňky; **otevřené šipky:** označují buňky s deformitami buněčného tvaru. Měřítko: 5 μm.

#### 4.1.2.2 Komplementace mutace $\Delta locZ$

Abychom potvrdili, že pozorovaný fenotyp mutantního kmene  $\Delta locZ$  je způsoben pouze delecí genu *locZ*, použili jsme komplementační kmen *S. pneumoniae* Sp60 (Rx1,  $\Delta locZ$  *bgaA*::P<sub>ccD</sub>-*his6-locZ*) (Štekerová, 2012) nesoucí na chromosomu v postradatelném lokusu *bgaA* pod inducibilním zinkovým promotorem gen *locZ* fúzaný s histidinovou kotvou (podrobněji viz kap. 3.10, Materiál a metody a Štekerová, 2012, kap. 4.4.1). Buňky komplementačního

kmene pěstovaného bez přidavku  $Zn^{2+}$  v médiu, ve kterém nedochází k žádné expresi proteinu LocZ, vykazují srovnatelnou morfologii, velikost, dělení DNA a charakteristiku růstu jako mutantní kmen Sp57 ( $\Delta locZ$ ) (tab. 4-4, obr. 4-11). V případě kultivace komplementačního kmene Sp60 v médiu s přidavkem 0,45 mM  $ZnCl_2$  dochází k expresi proteinu His6-LocZ. Exprimované množství proteinu His6-LocZ je nižší, než v případě exprese nativního proteinu LocZ v divokém kmeni (obr. 4-11B). Toto snížené množství exprimovaného proteinu His6-LocZ v buňkách není zcela dostatečné k úplné komplementaci velikosti buněk a morfologie (tab. 4-4, obr. 4-11). Přesto můžeme říci, že v komplementačním kmeni Sp60 pěstovaném v médiu s přidavkem induktoru dochází k téměř úplné komplementaci sledovaných morfologických znaků a tedy pozorovaný fenotyp mutantního kmene Sp57 je způsoben delecí genu *locZ* na chromosomu.

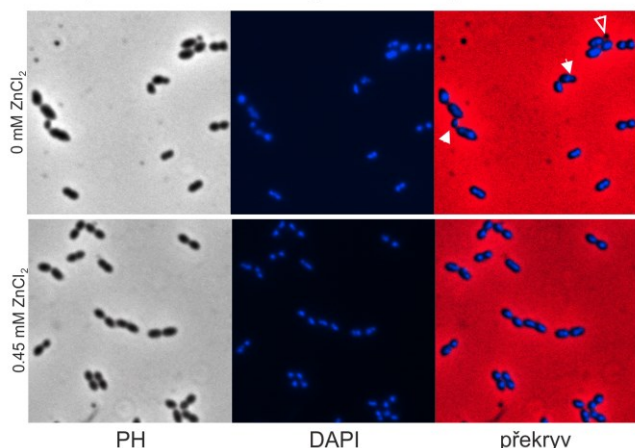
Všechna prezentovaná data jsou nově naměřená. Jsou ve shodě s předchozími výsledky uvedenými v diplomové práci (Štekerová, 2012) a jsou obohacena o další statistická data, např. šířku buňky, procentuální zastoupení tvorby minibuněk a asymetricky se dělicích buněk.

Označení kmene	$Zn^{2+}$	Min	První kvartil	Medián	Třetí kvartil	Max	Průměr	SD	Šířka	Asymetrické dělení (%)	Minibuňky (%)
Sp1 (WT)	-	1,00	1,53	1,77	2,08	2,81	1,83	0,39	0,67	0,00	0,00
Sp57 ( $\Delta locZ$ )	-	0,66	1,34	1,59	1,88	2,66	1,61	0,39	0,66	31,80	5,50
Sp60	-	0,63	1,29	1,55	1,83	3,01	1,57	0,44	0,65	29,00	10,25
Sp60	+	1,04	1,47	1,67	1,97	2,78	1,75	0,36	0,67	0,75	0,00

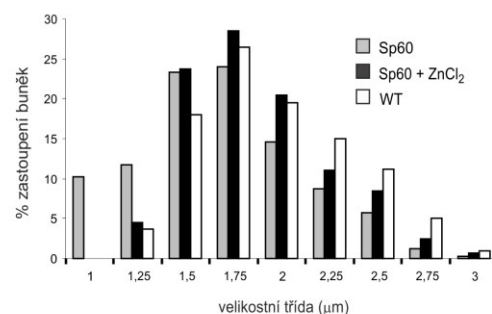
**Tab. 4-4: Popisná statistika velikosti buněk divokého kmene (WT), mutantu  $\Delta locZ$  a komplementačního kmene:** Velikosti buněk jsou uvedeny v  $\mu m$ . Pro každý kmen byl statisticky zpracován soubor 400 buněk. Délka buněk byla naměřena pomocí programu MicrobeTracker a analýza velikosti buněk byla provedena v programu GraphPad Prism 3.0 (3 až 10 sloupec). **Min:** minimální délka buňky; **Max:** maximální délka buňky; **SD:** směrodatná odchylka,  **$Zn^{2+}$ :** kmen byl kultivován v médiu s přidavkem 0,45 mM  $ZnCl_2$ , který indukuje expresi proteinu His6-LocZ. Procento asymetricky dělicích se buněk bylo kvantifikováno z mikroskopických snímků v režimu fázového kontrastu. Minibuňky představují všechny buňky menší než 1  $\mu m$ , což je nejmenší délka buněk divokého kmene Sp1.



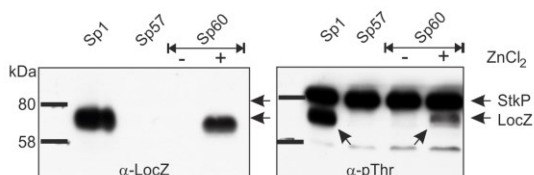
#### A/ Komplementace morfologie kmene Sp60



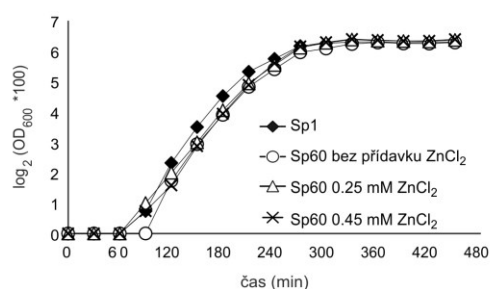
#### C/ Histogram - analýza velikosti buněk



#### B/ Expres a fosforylace proteinu LocZ



#### D/ Komplementace růstu



### Obr. 4-11: Komplementace delece *locZ*:

**A/ Morfologie komplementačního kmene:** Fixované preparáty komplementačního kmene Sp60 (Rx1,  $\Delta locZ$  *bga::P<sub>ced</sub>-his6-locZ*) pěstovaného v médiu TSB bez přídavku (0 mM ZnCl<sub>2</sub>) a s přídavkem 0,45 mM ZnCl<sub>2</sub>; **PH:** fázový kontrast; **DAPI:** fluorescenční signál DAPI; **překryv:** překryv fázového kontrastu a signálu DAPI; **bílá šipka:** označuje minibuňku obsahující DNA; **trojúhelníková šipka:** označuje minibuňku bez DNA. **B/ Expres a fosforylace proteinu LocZ:** **Sp1:** divoký kmen (WT); **Sp57:** mutant  $\Delta locZ$ ; **Sp60:** komplementační kmen pěstovaný v médiu bez přídavku (-) a s přídavkem 0,45 mM ZnCl<sub>2</sub> (+);  **$\alpha$ -LocZ:** specifická protilátka proti LocZ;  **$\alpha$ -pThr:** protilátka proti p-Thr. **C/ Histogram – analýza velikosti buněk:** **WT:** divoký kmen Sp1 (bílé sloupce); **Sp60:** komplementační kmen pěstovaný bez přídavku induktoru (šedé sloupce); **Sp60 + ZnCl<sub>2</sub>:** komplementační kmen pěstovaný s přídavkem 0,45 mM ZnCl<sub>2</sub> (černé sloupce). **D/ Komplementace růstu:** Semilogaritmičké vynesení růstových křivek kultur pěstovaných v tekutém médiu TSB. **Sp1:** divoký kmen (černé kosočtverce); **Sp60:** komplementační kmen pěstovaný v médiu bez přídavku ZnCl<sub>2</sub> (bílé kruhy), s přídavkem 0,25 mM ZnCl<sub>2</sub> (bílé trojúhelníky) a s přídavkem 0,45 mM ZnCl<sub>2</sub> (křížky).

#### 4.1.3 Lokalizace proteinu LocZ v průběhu buněčného dělení *S. pneumoniae*

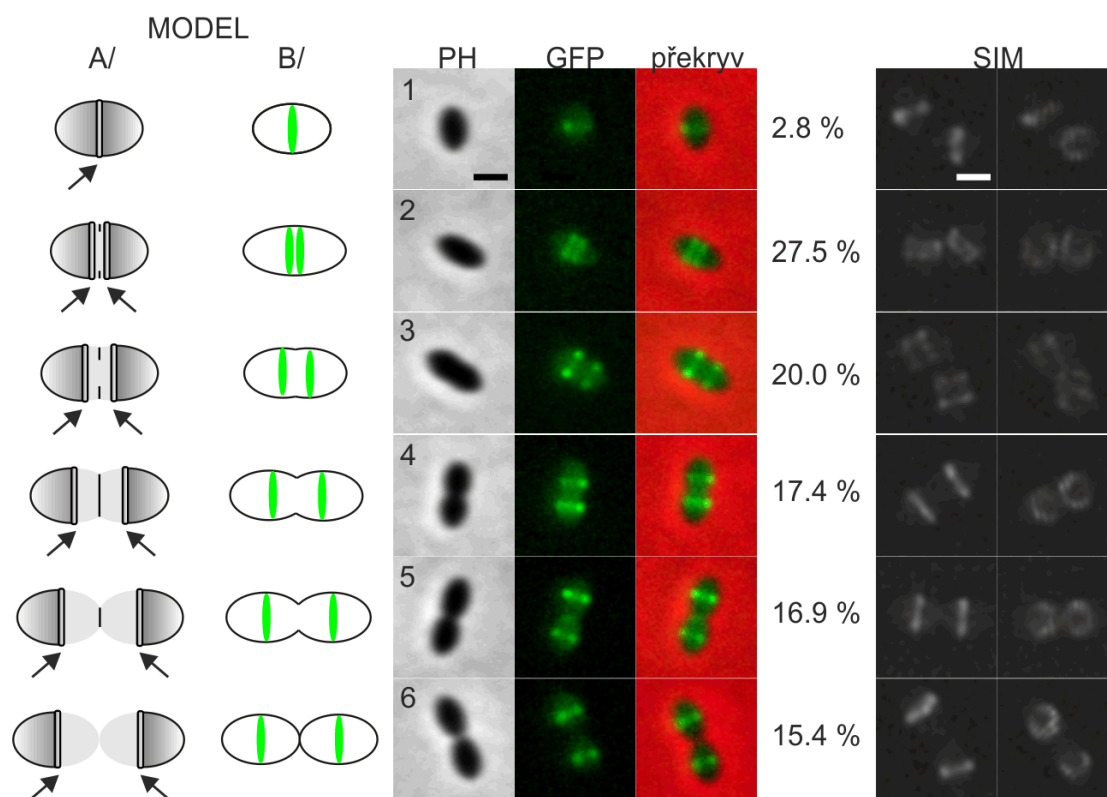
Fenotyp mutantního kmene  $\Delta locZ$  (Sp57) naznačuje, že protein LocZ hraje roli v procesu buněčného dělení u *S. pneumoniae*. Proto jsme se rozhodli charakterizovat jeho lokalizační profil za použití fúze proteinů LocZ se zeleným fluorescenčním proteinem GFP v exponenciálně rostoucí kultuře buněk kmene Sp229 (R6, *locZ::gfp-locZ*) (příprava kmene podrobněji v kap.

3.12.2, Materiál a metody). V buňkách kmene Sp229 dochází k expresi *gfp-locZ* jakožto jediné kopie *locZ* na chromosomu pod kontrolou nativního promotoru. Z mikroskopického snímku je patrné, že GFP-LocZ je exprimován a buňky mají morfologii nerozeznatelnou od morfologie divokého kmene, fúzní protein je tedy funkční (obr. 4-12 a obr. 4-13A).

Jak by se dalo očekávat od proteinu buněčného dělení, protein LocZ lokalizuje ve středu buňky *S. pneumoniae* během buněčného dělení. Rozhodli jsme se provést detailnější analýzu jeho lokalizace v průběhu buněčného dělení, které jsme rozdělili na 6 fází (Fadda et al., 2007). Analýza populace exponenciálně rostoucích buněk (celkem 610) kmene Sp229 (*locZ::gfp-locZ*) odhalila unikátní lokalizační profil proteinu LocZ v průběhu buněčného dělení, který nebyl u buněk *S. pneumoniae* doposud pozorován (Massidda et al., 2013). Na obrázku 4-12 pozorujeme u buněk v první fázi buněčného dělení, což odpovídá 2,8% (17/610) buněk z populace, lokalizaci LocZ uprostřed buňky jako prstence umístěného v buněčné stěně. Ve druhé fázi, kdy začíná docházet k elongaci buňky (27,5% buněk z populace (168/610)), tvoří LocZ již dva oddělené prstence, které jsou umístěny ve středu buňky blízko sebe. Ve třetí fázi, jak elongace buňky pokračuje, pozorujeme u 20 % buněk z populace (106/610) prstence LocZ, které se od sebe navzájem vzdalují. Ve čtvrté fázi buněčného dělení, kdy začíná být patrná konstriktce uprostřed buňky, je u 17,4% buněk z populace (106/610) LocZ umístěn v ekvatoriální oblasti budoucí dceřiné buňky, kde přetrvává, dokud není buněčné dělení (fáze 5) a separace buněk (fáze 6) dokončena. Zastoupení buněk v páté fázi je 16,9% (103/610) a v šesté fázi 15,4% (94/610) z populace. Detailněji můžeme lokalizační profil LocZ pozorovat i na obrázku ze super-rezoluční mikroskopie (SIM), na kterém je patrná kruhovitá struktura proteinu. LocZ je v rostoucí buňce umístěn v oblasti, kde se na povrchu buňky nachází struktura zvaná ekvatoriální kruh. Tato struktura je jediným doposud známým znakem, který u *S. pneumoniae* značí budoucí místo dělení (obr. 4-12, model A/) (Higgins a Shockman, 1970; Wheeler et al., 2011).

Jak již bylo zmíněno, LocZ patří mezi substráty proteinkinasy StkP (Nováková et al., 2010), zatím ale nebylo odhaleno, kdy přesně se tyto proteiny v průběhu buněčného dělení setkávají a jaký význam má fosforylace LocZ proteinkinásou StkP. Proto jsme se rozhodli určit vliv delece *stkP* na lokalizaci LocZ v buňce. Za tímto účelem jsme k pozorování použili již dříve připravený deleční kmen Sp58 (Rx1;  $\Delta$ *stkP* *bga::P<sub>czcD</sub>-gfp-LocZ*) (podrobněji viz kap. 3.10 Materiál a metody a Štekerová, 2012, Výsledky kap. 4.5), ve kterém dochází k expresi *gfp-locZ* pod kontrolou indukibilního zinkového promotoru na genetickém pozadí  $\Delta$ *stkP* kmene.

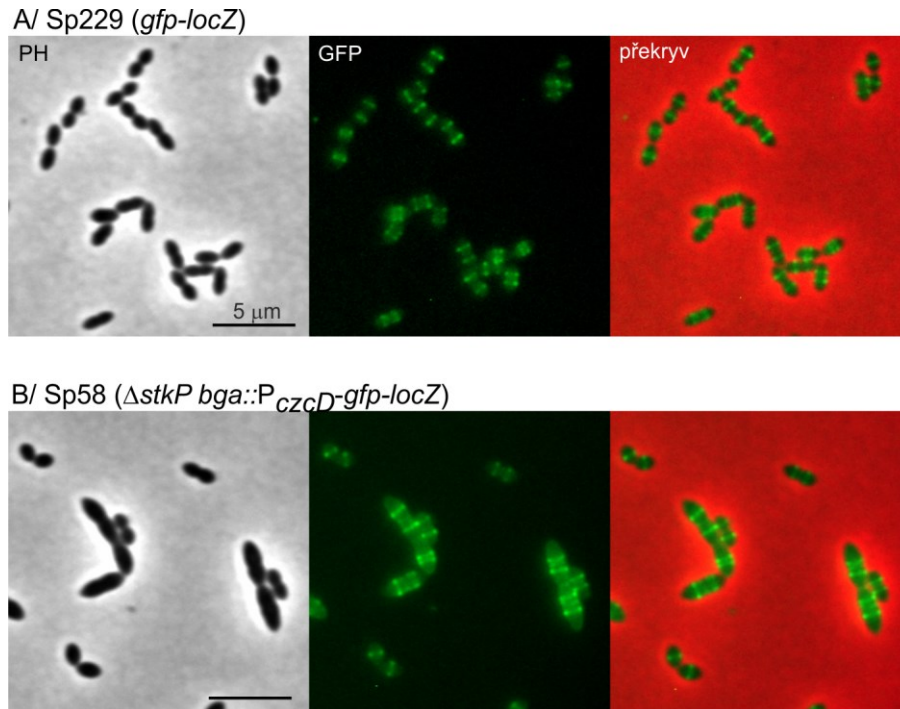
Na obrázku 4-13B pozorujeme tvorbu buněk typických pro mutantní kmen  $\Delta stkP$ , které se vyznačují protáhlým tvarem (Nováková et al., 2010) s četným výskytem Z-kruhů (Beilharz et al., 2012). V tomto bakteriálním kmeni nedochází k fosforylaci žádného ze substrátů StkP, tedy ani LocZ (Nováková et al., 2010). GFP-LocZ je lokalizován v dělicích přepážkách. Lokalizační profil GFP-LocZ v  $\Delta stkP$  kmeni zůstává zachován, ale zároveň reflektuje typický fenotyp kmene  $\Delta stkP$  (Beilharz et al., 2012). Z tohoto pozorování usuzujeme, že cílení LocZ do středu buňky předchází příchodu StkP do stejného místa a je nezávislé na StkP anebo na jejím fosforylovaném stavu. Pro kmen Sp58 jsou data ve shodě s výsledky diplomové práce (Štekerová, 2012, kap. 4.5.1.4).



**Obr. 4-12: Lokalizace GFP-LocZ v průběhu buněčného dělení:**

Na obrázku je prezentována lokalizace GFP-LocZ u kmene Sp229 exprimujícího protein, který je pod kontrolou nativního promotoru. Buňky jsme rozdělili dle jednotlivých stádií buněčného dělení (1 - 6). **PH:** fázový kontrast; **GFP:** fluorescenční signál GFP; **překryv:** překryv fázového kontrastu a signálu GFP. Měřítko: 1  $\mu\text{m}$ . **%:** procentuální zastoupení buněk v každé fázi buněčného dělení vykazující daný lokalizační vzor v populaci. **SIM:** super-rezoluční mikroskopie, buňka nalevo představuje pohled kolmý na buňku, buňka vpravo představuje buňku pootočenou tak, aby byla viditelná struktura GFP-LocZ. Měřítko: 0,5  $\mu\text{m}$ . **Model A/:** schématické znázornění rostoucí buňky *S. pneumoniae* v jednotlivých fázích buněčného dělení. Každá dceřiná buňka je tvořena z poloviny

buněčné stěny buňky mateřské (tmavě šedá) a od středu je syntetizována buněčná stěna nová (světle šedá); **šípky**: označují ekvatoriální kruh. **Model B/**: schématické znázornění lokalizace GFP-LocZ v jednotlivých fázích buněčného dělení.



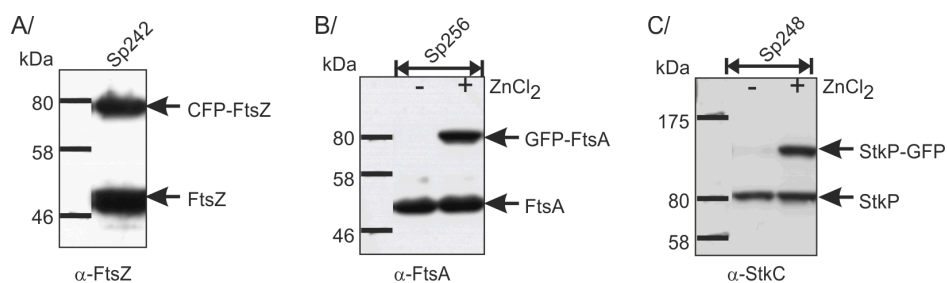
**Obr. 4-13: Fluorescenční mikroskopie:**

Morfologie a lokalizace GFP-LocZ na genetickém pozadí: **A/** divokého kmene (Sp229; *locZ::gfp-locZ*). **B/** mutanta  $\Delta$ *stkP* (Sp58;  $\Delta$ *stkP*, *bga::P<sub>czcD</sub>-gfp-locZ*).

#### 4.1.4 LocZ je časným proteinem buněčného dělení

Předchozí výsledky naznačují, že protein LocZ patří mezi časné proteiny buněčného dělení u *S. pneumoniae*. Proto jsme se rozhodli charakterizovat dynamiku lokalizace ve srovnání s proteiny FtsZ a FtsA, jakožto proteinů buněčného dělení, které u *S. pneumoniae* lokalizují v dělicí přepážce jako první (Morlot et al., 2003; Lara et al., 2005). Za tímto účelem jsme připravili kmeny, které dovolují simultánní expresi a vizualizaci proteinů LocZ a FtsZ nebo FtsA, které jsme fúzovali s různými fluorescenčními proteiny. V obou výsledných kmezech Sp242 (R6, *locZ::rfp-locZ*, pBCSMH036) a Sp256 (R6, *locZ::rfp-locZ bga::P<sub>czcD</sub>-gfp-ftsA*) dochází k expresi LocZ fúzovaného s červeným fluorescenčním proteinem (RFP-LocZ) pod kontrolou nativního promotoru. V kmeni Sp242 dále dochází k expresi FtsZ fúzovaného s modrým fluorescenčním proteinem (CFP-FtsZ) pod kontrolou konstitutivního promotoru z plasmidu pBCSMH036

(Henriques et al., 2013) a v kmeni Sp256 dochází k expresi FtsA fúzovaného se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP-FtsA) pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru (Beilharz et al., 2012) (podrobněji viz kap. 3.10, Materiál a metody). Úroveň exprese proteinů CFP-FtsZ a GFP-FtsA jsme ověřili pomocí imunodetekce za použití specifické protilátky proti FtsZ a proti FtsA (obr. 4-14A, B).



**Obr. 4-14: Expres FtsZ, FtsA a StkP v dvojité značených kmenech:**

Imunodetekce proteinů FtsZ/CFP-FtsZ, FtsA/GFP-FtsA a StkP/GFP-StkP v kmenech **A/** Sp242 (R6; *locZ::rfp-locZ*, pBCSMH036), **B/** Sp256 (R6; *locZ::rfp-locZ bga::P<sub>czcD</sub>-gfp-ftsA*) a **C/** Sp248 (R6; *locZ::rfp-locZ bga::P<sub>czcD</sub>-gfp-stkP*) za použití specifických protilátek proti FtsZ ( **$\alpha$ -FtsZ**), FtsA ( **$\alpha$ -FtsA**) nebo C-terminální doméně StkP ( **$\alpha$ -StkC**). Kmeny Sp256 a Sp248 jsme kultivovali v médiu C+Y bez přídavku (-) a s přídavkem (+) induktoru (0,15 mM ZnCl<sub>2</sub>), který indukuje expresi GFP-FtsA a GFP-StkP. **Šipky** znázorňují jednotlivé pozice proteinů.

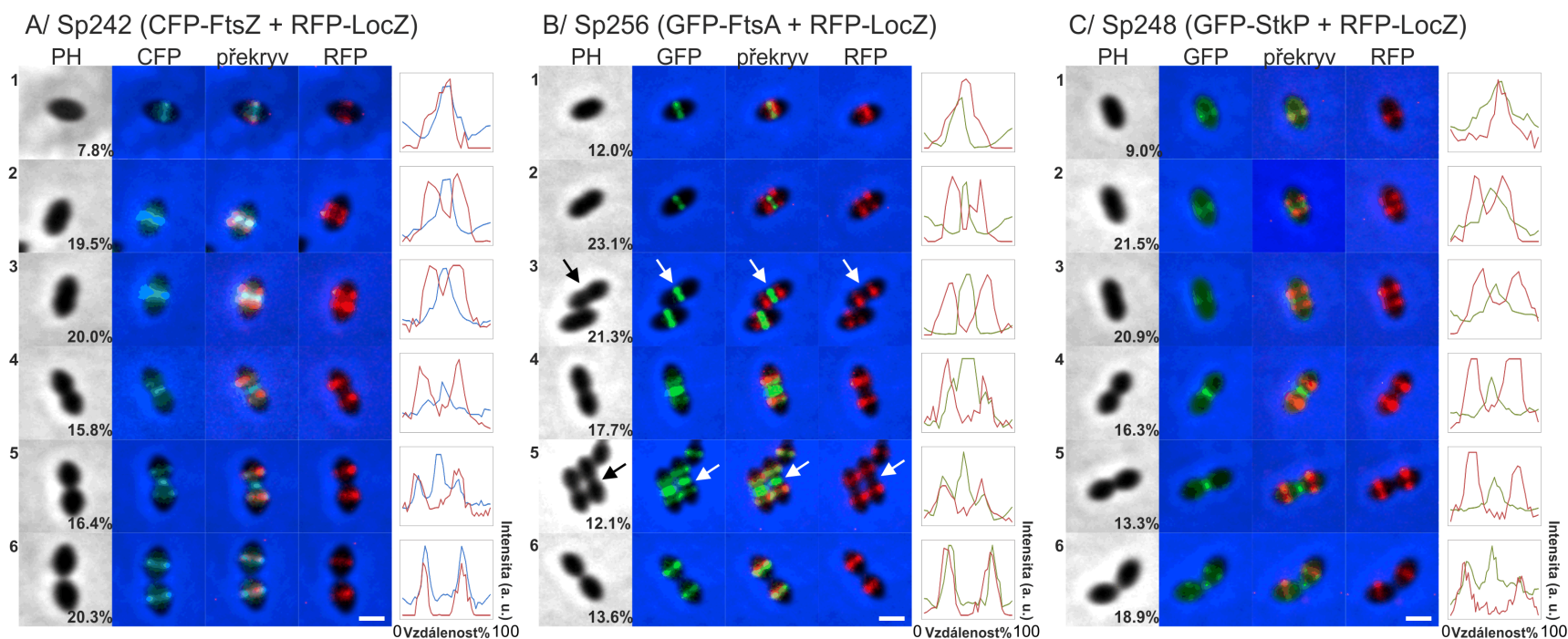
Analyzovali jsme lokalizaci koexprimovaných fúzních proteinů v šesti stádiích buněčného dělení v exponenciální kultuře. Za tímto účelem jsme použili snímky z fluorescenční mikroskopie daných kmenů, které jsme pěstovali v tekutém médiu C+Y do OD<sub>600</sub> ~0,3. Procenta uvedená v obrázku 4-15 panelu PH vyjadřují procentuální zastoupení buněk se stejným kolokalizačním profilem v populaci.

Jak můžeme pozorovat na obrázku 4-15A (koexpres RFP-LocZ a CFP-FtsZ v kmeni Sp242) a na obrázku 4-15B (koexpres RFP-LocZ a GFP-FtsA v kmeni Sp256), v první fázi buněčného dělení po oddělení dceřiných buněk kolokalizují LocZ a FtsZ, resp. FtsA uprostřed buňky. Ve druhé a třetí fázi buněčného dělení, kdy dochází hlavně k elongaci buněk, pozorujeme, že RFP-LocZ se dělí na dva kruhy (fáze 2), které se od sebe navzájem a od středu začínají oddalovat (fáze 3). V obou fázích lokalizuje CFP-FtsZ a GFP-FtsA jako jeden kruh uprostřed buňky. Názorně je tento jev pozorovatelný v grafech profilu fluorescenční intenzity proteinu v závislosti na délce buňky pro druhou a třetí fázi buněčného dělení. V grafech vidíme, že RFP-LocZ již tvoří dva píky, zatímco proteiny CFP-FtsZ a GFP-FtsA tvoří jeden pík setrvávající

uprostřed buňky. Ve čtvrté fázi buněčného dělení je již pozorovatelná konstriktce Z-kruhu, která je spojená s formováním nových FtsZ a FtsA kruhů v místech budoucích buněčných přepážek, které jsou již obsazeny proteinem RFP-LocZ. V grafech intenzity fluorescence pozorujeme fluorescenční profil CFP-FtsZ a GFP-FtsA jako trojitý pík, z nichž jeden největší je uprostřed buňky a další dva menší v oblasti ekvatoriálních kruhů, které se zároveň překrývají se signálem RFP-LocZ. Relokalizace CFP-FtsZ a GFP-FtsA do míst budoucího buněčného dělení je daleko lépe pozorovatelná v páté fázi buněčného dělení, kdy dochází ke kompletnímu překryvu fluorescenčních signálů (CFP-FtsZ nebo GFP-FtsA s RFP-LocZ) ve středu nově vznikajících dceřiných buňkách. Zároveň v této fázi přetrvává CFP-FtsZ a GFP-FtsA v uzavírající se dělicí přepážce, kde plní svou úlohu v konstriktci. Nakonec, v šesté fázi buněčného dělení, kdy je dokončeno buněčné dělení, kolokalizují RFP-LocZ a CFP-FtsZ, resp. GFP-FtsA kompletně ve středu dceřiných buněk. Tato data potvrzují, že protein LocZ přichází a opouští buněčný střed ještě dříve než časné proteiny buněčného dělení FtsZ a FtsA a v pokročilejších stádiích buněčného dělení dochází k jejich kolokalizaci v oblasti ekvatoriálního kruhu, který představuje budoucí místo dělení.

Další zajímavý pohled nám poskytla analýza dynamiky lokalizace proteinkinasy StkP a jejího substrátu LocZ. Za tímto účelem jsme připravili kmen Sp248 (R6, *locZ::rfp-locZ bga::P<sub>czcD</sub>-gfp-stkP*), ve kterém dochází ke koexpresi RFP-LocZ pod kontrolou nativního promotoru a GFP-StkP pod kontrolou indukibilního zinkového promotoru (obr. 4-14C a 4-15C) (Beilharz et al., 2012) (podrobněji viz kap. 3-10, Materiál a metody). Jak bylo dříve popsáno, GFP-StkP lokalizuje uprostřed buňky asociovaná s FtsZ kruhem až do uzavření dělicí přepážky a do míst ekvatoriálních kruhů relokalizuje až v šesté fázi buněčného dělení, tedy ještě později než FtsZ a FtsA (Beilharz et al., 2012), zatímco RFP-LocZ lokalizuje ve středu buňky pouze v iniciační fázi buněčného dělení. Tyto výsledky ukazují, že RFP-LocZ a GFP-StkP kolokalizují pouze v první fázi buněčného dělení, kdy je buňka ve stádiu jedné oválné buňky, a dále v šesté fázi buněčného dělení, kdy je již uzavřena dělicí přepážka a vznikly dvě nové dceřiné buňky. Z těchto dat vyplývá, že první a šestá fáze buněčného dělení, tedy fáze před vlastním buněčným dělením, jsou nejpravděpodobnějšími fázemi, kdy může být substrát LocZ fosforylován proteinkinásou StkP.





**Obr. 4-15: Kolokalizace LocZ s ostatními proteiny buněčného dělení: FtsZ, FtsA nebo StkP:**

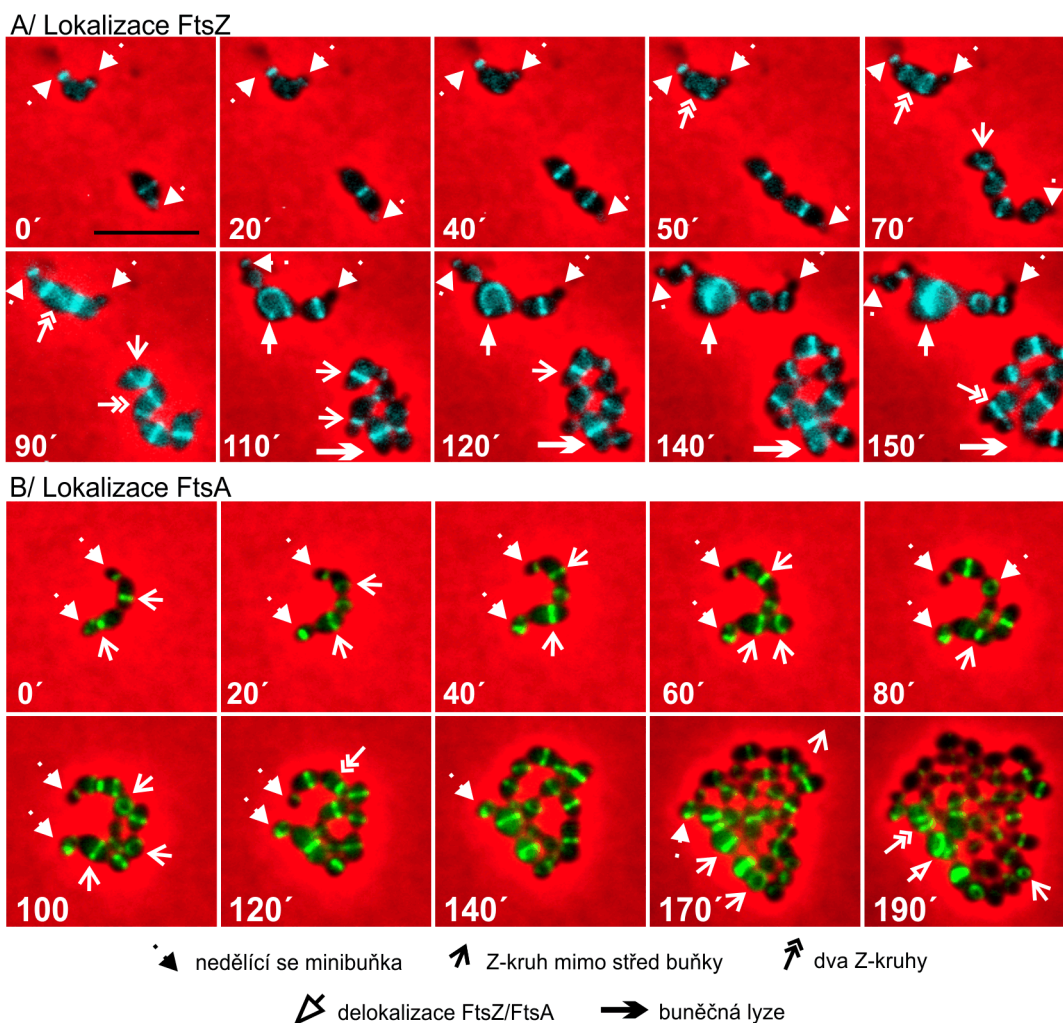
Fluorescenční mikroskopie dvojité značených kmenů. Každý kmen vždy exprimuje RFP-LocZ pod kontrolou nativního promotoru a jeden další protein buněčného dělení CFP-FtsZ, GFP-FtsA nebo GFP-StkP pod kontrolou konstitutivního nebo indukibilního zinkového promotoru. Buňky na obrázku jsou reprezentativní a představují stejný lokalizační profil pro procentuálně udanou část populace buněk v každé z šesti fází buněčného dělení, viz. procenta uvedená v panelu PH. **A/** Kmen Sp242 (R6; *locZ::rfp-locZ*, pBCSMH036) exprimující CFP-FtsZ pod kontrolou konstitutivního promotoru na plasmidu. Celkový počet analyzovaných buněk: 359. **B/** Kmen Sp256 (R6; *locZ::rfp-locZ bga::P<sub>zcd</sub>-gfp-ftsA*) exprimující GFP-FtsA pod kontrolou indukibilního zinkového promotoru. Celkový počet analyzovaných buněk: 389. **C/** Kmen Sp248 (R6; *locZ::rfp-locZ bga::P<sub>zcd</sub>-gfp-stkP*) exprimující GFP-StkP pod kontrolou indukibilního zinkového promotoru. Celkový počet analyzovaných buněk: 354. **PH:** fázový kontrast; **GFP:** signál GFP; **CFP:** signál CFP; **RFP:** signál RFP; **překryv:** odpovídající překryv dvou signálů. Měřítko: 1  $\mu$ m. Grafy představují profil fluorescenční intenzity signálu CFP-FtsZ (modrá), GFP-FtsA (zelená) nebo GFP-StkP (zelená) v porovnání s RFP-LocZ (červená) v jednotkách arbitrary units (a. u.) (volně přeloženo v libovolných jednotkách, kdy se jedná spíše o porovnání signálů v jednom vzorku než o skutečné jednotky). **Šipky** znázorňují analyzovanou buňku v obrázku s vícero buňkami.

#### 4.1.5 Lokalizace FtsZ a FtsA v mutantovi $\Delta locZ$

Mutantní kmen  $\Delta locZ$  vykazuje morfologické abnormality, které naznačují, že asymetrické dělení buněk tohoto kmene by mohlo být způsobeno delokalizací FtsA nebo FtsZ. Abychom potvrdili naši hypotézu, rozhodli jsme se připravit kmeny exprimující protein FtsZ nebo FtsA fúzovaný s fluorescenčním proteinem na genetickém pozadí mutantního kmene  $\Delta locZ$ . A to kmen Sp243 (R6,  $\Delta locZ$  pBCSMH036) exprimující pod kontrolou konstitutivního promotoru na plasmidu CFP-FtsZ (Henriques et al., 2013) a kmen označený Sp257 (R6,  $\Delta locZ$  *bga::P<sub>czcD</sub>-gfp-ftsA*) exprimující pod kontrolou indukibilního zinkového promotoru GFP-FtsA (Beilharz et al., 2012) (podrobněji viz kap. 3-10, Materiál a metody). Jednotlivé kmeny jsme kultivovali v tekutém médiu C+Y a pokud bylo potřeba, přidali jsme do média induktor (0,15 mM ZnCl<sub>2</sub>). Následně jsme jednotlivé kultury připravili k pozorování buněčného dělení v čase pomocí tzv. časosběrné fluorescenční mikroskopie, kdy je možné pozorovat buněčné dělení jednotlivých buněk v reálném čase (podrobněji viz kap 3.8.5, Materiál a metody).

Na obrázku 4-16, připraveného ze snímků z odpovídajících videí (video S1 a S2 přiloženo na CD disku), můžeme pozorovat různé události v průběhu buněčného dělení u každé z buněk. Jednotlivé události jsme v obrázku označili různými šipkami (viz klíč v obrázku 4-16). Oba fluorescenčně značené proteiny CFP-FtsZ a GFP-FtsA v mutantním kmeni tvoří typickou kruhovou strukturu a lze tedy říci, že tvorba Z-kruhu není ve většině buněk zásadně ovlivněna. Nicméně mnoho Z-kruhů je posunuto mimo buněčný střed a také jsou často náhodně umístěny ve vztahu k dlouhé i krátké ose buňky, což má za následek vznik dvou dceřiných buněk o různé velikosti. Občas také pozorujeme v jedné buňce dva Z-kruhy. Dalším jevem je vznik minibuněk, které jsou schopné dalších cyklů buněčného dělení. U některých minibuněk k dalšímu buněčnému dělení nedochází, jejich velikost se nemění a dokonce nedochází k jejich úplnému oddělení od druhé dceřiné buňky, která je schopná růstu a buněčného dělení. Neschopnost dělení některých minibuněk by mohla být způsobena ztrátou genetické informace. Zajímavým jevem je vznik abnormálně tvarovaných buněk, ve kterých dochází k formování CFP-FtsZ do tvaru podkovy, nikoli kruhu (obr. 4-16A). Takovéto buňky se dále nedělí a pouze zvětšují svůj objem. Podobně velké a velmi pomalu se dělící nebo vůbec se nedělící buňky obsahující GFP-FtsA ve tvaru podkovy jsme pozorovali i v kmeni Sp257 (obr. 4-16B). Tato data naznačují, že ačkoli není *LocZ* striktně vyžadován ke stavbě Z-kruhu, jeho nepřítomnost má negativní vliv na geometrickou symetrii a správné umístění Z-kruhu.





**Obr. 4-16: Lokalizace FtsZ a FtsA v dělicích se buňkách mutantního kmene  $\Delta locZ$ :**

Fluorescenční časosběrná mikroskopie: **A/** kmen Sp243 ( $\Delta locZ$  pBCSMH036) exprimující CFP-FtsZ a **B/** kmen Sp257 ( $\Delta locZ$  *bga::P<sub>czcD</sub>-gfp-ftsA*). Jednotlivé snímky byly vybrány z videí S1 a S2 přiložených na CD disku. Reprezentativně byly vybrány časové body, které ilustrují zajímavé události v buňkách kmene  $\Delta locZ$  během buněčného dělení. Mikroskopické snímky ukazují překryv fázového kontrastu a fluorescenčního signálu. Pět typů šipek (klíč pod obrázkem) poukazuje na různé události v průběhu buněčného dělení: nedělící se minibuňky, umístění Z-kruhu do náhodného místa mimo střed buňky, výskyt dvou Z-kruhů v jedné buňce, delokalizace FtsZ/FtsA a narušení jeho kruhové struktury, buněčná lyze. Měřítka, 5  $\mu$ m.

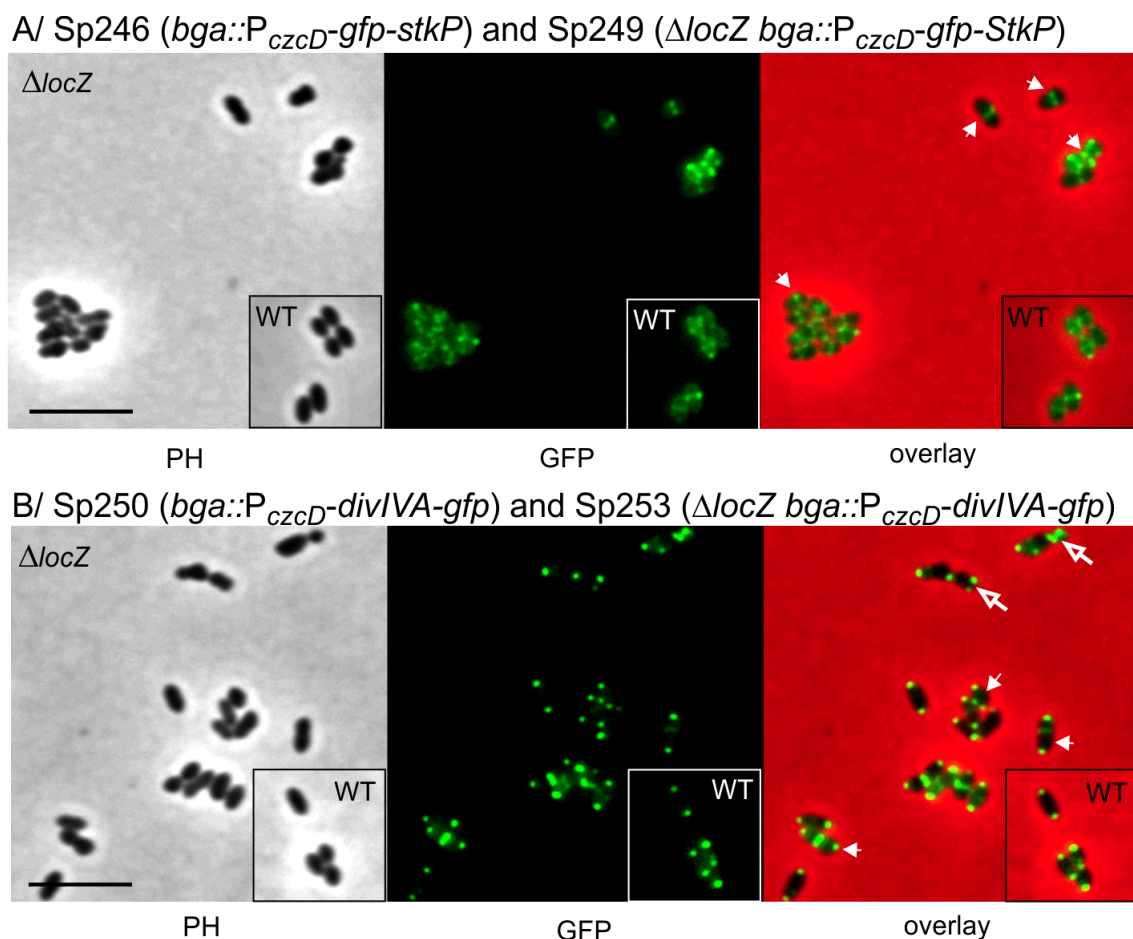
#### 4.1.6 Lokalizace dalších proteinů buněčného dělení v mutantovi $\Delta locZ$

Analýza lokalizace FtsZ a FtsA v mutantním kmeni  $\Delta locZ$  odhalila abnormality v jejich uložení mimo buněčný střed až po narušení jejich kruhové struktury. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli prozkoumat lokalizaci dalších proteinů buněčného dělení StkP a DivIVA, které cílí do buněčného středu později než FtsZ a FtsA (Beilharz et al., 2012). Pro toto pozorování jsme

připravili vždy dvojici bakteriálních kmenů, které exprimují dělicí protein fúzovaný s GFP na genetickém pozadí divokého kmene (WT) a na genetickém pozadí mutantního kmene ( $\Delta locZ$ ) pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru. Jednotlivé bakteriální kmeny jsme kultivovali v tekutém médiu C+Y s přidavkem induktoru (0,15 mM  $ZnCl_2$ ) do  $OD_{600} \sim 0,3$  a živé preparáty pozorovali pomocí fluorescenční mikroskopie.

Na obrázku 4-17A můžeme pozorovat lokalizaci GFP-StkP v kmeni Sp246 (R6, *bga::P<sub>czcD</sub>-gfp-stkP*) a v kmeni Sp249 (R6,  $\Delta locZ$  *bga::P<sub>czcD</sub>-gfp-stkP*). Na genetickém pozadí divokého kmene lokalizuje GFP-StkP v buněčné stěně s jasně znatelným obohacením v místě buněčného dělení, jak již bylo dříve publikováno (Beilharz et al., 2012). Na genetickém pozadí mutantního kmene Sp249 lokalizuje GFP-StkP také hlavně v dělicích přepážkách buněk, které jsou ale často posunuty mimo buněčný střed (obr. 4-17A, jednotlivé buňky jsou označeny šipkami). Na základě tohoto pozorování se domníváme, že LocZ není vyžadován pro cílení StkP do dělicí přepážky.

Podobně se chová i protein DivIVA (Fadda et al., 2007; Beilharz et al., 2012). Na obrázku 4-17B, kde můžeme pozorovat lokalizaci DivIVA-GFP v kmeni Sp250 (R6, *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA-gfp*) a kmeni Sp253 (R6,  $\Delta locZ$  *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA-gfp*), vidíme, že schopnost cíleně lokalizovat v místě buněčné přepážky a buněčných pólů v obou kmenech není ovlivněna, a tedy, že ani pro cílenou lokalizaci DivIVA není vyžadována přítomnost proteinu LocZ. Nicméně v tomto případě charakteristická lokalizace DivIVA-GFP na buněčných pólech ilustruje, že ne pouze buněčný střed, ale i póly mnoha buněk mutantního kmene  $\Delta locZ$  jsou vychýleny z vodorovné osy buňky (obr. 4-17B, bílé šipky). Navíc u některých abnormálně tvarovaných buněk DivIVA-GFP tvoří na pólech klastry v atypických pozicích, které poukazují na neschopnost DivIVA rozpoznat buněčný pól (obr 4-17B, otevřené šipky).



**Obr. 4-17: Lokalizace StkP a DivIVA v mutantním kmeni  $\Delta locZ$ :**

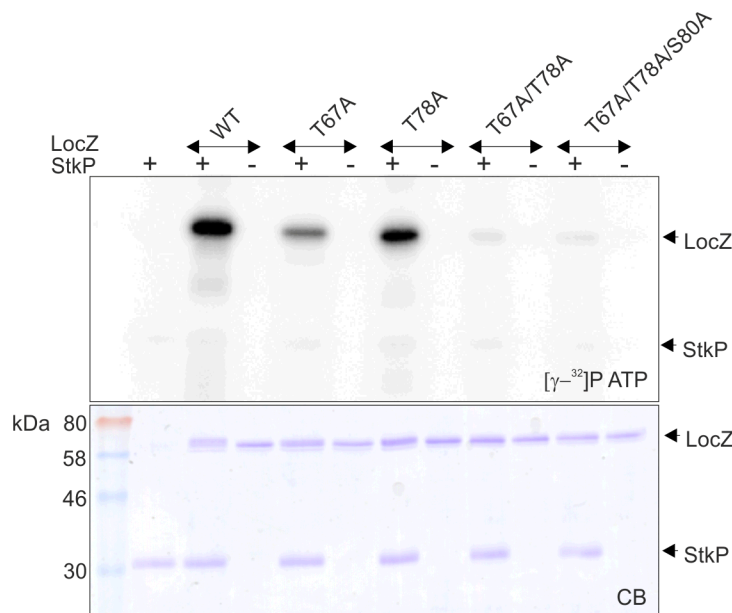
A/ Lokalizace GFP-StkP v mutantním kmeni  $\Delta locZ$  (Sp249,  $\Delta locZ$  *bga::P<sub>czcD</sub>-gfp-stkP*) a odpovídajícím divokém kmeni **WT** (Sp246, *bga::P<sub>czcD</sub>-gfp-stkP*). **Šipky** označují buňky, ve kterých GFP-StkP lokalizuje v dělicích přepážkách umístěných mimo buněčný střed. **B/** Lokalizace DivIVA-GFP v mutantním kmeni  $\Delta locZ$  (Sp253,  $\Delta locZ$  *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA-gfp*) a odpovídajícím divokém kmeni **WT** (Sp250, *bga::P<sub>czcD</sub>-divIVA-gfp*). **Bílé šipky** označují buňky s póly vychýlenými z vodorovné osy. **Otevřené šipky** označují buňky, ve kterých DivIVA-GFP tvoří atypické klastry na buněčných pólech, což poukazuje na fakt, že buněčný pól není v buňce zcela definován. Bakteriální kmeny jsme kultivovali v tekutém médiu C+Y s přidavkem induktoru (0,15 mM ZnCl<sub>2</sub>), který zajišťuje expresi genů pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru. **PH:** fázový kontrast, **GFP:** fluorescenční signál GFP, **překryv:** překryv fázového kontrastu a fluorescenčního signálu GFP. Měřítka: 5  $\mu$ m.

#### 4.1.7 LocZ je fosforylován *in vivo* na pozicích T67 a T78

Určením míst fosforylace proteinu *LocZ in vitro* se v naší laboratoři zabývala má školitelka. Za tímto účelem použila systém plasmidů pETDuet založený na duální expresi kinázy a jejího substrátu v bakterii *E. coli* (Molle et al., 2010). Následná analýza pomocí hmotnostní

spektrometrie určila dva fosforylované aminokyselinové zbytky v N-terminální doméně proteinu, a to T67 a T78, které jsou specificky fosforylovány proteinkinásou StkP (Holečková et al., 2014).

Naproti tomu v globální proteomové studii Sun et al. (2010) byly identifikovány fosforylované aminokyselinové zbytky proteinu LocZ na pozicích T78 a S80. Na základě těchto dat moje školitelka připravila mutované formy LocZ. V sekvenci genu pro LocZ byly nahrazovány aminokyseliny T67, T78 a S80, a to postupně každá zvlášť nebo v kombinacích, za neutrální aminokyselinu alanin, která nemůže být fosforylována. Odpovídající mutované formy proteinu LocZ byly použity v *in vitro* kinázové reakci v přítomnosti StkP a radioaktivně značeného  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP. Tato reakce ukázala částečně sníženou hladinu fosforylace v případě jednoduchých mutant proteinu LocZ-T67A a LocZ-T78A a téměř úplnou inhibici fosforylace *in vitro* v případě formy dvojité záměny LocZ-T67A/T78A. Nicméně trojitá záměna v proteinu LocZ-T67A/T78A/S80A vykazovala stejnou hladinu fosforylace jako v případě dvojité záměny LocZ-T67A/T78A (obr. 4-18). Z tohoto pozorování bylo usuzováno, že hlavními fosforylovanými aminokyselinovými zbytky proteinu LocZ jsou T67 a T78 a navíc se v proteinu LocZ vyskytuje ještě další místo fosforylace, které nebylo metodami *in vitro* prokázáno (Štekerová, 2012; Holečková et al., 2014).



**Obr. 4-18: *In vitro* fosforylace LocZ a jeho mutovaných forem:**

Divoká alela (WT) a mutované formy rekombinantního proteinu LocZ s danými záměnami aminokyselin(y) v *in vitro* reakci s rekombinantní StkP (+) v přítomnosti radioaktivně značeného  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP. Jako kontrola fosforylace byla vždy provedena i reakce bez přidavku StkP (-). Jednotlivé proteinové vzorky byly rozděleny pomocí

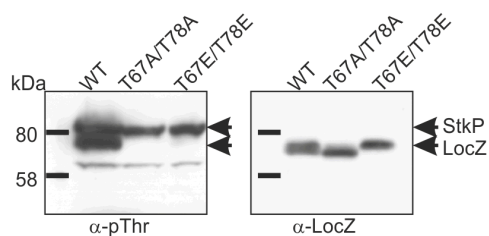
SDS-PAGE. **CB:** barvení rozdělených proteinů pomocí Coomassie blue, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]P **ATP:** detekce fosforylace, **šipky:** označují pozici jednotlivých proteinů StkP a LocZ. (Původní data: Linda Doubravová)

Jedním z cílů mé diplomové práce bylo zkoumání vlivu fosforylace na funkci proteinu LocZ. Za tímto účelem jsme připravili komplementační kmen Sp65 (Rx1;  $\Delta locZ$  *bga::P<sub>czcD</sub>-his6-locZ-T67A/T78A*) exprimující mutovanou formu proteinu His6-LocZ-T67A/T78A, kde byly zaměněny aminokyseliny T67 a T78 za neutrální alanin, který nemůže být fosforylován, a protein je tzv. fosfoablativní. Exprese proteinu je pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru a protein je fúzován s histidinovou kotvou. Imunodetekce fosforylace fosfoablativní formy proteinu ukázala, že protein není *in vivo* vůbec fosforylován a tedy aminokyseliny T67 a T78 jsou jedinými místy fosforylace proteinu LocZ. Další podrobná analýza morfologie a velikosti buněk odhalila, že fosfoablativní forma proteinu His6-LocZ-T67A/T78A je schopná komplementace mutace. Buňky se v přítomnosti induktoru dělí symetricky, včetně rozdělení DNA do dceřiných buněk. Z tohoto pozorování vyplynulo, že nefosforylovaný LocZ je funkční (Štekerová, 2012).

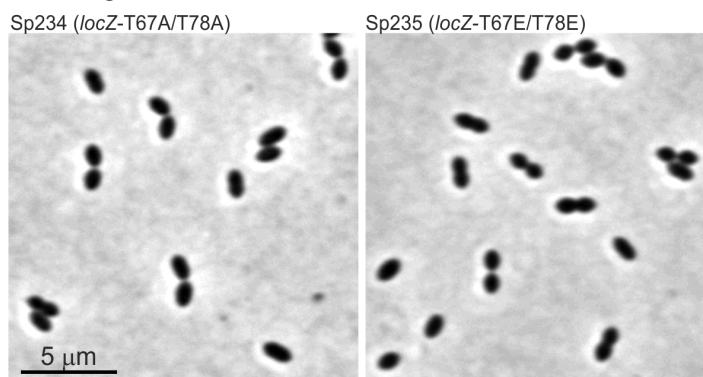
Dále nás zajímalo, zda a jak může ovlivnit funkci proteinu jeho fosforylovaný stav. Proto jsme připravili komplementační kmen Sp99 (Rx1;  $\Delta locZ$  *bga::P<sub>czcD</sub>-his6-locZ-T67E/T78E*) exprimující mutovanou formu proteinu His6-LocZ-T67E/T78E pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru, kde byly zaměněny fosfoakceptory T67 a T78 za kyselinu glutamovou, která mimikuje fosforylovaný stav proteinu, a taková forma se nazývá fosfomimetická. Nicméně výsledky pozorování morfologie, dělení DNA do buněk a schopnosti komplementace mutace byly stejné jako v případě fosfoablativní formy proteinu LocZ. Tedy exprimovaný protein His6-LocZ-T67E/T78E byl v přítomnosti induktoru schopen komplementace mutace, buňky se dělily symetricky, včetně separace DNA do buněk (data nejsou prezentována). Takové výsledky byly překvapující, a proto jsme se na jejich základě rozhodli připravit kmeny exprimující fosfoablativní [Sp234 (R6, *locZ::locZ-T67A/T78A*)] a fosfomimetickou [Sp235 (R6, *locZ::locZ-T67E/T78E*)] formu LocZ pod kontrolou nativního promotoru a to z důvodu, že by histidinová kotva nebo umístění genu *locZ* na chromosomu mohlo jeho funkci ovlivňovat (příprava jednotlivých kmenů je uvedena podrobněji v kap. 3.12.2, Materiál a metody). Imunodetekce pomocí specifické protilátky proti LocZ ukázala, že hladina exprese je jak v divokém kmeni (WT), tak v kmenech exprimujících fosfoablativní formu (Sp234) nebo fosfomimetickou formu (Sp235) LocZ srovnatelná. A jak jsme předpokládali, mutované formy proteinu nereagují s anti-pThr protilátkou (obr. 4-19A), čímž jsme potvrdili, že jedinými fosfoakceptory v proteinu LocZ

*in vivo* jsou aminokyseliny na pozici T67 a T78. Nicméně analýza morfologie obou kmenů, Sp234 i Sp235, neodhalila žádné rozdíly v morfologii buněk ve srovnání s divokým kmenem (obr. 4-19B).

A/ *In vivo* fosforylace



B/ Morfologie buněk



**Obr. 4-19: Vliv fosforylace na funkci LocZ:**

Bakteriální kmeny byly pěstovány v tekutém médiu C+Y. A/ Detekce exprese a fosforylace pomocí specifických protilátek proti p-Thr ( $\alpha$ -pThr) a proti LocZ ( $\alpha$ -LocZ) v celkových proteinových lyzátech buněk kmene Sp208 (WT), Sp234 (*locZ::locZ-T67A/T78A*) a Sp235 (*locZ::locZ-T67E/T78E*) rozdělených pomocí SDS-PAGE. Šipky znázorňují pozici jednotlivých proteinů. B/ Morfologie buněk kmene **Sp234** (fosfoablativní forma LocZ-T67A/T78A) a **Sp235** (fosfomimetická forma LocZ-T67E/T78E). Měřítka: 5  $\mu$ m.

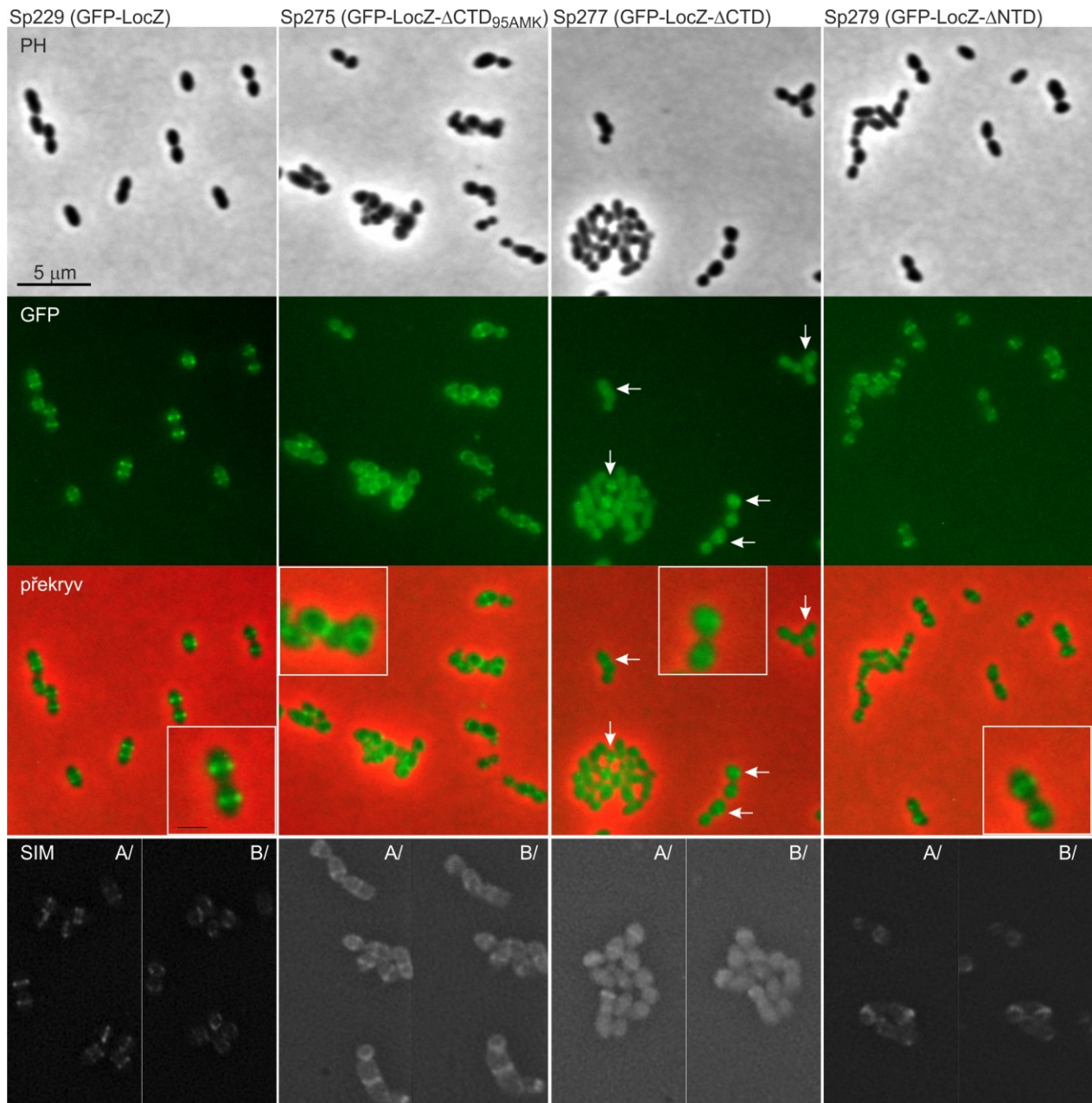
#### 4.1.8 Analýza funkce jednotlivých domén proteinu LocZ

K bližšímu určení funkce jednotlivých domén LocZ jsme se rozhodli připravit kmeny exprimující zkrácené varianty proteinu LocZ fúzované s GFP pod kontrolou nativního promotoru a pozorovat jejich lokalizaci v buňce. Jak již bylo v úvodu této podkapitoly zmíněno, LocZ se skládá z N-terminální intracelulární domény, ve které se nacházejí fosfoakceptory T67 a T78. Dále z transmembránové domény a C-terminální extracelulární domény, ve které se nachází mezi streptokoky vysoce konzervovaná doména tvořící posledních 95 AMK v sekvenci na obr. 4-2. Na základě těchto dat jsme připravili tři následující bakteriální kmeny. Sp275 (*locZ::gfp-locZ- $\Delta$ CTD<sub>95AMK</sub>*) exprimující variantu GFP-LocZ s delecí posledních 95 AMK v C-terminální extracelulární doméně, kmen Sp277 (*locZ::gfp-locZ- $\Delta$ CTD*) exprimující GFP-LocZ s delecí celé C-terminální extracelulární domény (283 AMK) a kmen Sp279 (*locZ::gfp-locZ- $\Delta$ NTD*) exprimující GFP-LocZ s delecí celé N-terminální intracelulární domény (158 AMK). Příprava kmenů je popsána podrobněji v kapitole 3.12.2, Materiál a metody.

Na snímcích z fluorescenční mikroskopie a detailnější super-rezoluční mikroskopie (obr. 4-20) můžeme pozorovat morfologii buněk a lokalizaci zkrácených variant proteinu LocZ fúzovaných s GFP v buňkách jednotlivých bakteriálních kmenů Sp275, Sp277 a Sp279 ve srovnání s divokým kmenem Sp229 exprimujícím GFP-LocZ pod kontrolou nativního promotoru. Delece jakékoli námi zvolené části proteinu LocZ má fenotyp odpovídající deleci celého *locZ* (tvorba asymetricky dělicích se buněk a minibuněk). V buňkách kmene Sp275 pozorujeme difuzní membránovou lokalizaci proteinu GFP-LocZ- $\Delta$ CTD<sub>95AMK</sub>. Protein je stále schopen lokalizovat ve středu buňky, nicméně ale pozorujeme jeho lokalizaci i v membráně buňky. Delece celé C-terminální domény má za následek delokalizaci proteinu GFP-LocZ- $\Delta$ CTD. Protein se vyskytuje hlavně v cytoplazmě, u některých buněk kmene Sp277 pozorujeme i lokalizaci v septu (obr. 4-20, panel Sp277, dané buňky jsou označeny šipkami). Delece N-terminální domény proteinu LocZ nemá na lokalizaci proteinu vliv, je stále schopen lokalizovat pouze v dělicí přepážce buňky (kmen Sp279).

Z tohoto pozorování lze usuzovat, že C-terminální doména proteinu LocZ je zodpovědná za jeho správnou lokalizaci. Delece N-terminální domény, ve které se nacházejí fosfoakceptory T67 a T78, nijak lokalizaci proteinu LocZ neovlivnila.





**Obr. 4-20: Zkrácené formy proteinu LocZ a jejich lokalizace v buňce:**

Fluorescenční mikroskopie kmenů exprimujících pod kontrolou nativního promotoru různě zkrácené varianty proteinu LocZ fúzaného s GFP. **Sp229** (*locZ::gfp-locZ*): kmen exprimující GFP-LocZ; **Sp275** (*locZ::gfp-locZ-ΔCTD<sub>95AMK</sub>*): kmen exprimující variantu GFP-LocZ, která má deletovanou část C-terminální domény, a to posledních 95 AMK, které jsou konzervovány u streptokoků. **Sp277** (*locZ::gfp-locZ-ΔCTD*): kmen exprimující variantu GFP-LocZ, která má deletovanou C-terminální doménu. **Sp279** (*locZ::gfp-locZ-ΔNTD*): kmen exprimující variantu GFP-LocZ, která má deletovanou N-terminální doménu. Bakteriální kmeny byly pěstovány v tekutém médiu C+Y do  $OD_{600} \sim 0,3$  a připravené živé preparáty následně mikroskopovány. **PH**: fázový kontrast; **GFP**: fluorescenční signál GFP; **překryv**: překryv fázového kontrastu se signálem GFP. **SIM**: super-rezoluční mikroskopie, kde v panelu **A/** jsou buňky v pohledu kolmém na buňku a v panelu **B/** buňky pootočené tak, aby byla



viditelná lokalizace varianty GFP-LocZ v buňce. **Šipky:** znázorňují buňky kmene Sp277, ve kterých je GFP-LocZ- $\Delta$ CTD lokalizován i v dělicí přepážce. Měřítka: 5  $\mu$ m a ve výřezech jednotlivých buněk v panelu překryvu 1  $\mu$ m.

#### 4.1.9 Diskuze

Charakterizace proteinu LocZ byla současně publikována nejen naší skupinou (Holečková et al., 2014) ale také konkurenční skupinou (Fleurie et al., 2014) pod názvem MapZ. Označení MapZ bylo následně všeobecně přijato. Proto v případě diskuze výsledků, které vzešly z jiných laboratoří, uvádím označení MapZ.

Protein LocZ (původní označení Spr0334) je membránový protein složený z N-koncové intracelulární domény, transmembránové domény a C-koncové extracelulární domény. V N-koncové doméně proteinu byly identifikovány *in vitro* i *in vivo* dva fosforylované aminokyselinové zbytky, a to T67 a T78. Homology proteinu LocZ jsou konzervovány pouze u streptokoků, laktokoků a enterokoků. V C-koncové doméně se nachází oblast bohatá na serinové zbytky o neznámé funkci, avšak tato oblast není široce konzervovaná a vyskytuje se jen u několika málo druhů streptokoků. Naopak sekvence posledních 95 AMK C-koncové domény je u streptokoků vysoce konzervovaná. U *S. pneumoniae* se LocZ účastní buněčného dělení (Nováková et al., 2010, Štekerová, 2012). LocZ, stejně tak jako další proteiny buněčného dělení FtsA, FtsZ, DivIVA a MurC, patří mezi substráty StkP, která je jedinou Ser/Thr proteinkinasou eukaryotního typu u *S. pneumoniae* (Nováková et al., 2010). Delece *stkP* má vliv na morfologii, navození stavu přirozené kompetence, odpovědi na stresové podmínky prostředí, virulenci a další buněčné funkce (Echenique et al., 2004; Sasková et al., 2007).

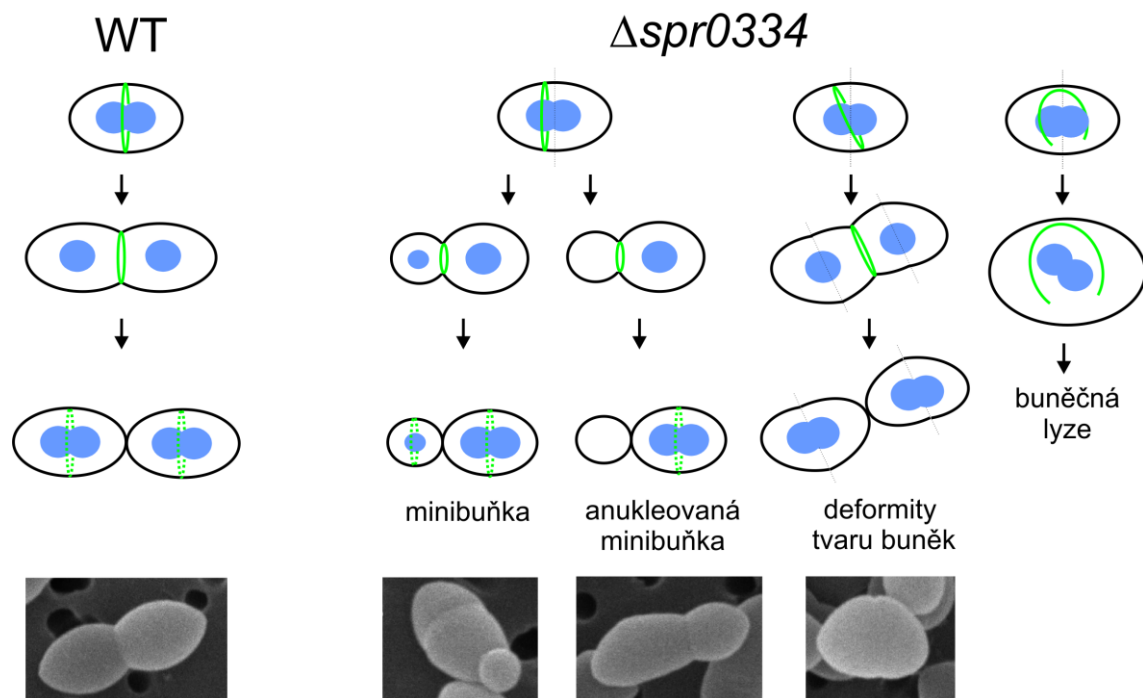
Naším cílem bylo určit lokalizaci proteinu LocZ a objasnit jeho roli v procesu buněčného dělení. Za tímto účelem jsme připravili kmen exprimující fúzní protein GFP-LocZ pod nativním promotorem. Analýza lokalizace GFP-LocZ v průběhu buněčného dělení, které jsme rozdělili na 6 fází (Fadda et al., 2007) odhalila jeho unikátní lokalizační vzor. V první fázi buněčného dělení, kdy mají jednotlivé buňky typický lancetovitý tvar, lokalizuje GFP-LocZ uprostřed buňky stejně tak jako ostatní proteiny buněčného dělení (Massidda et al., 2013). Již v druhé fázi buněčného dělení, kdy dochází k elongaci buňky, se GFP-LocZ rozděluje na dva kruhy, které putují od sebe navzájem a zároveň směrem ven ze středu buňky. Až v poslední šesté fázi, kdy dojde k rozdělení dceřiných buněk, GFP-LocZ opět lokalizuje ve středu buňky. Z tohoto pozorování se zdá, že protein LocZ migruje společně s povrchovou strukturou nazývanou ekvatoriální kruh, která se na buněčném povrchu vyskytuje ve stejném vzoru jako protein LocZ (Higgins a Shockman 1970;

Wheeler et al., 2011). O ekvatoriálním kruhu bylo uvažováno jako o jediné známé struktuře, která by mohla sloužit jako marker určující budoucí místo buněčného dělení u *S. pneumoniae* (Zapun et al., 2008; Monahan et al., 2014). Naši hypotézu podporuje měření ve studii Fleurie et al (2014), kdy vzdálenost mezi MapZ kruhy lineárně narůstá v závislosti na buněčné délce, zatímco vzdálenost mezi MapZ a buněčným pólem zůstává konstantní. MapZ je permanentně asociovaný s budoucím místem buněčného dělení a je mechanicky posouván, jak dochází k syntéze PG a tvorbě nového buněčného pólu dceřiné buňky, stejně tak jako ekvatoriální kruh. Podobně je tomu i u *Streptococcus mutans* (Li et al., 2018).

Velmi pozoruhodným morfologickým znakem kmene  $\Delta locZ$  je tvorba asymetricky rozdělených buněk. U buněk tohoto kmene pozorujeme chybné umístění dělicí přepážky, jejíž pozice je determinována umístěním Z kruhu (viz níže). Buněčná přepážka je velmi často uložena mimo buněčný střed a zároveň v jiném než kolmém úhlu na podélnou osu buňky. Na základě chybně umístěného septa vznikají buňky nepravidelného “bramborovitého“ tvaru s póly vychýlenými mimo dlouhou osu buňky (obr. 4-21). Syntéza PG je v buňkách, které postrádají LocZ, spojena s nesprávně umístěnou dělicí přepážkou. Toto pozorování podporuje tvrzení, že u *S. pneumoniae* je syntéza periferního a septálního PG soustavně spjata se Z-kruhem (Massidda et al., 2013). Nicméně samotná syntéza buněčné stěny není u mutantního kmene  $\Delta locZ$  významně narušena. Na základě těchto pozorování se pro vznik asymetricky rozdělených buněk nabízí jednoduchá mechanistická teorie. Vzhledem k tomu, že Z-kruh není uložen kolmo k dlouhé ose buňky, nemůže být zachována ani buněčná symetrie, přičemž biosyntéza PG není nikterak ovlivněna. Tuto teorii navíc podporuje zjištění, že delece *locZ* nemá vliv na obrat PG (Boersma et al., 2015).

Dalším významným znakem kmene  $\Delta locZ$  je tvorba minibuněk u *S. pneumoniae*. U kmene  $\Delta locZ$  se jich vyskytuje 5,5% v populaci. Téměř polovina minibuněk je anukleovaná, takže v nich nedošlo ke kompletní segregaci chromozomů (obr. 4-21). To naznačují i snímky z časosběrné fluorescenční mikroskopie, ve které jsou některé minibuňky schopné dalšího cyklu buněčného dělení a některé naopak ne. Tento jev by mohl být způsoben ztrátou genetické informace. Je zajímavé, že nikdy nepozorujeme anukleované buňky normální velikosti, které byly pozorovány u kmenů *S. pneumoniae*, které nesou mutace v proteinech účastnících se přímo segregace chromosomů, jako je ParB a SMC (Minnen et al., 2011; Kjos a Veening, 2014). To naznačuje, že v nepřítomnosti LocZ vznikají minibuňky spíše v důsledku špatného umístění septa

než narušením procesu rozdělování DNA do dceřiných buněk. Z výše uvedených dat vyplývá, že protein LocZ hraje roli v buněčném dělení a reguluje umístění Z-kruhu. V kompetitivní studii Fleurie et al. (2014) můžeme na mikroskopických snímcích kmene  $\Delta mapZ$  (Fleurie et al., 2014, Figure 1a) také pozorovat výskyt minibuněk, nicméně nejsou ve studii nikterak komentovány ani blíže popsány. Na druhou stranu ve výše zmíněné studii autoři pozorovali u 19% buněk z populace DNA zachycenou v uzavírající se dělicí přepážce.



**Obr. 4-21: Přehled morfologických a fenotypových deformit kmene  $\Delta locZ$ .**

WT: divoký kmen;  $\Delta locZ$ : mutantní kmen  $\Delta locZ$

Pro buněčné dělení každé bakterie je klíčové správné umístění Z-kruhu, který je složen z polymerních vláken proteinu FtsZ a ukotven prostřednictvím FtsA k membráně. U pneumokoků se Z-kruh tvoří vždy v ose kolmé na podélnou osu buňky. Nicméně mechanismus, který zajišťuje symetrické rozdělení nejen dceřiných buněk, ale i genetického materiálu během buněčného dělení, není u *S. pneumoniae* stále dostatečně objasněn. Ovoidní bakterie, jako je *S. pneumoniae*, ve svém genomu nekódují homology pro Min systém (Fadda et al., 2007; Rowlett a Margolin, 2015), ani pro chromozomální okluzi (Pinho et al., 2013; Adams et al., 2014), které patří mezi negativní regulátory vzniku Z-kruhu. Studie zabývající se buněčným dělením u jiných bakterií

než je *E. coli* nebo *B. subtilis* odhalují, že Min systém a chromozomální okluze nejsou tak konzervovanými regulačními mechanismy, jak se předpokládalo. U bakterie *Caulobacter crescentus* byl popsán negativní regulátor MipZ, homolog ParA proteinu (Thanbichler a Shapiro, 2006). U *Streptomyces coelicolor* byl popsán systém SsgA/B, který pozitivně ovlivňuje vznik FtsZ-kruhu (Willemse et al., 2011), a další pozitivní regulátor PomZ (homolog ParA) byl identifikován u bakterie *Myxococcus xanthus* (Treuner-Lange et al., 2013). Navíc mechanismus zahrnující chromosomální okluzi by se u *S. pneumoniae* nemusel vyskytovat vůbec, protože FtsZ lokalizuje nad nesegregovanými chromosomy, které se kompletně oddělují souběžně s konstrikcí Z-kruhu (Land et al., 2013). Jelikož mutantní kmen  $\Delta locZ$  vykazuje asymetrické dělení buněk, které by mohlo být způsobeno delokalizací FtsZ či FtsA, rozhodli jsme se pomocí časosběrné mikroskopie pozorovat buněčné dělení v kmenech exprimujících protein FtsZ nebo FtsA fúzovaný s fluorescenčním proteinem na genetickém pozadí  $\Delta locZ$  kmene. Časosběrná fluorescenční mikroskopie odhalila, že v nepřítomnosti proteinu LocZ sice dochází k polymerizaci FtsZ, tvorbě Z-kruhu a jeho asociaci s FtsA, ale lokalizace Z-kruhu je narušena. Je zřejmé, že hlavní příčinou asymetrického dělení buněk  $\Delta locZ$  kmene je špatné umístění Z-kruhů, které nejsou pouze posunuté od buněčného středu, ale jsou často náhodně nakloněny vzhledem k dlouhé i krátké ose buňky (obr. 4-21) a jsou tak příčinou chybného založení dělicí přepážky. Navzdory těmto defektům není polymerizace Z-kruhu obvykle ovlivněna a téměř většina buněk  $\Delta locZ$  kmene je schopna se rozdělit a následně i oddělit, jak by se dalo očekávat v případě, kdy je septum v buňce umístěno náhodně. V několika málo případech pozorujeme buňky, ve kterých Z-kruh tvoří aberantní podkovovitou strukturu. Tyto buňky nejsou schopné buněčného dělení a pouze zvětšují svůj objem (obr. 4-21). Buňky s aberantní ne kruhovou strukturou Z-kruhu byly pozorovány také v kompetitivní studii Fleurie et al. (2014), nicméně se ukázalo, že se jedná o syntetický fenotyp, který je způsoben kombinací deplece *mapZ* a fúze FtsZ s některými fluorescenčními epitopy (GFP, mCherry) (Boersma et al., 2015; Van Raaphorst et al., 2017). V našem případě by tedy mohlo jít o projev syntetického fenotypu z důvodu fúze FtsZ s CFP nebo nadprodukcí FtsZ.

Nepřítomnost proteinu LocZ negativně ovlivňuje časné proteiny buněčného dělení FtsZ a FtsA, které nejsou schopné lokalizovat v buněčném středu. Dá se předpokládat, že i lokalizace dalších proteinů buněčného dělení, jako je StkP či DivIVA, které do septa přicházejí později než

FtsZ či FtsA a jsou na těchto proteinech závislé (Fadda et al., 2007; Beilharz et al., 2012; Perez et al., 2019), bude u kmene  $\Delta locZ$  taktéž ovlivněna.

Fluorescenční mikroskopie ukázala, že proteiny StkP a DivIVA jsou v buňkách mutantního kmene  $\Delta locZ$  taktéž lokalizovány v atypicky založených Z-kruzích, což potvrzuje, že jejich lokalizace je přímo či nepřímo závislá na proteinu FtsZ. To může být obzvláště důležité pro protein DivIVA, který lokalizuje nejen v septu, ale i na buněčných pólech (Fadda et al., 2007). Navíc v publikaci Lenarcic et al. (2009) uvádějí, že DivIVA pravděpodobně nejprve cílí do buněčné přepážky a až poté do buněčných pólů v důsledku interakce s konkávně zaoblenou membránou. V buňkách mutantního kmene  $\Delta locZ$  také pozorujeme DivIVA, který lokalizuje ve vychýlených buněčných pólech. Nicméně v některých deformovaných často kulatějších buňkách pozorujeme delokalizaci DivIVA, který tvoří klastry v náhodných pozicích pravděpodobně proto, že buněčné póly nejsou správně tvarovány.

LocZ má unikátní lokalizační vzor, který naznačuje, že by mohl být velmi časným proteinem buněčného dělení a regulovat prostorové umístění Z-kruhu. Z tohoto důvodu jsme analyzovali dynamiku lokalizace LocZ ve srovnání s proteiny buněčného dělení FtsZ a FtsA, které byly časově popsány jako první proteiny lokalizující v budoucí buněčné přepážce (Morlot et al., 2003; Lara et al., 2005). Vlastní analýzu jsme provedli v kmenech, které dovolují simultánní expresi a vizualizaci LocZ a FtsZ nebo FtsA.

Lokalizaci koexprimovaných fúzních proteinů jsme pozorovali v šesti stádiích buněčného dělení. V první fázi buněčného dělení, kdy jsou dceřiné buňky zcela odděleny, kolokalizují LocZ a FtsZ, resp. FtsA uprostřed buňky. Ve druhé a třetí fázi buněčného dělení, které je typické převážně pro elongaci buňky, se LocZ dělí na dva kruhy, jež se od sebe navzájem a zároveň z buněčného středu oddalují, zatímco FtsZ i FtsA se nachází uprostřed buňky ve formě jednoho kruhu. Ve čtvrté a páté fázi buněčného dělení proteiny FtsZ a FtsA lokalizují ve středu buňky, kde se účastní konstrikce septa, a zároveň pozorujeme jejich relokalizaci do míst budoucího buněčného dělení, která jsou již obsazena proteinem LocZ. V poslední šesté fázi buněčného dělení, ve které dochází k ukončení buněčného dělení, opět proteiny LocZ a FtsZ resp. FtsA zcela kolokalizují ve středu každé dceřiné buňky. Na základě těchto dat se domníváme, že protein LocZ slouží jako molekulární marker, který je asociovaný s ekvatoriálním kruhem v geometrickém středu buňky a determinuje místo sestavení Z-kruhu, a tím určí místo budoucího buněčného dělení.

Na rozdíl od našich experimentů byl ve studiích provedených u bakterií *S. pneumoniae* (Fleurie et al., 2014) a *S. mutans* (Li et al., 2018) pozorován ještě třetí kruh MapZ. Ten vzniká v buněčné přepážce ve fázi buněčného dělení, kdy se dva kruhy MapZ již od sebe navzájem a od buněčného středu vzdalují a FtsZ lokalizuje pouze v buněčném středu. Zde spolu proteiny MapZ a FtsZ kolokalizují a zatímco dochází k relokaci FtsZ do budoucích míst buněčného dělení, třetí kruh MapZ a FtsZ zůstává v septu až do jeho uzavření (Fleurie et al., 2014; Li et al., 2018). Ve studii Fleurie et al. (2014) vyslovili na základě tohoto pozorování a výše diskutovaného výskytu DNA v uzavírajícím se septu hypotézu, že by MapZ mohl mít dvě funkce. Kromě regulace výběru místa dělení by se mohl účastnit i uzavírání septa společně s FtsZ. Na druhou stranu v recentní publikaci Van Raaphorst et al. (2017), stejně jako v nedávné studii Perez et al. (2019), popisují lokalizaci MapZ pouze v nově vytvořeném septu nebo ve formě dvou od sebe vzdalujících se kruhů. Nebyl zde pozorován třetí kruh MapZ, pouze reziduální zbytek proteinu MapZ mezi nově vzniklými ekvatoriálními kruhy, který zde přetrvává do doby, než FtsZ společně se stabilizačními proteiny FtsA a EzrA zcela neodejde ze septa. Zdá se, že výskyt třetího kruhu MapZ je dán experimentálním uspořádáním a může být tedy artefaktem, který vzniká v důsledku fúze s fluorescenčním proteinem nebo nadprodukce MapZ.

Jak se ukazuje, neměnnou proměnou všech studií zabývajících se funkcí LocZ/MapZ je fakt, že v jeho nepřítomnosti je Z-kruh zakládán asymetricky, čímž dochází k asymetrickému dělení buněk, a to nejen u *S. pneumoniae*, ale i u *S. mutans* (Fleurie et al., 2014; Boersma et al., 2015; Van Raaphorst et al., 2017; Li et al., 2018; Perez et al., 2019). Otázkou zůstává, jakou přesně funkci zastává LocZ v rámci buněčného dělení. Ve studii van Raaphorst et al. (2017) prokázali, že počátek replikace *oriC* zastává klíčovou roli ve výběru budoucího místa dělení, do kterého přichází ještě dříve než MapZ, který zodpovídá pouze za správný úhel sklonu Z-kruhu, tedy je prostorovým regulátorem buněčného dělení. Nicméně v této studii pracují s předpokladem, že FtsZ v rámci buněčného dělení lokalizuje nejprve pouze v septu a až v pozdější fázi buněčného dělení, kdy je již patrná konstriktce septa, relokazuje do budoucích míst buněčného dělení.

Recentní studie pomocí metody TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) odhalily, že FtsZ nejen u *S. pneumoniae*, ale i u *S. mutans* tvoří, podobně jako u eukaryot, vlákna a svazky, které jsou v neustálém pohybu, na rozdíl od MapZ, který tvoří rigidní kruhovitou strukturu (Li et al., 2018; Perez et al., 2019). U *S. pneumoniae* je transport FtsZ

z buněčného středu do ekvatoriálů kontinuálním procesem v průběhu celého buněčného cyklu. V časné fázi buněčného dělení se vlákna a svazky FtsZ pohybují paralelně s maturovaným septem. V době mezi pohybem MapZ z buněčného středu a pozorovatelnou relokací FtsZ do ekvatoriálů, kde se MapZ nachází, se nascentní vlákna a svazky FtsZ pohybují směrem od buněčného středu ven a houstnou. Jakmile dosáhnou budoucích míst buněčného dělení na ekvatoriálech, zbývající FtsZ po nich do těchto míst migruje. Společně s FtsZ se vždy pohybují i stabilizační proteiny Z-kruhu FtsA a EzrA. Navíc bylo pozorováno, že nascentní kruhy FtsZ a EzrA se překrývají s MapZ kruhy v časné fázi buněčného dělení. Také bylo zjištěno, že v buňkách kmene *ΔmapZ* není EzrA schopen vytvořit kruhovitou strukturu a nesouvisle proudí mezi dceřinými buňkami, což má za následek vznik Z-kruhu v nesprávném úhlu. Tento mechanismus vysvětluje, proč není delece *mapZ* pro *S. pneumoniae* letální (Perez et al., 2019). Na základě těchto dat byla v publikaci Perez et al. (2019) vyslovena hypotéza, že MapZ plní funkci průvodce pro nascentní FtsZ/FtsA/EzrA kruhy, které míří do budoucích míst buněčného dělení v místech ekvatoriálních kruhů dceřiných buněk.

Na základě všech výše zmíněných dat lze shrnout, že LocZ/MapZ je nejen prostorovým regulátorem buněčného dělení, ale je i pozitivním regulátorem Z-kruhu. Ačkoliv pravděpodobně existují i další, zatím neznámé regulační mechanismy ovlivňující výběr místa dělení u *S. pneumoniae*, protože v nepřítomnosti LocZ/MapZ jsou buňky *S. pneumoniae* stále životaschopné a nemalé procento z nich se stále dělí symetricky.

Avšak v další recentní publikaci Feng et al. (2019) prokázali, že N-terminální doména MapZ pozitivně ovlivňuje tvorbu jednořetězcových vláken FtsZ, a naopak brání tvorbě svazků FtsZ. Svazkování FtsZ pravděpodobně zabraňuje kompetitivní vazbou s hlavní doménou FtsZ. Na základě svých výsledků navrhli model, ve kterém MapZ není ani pozitivním, ani negativním regulátorem, ale časoprostorovým regulátorem buněčného dělení, který na jedné straně řídí přesné umístění Z-kruhu a jako spoušť usnadňuje tvorbu jednořetězcových vláken FtsZ. Na druhé straně svou interakcí s hlavní doménou FtsZ, která brání vzniku svazků FtsZ, dynamicky ovlivňuje sestavení Z-kruhu, což je důležité pro správné načasování dělení buněk.

Proteinkinasa StkP je globálním regulátorem buněčného dělení u *S. pneumoniae* (Beilharz et al., 2012; Fleurie et al., 2012). Protein LocZ patří mezi substráty StkP (Nováková et al., 2010) a bylo prokázáno *in vitro* i *in vivo*, že je fosforylován na pozicích T67 a T78 (Sun et al., 2010; Štekerová 2012; Fleurie et al., 2014). V diplomové práci jsme na základě pozorování funkční

fosfoablativní formy proteinu LocZ-T67A/T78A, která byla schopná komplementovat mutantní fenotyp kmene  $\Delta locZ$ , vyslovili hypotézu, že by fosforylace mohla působit negativně na protein LocZ (Štekerová 2012).

Abychom určili význam fosforylace LocZ na jeho funkci, charakterizovali jsme morfologické znaky tří komplementačních kmenů. Každý z těchto kmenů exprimuje jednu variantu proteinu LocZ s histidinovou kotvou pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru, a to divokou formu (His6-LocZ), fosfoablativní (His6-LocZ-T67A/T78A) a fosfomimetickou (His6-LocZ-T67E/T78E). K našemu překvapení všechny tři formy proteinu LocZ byly schopné komplementovat mutaci a vykazovaly morfologii divokého kmene. Abychom ověřili, že histidinová kotva či umístění na chromosomu neovlivňuje funkci proteinu LocZ, připravili jsme kmeny exprimující fosfoablativní a fosfomimetickou alelu genu *locZ* pod kontrolou nativního promotoru. Nicméně i oba tyto kmeny vykazují morfologii srovnatelnou s divokým kmenem. Na základě všech těchto pozorování se domníváme, že by fosforylace proteinu LocZ nemusela mít zásadní vliv na jeho funkci za standardních laboratorních podmínek. Na druhou stranu je zarážející, že v kompetitivní studii Fleurie et al. (2014) u kmenů exprimujících fosfomimetickou a fosfoablativní formu proteinu MapZ byl pozorován mutantní fenotyp (deformity buněčného tvaru, snížená životaschopnost buněk, výskyt aberantní struktury FtsZ), navzdory tomu, že FtsZ kruh je většinou v buňkách správně umístěn. Na základě těchto pozorování autoři vyslovili hypotézu, že obě formy proteinu a pravděpodobně hlavně rovnováha mezi nimi je zodpovědná za kontrolu tvorby FtsZ kruhu, jeho stabilitu a konstrikci, ale pravděpodobně nemá vliv na pozici FtsZ kruhu.

Ačkoliv jsme nedokázali objasnit význam fosforylace proteinu LocZ, i přesto nás zajímalo, v jaké fázi buněčného dělení se proteinkinasa StkP setkává se svým substrátem, protože protein LocZ je velmi časným proteinem buněčného dělení, zatímco StkP patří mezi pozdní proteiny buněčného dělení (Beilharz et al., 2012). Vlastní analýzu jsme provedli v kmeni, který dovoluje simultánní expresi a vizualizaci fluorescenčně značených proteinů RFP-LocZ a GFP-StkP.

Lokalizaci koexprimovaných fúzních proteinů jsme pozorovali v šesti stádiích buněčného dělení. RFP-LocZ lokalizuje v buněčném středu pouze v první a poslední fázi buněčného dělení, zatímco GFP-StkP lokalizuje uprostřed buňky společně se Z-kruhem až do uzavření dělicí přepážky a do míst ekvatoriálních kruhů relokalizuje až v poslední šesté fázi buněčného dělení,



což je srovnatelné s pozorováním lokalizace StkP v publikaci Beilharz et al. (2012). Z našeho pozorování vyplývá, že pouze v první a šesté fázi buněčného dělení, tedy ve fázích po a před vlastním buněčným dělením, je pravděpodobně substrát LocZ fosforylován proteinkinasou StkP. Jeho fosforylace by tedy mohla být signálem pro opuštění středu buňky. V kompetitivní studii Fleurie et al. (2014) navrhuji, že k cyklické fosforylaci a defosforylaci MapZ by mohlo docházet ve středu buňky ve fázi, kdy se MapZ setkává jak s proteinkinasou StkP, tak i proteinfosfatasou PhpP, která ho defosforyluje. Autoři také navrhuji, že by fosforylace MapZ mohla nepřímo ovlivňovat cytokinesi regulaci dalších proteinů účastnících se buněčného dělení.

Deplece *stkP*, jejímž substrátem LocZ je, má negativní vliv na růstové schopnosti *S. pneumoniae*, jehož doba zdvojení je výrazně prodloužena a ve stacionární fázi předčasně lyzuje. S oxidativním, osmotickým a pH stresem se kmen  $\Delta$ *stkP* vyrovnává obtížněji než divoký kmen a na teplotní stres reaguje téměř úplným zastavením růstu (Sasková et al., 2007).

Kmen  $\Delta$ *locZ* má při statické kultivaci v tekutém médiu při 37°C prodlouženou lag fázi v porovnání s divokým kmenem. Další fáze buněčného růstu, ani doba zdvojení nejsou nijak ovlivněny a jsou srovnatelné s divokým kmenem. Tyto výsledky jsou ve shodě s výsledky diplomové práce (Štekerová, 2012). Nicméně v publikaci Fleurie et al. (2014) u delečního kmene  $\Delta$ *mapZ* pozorují prodloužení doby zdvojení o 48% a snížení životaschopnosti buněk o 30%. Životaschopnost našeho delečního kmene nebyla ovlivněna (data nejsou prezentována). Je možné, že odlišné růstové vlastnosti kmene  $\Delta$ *locZ* a  $\Delta$ *mapZ* by mohly být ovlivněny genetickým pozadím divokého kmene, který byl k jejich přípravě použit. V případě deplece některých proteinů účastnících se buněčného dělení u *S. pneumoniae* byl pozorován různý fenotyp, a to v závislosti nejen na genetickém pozadí použitého kmene, ale i na použité metodice inaktivace genu či na kultivačních podmínkách (Massidda et al., 2013). Protein LocZ patří do této skupiny proteinů z hlediska fyziologického, avšak z hlediska morfologického nikoli. Ani genetické pozadí ani různé metody přípravy mutantního kmene neovlivnily jeho morfologii, a to jak v naší studii u kmenů Rx1 a R6 bez pouzdra i u opouzdrěného kmene D39, tak i u jiných kmenů použitých v rozličných studiích (Fleurie et al., 2014; Boersma et al., 2015; Van Raaphorst et al., 2017; Perez et al., 2018). Dokonce u *S. mutans* se kmen s delecí *locZ* projevuje stejnými morfologickými defekty (Li et al., 2018).

Následně jsme studovali vliv stresových podmínek (osmotický, pH, teplotní, oxidativní) na růst kmene  $\Delta$ *locZ* v porovnání s divokým kmenem. Výsledky pro osmotický, pH a teplotní

stres jsou srovnatelné s výsledky diplomové práce. Ze studovaných stresů je mutantní kmen citlivý k teplotnímu stresu, při kterém dorůstá nižší optické denzity než divoký kmen. Dále je citlivý k působení oxidativního stresu, kdy při působení 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na buňky časné exponenciální fáze přežívá o 50 % méně buněk ve srovnání s divokým kmenem. V případě oxidativního stresu bylo procento přeživších buněk mutantního a divokého kmene popsané v diplomové práci stejné a tedy závěr byl, že kmen  $\Delta locZ$  není k působení oxidativního stresu citlivý (Štekerová, 2012). Důvodem rozdílných výsledků by mohla být úprava metodiky, kdy jsme nově vystavili působení H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> buňky časné exponenciální fáze (OD<sub>600</sub> ~ 0,2) namísto buněk kultivovaných do OD<sub>600</sub> ~ 0,4. Z průběhu růstové křivky divokého i mutantního kmene je patrné, že kultura při OD<sub>600</sub> ~ 0,4 je kulturou, která se blíží k přechodu do stacionární fáze. Buňky ve stacionární fázi mají aktivovaný systém obecné stresové odpovědi, kdy jsou přepisovány geny vyvolávající rezistenci k různým druhům stresů, mezi nimi i k oxidativnímu. Závěrem lze shrnout, že absence *locZ* ovlivňuje odpověď *S. pneumoniae* na teplotní a oxidativní stres, nicméně neovlivňuje schopnost buňky reagovat na stresové podmínky v takovém rozsahu jako samotná StkP.

Protein *LocZ* je membránový protein složený z N-terminální intracelulární domény, transmembránové domény a C-terminální extracelulární domény, a tedy dalším krokem k objasnění funkce proteinu *LocZ* byla analýza funkce jednotlivých domén. K tomuto účelu jsme připravili tři kmeny exprimující zkrácené varianty proteinu *LocZ* fúzované s GFP pod kontrolou nativního promotoru, abychom mohli sledovat nejen vliv delece určité části proteinu na morfologii buněk, ale i vliv na lokalizaci proteinu.

První kmen exprimuje protein *LocZ* postrádající v C-terminální extracelulární doméně posledních 95 AMK, které jsou mezi streptokoky konzervované. Další kmen produkuje protein bez celé C-terminální extracelulární domény a poslední kmen exprimuje protein bez N-terminální cytoplasmatické domény, ve které se nacházejí fosfoakceptory T67 a T78. Delece jakékoli námi zvolené části proteinu způsobuje mutantní fenotyp typický pro deleci celého proteinu *LocZ*. Stejně tak v dalších studiích (Fleurie et al., 2014; Manuse et al., 2016) pozorovali mutantní fenotyp v případě delece N- i C-terminální domény či jimi vybrané části CTD proteinu *MapZ*. Jak by se dalo předpokládat, i u *S. mutans* je pozorován mutantní fenotyp v případě delece NTD i CTD v proteinu *MapZ* (Li et al., 2018).

Z našich pozorování vyplynulo, že delece N-terminální domény proteinu LocZ nemá vliv na jeho lokalizaci. Protein GFP-LocZ- $\Delta$ NTD je stále schopen lokalizovat pouze v dělicí přepážce, ačkoliv buňky vykazují mutantní fenotyp. Toto pozorování naznačuje, že NTD je důležitá pro interakci s dalšími proteiny buněčného dělení, pravděpodobně hlavně s FtsZ, což naznačují předchozí výsledky. V publikaci Fleurie et al (2014) prokázali, že skutečně prvních 41 AMK v NTD proteinu MapZ je esenciálních pro interakci s FtsZ a jejich delece vede k delokalizaci FtsZ, buňky vykazují aberantní morfologii, dochází k asymetrickému dělení a lyzi buněk. Překvapující je, že u *S. mutans* protein MapZ z těchto 41 AMK prvních 25 zcela postrádá a delece celé NTD proteinu má za následek jeho delokalizaci do celé membrány (Li et al., 2018) zatímco u *S. pneumoniae* je zachována lokalizace v buněčném středu (Fleurie et al., 2014, naše data). Za tuto odlišnost by mohla být odpovědná evoluční vzdálenost mezi *S. pneumoniae* a *S. mutans*, která nebyla předpokládána (Li et al., 2018). Avšak v nedávné studii Feng et al. (2019) *in vitro* prokázali, že za interakci s FtsZ je zodpovědných 9 AMK obsažených v N-terminální doméně MapZ (N7, R8, Q14, V38, V76, V92, S95, L126, E137) a nikoli prvních 41 AMK (Fleurie et al., 2014).

Delece posledních 95 AMK nacházejících se v CTD proteinu LocZ negativně ovlivnilo nejen morfologii buněk, ale i lokalizaci proteinu GFP-LocZ- $\Delta$ CTD<sub>95AMK</sub>, který je sice stále schopen lokalizovat v septu, ale také se nachází v celé membráně. Delece celé CTD proteinu LocZ způsobuje jeho úplnou delokalizaci. GFP-LocZ- $\Delta$ CTD se vyskytuje hlavně v cytoplazmě, u některých buněk pozorujeme jeho lokalizaci i v buněčném středu. Z těchto dat usuzujeme, že C-terminální doména proteinu LocZ zodpovídá za jeho správnou lokalizaci. Tuto teorii podporuje zjištění, že CTD proteinu MapZ je zodpovědná za vazbu s peptidoglykanem (PG) a inhibice syntézy PG pomocí vankomycinu způsobuje delokalizaci MapZ (Fleurie et al., 2014).

V recentní publikaci Manuse et al. (2016) pomocí metody NMR charakterizovali strukturu CTD proteinu MapZ, která se skládá ze dvou na sobě nezávislých subdomén, MapZextra1 a MapZextra2, spojených na serin bohatým linkerem SRL (Serine Rich Linker). Dále určili, že za vazbu PG s proteinem MapZ zodpovídá 7 aminokyselin nacházejících se v subdoméně MapZextra2 (AMK 355-464), které se nacházejí v námi určené konzervované doméně složené z posledních 95 AMK (AMK 369-464 proteinu LocZ). Záměna těchto sedmi aminokyselin výrazně redukuje schopnost vazby MapZ s PG. Mutovaný protein není schopen lokalizovat v místě ekvatoriálních kruhů, je delokalizován v membráně, ačkoliv je stále schopen

lokalizovat v buněčném středu, stejně jako protein GFP-LocZ- $\Delta$ CTD<sub>95AMK</sub>. Stejný delokalizační efekt způsobuje delece celé MapZextra2 subdomény nebo delece MapZextra1 subdomény se SRL. Dalšími experimenty prokázali, že subdoména MapZextra1 slouží jako stabilní podstavec, který napomáhá subdoméně MapZextra2 se správně umístit na buněčném povrchu a vázat PG, čemuž pravděpodobně napomáhá i SRL. O serin bohaté oblasti (SRL) nacházející se v CTD proteinu LocZ jsme se již zmiňovali v diplomové práci Štekerová (2012), nicméně jsme se touto oblastí dále nezabývali. Bylo zjištěno, že SRL se obecně vyskytují v modulárních proteinech eukaryot. U prokaryot je výskyt proteinů se SRL vzácný. Zatím byly identifikovány u bakterií *M. degradans* a *P. fluorescenc* jako součást karbohydráz, ve kterých SRL odděluje katalytickou doménu nebo karbohydrát vázající doménu od jiné vazebné domény. SRL mají flexibilní charakter a pravděpodobně zvyšují přístupnost substrátu k proteinu (Howard et al., 2004) a je tedy pravděpodobné, že u *S. pneumoniae* SRL proteinu LocZ/MapZ napomáhá vazbě s PG.

Na základě těchto dat v publikaci Manuse et al. (2016) navrhli hypotézu, že subdoména MapZextra2 proteinu MapZ u *S. pneumoniae* váže peptidoglykan tvořený v iniciační fázi buněčného dělení, jehož složení či architektura by mohla být odlišná, jako je tomu u *E. coli* (de Pedro a Schwarz, 1981). Tomu by mohl odpovídat ekvatoriální kruh, s nímž MapZ během buněčného dělení putuje a který je složen z tlustších pásů PG neustále lokalizovaných ve středu buňky v místě budoucího buněčného dělení (Zapun et al., 2008; Monahan et al., 2014).

Přesný mechanismus, jakým se protein LocZ/MapZ dostává do budoucího místa buněčného dělení, stále nebyl zcela objasněn, stejně tak jako význam fosforylace. Na druhou stranu můžeme shrnout, že podle výsledků získaných různými skupinami protein LocZ/MapZ není ani pozitivním, ani negativním regulátorem, ale spíše časoprostorovým regulátorem buněčného dělení *S. pneumoniae* a řídí jak přesné umístění, tak načasování polymerizace FtsZ (Feng et al., 2019). Zároveň slouží jako průvodce pro protein FtsZ, FtsA a stabilizační protein EzrA (Perez et al., 2019). Podobně je tomu i u *S. mutans*. Ačkoliv jsou *S. pneumoniae* a *S. mutans* evolučně vzdáleni a smMapZ vykazuje se spMapZ pouze 37% sekvenční identity, přesto zastává v rámci buněčného dělení stejnou funkci (Li et al., 2018). Je tedy otázkou, zda protein LocZ/MapZ zastupuje některý ze systémů, jako je chromozomální okluze či Min systém či současně oba dva, které *S. pneumoniae* postrádá. Zároveň by bylo zajímavé ověřit, zda ve všech bakteriích, u kterých se nalézá homolog proteinu LocZ/MapZ, vykonává stejnou funkci.

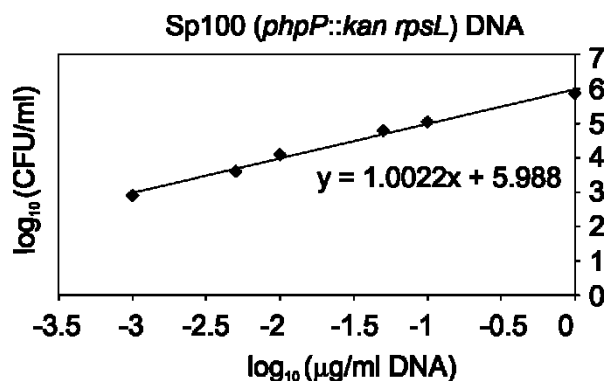
## 4.2 Projekt: Esencialita a funkce Ser/Thr proteinfosfatasy PhpP u *Streptococcus pneumoniae*

Jedním ze způsobů přenosu signálu v buňce je reverzibilní fosforylace proteinů, zajišťovaná Ser/Thr proteinkinasami a proteinfosfatasami. Jak již bylo několikrát v této práci zmíněno, *S. pneumoniae* nese na chromosomu pouze jedinou kopii genu pro Ser/Thr proteinkinazu StkP, která se účastní mnohých dějů v buňce či je, jako je virulence, stresová odpověď, buněčné dělení a syntéza buněčné stěny. StkP tvoří funkční pár s mangan dependentní proteinfosfatasou PP2C typu nazvanou PhpP, která mimo jiné defosforyluje i samotnou StkP (Nováková et al., 2005). První výzkumy ukazovaly, že *phpP* je esenciální pro životaschopnost neopouzdrěných kmenů *S. pneumoniae* Rx1 a R800, (Osaki et al., 2009; Fleurie et al., 2012). A také v další globální studii Thanassi et al. (2002) byl gen pro *phpP* i pro *stkP* uveden jako esenciální. Nicméně ve studii Agarwal et al. (2012) byly vytvořeny životaschopné deleční mutanty opouzdrěných kmenů D39 a 6A a bylo tedy prokázáno, že v těchto kmenech není *phpP* esenciálním genem. Navíc charakterizace mutant v uvedených kmenech odhalila kmenově specifickou roli PhpP v biosyntéze buněčné stěny, adhezenci a tvorbě biofilmu. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli připravit kmen  $\Delta phpP$  v námi používaném kmeni Rx1 a tak ověřit, zda je v tomto kmeni *phpP* esenciální či nikoli a případně mutantní kmen dále charakterizovat.

### 4.2.1 Esencialita *phpP* v kmeni *S. pneumoniae* Rx1

Kmen  $\Delta phpP$  nazvaný Sp113 byl připraven pomocí Janus kazety, která funguje na principu dvoukrokové strategie negativní selekce (Jana Goldová; popis přípravy kmene je uveden v článku Ulrych et al, 2016). Abychom vyloučili možnost, že připravený  $\Delta phpP$  kmen je životaschopný z důvodu vzniku extragenové supresorové mutace, provedli jsme test transformační kinetiky (Kent a Hotchkiss, 1964; Piotrowski et al., 2009). Test spočíval v transformaci divokého kmene Sp1 genomovou DNA kmene Sp100, ve kterém je *phpP* zaměněna za tzv. Janus kazetu (*phpP::kan rpsL*). V tomto testu se sleduje lineární závislost počtu životaschopných transformantů na koncentraci genomové DNA vnesených v dekadickém logaritmu. Pokud je konstanta v rovnici regrese rovna jedné, nedochází při transformaci ke vzniku supresorové mutace. V našem případě, kdy jsme použili genomovou DNA kmene Sp100 k záměně *phpP* za Janus kazetu, byl koeficient v rovnici regrese roven 1,0022, čímž jsme

vyloučili vznik supresorové mutace při přípravě kmene Sp113 (obr. 4-22). Přípravou životaschopného delečního kmene Sp113 a ověřením, že při jeho přípravě nedochází k supresorovým mutacím, jsme potvrdili, že *phpP* není v kmeni Rx1 esenciálním genem.



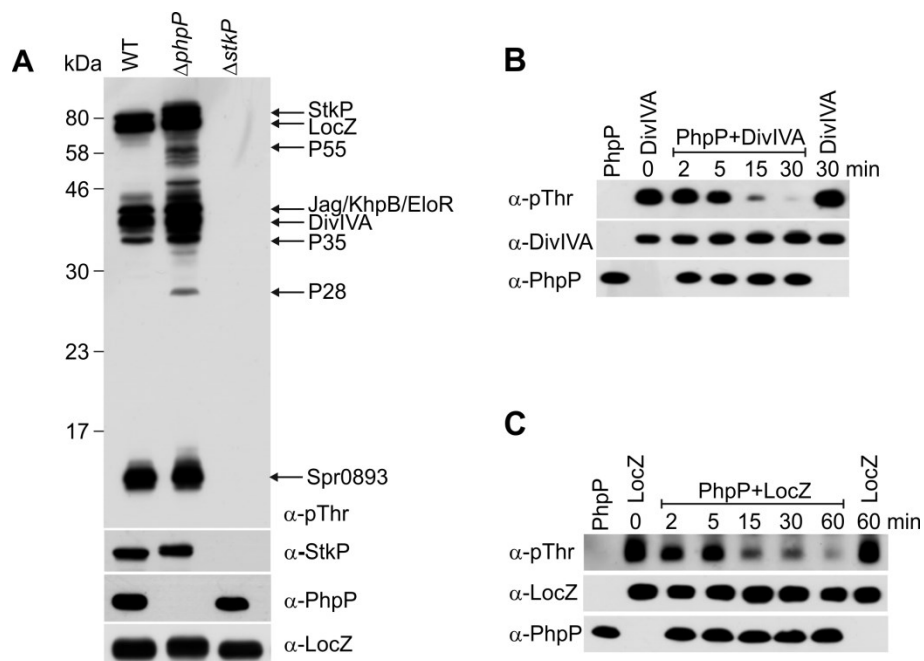
**Obr. 4-22: Graf transformační kinetiky:**

Divoký kmen Sp1 byl transformován genomovou DNA kmene Sp100, ve kterém je *phpP* zaměněn za Janus kazetu (*phpP::kan rpsL*). V grafu je vynesena závislost počtu získaných kanamycin rezistentních transformantů na koncentraci genomové DNA v dekadickém logaritmu. Tato závislost je lineární a sledovaný koeficient v rovnici regrese by měl být roven 1 ( $y = ax + b$ ;  $a =$  sledovaný koeficient).

#### 4.2.2 PhpP katalyzuje defosforylaci substrátů StkP

PhpP tvoří funkční pár se Ser/Thr proteinkinásou StkP, kterou defosforyluje (Nováková et al., 2005). Imunodetekcí proteinů membránové frakce a použitím specifických protilátek proti PhpP ( $\alpha$ -PhpP) a StkP ( $\alpha$ -StkP) jsme ověřili, že gen *phpP* je v kmeni Sp113 deletován ( $\Delta phpP$ ), zatímco exprese StkP v tomto kmeni není nikterak ovlivněna a je srovnatelná s expresí StkP v divokém kmeni Sp1 (obr. 4-23A). U *S. pneumoniae* je za fosforylaci proteinů na threoninu (Thr) zodpovědná hlavně StkP. Mezi její substráty patří převážně membránové či membránově asociované proteiny (Nováková et al., 2010). Jak bylo již dříve publikováno, v  $\Delta stkP$  kmeni (Sp10) nejsou specifickými protilátkami detekovatelné proteiny fosforylované na threoninu (obr. 4-23A). Za účelem zhodnocení úrovně fosforylace proteinů v kmeni Sp113 ( $\Delta phpP$ ) jsme provedli imunodetekci membránové frakce s použitím protilátky proti pThr ( $\alpha$ -pThr). Analýza ukázala zvýšenou úroveň fosforylace proteinů v kmeni Sp113 v porovnání s fosforylací v divokém kmeni Sp1. Na obr. 4-23A můžeme vidět, že mezi hyperfosforylovanými proteiny se nacházejí hlavně substráty StkP (LocZ, DivIVA, Jag/KhpB/EloR) i samotná StkP. Tato data naznačují, že PhpP negativně reguluje fosforylaci StkP i jejích substrátů.

Abychom dokázali, že PhpP přímo defosforyluje substráty StkP, provedli jsme defosforylační reakci *in vitro*. Nejprve jsme připravili bakteriální kmeny Sp188 a Sp174 exprimující známé substráty StkP, LocZ (Sp188) (příprava podrobně popsána v kapitole 3.10, Materiál a metody) a DivIVA (Sp174) (příprava kmene je popsána v článku Ulrych et al., 2016) fúzované s flag-kotvou. Z celkových lyzátů jsme pomocí flag-kotvy imunoprecipitovali fosforylované proteiny Flag-LocZ a DivIVA-Flag. Purifikované proteiny jsme inkubovali společně s rekombinantní His-PhpP, jak je popsáno v kapitole 3.6 (Materiál a metody), a defosforylaci proteinů jsme sledovali pomocí imunodetekce s použitím protilátky proti pThr ( $\alpha$ -pThr). Jak můžeme vidět na obrázku 4-23 B a C, fosforylace DivIVA a LocZ v čase klesá, což demonstruje, že PhpP přímo katalyzuje defosforylaci obou substrátů.



**Obr. 4-23: PhpP reguluje fosforylaci StkP a jejích substrátů:**

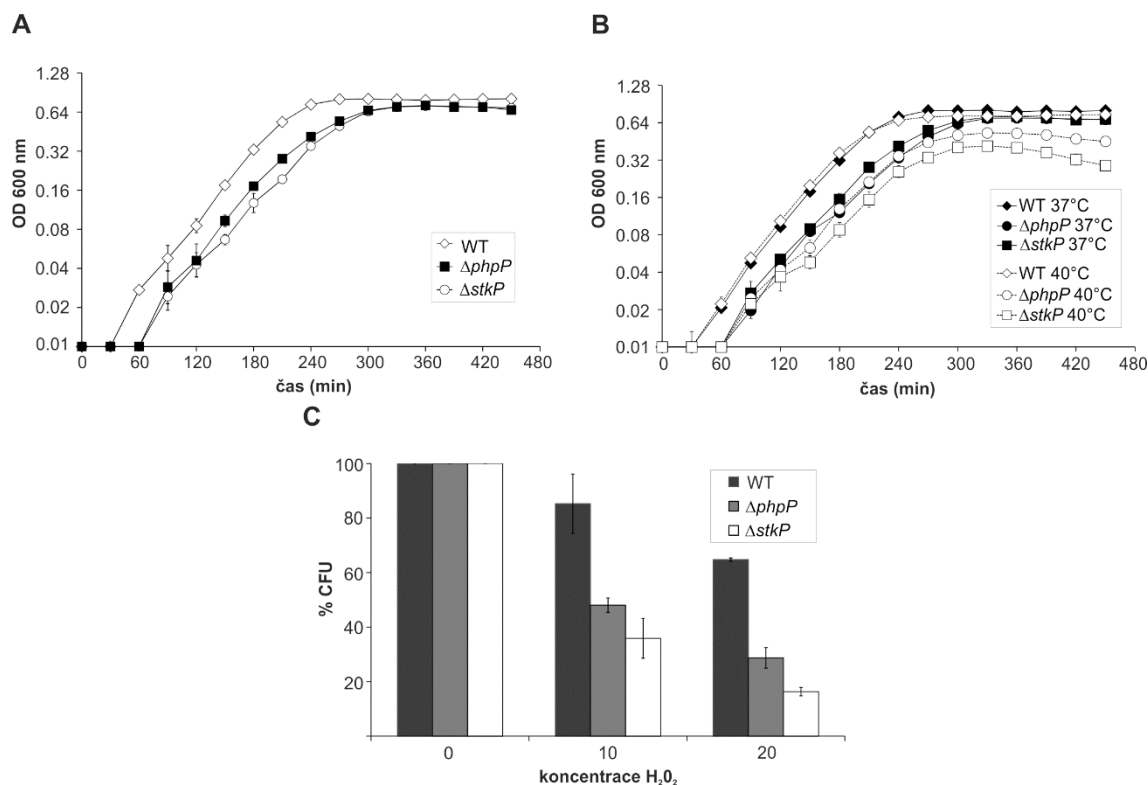
**A/ Fosforylační profil mutantního kmene  $\Delta$ phpP:** Na SDS-PAGE bylo naneseno 30  $\mu$ g proteinů izolovaných z membránové frakce divokého kmene WT (Sp1), kmene  $\Delta$ phpP (Sp113) a  $\Delta$ stkP (Sp10) a fosforylované proteiny byly detekovány pomocí protilátky proti fosfothreoninu ( $\alpha$ -pThr). Množství proteinů PhpP a StkP bylo detekováno pomocí specifických protilátek proti PhpP ( $\alpha$ -PhpP) a proti StkP ( $\alpha$ -StkP). Imunodetekce membránového proteinu LocZ ( $\alpha$ -LocZ) sloužila jako kontrola. Jednotlivé šipky označují pozici StkP a její známé (LocZ, Jag/KhpB/EloR, DivIVA, Spr0893) a neznámé (P28, P35, P55) substráty (Původní data: Jana Goldová, Aleš Ulrych). **PhpP defosforyluje DivIVA (B) a LocZ (C):** Purifikované proteiny DivIVA-Flag a Flag-LocZ byly inkubovány s His-PhpP *in vitro* a jednotlivé reakce byly v daných časových intervalech zastaveny. Tyto vzorky byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a imunodetekcí s  $\alpha$ -pThr protilátkou byla vizualizována defosforylace jednotlivých proteinů v čase. PhpP, LocZ a DivIVA byly detekovány použitím specifických protilátek, jak je popsáno výše. Abychom vyloučili

spontánní úbytek fosforylace proteinů, připravili jsme pro každý protein reakci bez přidavku His-PhpP a tuto reakci zastavili po 30 min v případě DivIVA-Flag a po 60 min u Flag-LocZ.

#### 4.2.3 Mutantní kmen $\Delta phpP$ je citlivý k působení teplotního a oxidativního stresu

Protože delece *stkP* u *S. pneumoniae* negativně ovlivňuje růstové schopnosti a citlivost k působení různých stresů (Sasková et al., 2007), rozhodli jsme se analyzovat růstové schopnosti za různých enviromentálních podmínek i u mutantního kmene  $\Delta phpP$  (Sp113). Nejprve jsme sledovali růst buněk kmene  $\Delta phpP$  v tekutém médiu TSB. Z obrázku 4-24A je patrné, že mutantní kmen  $\Delta phpP$  má oproti divokému kmeni delší lag fázi a ve stacionární fázi dosahuje nižších optických denzit obdobně jako mutantní kmen  $\Delta stkP$ . Navíc doba zdvojení u kmene  $\Delta phpP$  je prodloužena (38 min) v porovnání s divokým kmenem (31 min). Dále jsme zkoumali růstové vlastnosti kmene  $\Delta phpP$  vystaveného působení teplotního, osmotického a pH stresu a také jsme sledovali jeho životaschopnost po působení oxidativního stresu ( $H_2O_2$ ) (viz kap. 3.7, Materiál a metody). Výsledky ukázaly, že oproti *StkP* se *PhpP* nijak výrazně nepodílí na reakci buněk na působení osmotického stresu vyvolaného vysokou koncentrací soli nebo na toleranci ke kyselému či zásaditému pH (data nejsou prezentována). Nicméně *PhpP* je důležitá pro normální růst za zvýšených teplot. Na obrázku 4-24B můžeme vidět, že pokud je kmen  $\Delta phpP$  kultivován při 40°C, kultura přechází do stacionární fáze při nižší optické denzitě a navíc v této fázi dochází k rychlejšímu úhynu buněk. Nakonec jsme testovali rezistenci mutantního kmene k působení oxidativního stresu. Buňky kmene  $\Delta phpP$  jsme vystavili působení různých koncentrací  $H_2O_2$ . Podobně jako kmen  $\Delta stkP$  i kmen  $\Delta phpP$  vykazuje snížené procento přeživších buněk ve srovnání s divokým kmenem, což dokazuje zvýšenou citlivost mutantního kmene k působení oxidativního stresu. Na závěr lze shrnout, že *PhpP* je důležitá pro normální růst buněk a pro jejich schopnost odolávat působení teplotního a oxidativního stresu. Nicméně se zdá, že *PhpP* v odpovědi na osmotický stres, kyselý či zásaditý pH nehraje roli.





**Obr. 4-24: Fenotyp mutantního kmene  $\Delta\text{phpP}$ :**

**A/** Růstová křivka divokého kmene WT (Sp1),  $\Delta\text{stkP}$  (Sp10) a  $\Delta\text{phpP}$  (Sp113) kmene kultivovaného staticky při 37°C v tekutém médiu TSB. **B/** Teplotní stres: Růstová křivka divokého kmene a obou mutantních kmenů kultivovaných v médiu TSB při teplotě 37°C a 40°C. **C/** Oxidativní stres: Tekuté kultury divokého kmene,  $\Delta\text{stkP}$  a  $\Delta\text{phpP}$  kmene byly vystaveny různým koncentracím H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a alikvoty bakteriálních kultur byly vysety do pevného média GelosaD. Počet CFU (colony forming unit = jednotky tvořící kolonie) kontrolních kultur, které nebyly vystaveny působení oxidativnímu stresu (0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), byl stanoven jako 100%. Růstové křivky byly stanoveny ve třech nezávislých měřeních. Body grafu znázorňují průměrné hodnoty těchto měření s danou směrodatnou odchylkou.

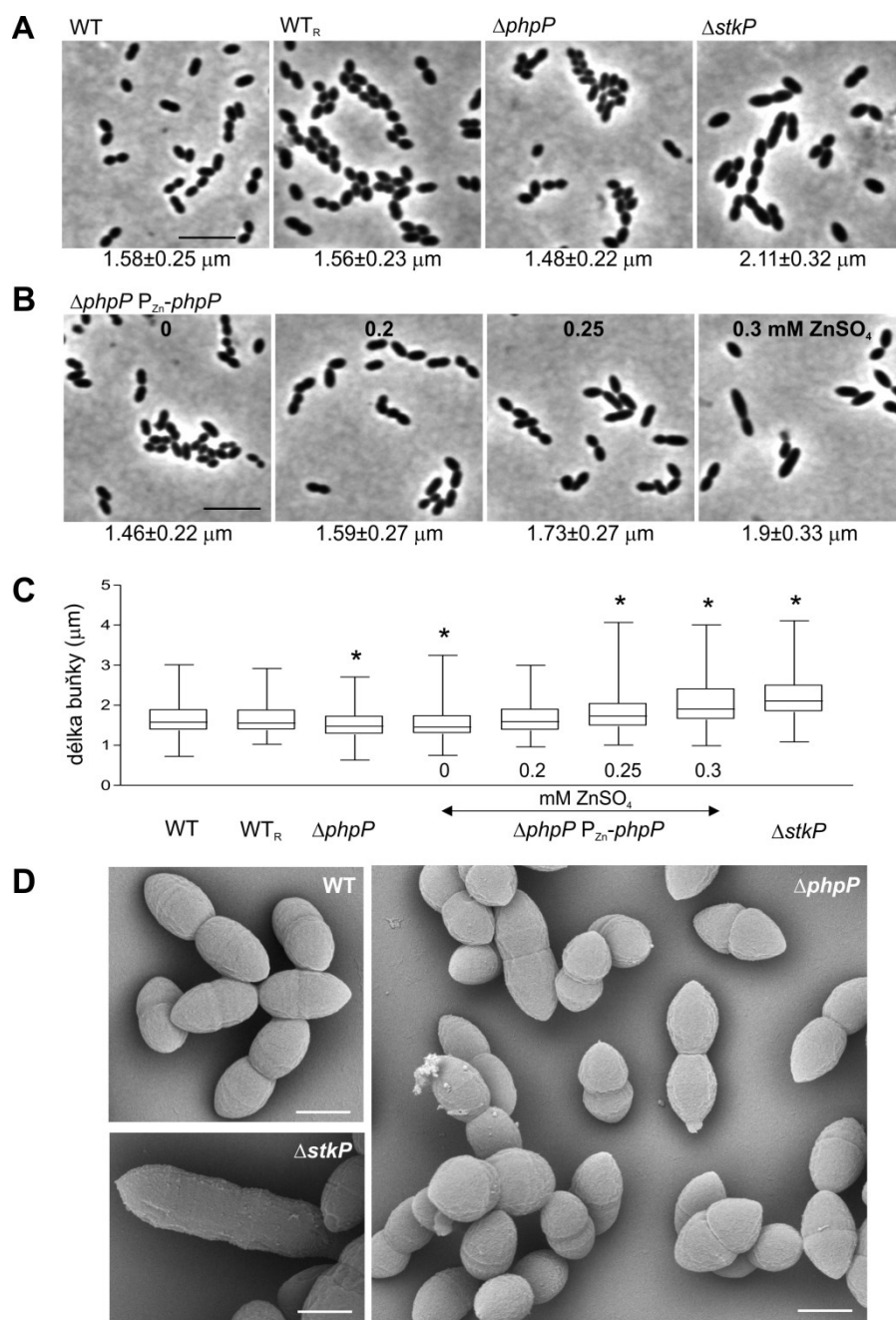
#### 4.2.4 PhpP reguluje buněčné dělení u *S. pneumoniae*

Významná úloha StkP v buněčném dělení nás přiměla ke zkoumání morfologie mutantního kmene  $\Delta\text{phpP}$  a potenciální role PhpP v regulaci buněčného dělení. Ačkoli u enkapsulovaných  $\Delta\text{phpP}$  kmenů nebyly pozorovány žádné morfologické změny (Agarwal et al., 2012), mikroskopie kmene  $\Delta\text{phpP}$  vytvořeného na genetickém pozadí neopouzdrěného kmene Rx1 ukázala morfologické odchylky v porovnání s divokým kmenem. Měření velikosti buněk pomocí softwaru MicrobeTracker odhalilo, že buňky  $\Delta\text{phpP}$  kmene jsou v porovnání s divokým kmenem (medián délky buňky  $1,58 \pm 0,25 \mu\text{m}$ ; medián šířky buňky  $0,66 \pm 0,04 \mu\text{m}$ )

signifikantně menší (medián délky buňky  $1,48 \pm 0,22 \mu\text{m}$ ; medián šířky buňky  $0,64 \pm 0,08 \mu\text{m}$ ) (obr. 4-25A, C) a fenotypově vypadají jako buňky, které naprodukují StkP. Abychom dokázali, že pozorovaný fenotyp je důsledkem delece *phpP*, analyzovali jsme také revertovaný divoký kmen WT<sub>R</sub> (Sp222), jenž byl připraven transformací divoké alely *phpP* do buněk mutantního kmene  $\Delta\textit{phpP}$  (Sp113) (Ulrych et al., 2016) a komplementační kmen Sp120 ( $\Delta\textit{phpP}$  *bga::P<sub>czcD</sub>-phpP*), který nese na chromosomu v postradatelném *bgaA* lokusu pod inducibilním zinkovým promotorem jediný gen *phpP* (Ulrych et al., 2016). Morfologie a délka buněk (obr. 4-25A, C) revertovaného kmene WT<sub>R</sub> se nijak nelišila od divokého kmene. Analýza komplementačního kmene Sp120 kultivovaného v gradientu induktoru (ZnSO<sub>4</sub>) ukázala, že vzrůstající exprese PhpP koreluje se snižováním fosforylace proteinů (obr. 4-23A) a prodlužováním buněk (obr. 4-25B, C). V přítomnosti 0,3 mM ZnSO<sub>4</sub> dosahují buňky délky o hodnotě mediánu  $1,9 \pm 0,33 \mu\text{m}$  (obr. 4-25B, C), a tedy jak délkou, tak fenotypově jsou podobné buňkám kmene  $\Delta\textit{stkP}$  (Sp10, medián buněčné délky  $2,11 \pm 0,32 \mu\text{m}$ ) (obr. 4-25A, C).

Za účelem získat podrobnější poznatky o morfologických změnách způsobených inaktivací *phpP* jsme provedli elektronovou mikroskopii mutantního kmene Sp113 ( $\Delta\textit{phpP}$ ). Obrázek 4-25D ukazuje snímek ze skenovací elektronové mikroskopie divokého kmene v porovnání s  $\Delta\textit{phpP}$  (Sp113) a  $\Delta\textit{stkP}$  (Sp10) kmenem. Jak už bylo několikrát zmíněno,  $\Delta\textit{stkP}$  kmen tvoří dlouhé buňky s několika neuzavřenými septy. Na druhé straně u  $\Delta\textit{phpP}$  kmene pozorujeme buňky různých velikostí s četným výskytem malých buněk. Nicméně obecně je jejich tvar normální a tvoří typické lancetovité diplokoky. Dále jsme provedli transmisní elektronovou mikroskopii, která ale neodhalila žádné další významné abnormality spojené s delecí *phpP* (data nejsou prezentována), které byly pozorovány u enkapsulovaných  $\Delta\textit{phpP}$  kmenů (Agarwal et al., 2012).

Analýza 600 buněk mutantního kmene  $\Delta\textit{phpP}$  ukázala, že 24,2% z nich tvoří řetízky složené z více jak 4 buněk v porovnání s divokým kmenem, kde jsme řetízky pozorovali pouze u 2,5% buněk. Nicméně jsme nepozorovali agregaci buněk či tvorbu abnormálně dlouhých řetízků, které byly pozorovány u enkapsulovaných mutantních kmenů (Agarwal et al., 2012).



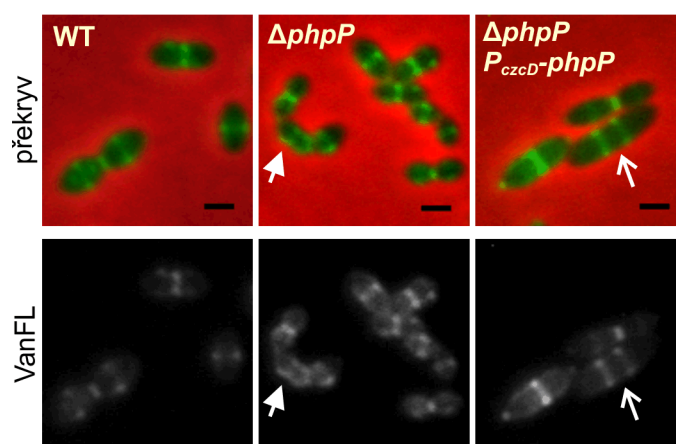
**Obr. 4-25: PhpP reguluje buněčné dělení u *S. pneumoniae*:**

**A/** Morfologie a analýza délky buněk divokého kmene WT (Sp1), revertovaného kmene WT<sub>R</sub> (Sp222),  $\Delta$ *phpP* (Sp113) a  $\Delta$ *stkP* (Sp10) kmene v exponenciální fázi v médiu C+Y. **B/** Délka buněk je závislá na expresi PhpP v komplementačním kmeni  $\Delta$ *phpP* *bgaA::P<sub>czcD-*phpP*</sub>* (Sp120). Jednotlivé snímky ukazují komplementační kmen kultivovaný v médiu C+Y s přidavkem 0; 0,2; 0,25 a 0,3 mM ZnSO<sub>4</sub>. Délka buněk v panelu A a B je vyjádřena hodnotou mediánu ± mediánová absolutní odchylka (n = 300). Měřítka 5 μm. **C/** Analýza délky buněk: Parametry délky buněk měřené pomocí softwaru MicrobeTracker byly analyzovány a vyneseny do krabicového grafu, ve kterém spodní a horní hranice boxu představuje 1. a 3. kvartil, čára uvnitř boxu představuje hodnotu mediánu, spodní a vrchní bod přímky představuje maximální a minimální délku buňky v souboru hodnot. \* označuje signifikantní

rozdíly v délce buněk v porovnání s divokým kmenem WT při použití neparametrického Mann-Whitney testu ( $P < 0,0001$ ). Pro každý kmen bylo hodnoceno 300 buněk. **D/** Skenovací elektronová mikroskopie divokého kmene WT,  $\Delta phpP$  a  $\Delta stkP$  kmene kultivovaných v médiu TSB. Zvětšení je stejné ve všech snímcích. Měřítka 0,5  $\mu\text{m}$ .

Abychom detailněji charakterizovali úlohu PhpP v buněčném dělení, rozhodli jsme se pro pozorování míst aktivní syntézy peptidoglykanu v živých buňkách kmene  $\Delta phpP$  pomocí barvení fluorescenčním vankomycinem (VanFL), který se specificky do těchto míst váže. Obrázek 4-26 ukazuje, že v buňkách kmene  $\Delta phpP$  VanFL lokalizuje hlavně v místě tvorby buněčné přepážky a dále do míst budoucího buněčného dělení, což je stejný lokalizační vzor, který pozorujeme i v divokém kmeni (WT). Nicméně u 4,5% buněk mutantního kmene (58/1300) pozorujeme difúznější lokalizaci VanFL (obr. 4-26, plná šipka), která naznačuje, že minoritní část buněk má narušenou syntézu buněčné stěny. Pokud ale indukujeme nadprodukcí PhpP u komplementačního kmene Sp120 ( $\Delta phpP$   $bga::P_{czcD}$ - $phpP$ ) přidávkem 0,3 mM  $\text{ZnSO}_4$  do média, pozorujeme významnou elongaci buněk a VanFL barvení odhaluje častý výskyt buněk s četnými neuzavřenými septy, což je typické pro buňky s delecí  $stkP$  (obr. 4-26, otevřená šipka). Dále jsme u mutantního kmene  $\Delta phpP$  zkoumali lokalizaci dalších dělicích proteinů LocZ, FtsA a DivIVA, ale neodhalili jsme žádné významné odlišnosti v jejich lokalizaci v porovnání s divokým kmenem (data nejsou prezentována).

Tato data jasně ukazují, že PhpP má v regulaci buněčného dělení opačnou roli než  $StkP$ , což z výsledků Agarwal et al. (2012) nebylo patrné.



**Obr. 4-26: Syntéza buněčné stěny u mutantu  $\Delta phpP$ :**

Místa aktivní syntézy peptidoglykanu v živých buňkách divokého kmene WT (Sp1),  $\Delta phpP$  kmene (Sp113) a nadprodukčního kmene  $\Delta phpP$   $P_{czcD}$ - $phpP$  (Sp120), které byly barveny fluorescenčním vankomycinem (VanFL).

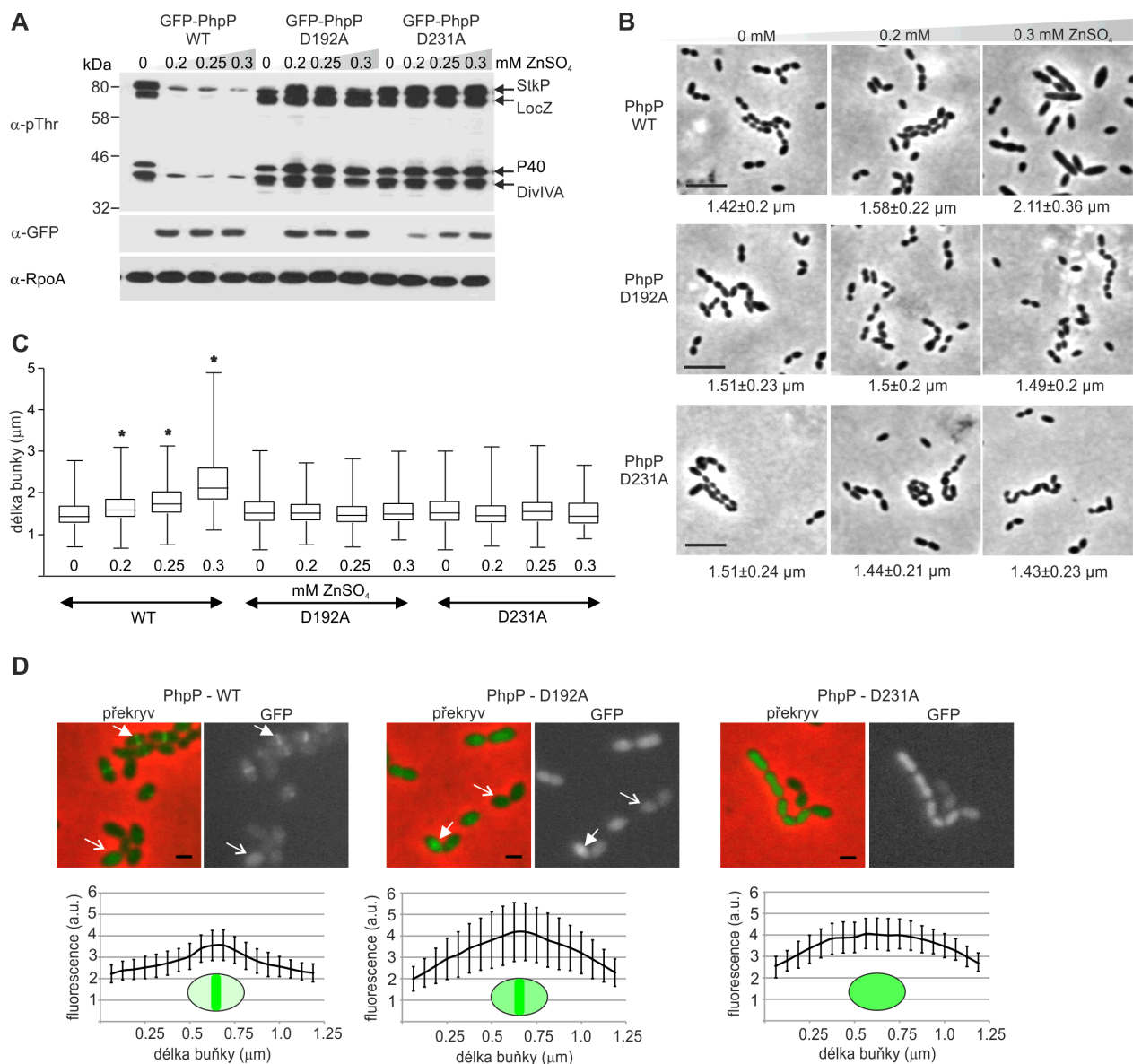
Nadprodukce PhpP v kmeni  $\Delta phpP$   $P_{czd}$ - $phpP$  byla vyvolána přidavkem  $ZnSO_4$  v konečné koncentraci 0,3 mM do tekutého média C+Y. **Plná šipka** ukazuje buňku s narušenou syntézou peptidoglykanu. **Otevřená šipka** ukazuje buňku s četnými neuzavřenými septy. **Překryv** představuje překryv obrazu z fázového kontrastu se signálem VanFL. Měřítka: 1  $\mu$ m.

#### 4.2.5 Konzervované aminokyseliny D192 a D231 jsou pro aktivitu PhpP *in vivo* esenciální

PhpP obsahuje vysoce konzervované aminokyseliny na pozicích D192 a D231. V publikaci Nováková et al. (2005) bylo uvedeno, že záměna D192 a D231 za alanin inhibuje aktivitu PhpP *in vitro*. Proto jsme se rozhodli zkoumat vliv aminokyselin D192 a D231 na enzymatickou aktivitu a vliv na lokalizaci PhpP *in vivo*. Za tímto účelem jsme použili kmeny exprimující mutantní alelu pro PhpP s aminokyselinovou záměnou D192A nebo D231A fúzovanou s GFP pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru  $P_{czd}$  na genetickém pozadí  $\Delta phpP$  kmene (příprava kmenů popsána v článku Ulrych et al., 2016). Kmeny exprimující GFP-PhpP-WT (Sp140), mutantní alelu D192A (Sp292) a mutantní alelu D231A (Sp293) jsme kultivovali v C+Y médiu s nebo bez přidavku induktoru. Expresi PhpP a fosforylaci proteinů jsme detekovali pomocí specifických protilátek po rozdělení proteinů pomocí SDS-PAGE. Exprese GFP-PhpP-WT a GFP-PhpP-D192A byla srovnatelná, nicméně exprese GFP-PhpP-D231A byla nižší, jak můžeme pozorovat na obrázku 4-27A, kde je zobrazena imunodetekce s protilátkou specifickou proti GFP ( $\alpha$ -GFP). Imunodetekce s použitím protilátky proti pThr ( $\alpha$ -pThr) ukázala, že se vzrůstající expresí divoké alely PhpP dochází ke snižování intenzity fosforylace proteinů. Na druhé straně zvýšená exprese GFP-PhpPD192A a GFP-PhpP-D231A po přidání induktoru nijak neovlivnila intenzitu fosforylace v jednotlivých kmene Sp292 a Sp293, což naznačuje, že obě mutantní alely PhpP jsou katalyticky inaktivní. Následně jsme provedli mikroskopii ve fázovém kontrastu. Ta ukazuje morfologii kmene Sp140 exprimujícího divokou alelu GFP-PhpP-WT, která se v závislosti na přidaném množství induktoru ( $ZnSO_4$ ) mění a dochází k prodlužování buněk (obr. 4-27B). Na druhé straně morfologie kmenů exprimující mutantní alely PhpP zůstává stále stejná nezávisle na přidaném množství induktoru v médiu (obr. 4-27B). Toto pozorování jsme potvrdili pomocí analýzy velikosti buněk (obr. 4-27C). Pokud byl do média přidán  $ZnSO_4$  v konečné koncentraci 0,3 mM u kmene Sp140 (GFP-PhpP-WT), pozorujeme prodloužení buněk ( $2,11 \pm 0,36 \mu$ m), zatímco u kmene Sp292 (GFP-PhpP-D192A;  $1,49 \pm 0,2 \mu$ m) a Sp293 (GFP-PhpP-D231A;  $1,43 \pm 0,23 \mu$ m) ke změnám délky buněk nedochází (obr. 4-27C).

V publikaci Beilharz et al. (2012) je uvedeno, že fosfatasa PhpP je cytoplazmatický protein, který je ale významně obohacen ve středu buňky v časně fázi exponenciálního růstu a tato lokalizace je závislá na přítomnosti aktivní proteinkinasy StkP. Abychom určili lokalizaci katalyticky inaktivních forem GFP-PhpP, kultivovali jsme jednotlivé kmeny Sp140 (WT), Sp292 (D192A), Sp293 (D231A) v tekutém médiu s přidavkem 0,2 mM ZnSO<sub>4</sub> do časně exponenciální fáze (OD<sub>600</sub> 0,2) a následně pozorovali preparáty živých buněk pomocí fluorescenční mikroskopie. V případě divoké alely GFP-PhpP-WT jsme u 23% (176/766) buněk pozorovali jasnou lokalizaci ve středu buňky v místě tvořící se dělicí přepážky. Výskyt v cytoplazmě vykazovalo 77% buněk. Lokalizaci GFP-PhpP-D192A ve středu buňky jsme pozorovali u 19% (152/800) buněk, nicméně GFP signál v těchto buňkách je difusnější. Abychom pozorované rozdíly kvantifikovali, provedli jsme měření intenzity fluorescence u buněk v první fázi buněčného dělení (Linda Doubravová; metodický popis v článku Ulrych et al., 2016). Analýza potvrdila rozdíly v distribuci fluorescenčního signálu GFP-PhpP-D192A v porovnání s GFP-PhpP-WT a to tak, že GFP-PhpP-D192A je obohacena v cytoplazmě. Zajímavé je, že GFP-PhpP-D231A lokalizuje výhradně v cytoplazmě (obr. 4-27D).

Všechna tato data naznačují, že inaktivace aminokyseliny v pozici D192 nebo D231 proteinfosfatasy PhpP má za následek nejen ztrátu její katalytické aktivity, ale také má vliv na její schopnost kolocalizovat s aparátem buněčného dělení.



**Obr. 4-27: Aminokyseliny D192 a D231 proteinfosfatasy PhpP jsou pro její aktivitu *in vivo* esenciální:**

**A/** Imunodetekce proteinů v kmenech exprimujících GFP-PhpP-WT (Sp140), GFP-PhpP-D19A (Sp292) a GFP-PhpP-D231A (Sp293) vytvořených na genetickém pozadí  $\Delta phpP$  kmene. Celkové lyzáty byly získány z kultur pěstovaných v C+Y médiu s přidavkem či bez přidavku induktoru (ZnSO<sub>4</sub>). Separovány byly pomocí SDS-PAGE a fosforylace proteinů byla vizualizována pomocí imunodetekce s  $\alpha$ -pThr protilátkou. Protilátka proti GFP ( $\alpha$ -GFP) byla použita k detekci exprese jednotlivých variant GFP-PhpP proteinů. Imunodetekce proteinu RpoA byla použita jako kontrola. Pozice StkP a jejích substrátů je označena šipkami. Původní data Aleš Ulrych. **B/** Morfologie kmenů exprimujících GFP-PhpP-WT (Sp140), GFP-PhpP-D19A (Sp292) a GFP-PhpP-D231A (Sp293) vytvořených na genetickém pozadí  $\Delta phpP$  kmene. Jednotlivé kmeny na snímcích z mikroskopie ve fázovém kontrastu byly kultivovány v médiu C + Y s přidavkem induktoru (ZnSO<sub>4</sub>) o konečné koncentraci 0; 0,2 a 0,3 mM a ukazují morfologii buněk a jejich velikost vyjádřenou jako medián  $\pm$  mediánová absolutní odchylka (n = 300). Měřítko: 5  $\mu$ m. **C/** Analýza délky buněk: Parametry délky buněk byly vyneseny do krabicového grafu. \* označuje statisticky

významné rozdíly v délce buněk kultivovaných v přítomnosti induktoru v porovnání s buňkami kultivovanými v médiu bez přidavku induktoru při použití neparametrického Mann-Whitney testu ( $P < 0,0001$ ). Pro každý vzorek bylo hodnoceno 300 buněk. **D/ Lokalizace PhpP:** Kmeny exprimující GFP-PhpP-WT (Sp140), GFP-PhpP-D19A (Sp292) a GFP-PhpP-D231A (Sp293) byly kultivovány v médiu C + Y s přidavkem 0,2 mM ZnSO<sub>4</sub>. Jednotlivé snímky ukazují mikroskopii signálu GFP a překryv obrazu z fázového kontrastu se signálem GFP. Plné šipky ukazují buňky v první fázi buněčného dělení, ve kterých je PhpP obohacena v jejich středu. Otevřené šipky ukazují buňky s cytoplazmatickou lokalizací PhpP. Měřítko: 1  $\mu$ m. Buňky v první fázi buněčného dělení, které vykazují buď obohacení PhpP ve středu buňky (WT a D192A) nebo cytoplazmatickou lokalizaci (D231A) byly vybrány pro analýzu distribuce GFP-PhpP na podélné ose buňky. Závislost intenzity fluorescence (a. u. = arbitrary units) na délce buňky je vynesena v jednotlivých grafech se znázorněnou směrodatnou odchylkou ( $n = 20$ ). Původní data Linda Doubravová

#### 4.2.6 Diskuze

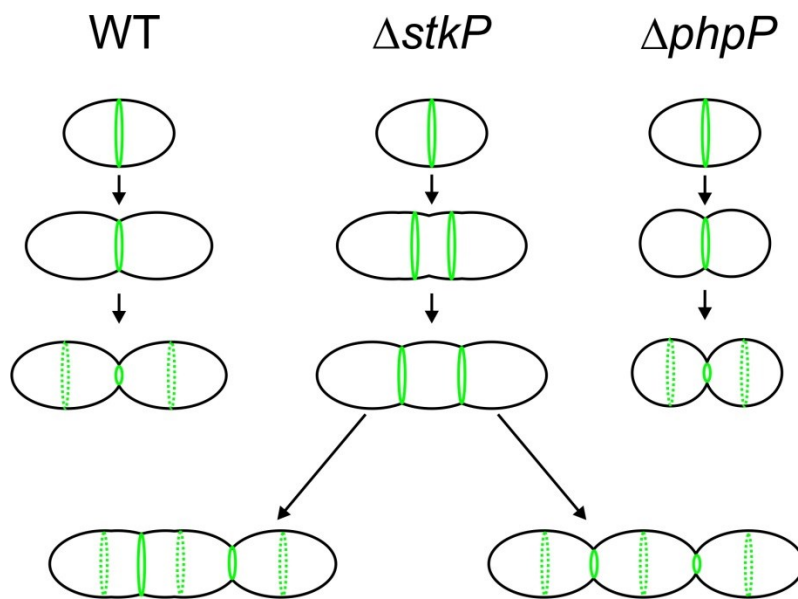
Genom bakterie *S. pneumoniae* je velmi dynamický a počet genů, které jsou podmíněně esenciální, závisí na mnoha faktorech, jako je genetické pozadí použitého kmene, přítomnosti pouzdra, metodě inaktivace genu či na kultivačních podmínkách (Massidda et al., 2013). Protichůdné výsledky dokazující nepostradatelnost (Thanassi, 2002; Osaki et al., 2009; Fleurie et al., 2012) či postradatelnost (Song et al., 2005; Bijlsma et al., 2007; Agarwal et al., 2012) genu *phpP* mohou vyplývat právě z různých metod použitých k inaktivaci genu nebo z genetické variability použitých pneumokokových kmenů. V případě kmene Rx1 se zdá, že hlavní roli hraje metodika přípravy mutantního kmene. Disertační práce Lenky Saskové (Sasková, 2007) se mimo jiné zabývala esencialitou gene *phpP*. Většina experimentů, které byly založeny hlavně na různých přístupech v přípravě mutantu, poukazovala na esencialitu *phpP*. Nicméně použitím nové metody přípravy kmene  $\Delta phpP$  pomocí Janus kazety (Agarwal et al., 2012) a následným ověřením, že v důsledku delece nedochází k supresorovým mutacím, jsme nepřímou metodou prokázali, že v kmeni Rx1 není gen *phpP* pro životaschopnost *S. pneumoniae* esenciální. Nicméně nejvhodnější metodou, která by vyloučila vznik jakékoli mutace, by bylo celogenomové sekvenování.

Ser/Thr proteinkinasa StkP lokalizuje u *S. pneumoniae* v septu, kde hraje důležitou roli v regulaci buněčného dělení. Buňky s deletovanou *stkP* jsou protáhlé, obsahují vícečetná neuzavřená septa a mají narušenou syntézu buněčné stěny (obr. 4-28). Tato pozorování naznačují, že StkP koordinuje syntézu buněčné stěny s buněčným dělením, čímž pomáhá pneumokokovi dosáhnout jeho typického lancetovitého tvaru (obr. 4-28) (Giefing et al., 2010; Beilharz et al.,



2012; Fleurie et al., 2012). Cílení PhpP do míst buněčného dělení závisí na přítomnosti aktivní StkP (Beilharz et al., 2012). Naším cílem bylo zjistit, jakou úlohu zastává PhpP v procesu buněčného dělení a zda je funkce PhpP protichůdná té, kterou vykonává StkP.

Morfologicky se delece *phpP* u *S. pneumoniae* projevuje tvorbou menších buněk, než jsou buňky divokého kmene, přičemž takto vypadají buňky nadprodukcující StkP (obr. 4-28) (Beilharz et al., 2012). Naproti tomu u enkapsulovaných  $\Delta phpP$  kmenů nebyly morfologické změny pozorovány, ale vykazovaly jiné abnormality, jako je tlustší buněčná stěna (Agarwal et al., 2012), které jsme u našeho neopouzdrěného  $\Delta phpP$  kmene nepozorovali. Také jsme kvantifikovali, že 24,2% buněk z populace  $\Delta phpP$  kmene tvoří řetízky. Nicméně tvorbu abnormálně dlouhých řetízků či agregaci buněk, jak je tomu u enkapsulovaných kmenů (Agarwal et al., 2012), jsme nepozorovali. Jelikož regulace počtu buněk v řetízku u streptokoků závisí na jejich autolytické aktivitě, byla metodou qRT-PCR otestována exprese genů kódujících peptidoglykanové hydrolázy *pcsB*, *lytA* a *lytB*, které mohou ovlivnit separaci buněk a jejichž hladiny byly u enkapsulovaných  $\Delta phpP$  kmenů zvýšené (Agarwal et al., 2012). V porovnání s divokým kmenem ale nebyly zaznamenány žádné odlišnosti v úrovni transkripce (Ulrych et al., 2016) a tedy důvod zvýšeného výskytu buněk v řetízcích zůstává neznámý.



**Obr. 4-28:** Schématické znázornění morfologie kmene  $\Delta stkP$  a  $\Delta phpP$ :

**WT:** divoký kmen;  **$\Delta stkP$ :** mutantní kmen  $\Delta stkP$ ;  **$\Delta phpP$ :** mutantní kmen  $\Delta phpP$

Pozorováním morfologie a analýzou velikosti buněk revertovaného kmene Sp222 (WT<sub>R</sub>) a komplementačního kmene Sp120, který v postradataálním *bga* lokusu na chromosomu nese pod inducibilním zinkovým promotorem jediný gen pro PhpP, jsme potvrdili, že fenotyp kmene  $\Delta phpP$  je skutečně způsoben delecí genu *phpP*. Přičemž analýza komplementačního kmene Sp120 navíc ukázala, že se vzrůstající koncentrací induktoru vzrůstá exprese PhpP, která koresponduje se snižováním fosforylace proteinů a prodlužováním buněk. Ty v přítomnosti 0,3 mM Zn<sup>2+</sup> vzhledově a buněčnou délkou odpovídají buňkám kmene  $\Delta stkP$  (Nováková et al., 2005). Navíc barvení pomocí fluorescenčního vankomycinu (VanFL) ukázala v těchto buňkách četná neuzavřená septa, která jsou typická pro buňky  $\Delta stkP$  kmene (Beilharz et al., 2012).

Všechna tato pozorování jasně ukazují, že v regulaci buněčného dělení u *S. pneumoniae* zastává proteinfosfatasa PhpP opačnou roli než proteinkinasa StkP, což z výsledků studie Agarwal et al. (2012) zcela nevyplývalo. Nicméně deplece *phpP* má na buněčné dělení menší negativní vliv než abnormality pozorované v případě absence StkP nebo nadprodukce PhpP, což naznačuje, že hyperfosforylace substrátů StkP je buňkou lépe tolerována než absence fosforylace.

Reverzibilní fosforylace proteinů je základním mechanismem přenosu signálu z vnějšího prostředí do buňky i uvnitř buňky. Pro správnou funkci signalizační dráhy je tedy nutný balanc mezi fosforylací a defosforylací jednotlivých proteinů. U *S. pneumoniae* zodpovídá za fosforylaci proteinů na threoninu proteinkinasa StkP. Proteinfosfatasa PhpP tvoří s StkP funkční pár a bylo prokázáno, že samotnou StkP defosforyluje (Nováková et al., 2005).

Pomocí imunodetekce se specifickou protilátkou jsme prokázali, že v kmeni  $\Delta phpP$  dochází k hyperfosforylaci proteinů fosforylovaných na threoninu, včetně samotné StkP, jejíž exprese není delecí *phpP* nikterak ovlivněna. Hyperfosforylace proteinů v kmeni  $\Delta phpP$  je opačným jevem, než který byl pozorován v případě kmene  $\Delta stkP$ , ve kterém nejsou detekovány žádné proteiny fosforylované na threoninu (Nováková et al., 2005). Toto pozorování naznačuje, že je PhpP přímo zodpovědná za defosforylaci substrátů StkP. Tuto domněnku podporují další naše výsledky. Nadprodukce PhpP v komplementačním kmeni, ve kterém je *phpP* exprimována pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru z postradataálního *bga* lokusu, jakožto jediné kopie genu na chromosomu, má za následek výrazné snížení fosforylace proteinů (Ulrych et al., 2016), které je stejně tak pozorováno v případě deplece StkP (Nováková et al., 2005). Defosforylaci substrátů StkP zprostředkovanou přímo PhpP jsme prokázali *in vitro* defosforylační reakcí, kdy jsme protein DivIVA a LocZ vystavili působení proteinfosfatasy PhpP.

Defosforylaci cytoplasmatické domény proteinu LocZ fosfatasou PhpP prokázali též ve studii Fleurie et al. (2014). Výše zmíněné skutečnosti ukazují, že PhpP přímo defosforyluje substráty StkP a že k této defosforylaci nedochází v důsledku snížené fosforylace StkP.

Proteinkinasa StkP se účastní mnohých buněčných dějů u *S. pneumoniae*. Delece genu *stkP* má, mimo jiné, negativní vliv na růstové schopnosti kmene. Doba zdvojení kmene  $\Delta stkP$  je prodloužena a ve stacionární fázi předčasně lyzuje. Mutantní kmen  $\Delta stkP$  se také velmi obtížně vyrovnává s různými druhy stresů, jako je oxidativní, pH, osmotický a teplotní (Sasková et al., 2007). Protože StkP a PhpP tvoří funkční pár, zajímalo nás, jak bude na různé environmentální podmínky reagovat kmen  $\Delta phpP$ . Také nás zajímalo, zda použité genetické pozadí bude mít vliv na fenotypový projev mutace *phpP*.

Kmen  $\Delta phpP$  má oproti divokému kmeni delší lag fázi, stejně tak doba zdvojení je prodloužena a ve stacionární fázi dochází k lyzi buněk za nižších optických denzit. Jak by se dalo očekávat, růstové vlastnosti mutantního kmene  $\Delta phpP$  jsou za daných kultivačních podmínek srovnatelné s vlastnostmi kmene  $\Delta stkP$ . Testování citlivostí k různým druhům stresů ukázalo, že na rozdíl od StkP se PhpP neúčastní odpovědi na osmotický stres či na snížené nebo zvýšené pH. Na druhou stranu v případě teplotního stresu buňky kmene  $\Delta phpP$  přecházejí do stacionární fáze při nižší optické denzitě a navíc v této fázi dochází k jejich předčasné lyzi. Dále kmen  $\Delta phpP$  vykazuje sníženou životaschopnost po vystavení oxidativnímu stresu, podobně jako kmen  $\Delta stkP$ .

Souhrnně lze říci, že fenotyp mutantního kmene  $\Delta phpP$ , který byl připraven na genetickém pozadí neopouzdrěného kmene Rx1, je odlišný v porovnání s kmeny  $\Delta phpP$  připravenými ve studii Agarwal et al. (2012), a to na genetickém pozadí opouzdrěného kmene 6A a D39. Kmen  $6A\Delta phpP$  je citlivý k působení všech testovaných stresů, naproti tomu kmen  $D39\Delta phpP$  vykazuje citlivost pouze k působení vysoké koncentrace soli. Tato pozorování naznačují, že genetické pozadí použitého kmene významně ovlivňuje projev mutace *phpP*, i když nemůžeme vyloučit roli samotného polysacharidového pouzdra.

Vzhledem k tomu, že mutantní kmen  $\Delta stkP$  připravený na genetickém pozadí kmene Rx1 je citlivý ke všem výše zmíněným testovaným stresům (Sasková et al., 2007), nepodařilo se nám potvrdit opačný vliv PhpP. Naše data naznačují, že nevyvážená aktivita jak PhpP, tak StkP má negativní vliv na fyziologii bakterie *S. pneumoniae* a její adaptivní reakci na environmentální stres, která ale není obecně řízena signalizačním párem StkP/PhpP.

Proteinfosfatasa PhpP je mangan dependentní fosfatasa typu PP2C. Katalytická doména PhpP obsahuje 11 konzervovaných signálních motivů (Bork et al., 1996) a mutace vysoce konzervovaných aminokyselin D192 a D231, které se přímo účastní vazby kovových iontů, zcela ruší aktivitu PhpP *in vitro* (Nováková et al., 2005). Zajímalo nás tedy, jaký vliv bude mít aminokyselinová záměna D192 a nebo D231 za alanin na funkci PhpP *in vivo*.

Za tímto účelem byly vytvořeny tři kmeny *S. pneumoniae*. Každý z nich nese na chromosomu v postradatelném lokusu *bga* jedinou kopii genu pro variantu genu *phpP* fúzovanou s GFP, a to divokou alelu *phpP*-WT (Sp140), mutovanou alelu *phpP*-D192A (Sp292) nebo *phpP*-D231A (Sp293), která je pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru (Ulrych et al., 2016). Tyto kmeny jsme následně pěstovali v tekutém médiu v gradientu induktoru. U kmene exprimujícího divokou alelu pro PhpP pozorujeme, v korelaci se vzrůstající koncentrací induktoru, snižování intenzity fosforylace proteinů a postupné prodlužování buněk. Naproti tomu u kmenů exprimujících mutovanou alelu *phpP*-D192A či *phpP*-D231A nepozorujeme se vzrůstající koncentrací induktoru žádné změny. Těmito experimenty jsme prokázali, že záměna D192 nebo D231 zcela ruší katalytickou aktivitu PhpP *in vivo*.

Proteinfosfatasa PhpP je cytoplazmatický protein, nicméně v časně fázi exponenciálního růstu lokalizuje i v buněčném středu, přičemž tato lokalizace je závislá na přítomnosti aktivní StkP (Beilharz et al., 2012). Jelikož aminokyselinová záměna na pozici D192 nebo D231 vede ke katalytické inaktivaci PhpP *in vivo*, vyvstala otázka, zda má tato inaktivace vliv i na lokalizaci PhpP. Proto jsme výše uvedené kmeny Sp140 (GFP-PhpP-WT), Sp292 (GFP-PhpP-D192A) a Sp293 (GFP-PhpP-231A) kultivovali v tekutém médiu s přidavkem 0,2 mM  $Zn^{2+}$  do časně exponenciální fáze a živé preparáty pozorovali pomocí fluorescenční mikroskopie. Následnou analýzou intenzity fluorescenčního signálu u buněk v první fázi buněčného dělení, tedy u dceřiných buněk, které jsou zcela oddělené, ale ještě u nich nebyl započat proces buněčného dělení, jsme zjistili, že GFP-PhpP-D192A je oproti GFP-PhpP-WT obohacena v cytoplazmě, nicméně stále je schopna lokalizovat v buněčném středu. Naproti tomu GFP-PhpP-D231A lokalizuje výhradně v cytoplazmě. Tato pozorování ukazují, že aminokyseliny v pozici D192 a D231 proteinfosfatasy PhpP jsou esenciální nejen pro její katalytickou aktivitu, ale jejich záměna ovlivňuje schopnost fosfatasy PhpP kolocalizovat s aparátem buněčného dělení, přičemž mutace D231 je pro tuto funkci fatální.

Nakonec můžeme shrnout, že gen *phpP* není pro životaschopnost neopouzdrěného kmene *S. pneumoniae* Rx1 esenciální. V regulaci buněčného dělení zastává proteinfosfatasa PhpP opačnou roli než proteinkinasa StkP a společně tvoří důležitý funkční pár, díky kterému *S. pneumoniae* dosahuje svého specifického tvaru. Přičemž pro aktivitu a správnou lokalizaci PhpP jsou důležité aminokyseliny na pozici D192 a D231. Nicméně by bylo potřeba ověřit, zda námi vytvořený kmen neobsahuje ve svém genomu supresorové mutace pomocí metod sekvenace nové generace.

## 5 Závěr

Výsledky projektu „LocZ je nový protein buněčného dělení určující správné umístění septa u *Streptococcus pneumoniae*“ můžeme shrnout do následujících bodů.

- Protein LocZ odpovídá za výběr místa buněčného dělení u *S. pneumoniae*, jelikož v mutantním kmeni  $\Delta locZ$  je Z-kruh uložen mimo střed podélné osy buňky a často je vychýlen i z osy kolmé na podélnou osu. Avšak syntéza peptidoglykanu není v dělicí přepážce narušena a ostatní proteiny buněčného dělení jsou lokalizovány v místě sestavení Z-kruhu. V důsledku špatně založeného septa mají buňky abnormální morfolonii. Dochází k tvorbě asymetricky rozdělených buněk “bramborovitého“ tvaru a minibuněk.
- LocZ je velmi časným proteinem buněčného dělení, který má v porovnání s ostatními proteiny buněčného dělení unikátní lokalizační vzor. Pomocí fluorescenční mikroskopie jsme ukázali, že protein LocZ v časně fázi buněčného dělení, poté co se dvojice buněk *S. pneumoniae* rozdělí, lokalizuje ve středu buňky spolu s časnými proteiny buněčného dělení FtsZ a FtsA. V následné fázi buněčného dělení, kdy je započata elongace buňky, dojde k vytvoření dvou LocZ kruhů, které se od sebe navzájem a zároveň od buněčného středu začínají oddalovat, zatímco proteiny FtsZ a FtsA lokalizují ve středu buňky. Tyto dva LocZ kruhy lokalizují v místě ekvatoriálních kruhů, kde značí budoucí místo buněčného dělení. V pozdější fázi buněčného dělení dochází k relokizaci FtsZ a FtsA z buněčného středu do ekvatoriálů, které jsou značeny proteinem LocZ. Domníváme se, že extracelulární doména proteinu LocZ zodpovídá za jeho lokalizaci, zatímco intracelulární doména by mohla sloužit k interakci s ostatními proteiny buněčného dělení, pravděpodobně hlavně s FtsZ.
- Význam fosforylace proteinu LocZ jsme nedokázali objasnit, protože obě formy proteinu LocZ, jak fosfomimetická tak i fosfoablativní, se morfologicky projevují stejně jako divoký kmen. Prokázali jsme však, že proteinkinasa StkP se setkává se svým substrátem proteinem LocZ pouze ve fázích předcházejících buněčnému dělení, kdy se oba proteiny nachází ve středu buňky.

Výsledky projektu „Esencialita a funkce Ser/Thr proteinfosfatasy PhpP u *Streptococcus pneumoniae*“ můžeme shrnout do následujících bodů:

- Proteinfosfatasa PhpP není pro životaschopnost buněk neopouzdřeného kmene Rx1 esenciální.
- PhpP zastává v regulaci buněčného dělení u *S. pneumoniae* opačnou roli než proteinkinasa StkP. Zjistili jsme, že se delece *phpP* morfologicky projevuje tvorbou menších kulatých buněk, a naopak nadprodukce PhpP vede k tvorbě protáhlých buněk s četnými neuzavřenými septy, což je typické pro buňky kmene  $\Delta$ *stkP*. Pomocí různých metod jsme ukázali, že PhpP přímo defosforyluje substráty StkP a navíc i samotnou StkP.
- Fyziologie u *S. pneumoniae* není obecně řízena signalizačním párem StkP/PhpP. Ukázali jsme, že mutantní kmen  $\Delta$ *phpP* má v porovnání s divokým kmenem delší lag fázi, doba zdvojení je též prodloužena a je citlivý k působení teplotního a oxidativního stresu. Podobně se projevuje kmen  $\Delta$ *stkP*, který je navíc citlivý k působení osmotického stresu a nízkému pH.
- Pro katalytickou aktivitu proteinfosfatasy PhpP jsou esenciální aminokyseliny D192 a D231. Katalytická aktivita je nezbytná pro schopnost PhpP kolokalizovat s aparátem buněčného dělení.

## 6 Seznam použité literatury

- ACIP. Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 1997;46:1–24. (doi není uvedeno).
- Adams, D. W., a Errington, J. (2009). Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat. Rev. Microbiol.* doi:10.1038/nrmicro2198.
- Adams, D. W., Wu, L. J., and Errington, J. (2014). Cell cycle regulation by the bacterial nucleoid. *Curr. Opin. Microbiol.* doi:10.1016/j.mib.2014.09.020.
- Adams, D. W., Wu, L. J., and Errington, J. (2015). Nucleoid occlusion protein Noc recruits DNA to the bacterial cell membrane. *EMBO J.* doi:10.15252/emboj.201490177.
- Addinall, S. G., a Lutkenhaus, J. (1996). FtsA is localized to the septum in an FtsZ-dependent manner. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/jb.178.24.7167-7172.1996.
- Agarwal, S., Agarwal, S., Pancholi, P., a Pancholi, V. (2012). Strain-specific regulatory role of eukaryote-like serine/threonine phosphatase in pneumococcal adherence. *Infect. Immun.* doi:10.1128/IAI.06311-11.
- Arumugam, S., Petrášek, Z., a Schwille, P. (2014). MinCDE exploits the dynamic nature of FtsZ filaments for its spatial regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1317764111.
- Avery, O. T., Macleod, C. M., a McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. *J. Exp. Med.* doi:10.1084/jem.79.2.137.
- Barendt, S. M., Sham, L. T., a Winkler, M. E. (2011). Characterization of mutants deficient in the L,D-carboxypeptidase (DacB) and WalRK (VicRK) regulon, involved in peptidoglycan maturation of *Streptococcus pneumoniae* serotype 2 strain D39. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.01555-10.
- Barreteau, H., Kovač, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., a Blanot, D. (2008). Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00104.x.
- Bartual, S. G., Straume, D., Stamsås, G. A., Muñoz, I. G., Alfonso, C., Martínez-Ripoll, M., et al. (2014). Structural basis of PcsB-mediated cell separation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Commun.* doi:10.1038/ncomms4842.



- Beilharz, K., Nováková, L., Fadda, D., Branny, P., Massidda, O., a Veening, J. W. (2012). Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1119172109.
- Bernhardt, T. G., a De Boer, P. A. J. (2005). SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over chromosomes in *E. coli*. *Mol. Cell.* doi:10.1016/j.molcel.2005.04.012.
- Bi, E., a Lutkenhaus, J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature*. doi:10.1038/354161a0.
- Bigot, S., Corre, J., Louarn, J. M., Cornet, F., a Barre, F. X. (2004). FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04335.x.
- Bijlsma, J. J. E., Burghout, P., Kloosterman, T. G., Bootsma, H. J., De Jong, A., Hermans, P. W. M., et al. (2007). Development of genomic array footprinting for identification of conditionally essential genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.01900-06.
- Bisicchia, P., Arumugam, S., Schwille, P., a Sherratt, D. (2013). MinC, MinD, and MinE drive counter-oscillation of early-cell-division proteins prior to *Escherichia coli* septum formation. *MBio*. doi:10.1128/mBio.00856-13.
- Boersma, M. J., Kuru, E., Rittichier, J. T., VanNieuwenhze, M. S., Brun, Y. V., a Winkler, M. E. (2015). Minimal peptidoglycan (PG) turnover in wild-type and PG hydrolase and cell division mutants of *Streptococcus pneumoniae* D39 growing planktonically and in host-relevant biofilms. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.00541-15.
- Bogaert, D., De Groot, R., a Hermans, P. W. M. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: The key to pneumococcal disease. *Lancet Infect. Dis.* doi:10.1016/S1473-3099(04)00938-7.
- Bonny, M., Fischer-Friedrich, E., Loose, M., Schwille, P., a Kruse, K. (2013). Membrane binding of MinE allows for a comprehensive description of Min-protein pattern formation. *PLoS Comput. Biol.* doi:10.1371/journal.pcbi.1003347.
- Bork, P., Brown, N. P., Hegyi, H., a Schultz, J. (1996). The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: Detection of bacterial homologues. *Protein Sci.* doi:10.1002/pro.5560050720.
- Bramkamp, M., Emmins, R., Weston, L., Donovan, C., Daniel, R. A., a Errington, J. (2008). A novel component of the division-site selection system of *Bacillus subtilis* and a new mode of

- action for the division inhibitor MinCD. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06501.x.
- Brown, J., Hammerschmidt, S., a Orihuela, C. (2015). *Streptococcus pneumoniae*: Molecular mechanisms of host-pathogen interactions. doi:10.1016/C2012-0-00722-3.
- Burnside, K., a Rajagopal, L. (2011). Aspects of eukaryotic-like signaling in Gram-positive cocci: A focus on virulence. *Future Microbiol.* doi:10.2217/fmb.11.62.
- Cabré, E. J., Monterroso, B., Alfonso, C., Sánchez-Gorostiaga, A., Reija, B., Jiménez, M., et al. (2015). The nucleoid occlusion SlmA protein accelerates the disassembly of the FtsZ protein polymers without affecting their GTPase activity. *PLoS One.* doi:10.1371/journal.pone.0126434.
- Cheng, Q., Campbell, E. A., Naughton, A. M., Johnson, S., a Masure, H. R. (1997). The *com* locus controls genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* doi:10.1046/j.1365-2958.1997.2481617.x.
- Chewapreecha, C., Harris, S. R., Croucher, N. J., Turner, C., Marttinen, P., Cheng, L., et al. (2014). Dense genomic sampling identifies highways of pneumococcal recombination. *Nat. Genet.* doi:10.1038/ng.2895.
- Cho, H., McManus, H. R., Dove, S. L., a Bernhardt, T. G. (2011). Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1018674108.
- Daniel, R. A., a Errington, J. (2003). Control of cell morphogenesis in bacteria: Two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell.* doi:10.1016/S0092-8674(03)00421-5.
- Das, A. K., Helps, N. R., Cohen, P. T., a Barford, D. (1996). Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO J.* doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb01071.x.
- de Boer, P. A. J., Crossley, R. E., a Rothfield, L. I. (1989). A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. *Cell.* doi:10.1016/0092-8674(89)90586-2.
- De Las Rivas, B., García, J. L., López, R., a García, P. (2002). Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase: The chain-dispersing murein hydrolase. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.184.18.4988-5000.2002.

- de Pedro, M., a Schwarz, U. (1981). Heterogeneity of newly inserted and preexisting murein in the sacculus of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.78.9.5856.
- Donovan, C., Schwaiger, A., Krämer, R., a Bramkamp, M. (2010). Subcellular localization and characterization of the ParAB system from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.00214-10.
- Du, S., a Lutkenhaus, J. (2014). SlmA antagonism of FtsZ assembly employs a two-pronged mechanism like MinCD. *PLoS Genet.* doi:10.1371/journal.pgen.1004460.
- Dworkin, J. (2015). Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* doi:10.1016/j.mib.2015.01.005.
- Eberhardt, A., Wu, L. J., Errington, J., Vollmer, W., a Veening, J. W. (2009). Cellular localization of choline-utilization proteins in *Streptococcus pneumoniae* using novel fluorescent reporter systems. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06872.x.
- Edwards, D. H., Thomaidis, H. B., a Errington, J. (2000). Promiscuous targeting of *Bacillus subtilis* cell division protein DivIVA to division sites in *Escherichia coli* and fission yeast. *EMBO J.* doi:10.1093/emboj/19.112719.
- Echenique, J., Kadioglu, A., Romao, S., Andrew, P. W., a Trombe, M. C. (2004). Protein Serine/Threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* doi:10.1128/IAI.72.4.2434-2437.2004.
- Engholm, D. H., Kilian, M., Goodsell, D. S., Andersen, E. S., a Kjærsgaard, R. S. (2017). A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Rev.* doi:10.1093/femsre/fux037.
- Errington, J., Daniel, R. A., a Scheffers, D.-J. (2003). Cytokinesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* doi:10.1128/mubr.67.1.52-65.2003.
- Eswaramoorthy, P., Erb, M. L., Gregory, J. A., Silverman, J., Pogliano, K., Pogliano, J., et al. (2011). Cellular architecture mediates DivIVA ultrastructure and regulates min activity in *Bacillus subtilis*. *MBio.* doi:10.1128/mBio.00257-11.
- Fadda, D., Pischedda, C., Caldara, F., Whalen, M. B., Anderluzzi, D., Domenici, E., et al. (2003). Characterization of *divIVA* and other genes located in the chromosomal region downstream of the *dcw* cluster in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.185.20.6209-6214.2003.
- Fadda, D., Santona, A., D'Ulisse, V., Ghelardini, P., Ennas, M. G., Whalen, M. B., et al. (2007).

- Streptococcus pneumoniae* DivIVA: Localization and interactions in a MinCD-free context. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.01168-06.
- Falk, S. P., a Weisblum, B. (2013). Phosphorylation of the *Streptococcus pneumoniae* cell wall biosynthesis enzyme MurC by a eukaryotic-like Ser/Thr kinase. *FEMS Microbiol. Lett.* doi:10.1111/1574-6968.12067.
- Feldman, C., a Anderson, R. (2014). Review: Current and new generation pneumococcal vaccines. *J. Infect.* doi:10.1016/j.jinf.2014.06.006.
- Feng, Z., Zhang, J., Xu, D., Jiang, Y. L., Zhou, C. Z., a Chen, Y. (2019). Multi-functional regulator MapZ controls both positioning and timing of FtsZ polymerization. *Biochem. J.* doi:10.1042/BCJ20190138.
- Fenton, A. K., Manuse, S., Flores-Kim, J., Garcia, P. S., Mercy, C., Grangeasse, C., et al. (2018). Phosphorylation-dependent activation of the cell wall synthase PBP2a in *Streptococcus pneumoniae* by MacP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1715218115.
- Fenton, A. K., Mortaji, L. El, Lau, D. T. C., Rudner, D. Z., a Bernhardt, T. G. (2016). CozE is a member of the MreCD complex that directs cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Microbiol.* doi:10.1038/nmicrobiol.2016.237.
- Fiuza, M., Canova, M. J., Zanella-Cléon, I., Becchi, M., Cozzone, A. J., Mateos, L. M., et al. (2008). From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the role of PknA and PknB in cell division. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M802615200.
- Fleurie, A., Cluzel, C., Guiral, S., Freton, C., Galisson, F., Zanella-Cleon, I., et al. (2012). Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07962.x.
- Fleurie, A., Lesterlin, C., Manuse, S., Zhao, C., Cluzel, C., Lavergne, J. P., et al. (2014). MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature.* doi:10.1038/nature13966.
- Giefing, C., Jelencsics, K. E., Gelbmann, D., Senn, B. M., a Nagy, E. (2010). The pneumococcal eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP co-localizes with the cell division apparatus and interacts with FtsZ *in vitro*. *Microbiology.* doi:10.1099/mic.0.036335-0.
- Giefing, C., Meinke, A. L., Hanner, M., Henics, T., Minh, D. B., Gelbmann, D., et al. (2008). Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale

- antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *J. Exp. Med.* doi:10.1084/jem.20071168.
- Glanville, D. G., Han, L., Maule, A. F., Woodacre, A., Thanki, D., Abdullah, I. T., et al. (2018). RitR is an archetype for a novel family of redox sensors in the streptococci that has evolved from two-component response regulators and is required for pneumococcal colonization. *PLoS Pathog.* doi:10.1371/journal.ppat.1007052.
- Gregory, J. A., Becker, E. C., a Pogliano, K. (2008). *Bacillus subtilis* MinC destabilizes FtsZ-rings at new cell poles and contributes to the timing of cell division. *Genes Dev.* doi:10.1101/gad.1732408.
- Haeusser, D. P., a Margolin, W. (2016). Splitsville: Structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring. *Nat. Rev. Microbiol.* doi:10.1038/nrmicro.2016.26.
- Hakenbeck, R., Denapate, D., a Maurer, P. (2012). “Mechanisms of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Targets, gene transfer and mutations.” *Antibiotic Discovery and Development.* doi:10.1007/978-1-4614-1400-1\_18.
- Hausdorff, W. P., Bryant, J., Paradiso, P. R., a Siber, G. R. (2000). Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: Implications for conjugate vaccine formulation and use, Part I. *Clin. Infect. Dis.* doi:10.1086/313608.
- Hempel, A. M., Cantlay, S., Molle, V., Wang, S. B., Naldrett, M. J., Parker, J. L., et al. (2012). The Ser/Thr protein kinase AfsK regulates polar growth and hyphal branching in the filamentous bacteria *Streptomyces*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1207409109.
- Henriques, M. X., Catalão, M. J., Figueiredo, J., Gomes, J. P., a Filipe, S. R. (2013). Construction of improved tools for protein localization studies in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One.* doi:10.1371/journal.pone.0055049.
- Higgins, M. L., a Shockman, G. D. (1970). Model for cell wall growth of *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/jb.101.2.643-648.1970.
- Holečková, N., Doubravová, L., Massidda, O., Molle, V., Buriánková, K., Benada, O., et al. (2014). LocZ is a new cell division protein involved in proper septum placement in *Streptococcus pneumoniae*. *MBio.* doi:10.1128/mBio.01700-14.
- Hoskins, J., Alborn, J., Arnold, J., Blaszcak, L. C., Burgett, S., Dehoff, B. S., et al. (2001). Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.*

- doi:10.1128/JB.183.19.5709-5717.2001.
- Howard, M. B., Ekborg, N. A., Taylor, L. E., Hutcheson, S. W., a Weiner, R. M. (2004). Identification and analysis of polyserine linker domains in prokaryotic proteins with emphasis on the marine bacterium *Microbulbifer degradans*. *Protein Sci.* doi:10.1110/ps.03511604.
- Hsieh, C. W., Lin, T. Y., Lai, H. M., Lin, C. C., Hsieh, T. S., a Shih, Y. L. (2010). Direct MinE-membrane interaction contributes to the proper localization of MinDE in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2958.2009.07006.x.
- Huang, K. C., Meir, Y., and Wingreen, N. S. (2003). Dynamic structures in *Escherichia coli*: Spontaneous formation of MinE rings and MinD polar zones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.2135445100.
- Jacq, M., Arthaud, C., Manuse, S., Mercy, C., Bellard, L., Peters, K., et al. (2018). The cell wall hydrolase Pmp23 is important for assembly and stability of the division ring in *Streptococcus pneumoniae*. *Sci. Rep.* doi:10.1038/s41598-018-25882-y.
- Jarošová, V. (2017). Úloha proteinu Spr1851 *Streptococcus pneumoniae* v buněčném dělení, PřF UK, Praha, Diplomová práce
- Kellenberger, E., Séchaud, J., a Ryter, A. (1959). Electron microscopical studies of phage multiplication. IV. The establishment of the DNA pool of vegetative phage and the maturation of phage particles. *Virology.* doi:10.1016/0042-6822(59)90050-9.
- Kent, J. L., a Hotchkiss, R. D. (1964). Kinetic analysis of multiple, linked recombinations in pneumococcal transformation. *J. Mol. Biol.* doi:10.1016/S0022-2836(64)80209-6.
- Kiekebusch, D., Michie, K. A., Essen, L. O., Löwe, J., a Thanbichler, M. (2012). Localized dimerization and nucleoid binding drive gradient formation by the bacterial cell division inhibitor MipZ. *Mol. Cell.* doi:10.1016/j.molcel.2012.03.004.
- Kjos, M., a Veening, J. W. (2014). Tracking of chromosome dynamics in live *Streptococcus pneumoniae* reveals that transcription promotes chromosome segregation. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/mmi.12517.
- Kleinová, S. (2019): Identifikace nových substrátů Ser/Thr proteinkinázy StkP, PřF UK, Praha, Diplomová práce

- Kozáková, J., Okonji Z., Šebestová H., Křížová P. (2018). Invazivní pneumokokové onemocnění v české republice v roce 2017. Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2018; 27(2): 49–55 (doi není uvedeno).
- Kristich, C. J., Wells, C. L., a Dunny, G. M. (2007). A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in *Enterococcus faecalis* mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.0608742104.
- Kubincová, H. (2017): Kontrola buněčného dělení *Streptococcus pneumoniae* unikátní signální dráhou, PřF UK, Praha, Diplomová práce
- Lacks, S., a Hotchkiss, R. D. (1960). A study of the genetic material determining an enzyme activity in pneumococcus. *BBA - Biochim. Biophys. Acta.* doi:10.1016/0006-3002(60)90205-5.
- Lagousi, T., Basdeki, P., Routsias, J., a Spoulou, V. (2019). Novel protein-based pneumococcal vaccines: Assessing the use of distinct protein fragments instead of full-length proteins as vaccine antigens. *Vaccines.* doi:10.3390/vaccines7010009.
- Lahti, R. (1983). Microbial inorganic pyrophosphatases. *Microbiol. Rev.* doi:10.1128/mmbr.47.2.169-178.1983.
- Lammers, T., a Lavi, S. (2007). Role of type 2C protein phosphatases in growth regulation and in cellular stress signaling. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* doi:10.1080/10409230701693342.
- Land, A. D., Tsui, H. C. T., Kocaoglu, O., Vella, S. A., Shaw, S. L., Keen, S. K., et al. (2013). Requirement of essential Pbp2x and GpsB for septal ring closure in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/mmi.12408.
- Land, A. D., a Winkler, M. E. (2011). The requirement for pneumococcal MreC and MreD is relieved by inactivation of the gene encoding PBP1a. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.05245-11.
- Lara, B., Rico, A. I., Petruzzelli, S., Santona, A., Dumas, J., Biton, J., et al. (2005). Cell division in cocci: Localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA protein. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04432.x.
- Le Bourgeois, P., Bugarel, M., Campo, N., Daveran-Mingot, M. L., Labonté, J., Lanfranchi, D., et al. (2007). The unconventional xer recombination machinery of *Streptococci/Lactococci*. *PLoS Genet.* doi:10.1371/journal.pgen.0030117.
- Le Gouëllec, A., Roux, L., Fadda, D., Massidda, O., Vernet, T., a Zapun, A. (2008). Roles of pneumococcal DivIB in cell division. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.00376-08.

- Lenarcic, R., Halbedel, S., Visser, L., Shaw, M., Wu, L. J., Errington, J., et al. (2009). Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *EMBO J.* doi:10.1038/emboj.2009.129.
- Li, Y., Shao, S., Xu, X., Su, X., Sun, Y., a Wei, S. (2018). MapZ forms a stable ring structure that acts as a nanotrack for FtsZ treadmilling in *Streptococcus mutans*. *ACS Nano.* doi:10.1021/acsnano.8b02469.
- Lo Sapio, M., Hilleringmann, M., Barocchi, M. A., a Moschioni, M. (2012). A novel strategy to over-express and purify homologous proteins from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biotechnol.* doi:10.1016/j.jbiotec.2011.11.011.
- Loose, M., Fischer-Friedrich, E., Herold, C., Kruse, K., a Schwille, P. (2011). Min protein patterns emerge from rapid rebinding and membrane interaction of MinE. *Nat. Struct. Mol. Biol.* doi:10.1038/nsmb.2037.
- Lu, G., a Wang, Y. (2008). Functional diversity of mammalian type 2C protein phosphatase isoforms: New tales from an old family. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04843.x.
- Lutkenhaus, J. (2012). The ParA/MinD family puts things in their place. *Trends Microbiol.* doi:10.1016/j.tim.2012.05.002.
- Ma, L. Y., King, G., a Rothfield, L. (2003). Mapping the MinE site involved in interaction with the MinD division site selection protein of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.185.16.4948-4955.2003.
- Maestro, B., Novaková, L., Heseck, D., Lee, M., Leyva, E., Mobashery, S., et al. (2011). Recognition of peptidoglycan and  $\beta$ -lactam antibiotics by the extracellular domain of the Ser/Thr protein kinase StkP from *Streptococcus pneumoniae*. *FEBS Lett.* doi:10.1016/j.febslet.2010.12.016.
- Maggi, S., Massidda, O., Luzi, G., Fadda, D., Paolozzi, L., a Ghelardini, P. (2008). Division protein interaction web: Identification of a phylogenetically conserved common interactome between *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Microbiology.* doi:10.1099/mic.0.2008/018697-0.
- Manuse, S., Jean, N. L., Guinot, M., Lavergne, J. P., Laguri, C., Bougault, C. M., et al. (2016). Structure-function analysis of the extracellular domain of the pneumococcal cell division site positioning protein MapZ. *Nat. Commun.* doi:10.1038/ncomms12071.



- Marston, A. L., a Errington, J. (1999). Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. *Mol. Microbiol.* doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01450.x.
- Mascarenhas, J., Soppa, J., Strunnikov, A. V., a Graumann, P. L. (2002). Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in *Bacillus subtilis* that interact with SMC protein. *EMBO J.* doi:10.1093/emboj/cdf314.
- Massidda, O., Anderluzzi, D., Friedli, L., a Feger, G. (1998). Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology.* doi:10.1099/00221287-144-11-3069.
- Massidda, O., Nováková, L., a Vollmer, W. (2013). From models to pathogens: How much have we learned about *Streptococcus pneumoniae* cell division? *Environ. Microbiol.* doi:10.1111/1462-2920.12189.
- Masson, S., Kern, T., Le Gouëllec, A., Giustini, C., Simorre, J. P., Callow, P., et al. (2009). Central domain of DivIB caps the C-terminal regions of the FtsL/DivIC coiled-coil rod. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M109.019471.
- McCormick, J. R., Su, E. P., Driks, A., a Losick, R. (1994). Growth and viability of *Streptomyces coelicolor* mutant for the cell division gene *ftsZ*. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2958.1994.tb01285.x.
- Meeske, A. J., Riley, E. P., Robins, W. P., Uehara, T., Mekalanos, J. J., Kahne, D., et al. (2016). SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature.* doi:10.1038/nature19331.
- Mercy, C., Ducret, A., Slager, J., Lavergne, J. P., Freton, C., Nagarajan, S. N., et al. (2019). RocS drives chromosome segregation and nucleoid protection in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Microbiol.* doi:10.1038/s41564-019-0472-z.
- Minnen, A., Attaiech, L., Thon, M., Gruber, S., a Veening, J. W. (2011). SMC is recruited to *oriC* by ParB and promotes chromosome segregation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07722.x.
- Mir, M., Asong, J., Li, X., Cardot, J., Boons, G. J., a Husson, R. N. (2011). The extracytoplasmic domain of the *Mycobacterium tuberculosis* ser/thr kinase PknB binds specific muropeptides and is required for PknB localization. *PLoS Pathog.* doi:10.1371/journal.ppat.1002182.
- Molle, V., Leiba, J., Zanella-Cléon, I., Becchi, M., a Kremer, L. (2010). An improved method to

- unravel phosphoacceptors in Ser/Thr protein kinase-phosphorylated substrates. *Proteomics*. doi:10.1002/pmic.201000316.
- Monahan, L. G., Liew, A. T. F., Bottomley, A. L., a Harry, E. J. (2014). Division site positioning in bacteria: One size does not fit all. *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2014.00019.
- Morlot, C., Noirclerc-Savoie, M., Zapun, A., Dideberg, O., a Vernet, T. (2004). The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03953.x.
- Morlot, C., Pernot, L., Le Gouellec, A., Di Guilmi, A. M., Vernet, T., Dideberg, O., et al. (2005). Crystal structure of a peptidoglycan synthesis regulatory factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M408446200.
- Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O., a Vernet, T. (2003). Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: Localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol. Microbiol.* doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03767.x.
- Morona, J. K., Paton, J. C., Miller, D. C., a Morona, R. (2000). Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01808.x.
- Morrison, D. A., Lacks, S. A., Guild, W. R., a Hageman, J. M. (1983). Isolation and characterization of three new classes of transformation-deficient mutants of *Streptococcus pneumoniae* that are defective in DNA transport and genetic recombination. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/jb.156.1.281-290.1983.
- Muñoz-Dorado, J., Inouye, S., a Inouye, M. (1991). A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell*. doi:10.1016/0092-8674(91)90372-6.
- Mura, A., Fadda, D., Perez, A. J., Danforth, M. L., Musu, D., Rico, A. I., et al. (2017). Roles of the essential protein FtsA in cell growth and division in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.00608-16.
- Noirclerc-Savoie, M., Lantéz, V., Signor, L., Philippe, J., Vernet, T., a Zapun, A. (2013). Reconstitution of membrane protein complexes involved in pneumococcal septal cell wall assembly. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0075522.
- Noirclerc-Savoie, M., Le Gouellec, A., Morlot, C., Dideberg, O., Vernet, T., a Zapun, A. (2005). In vitro reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient

- co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04408.x.
- Nourikyan, J., Kjos, M., Mercy, C., Cluzel, C., Morlot, C., Noiro-Gros, M. F., et al. (2015). Autophosphorylation of the bacterial tyrosine-kinase CpsD connects capsule synthesis with the cell cycle in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Genet.* doi:10.1371/journal.pgen.1005518.
- Nováková, L., Bezoušková, S., Pompach, P., Špidlová, P., Sasková, L., Weiser, J., et al. (2010). Identification of multiple substrates of the StkP Ser/Thr protein kinase in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.01564-09.
- Nováková, L., Sasková, L., Pallová, P., Janeček, J., Novotná, J., Ulrych, A., et al. (2005). Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. *FEBS J.* doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04560.x.
- O'Brien, K. L., Wolfson, L. J., Watt, J. P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., et al. (2009). Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet.* doi:10.1016/S0140-6736(09)61204-6.
- Osaki, M., Arcondéguy, T., Bastide, A., Touriol, C., Prats, H., a Trombe, M. C. (2009). The StkP/PhpP signaling couple in *Streptococcus pneumoniae*: Cellular organization and physiological characterization. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.00196-09.
- Pallová, P. (2007): Dimerizace Ser/Thr proteinkinasy eukaryotního typu *Streptococcus pneumoniae* a charakterizace jejího substrátu, fosfoglukosaminmutasy GlmM, PřF UK, Praha, Disertační práce
- Pallová, P., Hercík, K., Sasková, L., Nováková, L., a Branny, P. (2007). A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP of *Streptococcus pneumoniae* acts as a dimer *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.184.
- Park, K. T., Villar, M. T., Artigues, A., a Lutkenhaus, J. (2017). MinE conformational dynamics regulate membrane binding, MinD interaction, and Min oscillation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1707385114.
- Park, K. T., Wu, W., Battaile, K. P., Lovell, S., Holyoak, T., a Lutkenhaus, J. (2011). The Min oscillator uses MinD-dependent conformational changes in MinE to spatially regulate cytokinesis. *Cell.* doi:10.1016/j.cell.2011.06.042.
- Patrick, J. E., a Kearns, D. B. (2008). MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in

- Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06469.x.
- Pereira, S. F. F., Goss, L., a Dworkin, J. (2011). Eukaryote-like Serine/Threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* doi:10.1128/mmbr.00042-10.
- Perez, A., Cesbron, Y., Shaw, S., Villicana, J. B., Tsui, H.-C., Boersma, M., et al. (2018). Movement dynamics of divisome and penicillin-binding proteins (PBPs) in cells of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* doi:10.1101/429217.
- Perez, A. J., Cesbron, Y., Shaw, S. L., Villicana, J. B., Tsui, H. C. T., Boersma, M. J., et al. (2019). Movement dynamics of divisome proteins and PBP2x: FtsW in cells of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1816018116.
- Pichoff, S., a Lutkenhaus, J. (2005). Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04522.x.
- Piñas, G. E., Reinoso-Vizcaino, N. M., Yandar Barahona, N. Y., Cortes, P. R., Duran, R., Badapanda, C., et al. (2018). Crosstalk between the serine/threonine kinase StkP and the response regulator ComE controls the stress response and intracellular survival of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog.* doi:10.1371/journal.ppat.1007118.
- Pinho, M. G., Kjos, M., a Veening, J. W. (2013). How to get (a)round: Mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* doi:10.1038/nrmicro3088.
- Piotrowski, A., Burghout, P., and Morrison, D. A. (2009). Spr1630 is responsible for the lethality of clpX mutations in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.00285-09.
- Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., a Claverys, J. P. (2006). Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science (80-. )*. doi:10.1126/science.1127912.
- Rajagopal, L., Clancy, A., a 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.* doi:10.1074/jbc.M212747200.
- Rowlett, V. W., a Margolin, W. (2015). The Min system and other nucleoid-independent regulators of Z ring positioning. *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2015.00478.
- Rued, B. E., Zheng, J. J., Mura, A., Tsui, H. C. T., Boersma, M. J., Mazny, J. L., et al. (2017). Suppression and synthetic-lethal genetic relationships of  $\Delta$ gpsB mutations indicate that

- GpsB mediates protein phosphorylation and penicillin-binding protein interactions in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/mmi.13613.
- Sasková, L. (2007): Signalizační proteiny eukaryotického typu a jejich vztah ke kompetenci a virulenci *Streptococcus pneumoniae*, PřF UK, Praha, Disertační práce
- Sasková, L., Nováková, L., Basler, M., a Branny, P. (2007). Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.01616-06.
- Schumacher, D., Bergeler, S., Harms, A., Vonck, J., Huneke-Vogt, S., Frey, E., et al. (2017). The PomXYZ proteins self-organize on the bacterial nucleoid to stimulate cell division. *Dev. Cell.* doi:10.1016/j.devcel.2017.04.011.
- Schumacher, D., a Søgaard-Andersen, L. (2017). Regulation of cell polarity in motility and cell division in *Myxococcus xanthus*. *Annu. Rev. Microbiol.* doi:10.1146/annurev-micro-102215-095415.
- Schumacher, M. A., a Zeng, W. (2016). Structures of the nucleoid occlusion protein SlmA bound to DNA and the C-terminal domain of the cytoskeletal protein FtsZ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1602327113.
- Shah, I. M., Laaberki, M. H., Popham, D. L., a Dworkin, J. (2008). A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell.* doi:10.1016/j.cell.2008.08.039.
- Sham, L. T., Barendt, S. M., Kopecky, K. E., a Winkler, M. E. (2011). Essential PcsB putative peptidoglycan hydrolase interacts with the essential FtsXSpn cell division protein in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1108323108.
- Sham, L. T., Jensen, K. R., Bruce, K. E., a Winkler, M. E. (2013). Involvement of FtsE ATPase and FtsX extracellular loops 1 and 2 in FtsEX-PcsB complex function in cell division of *Streptococcus pneumoniae* D39. *MBio.* doi:10.1128/mBio.00431-13.
- Sharifzadeh, S., Boersma, M. J., Kocaoglu, O., Shokri, A., Brown, C. L., Shirley, J. D., et al. (2017). Novel electrophilic scaffold for imaging of essential penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae*. *ACS Chem. Biol.* doi:10.1021/acscchembio.7b00614.
- Shi, Y. (2009). Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell.* doi:10.1016/j.cell.2009.10.006.

- Silvestroni, A., Jewell, K. A., Lin, W. J., Connelly, J. E., Ivancic, M. M., Tao, W. A., et al. (2009). Identification of serine/threonine kinase substrates in the human pathogen group B *streptococcus*. *J. Proteome Res.* doi:10.1021/pr900069n.
- Slager, J., Kjos, M., Attaiech, L., a Veening, J. W. (2014). Antibiotic-induced replication stress triggers bacterial competence by increasing gene dosage near the origin. *Cell.* doi:10.1016/j.cell.2014.01.068.
- Sliusarenko, O., Heinritz, J., Emonet, T., a Jacobs-Wagner, C. (2011). High-throughput, subpixel precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07579.x.
- Song, J. H., Ko, K. S., Lee, J. Y., Baek, J. Y., Oh, W. S., Yoon, H. S., et al. (2005). Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis. *Mol. Cells.* 19 (3), 365-74. (doi:není uvedeno).
- Stamsås, G. A., Straume, D., Ruud Winther, A., Kjos, M., Frantzen, C. A., a Håvarstein, L. S. (2017). Identification of EloR (Spr1851) as a regulator of cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/mmi.13748.
- Stock, A. M., Robinson, V. L., a Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.183.
- Stouf, M., Meile, J. C., a Cornet, F. (2013). FtsK actively segregates sister chromosomes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1304080110.
- Straume, D., Stamsås, G. A., Berg, K. H., Salehian, Z., a Håvarstein, L. S. (2017). Identification of pneumococcal proteins that are functionally linked to penicillin-binding protein 2b (PBP2b). *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/mmi.13543.
- Sun, X., Ge, F., Xiao, C. Le, Yin, X. F., Ge, R., Zhang, L. H., et al. (2010). Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae*. *J. Proteome Res.* doi:10.1021/pr900612v.
- Sung, C. K., Li, H., Claverys, J. P., a Morrison, D. A. (2001). An *rpsL* cassette, Janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/aem.67.11.5190-5196.2001.
- Szwedziak, P., Wang, Q., Freund, S. M., a Löwe, J. (2012). FtsA forms actin-like protofilaments. *EMBO J.* doi:10.1038/emboj.2012.76.

- Štekerová, N. (2012): Spr0334, nový protein buněčného dělení u *Streptococcus pneumoniae*, PřF UK, Praha, Diplomová práce
- Thanassi, J. A. (2002). Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkf418.
- Thanbichler, M., a Shapiro, L. (2006). MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2006.05.038.
- Tomasz, A. (1997): Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Infect. Dis.* doi: 10.1093/clinids/24.supplement\_1.s85
- Tonthat, N. K., Arold, S. T., Pickering, B. F., Van Dyke, M. W., Liang, S., Lu, Y., et al. (2011). Molecular mechanism by which the nucleoid occlusion factor, SlmA, keeps cytokinesis in check. *EMBO J.* doi:10.1038/emboj.2010.288.
- Tonthat, N. K., Milam, S. L., Chinnam, N., Whitfill, T., Margolin, W., a Schumacher, M. A. (2013). SlmA forms a higher-order structure on DNA that inhibits cytokinetic Z-ring formation over the nucleoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1221036110.
- Traag, B. A., a van Wezel, G. P. (2008). The SsgA-like proteins in actinomycetes: Small proteins up to a big task. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* doi:10.1007/s10482-008-9225-3.
- Treuner-Lange, A., Aguiluz, K., van der Does, C., Gómez-Santos, N., Harms, A., Schumacher, D., et al. (2013). PomZ, a ParA-like protein, regulates Z-ring formation and cell division in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/mmi.12094.
- Tsui, H. C. T., Boersma, M. J., Vella, S. A., Kocaoglu, O., Kuru, E., Peceny, J. K., et al. (2014). Pbp2x localizes separately from Pbp2b and other peptidoglycan synthesis proteins during later stages of cell division of *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/mmi.12745.
- Tsui, H. C. T., Zheng, J. J., Magallon, A. N., Ryan, J. D., Yunck, R., Rued, B. E., et al. (2016). Suppression of a deletion mutation in the gene encoding essential PBP2b reveals a new lytic transglycosylase involved in peripheral peptidoglycan synthesis in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/mmi.13366.
- Ulijasz, A. T., Andes, D. R., Glasner, J. D., a Weisblum, B. (2004). Regulation of iron transport in *Streptococcus pneumoniae* by RitR, an orphan response regulator. *J. Bacteriol.*

- doi:10.1128/JB.186.23.8123-8136.2004.
- Ulijasz, A. T., Falk, S. P., a Weisblum, B. (2009). Phosphorylation of the RitR DNA-binding domain by a Ser-Thr phosphokinase: Implications for global gene regulation in the streptococci. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06532.x.
- Ulrych, A., Holečková, N., Goldová, J., Doubravová, L., Benada, O., Kofroňová, O., et al. (2016). Characterization of pneumococcal Ser/Thr protein phosphatase phpP mutant and identification of a novel PhpP substrate, putative RNA binding protein Jag. *BMC Microbiol.* doi:10.1186/s12866-016-0865-6.
- van Baarle, S., a Bramkamp, M. (2010). The MinCDJ system in *Bacillus subtilis* prevents minicell formation by promoting divisome disassembly. *PLoS One.* doi:10.1371/journal.pone.0009850.
- van den Ent, E. F., a Löwe, J. (2000). Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *EMBO J.* doi:10.1093/emboj/19.20.5300.
- Van Raaphorst, R., Kjos, M., a Veening, J. W. (2017). Chromosome segregation drives division site selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1620608114.
- Vollmer, W., a Bertsche, U. (2008). Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* doi:10.1016/j.bbamem.2007.06.007.
- Weng, L., Biswas, I., a Morrison, D. A. (2009). A self-deleting Cre-lox-ermAM cassette, Cheshire, for marker-less gene deletion in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Microbiol. Methods.* doi:10.1016/j.mimet.2009.10.007.
- Wheeler, R., Mesnage, S., Boneca, I. G., Hobbs, J. K., a Foster, S. J. (2011). Super-resolution microscopy reveals cell wall dynamics and peptidoglycan architecture in ovococcal bacteria. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07871.x.
- Willemse, J., Borst, J. W., De Waal, E., Bisseling, T., a Van Wezel, G. P. (2011). Positive control of cell division: FtsZ is recruited by SsgB during sporulation of *Streptomyces*. *Genes Dev.* doi:10.1101/gad.600211.
- World Health Organization. Pneumonia. (2014). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/> (29.6. 2019).
- Wu, L. J., a Errington, J. (2004). Coordination of cell division and chromosome segregation by a



- nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2004.06.002.
- Wu, L. J., a Errington, J. (2012). Nucleoid occlusion and bacterial cell division. *Nat. Rev. Microbiol.* doi:10.1038/nrmicro2671.
- Wu, L. J., Ishikawa, S., Kawai, Y., Oshima, T., Ogasawara, N., a Errington, J. (2009). Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. *EMBO J.* doi:10.1038/emboj.2009.144.
- Xiang, Z., Li, Z., Zeng, J., Li, Y., a Li, J. (2019). Regulation of cell division in streptococci: Comparing with the model rods. *Curr. Issues Mol. Biol.* doi:10.21775/cimb.032.259.
- Xue, T., Wang, D., Zhang, S., Ehling, J., Ni, F., Jakab, S., et al. (2008). Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and *Arabidopsis*. *BMC Genomics.* doi:10.1186/1471-2164-9-550.
- Yeats, C., Finn, R. D., a Bateman, A. (2002). The PASTA domain: A  $\beta$ -lactam-binding domain. *Trends Biochem. Sci.* doi:10.1016/S0968-0004(02)02164-3.
- Yu, X. C., a Margolin, W. (1999). FtsZ ring clusters in min and partition mutants: Role of both the Min system and the nucleoid in regulating FtsZ ring localization. *Mol. Microbiol.* doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01351.x.
- Zapun, A., Vernet, T., a Pinho, M. G. (2008). The different shapes of cocci. *FEMS Microbiol. Rev.* doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00098.x.
- Zhang, L., Willemsse, J., Claessen, D., a Van Wezel, G. P. (2016). SepG coordinates sporulation-specific cell division and nucleoid organization in *Streptomyces coelicolor*. *Open Biol.* doi:10.1098/rsob.150164.
- Zheng, J. J., Perez, A. J., Tsui, H. C. T., Massidda, O., a Winkler, M. E. (2017). Absence of the KhpA and KhpB (JAG/EloR) RNA-binding proteins suppresses the requirement for PBP2b by overproduction of FtsA in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/mmi.13847.
- Zucchini, L., Mercy, C., Garcia, P. S., Cluzel, C., Gueguen-Chaignon, V., Galisson, F., et al. (2018). PASTA repeats of the protein kinase StkP interconnect cell constriction and separation of *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Microbiol.* doi:10.1038/s41564-017-0069-3.