

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

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie (N1501)

Studijní obor: NGEMOVI (1515T010)



Bc. Jan Keil

Studium unikátní signální dráhy Ser/Thr proteinkinázy StkP a fosfatázy PhpP u
Streptococcus pneumoniae

Study of the unique signaling pathway of Ser/Thr protein kinase StkP and
phosphatase PhpP in *Streptococcus pneumoniae*

Typ závěrečné práce:

Diplomová práce

Vedoucí práce:

RNDr. Aleš Ulrych, Ph.D

Prohlášení:

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

V Praze, DD.MM.RRRR

Podpis:

.....

Poděkování

Děkuji svému školiteli RNDr. Aleši Ulrychovi, Ph.D. za jeho trpělivost, cenné rady a čas, který mi během mého studia věnoval. Společné diskuse i na témata, která přímo nesouvisela s mou prací, mi vždy rozšířila obzory.

Také bych chtěl poděkovat vedoucímu laboratoře RNDr. Pavlu Brannymu, CSc. za možnost pracovat v Laboratoři buněčné signalizace MBÚ AV ČR. Dále děkuji všem svým kolegům, jmenovitě Olivě, Vendy, Bobovi, Kačce, Lindě, Karolíně, Šárce a Sylvii za vytvoření přátelského pracovního kolektivu.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat rodině za podporu během celého studia.

Abstrakt

Významný lidský patogen *Streptococcus pneumoniae* je jedinečným modelem pro studium serin/threoninových proteinkináz eukaryotního typu a jejich příslušných fosfatáz u bakterií, jelikož kóduje pouze jediný signalizační pár složený z proteinkinázy StkP a fosfatázy PhpP. Tento signalizační pár hraje úlohu v řadě buněčných procesů zejména pak v syntéze buněčné stěny a buněčného dělení. Signalizační pár StkP/PhpP nejspíše reguluje složitou síť signalizačních kaskád reverzní fosforylací několika substrátů, z nichž je charakterizována pouze část. Nedávno bylo pomocí MS analýzy identifikováno kolem 90 fosfopeptidů, které jsou potenciálními substráty kinázy StkP a fosfatázy PhpP.

Cílem této diplomové práce byla charakterizace předpokládaného nového substrátu Spr0929 a jeho vlivu na fyziologii pneumokoka. Zkoumána byla morfologie buněk kmenů s odstraněným genem *spr0929* na různých genetických pozadích pneumokoka. Bylo zjištěno, že vliv odstranění tohoto genu na morfologii buněk je kmenově specifický. Porovnáván byl též růst buněk postrádajících gen *spr0929* s divokým typem, a to za různých fyziologických podmínek.

Jelikož protein Spr0929 obsahuje nukleoid-asociovanou doménu NdpA, určení jeho lokalizace v buňce byla též jedním z důležitých cílů práce. Translační fúzi s fluorescenční značkou GFP byla odhalena jeho lokalizace v oblasti bakteriálního nukleoidu.

Získané výsledky také vedly k potvrzení předpokládaného místa fosforylace tohoto proteinu pomocí StkP na threoninu T255. Tuto fosforylací se podařilo potvrdit v *in vitro* i *in vivo* podmínkách.

Celkově výsledky prezentované v této diplomové práci přispívají k rozluštění regulace nové signální kaskády řízené párem StkP/PhpP.

Klíčová slova

Streptococcus pneumoniae, Ser/Thr proteinkináza, buněčná signalizace, fosforylace, Spr0929

Abstract

The major human pathogen *Streptococcus pneumoniae* is a unique model for the study of eukaryotic-type serine/threonine protein kinases and its cognate phosphatases in bacteria, since it encodes only a single signaling pair composed of the StkP protein kinase and PhpP phosphatase. This signaling pair plays a role in several cellular processes, mainly in cell wall biosynthesis and cell division. StkP and PhpP proteins with a pleiotropic effect appear to regulate a complex signaling cascade by phosphorylation of many substrates. However, only a few have been characterized so far. Using MS analysis, we have identified about 90 phosphopeptides that are potential substrates for the StkP kinase and PhpP phosphatase.

This diploma thesis is focused on the characterization of the new substrate Spr0929 and its role in pneumococcal physiology. One of the objectives was to investigate cell morphology of strains carrying deletion of the *spr0929* gene in different genetic backgrounds. It turned out that the role of Spr0929 in cell morphology is strain specific. The growth curves of strains with this deletion were compared to that of the wild type in various physiological conditions as well.

As Spr0929 contains a nucleoid-associated domain called NdpA, determination of its cell localization was an important objective, too. Using translation fusion of Spr0929 with GFP, its localization near bacterial nucleoid was found.

The results obtained also confirmed the assumed phosphorylation site of this protein on threonine 255. StkP-mediated phosphorylation at this site was confirmed in both *in vitro* and *in vivo* conditions.

Taken together, the results presented in this diploma thesis help to decipher the regulation of a new signaling cascade controlled by StkP and PhpP.

Keywords

Streptococcus pneumoniae, Ser/Thr protein kinase, cell signaling, phosphorylation, Spr0929

Obsah

1	Úvod.....	13
2	Literární rešerše	15
2.1	Bakterie <i>Streptococcus pneumoniae</i>	15
2.2	Mechanismy bakteriální buněčné signalizace	17
2.2.1	Dvoukomponentové systémy	18
2.2.1.1	TCS 01 (SirRH)	21
2.2.1.2	TCS 02 (WalRK)	22
2.2.1.3	TCS03 (LiaRS).....	23
2.2.1.4	TCS05 (CiaRH)	24
2.2.1.5	TCS06 (CbpRS).....	25
2.2.1.6	TCS12 (ComDE)	26
2.2.1.7	RR14 (RitR).....	27
2.2.1.8	Ostatní TCS	29
2.2.2	Tyrosinové kinázy.....	30
2.2.2.1	CpsD.....	32
2.2.2.2	UbK.....	33
2.2.3	Kinázy a fosfatázy eukaryotního typu.....	33
2.3	Kináza StkP a fosfatáza PhpP.....	35
2.4	Substráty StkP.....	36
2.5	Protein Spr0929	39
3	Cíle práce	41
4	Materiál a metody.....	42
4.1	Materiály	42
4.1.1	Bakteriální kmeny	42
4.1.1.1	<i>Escherichia coli</i>	42

4.1.1.2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	43
4.1.2	DNA oligonukleotidy	44
4.1.3	Vektory a kazety	46
4.1.4	Chemikálie	48
4.1.5	Kultivační média a půdy.....	49
4.1.6	Pufry a roztoky.....	50
4.1.7	Gely	51
4.1.8	Enzymy.....	51
4.1.9	Protilátky.....	51
4.1.10	Komerční soupravy, standardy a další materiály	52
4.1.11	Laboratorní přístroje.....	53
4.1.12	Software.....	54
4.2	Metody	54
4.2.1	Manipulace s DNA.....	54
4.2.1.1	PCR.....	54
4.2.1.2	Elektroforéza v agarózovém gelu, izolace DNA z gelu	55
4.2.1.3	Izolace chDNA	56
4.2.1.4	Izolace plazmidové DNA	56
4.2.1.5	Štěpení DNA restrikčními endonukleázami.....	56
4.2.1.6	Ligace DNA.....	57
4.2.1.7	Místně specifická mutageneze	57
4.2.1.8	Sekvenace DNA.....	57
4.2.2	Manipulace s proteiny	58
4.2.2.1	Příprava rychlých proteinových lyzátů (SEDS)	58
4.2.2.2	Izolace proteinů mechanickou dezintegrací buněk.....	58
4.2.2.3	Stanovení koncentrace proteinů.....	59
4.2.2.4	Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS	59

4.2.2.5	Přenos proteinů na membránu („Western blot“) a jejich imunodetekce.....	60
4.2.2.6	Purifikace proteinů s FLAGovou kotvou pomocí magnetických kuliček.....	60
4.2.2.7	Exprese rekombinantních proteinů řízená IPTG inducibilním promotorem.....	61
4.2.2.8	Purifikace proteinů s His-Tagovou kotvou	61
4.2.2.9	Dialýza purifikovaných proteinů	62
4.2.2.10	Kinázová reakce <i>in vitro</i>	62
4.2.3	Manipulace s kmeny <i>S. pneumoniae</i>	63
4.2.3.1	Kultivace a tvorba glycerolových konzerv.....	63
4.2.3.2	Transformace DNA.....	63
4.2.3.3	Měření růstových křivek	64
4.2.4	Manipulace s kmeny <i>E. coli</i>	64
4.2.4.1	Kultivace a tvorba glycerolových konzerv.....	64
4.2.4.2	Transformace DNA.....	65
4.2.5	Mikroskopie	65
4.2.5.1	Mikroskopie živých preparátů	65
4.2.5.2	Mikroskopie fixovaných preparátů.....	66
	Výsledky.....	67
4.3	Delece genu <i>spr0929</i>	67
4.4	Růstová charakterizace delečních kmenů	68
4.5	Morfologická charakterizace kmenů s delecí <i>spr0929</i>	70
4.6	Merodiploidní kmeny a komplementace fenotypu WT	73
4.6.1	Nadprodukce proteinu Spr0929	76
	Fyziologické stresy	78
4.6.2	pH stres	78
4.6.3	Teplotní stres.....	80

4.7	Určení lokalizace proteinu Spr0929.....	81
4.7.1	N-koncová fúze s GFP ektopicky exprimována z inducibilního promotoru.....	81
4.7.2	C-koncová fúze s GFP v nativním lokusu.....	85
4.7.3	N-koncová fúze s GFP v nativním lokusu.....	86
4.8	Průkaz fosforylace proteinu Spr0929 kinázou StkP	87
4.8.1	Průkaz fosforylace v podmínkách <i>in vitro</i>	87
4.8.2	Průkaz fosforylace v podmínkách <i>in vivo</i>	89
5	Diskuze	94
6	Souhrn.....	104
7	Seznam použité literatury.....	105

Seznam zkratek

Anti	Protilátka
ASIL	Lyze za podmínek nízkého pH
ATB	Antibiotikum
ATR	Tolerance k nízkému pH
BATCH	Bakteriální dvouhybridní systém
bp	Páry bází
BS	Buněčná stěna
BYK	Tyrosinové kinázy bakteriálního typu
CSP	Kompetenci stimulující peptid
FLAG	FLAG-epitop
g	Tíhové zrychlení
GFP	Zelený fluorescenční protein
HK	Histidinová kináza
chDNA	Chromozomální DNA
IPTG	Syntetický analog laktózy (Isopropyl β - d-1-thiogalaktopyranosid)
KD	Kinázová doména
kDa	Kilodalton
OD ₆₀₀	Optická denzita při vlnové délce 600 nm
PASTA	PBP a STK asociovaná doména
PBP	Penicilin-vazebný protein
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PG	Peptidoglykan
PTM	post-translační modifikace
PTS	fosfotransferázový systém
pZn	Zinkem indukovatelný promotor
RE	Restrikční endonukleázy
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RR	Regulátor odpovědi (Response regulator)
SJK	Sweet Janus kazeta
STK	Serin/threoninová proteinkináza

STP	Serin/threoninová proteinfosfatáza
T255A	Záměna threoninu v pozici 255 za alanin
TCS	Dvoukomponentový systém
TM	Trans-membránový
WT	Divoký kmen

1 Úvod

Všechny živé organismy se vyskytují v neustále se měnícím prostředí. Jejich přežití je dáno schopností tyto změny vnímat a odpovídat na ně změnou v jejich fungování; Ať už jde o změnu exprese proteinů na buněčné úrovni nebo reakci, kterou nazýváme chováním u vyšších organismů, což je koneckonců též důsledkem buněčných procesů, byť jde o mnohem komplexnější odpověď. Buněčná signalizace je proto jedním z fundamentálních procesů, které umožňují existenci života tak, jak ho známe. Obecně jde o mechanismus umožňující přenos informace o změně nějakého stavu od receptoru k efektoru. Přenos bývá zřídka přímý, většinou se jedná o kaskádu biochemických dějů, do které je zapojená celá síť regulačních proteinů. Abychom pochopili fungování organismů, je třeba tyto regulační sítě mapovat.

Způsobů, jak předat signál v rámci kaskády je několik. Mezi nejvýznamnější patří post-translační modifikace (PTM). U eukaryot hraje zásadní roli fosforylace. Po mnoho let se soudilo, že se vyskytuje pouze v této říši. Až na konci sedmdesátých let minulého století byly učiněny první pozorování tohoto jevu i u bakterií. Dnes existuje mnoho studií, dokládajících, že fosforylace hraje důležitou roli v celé řadě buněčných procesů od syntézy peptidoglykanu (PG) buněčné stěny přes regulaci dělicí mašinerie až po regulaci odpovědi na antibiotika a fyziologické stresy.

Fosforylace je v bakteriích zajišťována několika mechanismy, nejrozšířenější jsou dvoukomponentové systémy. Ty se skládají z histidinové sensorové kinázy (HK) monitorující nějaký signál z prostředí a regulátoru odpovědi (Response regulator, RR). Domény RR slouží jako efektor. Vážou se na oblasti DNA, které regulují genovou expresi v reakci na změny ve vnějším prostředí.

Jinou třídou kináz jsou Ser/Thr kinázy a fosfatázy eukaryotního typu. Ty se (jak název napovídá) vyskytují hojně u eukaryot, jejich přítomnost u bakterií byla prokázána později. Bakteriální homology eukaryotického typu Ser/Thr kináz a fosfatáz se v posledních desetiletích ukázaly nezbytné pro některé buněčné funkce, jako je růst, diferenciace, patogenita, odpověď na teplotní stres nebo regulace sekundárního metabolismu.

Jako modelový organismus používá naše laboratoř avirulentní laboratorní kmeny gram-pozitivní bakterie *Streptococcus pneumoniae*. Tato bakterie spadá do taxonu Lactobacillales, kam patří také bakterie mléčného kvašení. Jde o oportunní lidským patogen, u kterého se vyvinula adaptace pro osídlení nového prostředí – lidských sliznic. Díky tomu je významným

patogenem nejen v rozvojovém světě. Kromě potenciálního klinického významu je pneumokok vhodný pro genetické manipulace kvůli schopnosti přirozené kompetence. Hlavním důvodem, proč jej naše laboratoř používá však je, že jeho genom kóduje pouze jeden funkční pár kinázy eukaryotního typu a příslušné fosfatázy: Ser/Thr kinázu StkP a fosfatázu PhpP. A právě popisu kinázy StkP, jejího fungování a substrátů se naše laboratoř věnuje dlouhodobě. Mapování regulačních sítí pneumokoka má význam nejen pro pochopení jeho fungování, ale i pro obecné rozšíření znalostí o roli Ser/Thr kináz eukaryotního typu (nejen) v bakteriální buněčné signalizaci.

2 Literární rešerše

2.1 Bakterie *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae, v literatuře též označovaný jednoduše pneumokok, je grampozitivní bakterie, která se z hlediska vztahu ke kyslíku řadí mezi aerotolerantní anaeroby. Taxonomicky přísluší ke kmeni *Firmicutes*, do třídy *Bacilli*, k řádu *Lactobacillales*, čeledi *Streptococcaceae* a rodu *Streptococcus*. Jeho buňky mají lancetovitý tvar a vyskytují se ve formě koků, diplokoků nebo krátkých řetízků. Pneumokok není schopný sporulace a je nepohyblivý. Je schopen alfa-hemolýzy produkcí H_2O_2 , která způsobuje rozpad červených krvinek a přeměnu hemoglobinu na verdoglobin. Na miskách s krevním agarem je hemolýza zřetelně vidět díky tvorbě žlutohnědého zbarvení v okolí kolonií pneumokoka.

Izolován a popsán byl v roce 1881 nezávisle na sobě dvěma vědci – Georgem Sternbergem a Louisem Pasteurem.

Pneumokok je za normálních podmínek lidský komenzál, je však také významný lidský patogen, který i v dnešní době způsobuje masivní epidemie především v rozvojovém světě. Při infekci může způsobovat řadu vážných zdravotních problémů. Nejčastějším projevem je pneumonie, může však způsobovat i bronchitidu, meningitidu či sepsi. Nejvíce ohroženou skupinou jsou děti. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je pneumonie odpovědná za 15 % všech úmrtí dětí mladších 5 let, což v roce 2017 představovalo celkem 808 694 úmrtí (WHO, 2020). Nebezpečí však představuje pneumokok i pro obyvatele ostatních zemí. Ve vyspělém světě se mezi lety 1980 - 2006 vyskytla průměrně jedna epidemie ročně, především v nemocničních zařízeních (Ihekweazu et al., 2010). Nedávno zavedená vakcína PCV13 (WHO, 2013) toto nebezpečí významným způsobem snižuje (WHO, 2019), problémem je její cena. Zajímavou potenciální alternativou pro rozvojový svět je PNEUMOSIL. Ten loni získal prekvalifikaci od WHO pro široké použití. Měla by to být velmi levná (2 USD za dávku) desetivalentní konjugativní vakcína (Republic et al., 2020).

Obecným problémem všech dnešních vakcín je jejich cílení na nejběžnější povrchové polysacharidy. Ty jsou sice hlavním virulenčním faktorem, jsou ale také specifické pro konkrétní sérotyp. Těch je nyní u pneumokoka identifikováno přes 90 (Hausdorff et al., 2000). Budoucí proteinové vakcíny však možná budou univerzální. Pracuje se například na vakcíně cílící na povrchový PspA protein (Yu et al., 2018). Ve vývoji jsou i další, uvažuje se i o proteinkináze StkP, jakožto cíli v kombinaci s PspA, PcsB a adjuvanten IC31 (Olafsdottir et al., 2012).

Pneumokok je kvůli svému klinickému významu a snadné laboratorní kultivaci využíván jako modelový organismus po velmi dlouhou dobu. Sehrál klíčovou roli v pochopení fungování živých organismů, neboť byl použit ve známém Griffithově experimentu, provedeném v roce 1928. Zde Griffith demonstroval schopnost přenosu tehdy blíže neurčené látky, tzv. „transformačního principu“ z virulentních kmenů usmrcených tepelným šokem, označovaných R do nevirulentních S kmenů. Po infikování myši živým S kmenem inkubovaným s mrtvým R kmenem došlo k jejímu usmrcení. S kmen byl tedy evidentně schopen přijmout nějaký faktor způsobující letalitu. Griffith ve své publikaci vyřkl hypotézu, že oním „transformačním principem“ je protein (Griffith, 1928). Teprve o 16 let později vyšlo najevo, že nosičem genetické informace je DNA (Avery et al., 1944).

Schopnost přijmout za určitých podmínek exogenní DNA je označována jako kompetence. Pneumokok je schopen tzv. přirozené kompetence, tedy má schopnost přijmout DNA z okolí bez umělého zásahu, a to díky celému aparátu proteinů, zodpovědných za transport DNA, homologní rekombinaci a v neposlední řadě regulaci těchto procesů. Kompetence je intenzivně studovaným fenoménem, který je v praxi využitelný pro genetickou manipulaci i pochopení, jak dochází v přirozených podmínkách k horizontálnímu přenosu genů například pro rezistence k antibiotikům či genů virulence. Navození stavu kompetence je možné díky signálnímu „kompetenci stimulujícímu“ peptidu (CSP). Jeho receptor patří ke třídě proteinů označovaných jako dvoukomponentové systémy (two component systems, TCS), jejichž popisu se tato práce také věnuje. Jde o jeden ze dvou nejrozšířenějších způsobů přenosu signálu u bakterií.

Kromě TCS má pneumokok i jednu kinázu eukaryotního typu StkP, která reguluje mnoho procesů, včetně buněčného dělení či syntézy buněčné stěny (BS) a funkčně spjatou fosfatázu PhpP (Nováková et al., 2005). Druhá část této rešerše je věnována popisu StkP a jejích substrátů. Oba tyto systémy přenášejí signál pomocí fosforylace cílových proteinů. Fosfoproteomová analýza kmene D39 odhalila 102 potenciálně fosforylovaných aminokyselinových (AK) zbytků u 85 různých proteinů. Tento počet je mnohem větší než u jiných, běžně studovaných organismů, jako je *E. coli*, *B. subtilis* a *L. lactis* navzdory velikosti genomu pneumokoka, která je srovnatelná s *L. lactis*, je však zhruba poloviční oproti genomům *E. coli* a *B. subtilis* (Sun et al., 2010). Fyziologická funkce těchto fosforylací je ve velké míře neznámá, navíc se na základě nových fosfoproteomových studií daří identifikovat nové substráty StkP a PhpP (Hirschfeld et al., 2020).

Prvním krokem k pochopení molekulárních mechanismů fungování nejen fosforylačních signálních kaskád streptokoka byla úplná sekvenace jeho genomu (Hoskins et al., 2001; Lanie

et al., 2007). Ačkoliv se dnes výzkumem této bakterie zabývá několik laboratorních týmů z celého světa, až 76 % proteinů stále není funkčně charakterizováno. Pro porovnání: nejprostudovanější bakterie *Escherichia coli* má v téže databázi Uniprot (Bateman, 2019) detailní a revidovanou anotaci u 99 % proteinů.

Současný vývoj nových metod molekulární biologie, jako je rozšíření sekvenace genomů a proteomické analýzy přináší nový pohled do vnitřního fungování patogenních bakteriálních druhů, včetně pneumokoka. Tyto informace mohou přinést nové možnosti, jak proti nim zasahovat. Dá se předpokládat, že rozvoj v této oblasti vědy bude pokračovat.

2.2 Mechanismy bakteriální buněčné signalizace

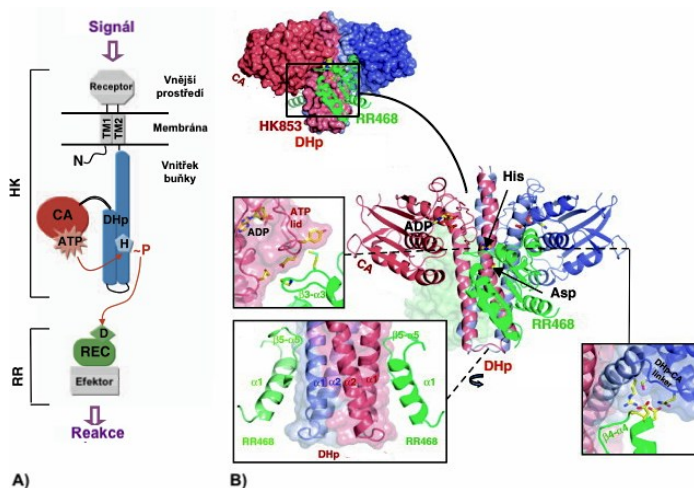
Bakterie jsou ve svém často velmi kompetitivním prostředí neustále v kontaktu s velkým množstvím různých typů molekul, které nesou velké množství informací o jeho stavu a dynamice. Stejně důležité jsou molekuly, které jsou produktem vlastního sekundárního metabolismu. Tyto chemické látky fungují jako stimuly, na které je nutné správným způsobem reagovat. Klíčovou roli v tomto procesu sehrávají systémy signální transdukce, založené na fosforylaci proteinů pomocí kináz. Kinázy fungují jako molekulární „přepínače“ měnící aktivitu proteinů přímo například změnou konformace či nepřímo přes protein-proteinové interakce (Pereira et al., 2011). Již malá úroveň fosforylace může mít fyziologickou funkci, zejména pokud způsobí, že se protein chová jako dominantně negativní, tedy blokuje funkci nefosforylované formy (Dworkin, 2015). První důkazy o fosforylaci u bakterií pocházejí ze 70. let (Garnak & Reeves, 1979). Jsou zde rozšířené a konzervované především dva mechanismy – fosforylace pomocí Ser/Thr kináz (STK) a dvoukomponentové systémy (TCS). Třetím typem jsou BY-kinázy. Jedná se o bakteriální typ tyrozinových **kináz, které** se od eukaryotního typu liší. Čtvrtou skupinou jsou jednokomponentové systémy nesoucí receptorovou i DNA-vazebnou doménu v rámci jednoho proteinu. Dalším mechanismem, který využívá přenos fosfátové skupiny pro účely signální transdukce jsou fosfotransferázové systémy (PTS), které propojují transport sacharidů a buněčnou signalizaci (Stülke & Schmalisch, 2004). Společně tyto mechanismy ovlivňují celou řadu vlastností mikroorganismů včetně virulence, reakce na antibiotika nebo kontroly buněčného dělení. V rámci této rešerše budou blíže představeny především TCS systémy, bakteriální Tyr kinázy a Ser/Thr kinázy eukaryotního typu se zaměřením na výskyt a funkci těchto systémů u pneumokoka.

2.2.1 Dvoukomponentové systémy

Dvoukomponentové systémy (TCS) jsou nejrozšířenějším bakteriálním mechanismem pro přenos signálu (Hoch, 2000). Tento signalizační mechanismus využívá až na některé výjimky většina známých bakteriálních druhů. Mezi tyto výjimky patří například endosymbionti s extrémně redukovaným genomem (Wuichet et al., 2010).

Dvoukomponentový systém má modulární strukturu, je charakteristický přítomností homodimerní membránově-vázané sensorové histidinové kinázy (HK) a cytoplazmatického DNA-vazebného response regulátoru (RR) (A. M. Stock et al., 2000). Existují však i jiná uspořádání kombinující více sensorových domén, které mohou být extracelulární i cytoplazmatické (Wuichet et al., 2010). RR slouží jako efektor a reguluje expresi genů v závislosti na změnách v prostředí. Toto relativně jednoduché uspořádání umožňuje rychlou změnu exprese cílových genů.

Kromě bakteriální říše jsou TCS také čteně zastoupené u archeí, vyskytují se asi u 50% druhů (Wuichet et al., 2010) a nacházejí se i u rostlin a kvasinek. Naproti tomu u živočichů se tento typ signálních kaskád nevyskytuje (Casino et al., 2010). Mezi prokaryotním a eukaryotním typem TCS existují rozdíly v sekvencích. Na rozdíl od bakteriálních TCS jsou HK u eukaryot často hybridní, tj. obsahují domény response regulátorů (A. M. Stock et al., 2000).



Obrázek 1: Struktura TCS.

A: Schéma dvoukomponentového systému s vyznačenými funkčními doménami a jejich buněčnou lokalizací.

B: Struktura TCS s detailním pohledem na místo interakce HK s RR. Převzato a upraveno z (Casino et al., 2010).

Samotné cytoplazmaticky lokalizované jádro kinázy je tvořeno dvěma doménami: konzervovanou C-terminální katalytickou a ATP-vazebnou (CA) doménu s funkcí přenosu fosfátu z ATP na histidin. Tento konzervovaný histidinový zbytek se nachází na druhé, méně

Kináza každého TCS je složena z několika domén. Obsahuje extracelulární signál-rozeznávající doménu nesoucí vazebné místo pro specifickou signální molekulu, transmembránový (TM) region a na něj intracelulárně vázané katalytické kinázové jádro, které je evolučně konzervované a je schopné autofosforylace (Hoch, 2000).

Signál-rozeznávající domény klasifikujeme do více rodin podle jejich 3D struktury a rozeznávaného signálu.

konzervované DHp (dimerizační a histidin fosfotransferázové) doméně – viz **Obrázek 1A** (Gao & Stock, 2009).

Při navázání spouštěcí signální molekuly na receptorovou část HK dojde k hydrolýze ATP a vazbě fosfátu na histidinový zbytek na autofosforylační doméně kinázy, která se tím aktivuje. Následuje přenos fosfátu na asparaginový zbytek N-terminální „reciever“ (REC) domény příslušného RR (Hoch, 2000). Intenzita regulace závisí na množství fosforylace, které je dáno rovnováhou mezi fosforylací a defosforylací. HK funguje často též jako fosfatáza. (Casino et al., 2010). Celý systém tak může fungovat jako smyčka, jejíž funkce je resetována defosforylací (Gao & Stock, 2009).

Podstatný rozdíl mezi fosforylací na histidinu a na esteru (například na serinu nebo threoninu) je stabilita vazby mezi fosfátem a příslušnou AK. Z termodynamického hlediska je fosfo-histidin molekula s vysokou energií, může být tedy snadno defosforylována hydrolýzou (J. B. Stock et al., 1990). Fosfo-histidin je tím pádem vhodný jako intermediát pro přenos fosfátu (Gao & Stock, 2009). Naproti tomu fosfoestery jsou relativně stabilní (J. B. Stock et al., 1990) a je nutné je defosforylovat enzymaticky.

Mechanismus přenosu fosfátu mezi histidinem HK a asparaginem RR spočívá v jejich fyzickém přiblížení (**Obrázek 1B**). Při interakci dochází k sevření helixu 1 DHp domény HK mezi helix 1 a $\beta 5$ - $\alpha 5$ smyčku RR a dojde k přiblížení helixu 2 RR. **Protože** jak kináza, tak RR jsou v tomto komplexu ve formě dimeru, výslednou strukturu tvoří svazek šesti alfa helixů (**Obrázek 1B**). Specifita vazby HK s příslušným RR je dána interakcí specifických AK zbytků v cytoplazmatické části HK a jejich interakčních partnerů na RR, především v helixu 1 a $\beta 5$ - $\alpha 5$ smyčce (Casino et al., 2010). Úloha těchto konkrétních AK zbytků ve specifitě vazby byla dokázána záměnou cytoplazmatické části HK za část jiné kinázy. Tím došlo k propojení původní kinázy s RR kinázy druhé (Skerker et al., 2008).

Fosforylace asparaginu na REC doméně RR vede ke konformační změně a uvolnění této domény z efektorové domény (Hoch, 2000; A. M. Stock et al., 2000). Efektorová doména RR je většinou transkripční regulátor, po uvolnění inhibiční REC domény dochází k její vazbě na cílové místo na DNA a ovlivnění transkripce (Hoch, 2000).

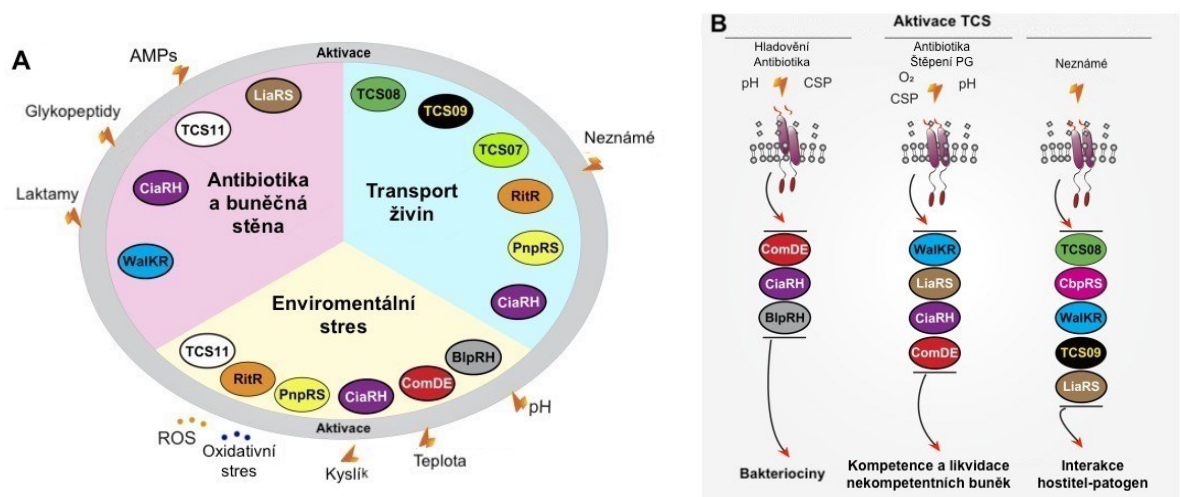
U bakterií, jako je *E. coli* nebo *B. subtilis*, které obsahují několik desítek TCS systémů se ukazuje, že většina těchto systémů vznikla genovou duplikací a mají tedy jednoho nebo několik málo společných předků. Takto duplikované TCS systémy se adaptovaly na vnímání nových signálů a k vazbě regulátorů na nové promotorové oblasti (Hoch, 2000). Například u bacila se dá všech 36 histidinových kináz a 34 response regulátorů klasifikovat do čtyř rodin odvozených

od společného předka. Tato příbuznost je patrná z konzervovaných sekvencí okolo aktivních míst, genové organizace TCS a struktury RR (Fabret et al., 1999).

Zajímavou vlastností TCS je jejich jednoduchost a efektivita. K přenosu signálu stačí jen dvě fosforylační reakce (Zhang, 1996), ačkoli existují i jednodušší jednosložkové systémy. TCS se zřejmě vyvinuly z těchto jednodušších systémů. Jejich výhodou je schopnost vnímat jak extracelulární, tak intracelulární změny (Wuichet et al., 2010).

Protože jsou TCS dobře charakterizovány a sekvence konzervovány, je možné jejich nalezení přímo v sekvenčních datech. U pneumokoka byla dvěma nezávislými skupinami provedena tato analýza u různých kmenů *S pneumoniae* a oba tyto kmény obsahují třináct kompletních TCS systémů a jeden samostatně fungující „sirotčí“ RR (Lange et al., 1999; Throup et al., 2000).

Dále nese pneumokok několik jednokomponentových regulátorů, příkladem může být CcpA regulující metabolismus cukrů a virulenci (Iyer et al., 2005), či MgrA podílející se na regulaci virulence (Hemsley et al., 2003).



Obrázek 2: Rozdělení pneumokokových TCS. A: Podle faktorů vnějšího prostředí. B: podle spouštěné funkce. Převzato a upraveno z (Gómez-Mejía, Gámez, & Hammerschmidt, 2018).

Co se týče genové organizace, TCS systémy jsou kódovány po celé délce genomu (jejich číslování není chronologické) a to na obou vláknech DNA (Lange et al., 1999). Geny kinázy jsou v operonu s příslušným response regulátorem v pořadí HK-RR i RR-HK. Navíc je operon TCS ve většině případů lokalizován v blízkosti promotorových oblastí, jejichž aktivitu reguluje. (Gómez-Mejía, Gámez, & Hammerschmidt, 2018).

Zajímavou vlastností TCS systémů je jejich vzájemná provázanost. Kmeny nesoucí mutaci nebo delecii v genu pro nějakou komponentu TCS mají často ovlivněnou funkci jiného TCS. To ukazuje na interakci mezi jednotlivými regulačními mechanismy a celkově vysokou komplexitu regulace genové exprese u pneumokoka (Hakenbeck & Chhatwal, 2007).

Pneumokokové TCS systémy regulují rozmanitou škálu buněčných procesů, většinou v závislosti na faktorech vnějšího prostředí. Tyto faktory lze rozdělit do třech základních skupin (viz **Obrázek 2A**). TCS je možné rozdělit na základě fyziologických funkcí, které ovládají v závislosti na tyto vnější stimuly – viz **Obrázek 2B** (Gómez-Mejia, Gámez, & Hammerschmidt, 2018). Jednotlivé TCS systémy pneumokoka nyní budou popsány podrobněji.

2.2.1.1 TCS 01 (SirRH)

TCS01 kódovaný genem *spr1473* pro HK a *spr1474* pro RR je systém, u něhož byla předpokládána role ve virulenci již od jeho identifikace v sekvenci (Throup et al., 2000). Nicméně až do nedávna zůstával tento dvoukomponentový systém pneumokoka nejméně charakterizovaný. Studie z minulého roku odhalila jeho klíčivou roli v kooperaci s virem chřipky IAV (Reinoso-Vizcaíno et al., 2020). Za celou řadu úmrtí v epidemiích chřipky jsou zodpovědné sekundární bakteriální infekce a pneumokok patří v tomto ohledu k největším zabijákům. Kolem 34% úmrtí v epidemii chřipky v roce 2009 mají na svědomí právě sekundární infekce bakteriemi *S. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes* (Chertow & Memoli, 2013).

Ačkoliv je *S. pneumoniae* běžně vnímán jako extracelulární patogen, byla popsána jeho schopnost replikace v intracelulárním prostředí makrofágů, která se považuje za důvod rozvoje septikémie u některých pacientů (Ercoli et al., 2018). Tato schopnost přežití není kmenově specifická (Reinoso-Vizcaíno et al., 2020).

Reinoso-Vizcaíno a kol. dokázali, že společná infekce pneumokoka a virem chřipky typu A (konkrétně H1N1) vede u pneumokoka k vyšší míře přežití v plicních buňkách a že zde hraje roli SirRH. Podle autorů studie slouží SirRH jako senzor stresových podmínek vyvolaných přítomností viru a spouští systém adaptivní odpovědi na tyto podmínky. Pomocí komparativní transkriptomické analýzy metodou RNAseq byly odhaleny rozdíly v expresi 179 genů mezi WT a kmenem s $\Delta sirR$. Mezi tyto geny patří i gen *clpL* pro chaperon a gen *psaB* kódující Mn^{+2} transporter. Oba tyto geny se podílí na stresové odpovědi. Kmeny nesoucí mutace $\Delta sirR \Delta clpL$ a $\Delta psaB$ vykazovaly zvýšenou citlivost k nižšímu pH a nižší míru intracelulárního přežití. SirR také reguluje odpověď na oxidativní stres.

2.2.1.2 TCS 02 (WalRK)

Tento dvoukomponentový systém s alternativním označením MicAB, VicRK či YycGF (Dubrac et al., 2008) je na chromozomu kódován geny *spr1106* a *spr1107*. Jedná se o jediný esenciální TCS pneumokoka (Kadioglu et al., 2003). Jeho homology se nacházejí u více bakteriálních druhů patřících do *Firmicutes*, poprvé byl popsán u *Bacillus subtilis* (Fabret et al., 1999). Vzhledem k jeho esencialitě se jedná o zajímavý cíl pro budoucí léčiva. Slibnými kandidáty jsou deriváty benzamidu, furanu, pyrimidinonu a imidazolu (Hirakawa et al., 2020)

U pneumokoka byl pozorován vliv WalRK systému na limitaci transkripce kompetenčních genů. Přestože však kmeny nesoucí nulové mutace genů pro WalRK měly zvýšenou expresi kompetenčních genů, nebyly schopny přirozené kompetence (J. R. Echenique & Trombe, 2001). Později bylo zjištěno, že blokování kompetence je přímo způsobeno fosforylací RR02. Jeho množství v buňce má vliv na morfologii a expresi několika genů (Ng et al., 2003). Gen pro mureinovou hydrolázu PcsB je jedním z nich. Dimer PcsB štěpí BS při separaci dceřiných buněk. Tato funkce je esenciální, což vysvětluje jak esencialitu WalRK, tak změny v morfologii při změně hladině exprese RR02. Za správnou lokalizaci hydrolázy odpovídá protein buněčného dělení FtsX (Bartual et al., 2014).

Kmen nesoucí delecii v genu *walR* je možné připravit vložením esenciálního genu *pcsB* za syntetický promotor. Microarray analýza srovnávající WT a $\Delta walR$ kmeny ukazuje na silnou pozitivní regulaci exprese několika dalších proteinů, mezi nimiž je virulenční faktor PspA. Ten je schopen mírnit imunitní reakci hostitele tlumením aktivace imunitního komplementu (Tu et al., 1999). Tři další proteiny nejsou popsány – jeden je membránový (Spr0709) a dva (Spr0096 a Spr1875) obsahují PG-vazebnou doménu LysM (Ng et al., 2005).

V *Bacillus subtilis* je WalRK systém pod kontrolou Ser/Thr kinázy eukaryotního typu PrkC (Libby et al., 2015), která je funkčním homologem kinázy StkP u pneumokoka. WalK a StkP interagují skrze své transmembránové domény. Naznačují to výsledky analýzy protein-proteinových interakcí zkrácených forem těchto proteinů metodou BATCH (bacterial adenylate cyclase two-hybrid system) (Stamsås, Straume, Salehian, et al., 2017). Přímá fosforylace kinázou je doposud nepublikovaným výsledkem naší laboratoře.

Operon pro WalRK systém podléhá jisté formě autoregulace. Při zavedení druhé kopie genu pro WalR pod inducibilním promotorem a zvýšení exprese dochází též ke zvýšení exprese kinázy WalK. Nadprodukce pak má za následek změnu exprese genů zodpovědných za biosyntézu mastných kyselin a změny v zastoupení mastných kyselin v cytoplazmatické membráně ve prospěch těch s delším řetězcem (M. Luz Mohedano et al., 2005). Později bylo zjištěno, že nefosforylovaná forma RR02 inhibuje expresi represoru biosyntézy mastných

kyselin FabT (Maria L. Mohedano et al., 2016). WalRK tedy ovlivňuje fluiditu a integritu membrány.

2.2.1.3 TCS03 (LiaRS)

Tento TCS je široce konzervovaný, nachází se ve většině bakterií kmene *Firmicutes* (Mascher, 2006). Jeho funkce byla poprvé popsána u *Bacillus subtilis*, kde byla doložena jeho role ve vnímání stresu buněčné stěny a odpovědi na něj. Součástí tohoto systému je pomocný protein LiaF, který za standartních podmínek blokuje funkci kinázy LiaS. Někdy je tento systém označován jako trojkomponentový – LiaFSR. U *Bacillus sp.* bylo dokázáno, že dochází k jeho uvolnění z komplexu v přítomnosti enzymů štěpících peptidoglykan (Jordan et al., 2006). Všechny doposud identifikované systémy typu LiaFSR jsou aktivovány látkami narušujícími integritu buněčných obalů (Mascher, 2006).

U pneumokoka je LiaRS kódován sousedními geny *spr0343* a *spr0344*. Hraje zde roli v ochraně před antibiotiky, ale také se podílí na přirozené kompetenci (Eldholm et al., 2010).

Během procesu přirozené kompetence dochází u pneumokoka k procesu tzv. „bratrovraždy“. Kompetentní buňky uvolňují do svého okolí mureinové hydrolázy LytA, CbpD a LytC, které napadají BS subpopulace nekompetentních buněk. DNA uvolněná z lyzovaých buněk může být následně převzata kompetentními bakteriemi (Kietzman & Rosch, 2015). Kompetentní buňky produkují tzv. imunitní protein ComM, který je chrání před lyzí hydrolázami (Håvarstein et al., 2006). TCS03 se významně podílí na ochraně buněk před lyzí v procesu bratrovraždy. V kmeni s odstraněným genem pro ComM byla funkce LiaRS systému aktivována ve stavu kompetence přítomností mureinových hydroláz CbpD, LytA a LytC. Na protektivní roli v kompetenci poukazuje i fakt, že kmeny s absencí LiaR měly při kompetenci významně sníženou životaschopnost (Eldholm et al., 2010).

Jako aktivátory stresové odpovědi spouštěné TCS03 byly identifikovány také antibiotika cílicí na syntézu prekurzoru buněčné stěny – lipidu II. Na rozdíl od jeho homologů však na jejich přítomnost neodpovídá aktivací genů pro rezistenci (Eldholm et al., 2010).

Pomocí microarray analýzy byly identifikovány geny, které LiaRS ovlivňuje. Produkty tří z nich (*hrcA*, *grpE* a *spr0810*) jsou zodpovědné za odpovědi na různé typy stresů (Eldholm et al., 2010). Například HrcA inhibuje expresi genů kódujících proteiny DnaK a GroEL. Tyto chaperony zabezpečují správné sbalení proteinů a umožňují tak přežití buněk za podmínek teplotních a jiných environmentálních stresů (Jayaraman et al., 1997).

Celkově se zdá, že mureinové hydrolázy aktivní v mechanismu bratrovraždy vyvolávají stresovou odpověď. TCS03 je nejspíše adaptací klasických stresových TCS, které regulují

expresi genů pro uvolnění tohoto stresu u kompetentních buněk. Současně poskytuje alternativní způsob obrany před autolýzou, nezávislý na imunitním proteinu ComM (Eldholm et al., 2010).

U kmene TIGR4 byla zjištěno, že TCS03 negativně reguluje expresi *rlrA* lokusu, který je jedním z ostrovů patogenicity získaných některými kmeny rekombinací. Tento lokus dává vzniknout pilusu (Rosch et al., 2008). Kromě toho je pod pozitivní regulací TCS03 systému také proteáza CbpG podílející se na adherenci.

2.2.1.4 TCS05 (CiaRH)

Tento TCS patří spolu s TCS02 a TCS12 k nejlépe prostudovaným systémům jak v pneumokokovi, tak ve *Firmicutes* obecně (Kietzman & Rosch, 2015). U pneumokoka jej kódují geny *spr0708* pro kinázu CiaH a *spr0707* pro RR CiaR. CiaRH systém je zásadní pro regulaci stresové odpovědi při pH stresu.

Reakce na podmínky nízkého pH může být různá. Pneumokok může spustit lyzi, což je mechanismus označovaný jako acidic stress-induced lysis (ASIL). ASIL mechanismus je dán činností hydroláz PG, především autolysinu LytA a v laboratorních podmínkách k němu dochází při kultivaci pneumokoka při pH 5.9 po více než hodinu (Piñas et al., 2008). Alternativou je přežití pomocí tzv. „acid tolerance response“ (ATR) strategie (Martín-Galiano et al., 2005). Malá část buněk pneumokoka je schopná díky této reakci po kultivaci v subletálním pH 6,6 až 5,8 přežít i letální pH 4,4. Jak ve fázi přežívání při takto nízkém pH, tak ve fázi adaptace na pH mírněji kyselém dochází k významné změně expresního profilu pneumokoka. Exprese je posílená například u genů kódující chaperony nebo některé transportní systémy. Ve fázi přežívání extrémně nízkého pH je exprese většiny genů snížena (Martín-Galiano et al., 2005).

Na regulaci procesů ASIL i ATR, se podílí dva TCS pneumokoka – CiaRH a ComDE, který je v rámci této práce popsán později. Tyto dva systémy jdou v regulaci *lytA* a mechanismu přežití nebo lyze „proti sobě“. CiaRH je esenciální pro spuštění ATR odpovědi a přežití, zatímco ComE ji tlumí. Pro odpověď ASIL mechanismem platí pravý opak (Cortes et al., 2015).

Pro odpověď na stres vzniklý kyselým pH je zásadní též F_0F_1 -ATPáza. Inhibice této protonové pumpy vede k posílení ASIL mechanismu a naopak k represí ATR odpovědi nezávisle na TCS signalizaci (Cortes et al., 2015).

Stejně jako u odpovědi na pH stres jsou i v regulaci kompetence ComDE a CiaRH antagonisté. HtrA proteáza regulovaná CiaRH inhibuje kompetenci (Sebert et al., 2005). Kromě toho hraje klíčovou roli ve schopnosti pneumokoka kolonizovat nosohltan (Sebert et al., 2002).

Při genetické analýze kmene C306 vykazujícího rezistenci k β -laktamovému antibiotiku cefotaximu a současně neschopnost přirozené kompetence byl jako determinant tohoto fenotypu identifikován DNA fragment nesoucí právě lokus s geny pro TCS05. Bodové záměny způsobující tento fenotyp se nacházely v C-terminální části CiaH. Mutace brání produkci CSP a ani uměle dodané CSP neobnovilo kompetenci (Guenzi et al., 1994).

Studie identifikující CiaR vazebná místa v genomu odhalila celkem 26 cílových míst. Mezi nimi byly geny důležité pro syntézu a modifikaci polymerů BS, geny pro produkci feromonů a bacteriocinů a region *htrA-sop0J*. Některé operony pod kontrolou CiaRH jsou exprimovány pouze v určité fázi buněčného cyklu. Například *dlt* a *lic*, kódující enzymy metabolismu teichoových kyselin, jsou exprimovány pouze v pozdní exponenciální fázi růstu (Mascher et al., 2003).

CiaR také kontroluje expresi pěti malých nekódujících RNA (Halfmann et al., 2007). Vliv tohoto TCS na kompetenci může být založen na tomto nepřímém mechanismu (Schnorpfeil et al., 2013).

2.2.1.5 TCS06 (CbpRS)

Tento TCS je důležitý pro virulenci, jeho konkrétní mechanismus fungování je však kmenově specifický.

CbpRS se společně s TCS03 podílí u kmene TIGR4 na expresi genů pro vznik pilusu. (Rosch et al., 2008). Geny pro CbpRS (*spr1997* pro kinázu CbpS a *spr1998* pro její RR) jsou na chromozomu lokalizovány před genem pro adhezín CbpA (choline binding protein A). Tento důležitý virulenní faktor je jedním z hlavních adhezínů pneumokoka. Je schopen se vázat na extracelulární a sekreční komponentu pIgR receptoru na epitelálních buňkách dýchacích cest (Hammerschmidt et al., 1997). CbpA je v kmeni D39 pod pozitivní regulací tohoto TCS. Delecí RR06 dojde ke ztrátě CbpA, což způsobí snížení schopnosti adheze (Standish et al., 2005). Naproti tomu u kmene TIGR4 nulová mutace RR06 expresi CbpA neovlivňuje. Nadprodukce *rr06* u obou kmenů vede k nadprodukci CbpA (Standish et al., 2007).

Dalším adhezínem regulovaným částečně pomocí CbpRS je PspA. Na rozdíl od WalRK systému ovlivňuje jeho expresi negativní regulací (Standish et al., 2007).

CbpRS také reguluje aktivitu genu kódujícího protein Gls24 podílející se na odpovědi na alkalický stres (Standish et al., 2007) a genu *spr1996*, kódující protein s doposud neznámou funkcí (Ma & Zhang, 2007).

Aktivita CbpRS je modulována fosforylací svou HK06 kinázou na Asp51. Kromě toho může být CbpR (RR06) fosforylovaný na threoninu Ser/Thr kinázou StkP. Takto fosforylovaný se váže na *cbpA* promotor i bez fosforylace pomocí HK06 (Agarwal et al., 2012).

2.2.1.6 TCS12 (ComDE)

Kináza ComD je kódována genem *spr2042*, gen pro regulátor ComE se nachází před tímto genem. Sekvence DNA obou genů obsahuje nezvykle nízký počet GC párů. Tato odchylka od průměrné hodnoty může ukazovat na horizontální přenos těchto genů z bakteriálních druhů s nižším zastoupením GC párů v genomu (Lange et al., 1999).

Tento TCS se, stejně jako TCS05, podílí na regulaci kompetence. Mezi faktory ovlivňující kompetenci je kromě pH důležitá přítomnost kyslíku, která na transkripční úrovni ovlivňuje množství ComE. Zatímco přítomnost kyslíku zvyšuje transkripci genu *comE*, CiaRH systém působí přesně opačně. TCS05 je tedy funkčním komplementem TCS12 (José R. Echenique et al., 2000).

Celý proces navození stavu kompetence je řízen mechanismem zvaným quorum sensing (QS). Jak bylo zmíněno výše, stav kompetence navozuje přítomnost kompetenci stimulujícího peptidu (CSP), což je feromon kódovaný genem *comC*. Autoinduktor kompetence CSP je 17 aminokyselin dlouhý peptid, který je po syntéze a sestřihu sekretován pomocí ABC transportéru ComA a transportního proteinu ComB (Håvarstein et al., 1995). Část populace buněk začne vylučovat CSP při dosažení určité OD v exponenciální fázi růstu (Håvarstein et al., 1995, 1996). Přítomnost CSP v okolí buněk pneumokoka je vnímána kinázou ComD (Håvarstein et al., 1996). Takto aktivovaná kináza ComD fosforyluje RR ComE, který se váže na specifické neúplně přímé repetitivní sekvence promotorů pro časné geny kompetence. Tyto vazebné motivy jsou v rámci různých druhů streptokoka evolučně konzervovány. Celkem je takto regulována exprese okolo 20 časných genů kompetence. Mezi cílové operony patří ComAB a ComCDE, celý mechanismus tedy funguje na principu pozitivní zpětné vazby (Ween et al., 1999). Mezi časné geny kompetence patří i výše zmíněný imunitní protein ComM, který chrání buňky před účinky hydroláz BS, viz **Kapitola 2.2.1.3**. Dále RR12 aktivuje expresi alternativního sigma faktoru σ^X . Gen *comX* kódující tento sigma faktor je u pneumokoka ve dvou identických kopiích (Peterson et al., 2004). Ke stabilizaci ComX, jeho ochraně před proteolýzou a jeho plnému fungování je třeba protein ComW, jehož exprese není závislá na sigma faktoru σ^X (Chang & Morrison, 2005). ComX mění specifitu RNA polymerázy k promotorům a dochází tak k přepisu pozdních genů kompetence.

Celkově bylo na základě microarray analýz zjištěna změna exprese u 188 genů působením CSP. 23 z nich je nezbytných pro transformaci. Mezi produkty těchto genů jsou proteiny pro příjem DNA z okolí, její opravu a proces homologní rekombinace (Peterson et al., 2004).

Kromě regulace kompetence se ComDE systém podílí i na jiných procesech. Jak již bylo zmíněno v sekci o CiaRH, společně s ním reguluje ComDE odpověď na stresové podmínky vyvolané nízkým pH. Kromě aktivace ComE kinázou ComD existuje alternativní způsob prostřednictvím jeho fosforylace proteinkinázou StkP. Podrobnějšímu popisu substrátů této kinázy se věnuje samostatná kapitola této práce. StkP rovněž zvyšuje afinitu ComE k cílové DNA za podmínek pH stresu. Výsledkem je regulace transkripce 104 genů hrajících roli v mnoha buněčných procesech (Piñas et al., 2018).

Pod kontrolou ComDE je též operon *cinA-recA-dinF-lytA*, který je přepisován v přítomnosti CSP. Jeho součástí je i gen pro výše zmíněný autolysin LytA, který v podmínkách kompetence zajišťuje uvolnění DNA do okolí (Dagkessamanskaia et al., 2004). Existuje však i dráha aktivace transkripce LytA, která je nezávislá na CSP. Samotný ComE může nejspíš sloužit jako senzor kyselého pH. (Piñas et al., 2008).

ComDE se podílí také na intracelulárním přežití pneumokoka v buňkách plic (Cortes et al., 2015). Již zmíněná fosforylace StkP kinázou k tomuto přežívání přispívá modulací produkce H₂O₂ a tolerance k němu (Piñas et al., 2018).

2.2.1.7 RR14 (RitR)

Regulátor RitR (repressor of iron transport) je jediný response regulátor pneumokoka, ke kterému není v genomu těsně přilehlá HK. Navíc žádná jiná HK pneumokoka jej nefosforyluje. Namísto toho je jeho gen *spr0336* v operonu s genem *gnd* kódující 6-fosfoglukonát dehydrogenázu (Ulijasz et al., 2004). Jedná se tedy o tzv. sirotčí RR.

Konzervovaný aspartát REC domény, který je klíčový pro aktivaci přijetím fosfátu je u RitR zaměněn za asparagin (Ulijasz et al., 2009). To je nejspíš i důvodem, proč se RitR nevyskytuje za standartních podmínek v dimerické formě na rozdíl od jiných RR (Glanville et al., 2018). K jeho aktivaci tedy dochází jiným mechanismem. V *in vitro* podmínkách bylo prokázáno, že kináza StkP fosforyluje RitR uvnitř jeho DNA-vazebné domény a že RitR interaguje s fosfatázou PhpP (Ulijasz et al., 2009).

Cílovými vazebnými místy na DNA jsou tři regiony v promotoru *piu*, jehož transkripci reprimuje. Tento operon kóduje ABC transportér PiuABC zodpovědný za příjem železa a regulaci jeho množství v cytoplazmě (Ulijasz et al., 2004). Mezi StkP a PhpP dochází k vazebné kompetici a StkP narušuje funkční komplex RitR-PhpP-*piu* (Ulijasz et al., 2009). Železo je pro

bakteriální buňku důležitým prvkem, může však být nebezpečné kvůli tzv. Fentonově reakci, kdy reaguje s peroxidem vodíku za vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS). Peroxid vodíku vzniká u pneumokoka ve velkém množství kvůli činnosti enzymu pyruvát oxidázy SpxB, jednoho z virulencních faktorů, umožňujícího kolonizaci plic (Orihuela et al., 2004).

Přestože PhpP a potažmo StkP jsou důležité pro regulaci transkripce z *piu* operonu, fosforylace nemá zásadní vliv na aktivaci RitR. Signálem pro tuto aktivaci se ukázala být právě přítomnost oxidativního stresu (Ulijasz et al., 2004).

RitR zamezuje vzniku škodlivých ROS několika mechanismy. Omezuje příjem železa, a naopak aktivuje příjem manganu, který funguje jako antioxidant (Ong et al., 2013). Navíc exprese *gnd* vede ke vzniku NADPH, které vzniká činností enzymu 6-fosfoglukonát dehydrogenázy a které generuje redoxní potenciál (Gómez-Mejia, Gámez, & Hammerschmidt, 2018).

Doposud nejnovější studie zabývající se RitR odhalila unikátní mechanismus, jakým způsobem probíhá vnímání redoxního stavu tímto RR. Klíčovou aminokyselinou se ukázal být cystein v pozici 128, nacházející se ve flexibilní linker doméně umístěné mezi REC a DNA-vazebnou doménou. Tento cystein je nezbytný i pro kolonizaci horních dýchacích cest. Jeho mutace za alanin (stejně jako úplná delece RitR) též zpomaluje růst. Tento AK zbytek je důležitý pro dimerizaci RitR v přítomnosti H₂O₂ a vazbu na *piu* promotor. Dimerizaci může způsobit i přítomnost kyslíku. Oxidace Cys128 vede k rozpuštění lokální alfa-helikální struktury a vzniku disulfidického můstku umožňujícího odkrytí DNA-vazebné domény a vazbu na DNA (Glanville et al., 2018).

Nejbližším homologem RitR je klasický response regulátor CovR (control of virulence), který je součástí TCS u několika druhů streptokoků (*S. pneumoniae* tento TCS nekóduje), kde reprimuje transkripci některých operonů virulence (Federle et al., 1999). U části druhů došlo ke změně sekvence v linker doméně. Fylogenetický strom streptokoka dokládá, že šlo o unikátní evoluční událost, kdy došlo k funkčnímu osamostatnění RitR. Namísto dimerizace působením fosforylace HK začal být aktivován samostatně oxidací Cys128 peroxidem vodíku (Glanville et al., 2018).

Na základě analýz DNA sekvencí jiných bakteriálních druhů bylo zjištěno, že mnoho proteinů s REC doménou obsahuje podobně umístěný cystein, jako tomu je u RitR. Je tedy možné, že RitR představuje pouze první popsany senzor redoxního stavu tohoto typu a tento mechanismus může být rozšířen napříč bakteriálními druhy (Glanville et al., 2018).

2.2.1.8 Ostatní TCS

TCS04 (PnpRS) řídí expresi povrchového antigenu PsaA a podílí se na expresi virulenčních genů (McCluskey et al., 2004). PsaA je lipoproteinová komponenta ABC transportéru Mn^{2+} . Mangan přispívá k odbourávání ROS při oxidativním stresu (Johnston et al., 2004). Regulace virulence je kmenově specifická. U třech různých laboratorních kmenů byla pomocí komparativní microarray analýzy zjištěna regulace exprese odlišných genů a s tím související rozdílný efekt na virulenci. Při absenci RR04 dochází u kmene TIGR4 k výraznému útlumu virulence, kmen D39 vykazuje její částečnou ztrátu, zatímco u sérotypu 3 nebyl pozorován významný rozdíl (McCluskey et al., 2004).

Pneumokok postrádá genetickou výbavu pro Krebsův cyklus, přesto jsou některé druhy schopny růst v podmínkách s nedostatkem sacharidů. Namísto metabolické přeměny spoléhají na transport těchto látek od hostitele. TCS07 je klíčový v tomto procesu. Signálem pro aktivaci HK07 jsou cukerné řetězce glykoproteinů hostitele. RR07 aktivuje expresi enzymů pro štěpení těchto struktur, transport uvolněných glykanů do buňky a jejich katabolismus. Tato funkce je u druhů, které využívají glykany hostitele, konzervovaná (Andreassen et al., 2020). TCS07 také sehrává roli ve virulenci (Throup et al., 2000), což bylo v *in vivo* podmínkách potvrzeno na myším modelu (Andreassen et al., 2020). Společně s TCS12 je pravděpodobně regulován jednokomponentovým globálním regulátorem CcpA (Carvalho et al., 2011).

Už základní charakterizace TCS u pneumokoka odhalila, že TCS08 je důležitý pro virulenci (Throup et al., 2000). Později bylo zjištěno, že reguluje expresi cellobiózového operonu (McKessar & Hakenbeck, 2007). Role ve virulenci je kmenově specifická a spočívá v regulaci exprese několika operonů včetně dříve zmíněného *psa* operonu, *pilus-1* operonu u TIGR4 kmene či adhezinu PavB, jehož gen leží v blízkosti operonu *tcs08*. Celkově sehrává TCS08 roli v adaptaci pneumokoka na prostředí dýchacích cest při kolonizaci (Gómez-Mejía, Gámez, Hirschmann, et al., 2018).

Regulace genové exprese TCS09 systémem je kmenově specifická. Na rozdíl od TIGR4 kmene je u D39 ovlivňována exprese kompetenčních genů a genů pro fosfotransferázové systémy důležité pro příjem cukrů (Hendriksen et al., 2007). Tento TCS reguluje transkripci 67 genů, nejvýraznější změna byla zaznamenána u *aga* operonu pro metabolismus galaktózy. Delece HK09 se pak skutečně projevuje zpomalením růstu na galaktóze. Byla zjištěna též změna syntézy kapsulárních polysacharidů u opouzdřených kmenů. Kontrola metabolismu cukrů pomocí TCS09 vede nejspíše nepřímo i k odolnosti vůči oxidativnímu stresu, a to díky vlivu na integritu buněčné stěny (Hirschmann et al., 2021).

TCS10, označovaný též jako VncRS byl dáván do souvislosti s rezistencí pneumokoka k vankomycinu (Normark et al., 2001). Nicméně samotná ztráta funkce VncS nevede k vyšší senzitivitě k tomuto ATB. VncR také reguluje syntézu kapsulárních polysacharidů, které jsou nutné pro rozvoj virulence. Vazbou VncR na promotorovou oblast *cps* lokusu při kultivování s lactoferrinem ze séra dochází k expresi kapsulárních polysacharidů. Tento mechanismus je kmenově specifický (Ghosh et al., 2019).

TCS11 je méně charakterizován, sehrává však roli ve virulenci (Throup et al., 2000).

TCS13 (BlpRH) je další systém založený na QS mechanismu. Je velmi podobný ComDE systému, jako autoindukční peptid (analog CSP) zde slouží BlpC. BlpRH reguluje expresi vysoce variabilního *blp* lokusu. Ten kóduje geny pro syntézu a transport bacteriocinů, peptidu BlpC, imunitních proteinů i samotného TCS13 (De Saizieu et al., 2000). Bacteriociny jsou peptidy produkované bakteriemi za účelem likvidace konkurenčních, většinou blízce příbuzných druhů, se stejnými nároky na živiny (Lux et al., 2007). Spouštěcím signálem může být hladovění či přítomnost antibiotik.

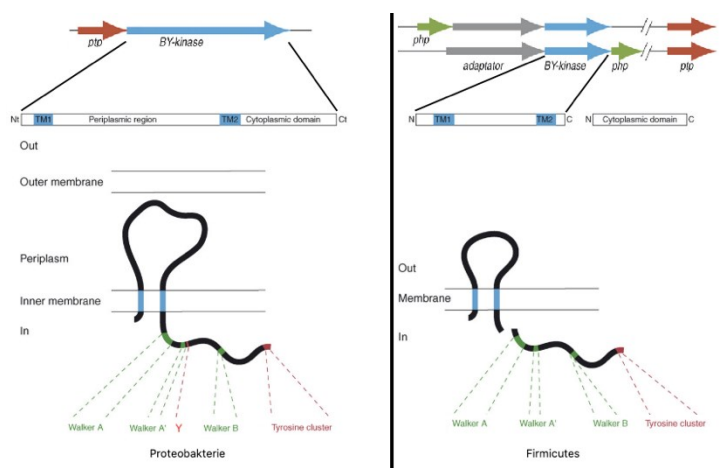
2.2.2 Tyrozinové kinázy

Fosforylace na tyrosinu byla velmi dlouhou dobu považována za čistě eukaryotní mechanismus. Ačkoliv byla fosforylace na tyrozinu u *E. coli* detekována již v roce 1986, první objevená kináza tohoto typu byla objevena až o 10 let později u bakterie *Acinetobacter johnsonii* (Cortay et al., 1986; Duclos et al., 1996).

Problémem detekce tyrozinové fosforylace je nespecifita komerčních protilátek, nízká míra fosforylace za standardních podmínek či obecně nižší zastoupení tyrozinových zbytků (Grangeasse et al., 2007, 2012).

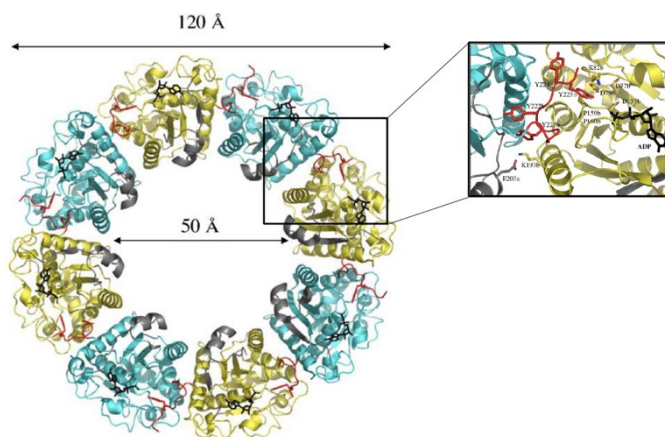
Dnes víme, že tyrozinové kinázy bakteriálního typu (BY-kinázy, BYK) jsou širokou rodinou proteinů, které se vyskytují u většiny bakteriálních druhů. Sekvenčně, strukturně i mechanismem fosforylace se liší od eukaryotního typu, u eukaryot naopak nebyl zaznamenán jejich výskyt (Grangeasse et al., 2012). Fosfatázy naopak sdílejí strukturu a funkci s eukaryotním typem (Kennelly, 2002).

BYK jsou TM proteiny, dvakrát procházející membránou. Jejich společným rysem je výskyt tří Walker motivů A, B a A' s konzervovanou organizací, viz **Obrázek 3**. Tyto motivy mají BYK společné s proteiny s P-smyčkou, kam patří rodina GTPáz (Leipe et al., 2003), sekvenčně se však od těchto proteinů liší (Duclos et al., 1996).



Obrázek 3: BYK. Genová organizace a TM lokalizace BYK u různých bakteriálních kmenů. Převzato a upraveno z (Grangeasse et al., 2007).

U *Firmicutes* došlo k osamostatnění kinázové a TM domény, viz **Obrázek 3**. Díky tomu může kináza kolokalizovat s cytoplazmatickými proteiny a jejich fosforylací ovlivňovat jejich aktivitu a lokalizaci, jako tomu je např. u kinázy PtkA u *B. Subtilis* (Jers et al., 2010). Pro její autofosforylacii a aktivitu je však nutná TM část, která je typicky kódována v operonu.



Obrázek 4: Oktamerová struktura BYK CapB u *Staphylococcus aureus*. S detailem na místo kontaktu dvou podjednotek. ATP je vyznačeno šedě, 4 tyroziny v YC klastru červeně. Y225b zasahuje do aktivního místa. Převzato a upraveno z (Olivares-Illana et al., 2008).

K autofosforylacii dochází mechanismem vzájemné trans-fosforylace dvou molekul. Konzervovaná 3D struktura má v nefosforylovaném stavu podobu oktameru, kdy aktivní místo jedné kinázy je vždy v kontaktu s C-koncovým Tyr kinázy sousední, viz **Obrázek 4**. Trans-fosforylace vede k jeho rozpadu (Olivares-Illana et al., 2008).

Typickou funkcí BY-kináz je regulace biosyntézy a exportu povrchových polysacharidů a tvorba pouzdra. Mechanismus fungování není zcela objasněn, oktamer může však sloužit jako kanál pro jejich export (Bechet et al., 2010). Produkce kapsulárních polysacharidů je často

Periplazmatická smyčka u proteobakterií je delší, než extracelulární smyčka u *Firmicutes* (Grangeasse et al., 2007, 2012).

Na úplném C-konci BYK je Tyrosinový klastr, který není konzervovaný a liší se délkou. Obsahuje 3-7 fosfoakceptorových Tyr zbytků, typicky obklopených glyciny. Pořadí fosforylace nehraje roli, důležité je její celkové množství (Grangeasse et al., 2007).

spojena s virulencí. Prostřednictvím fosforylace svých substrátů se však mohou účastnit i jiných buněčných procesů, jako je DNA metabolismus, buněčné dělení či produkce antibiotik (Whitmore & Lamont, 2012). BYK jsou tedy klinicky zajímavé a díky absenci homologních proteinů u Eukaryot jsou vhodným kandidátem pro hledání nových antimikrobiálních léčiv (Cozzone, 2009).

2.2.2.1 CpsD

U bakterie *S. pneumoniae* je kódována jedna typická BYK CpsD (gen *SPD_0318* u kmene D39), v operonu se svou fosfatázou CpsB (Bender & Yother, 2001) a TM adaptorovým proteinem CpsC (Whittall et al., 2015). Geny pro tyto proteiny jsou v operonu *cps* společně s geny důležité pro syntézu kapsulárních polysacharidů. Tento operon podléhá regulaci CpsD a vzhledem k faktu, že povrchové polysacharidy jsou hlavním virulencním faktorem, jedná se o důležitý regulátor virulence. Neopouzřené kmeny Rx a R6 postrádají operon *cps* kromě prvního genu CpsA, kmen D39 používaný naší laboratoří má tento operon též vydeletovaný.

U Rx kmene, kde byla CpsD objevena (Morona et al., 2000) bylo popsáno, že syntézu spouští její nefosforylovaná forma. Opačný jev byl pozorován u kmene D39 (Bender et al., 2003). Pro homologní kinázu Wzc u *E. coli* platí, že pro správnou syntézu a export polysacharidů je třeba cyklická fosforylace a defosforylace CpsD, což může tento spor vysvětlit, pokud zde platí stejný model (Grangeasse et al., 2012).

C-koncová oblast proteinu CpsC je zodpovědná za septální lokalizaci CpsD. Komplex CpsC/D navádí do septa polymerázu polysacharidů CpsH (Nourikyan et al., 2015). Proces připojování polysacharidů k BS je také regulován CpsD a CpsC a je mimo jiné nutný pro pronikání pneumokoka do krve a vznik invazivního onemocnění (Morona et al., 2006).

CpsD také pomocí přímé interakce moduluje mobilitu proteinu ParB, který se účastní dělení chromozomů. Tato signální dráha spojuje produkci kapsulárních polysacharidů s buněčným dělením (Nourikyan et al., 2015).

Dalším substrátem CpsD je autolysin LytA, který je důležitým faktorem virulence. Kmeny nesoucí fosfomimetickou mutaci lyzují častěji a dříve oproti WT, což ukazuje na pozitivní regulaci (Standish et al., 2014).

Strukturní vzhled do fungování CpsD nebyl podán, avšak na základě podobnosti s kinázou CapB u *Staphylococcus aureus* lze předpokládat, že i tato kináza tvoří v nefosforylované formě věčitou oktamerní strukturu jako na **Obrázku 4**. Fosforylaci a rozpad oligomeru by mohl umožňovat CpsC, defosforylaci naopak CpsB (Grangeasse, 2016).

2.2.2.2 UbK

Z fosfoproteomové analýzy pneumokoka vyplývá, že při exponenciálním růstu je nejméně 13 proteinů fosforylovaných na tyrozinu (Sun et al., 2010), u většiny z nich není známo, jakým mechanismem k těmto modifikacím dochází. Tato „temná hmota“ však postupně odhaluje svá tajemství. Díky nedávnému objevu zcela nové rodiny Tyr kináz s unikátním ATP-vazebným motivem, se počet známých tyrozinových kináz pneumokoka zdvojnásobil. První zástupce byl popsán v roce 2017 u bakterie *Bacillus Subtilis* (Nguyen et al., 2017), homologní sekvence byly nalezeny u mnoha bakteriálních druhů včetně pneumokoka.

Kináza, kódovaná genem *spr1761* získala označení UbK. Její autofosforylace na Tyr58, potvrzená v *in vivo* podmínkách, ovlivňuje její schopnost hydrolyzovat ATP. Právě tato aktivita je, na rozdíl od fosforylace, klíčová v buněčném dělení. Delece a mutace *ubk* vedou ke změnám v morfologii. UbK tak může hrát roli v regulaci syntézy BS (Pelletier et al., 2019). Tomu nasvědčuje i fakt, že gen *ubk* je v operonu s genem pro protein LytR, jehož domnělá funkce je vazba teichoových kyselin a kapsulárních polysacharidů na PG. Regulace tohoto, ani žádného jiného proteinu kinázou UbK však nebyla popsána. Také dosud nebyla odhalena fosfatáza, která by regulovala intenzitu fosforylace a ATP-hydrolytickou aktivitu UbK.

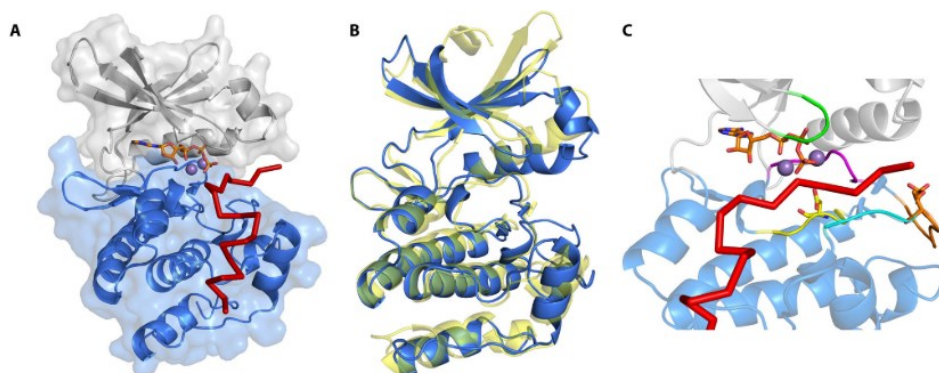
2.2.3 Kinázy a fosfatázy eukaryotního typu

Serin/Threoninové kinázy eukaryotního typu (eSTK) a jejich funkční protějšky – fosfatázy jsou další skupinou enzymů, které se podílejí na procesu signální transdukce. Byly popsány později než histidinové kinázy. První Ser/Thr kináza objevená u bakterií nebyla homologní s eukaryotním typem kináz (Garnak & Reeves, 1979). První kináza pařící do eukaryotní rodiny byla popsána u *Myxococcus xanthus* (Muñoz-Dorado et al., 1991).

Tento typ kináz je evolučně velmi konzervovaný. Dnes je známo, že je u bakterií široce rozšířen (Pereira et al., 2011), a to především u *Firmicutes* a *Actinobacterii* (Zucchini et al., 2018). Regulují důležité buněčné funkce jako je buněčné dělení, diferenciace, sekundární metabolismus a virulenci (Dworkin, 2015).

Jak již bylo zmíněno, podstatný rozdíl mezi HK a STK spočívá v síle vazby mezi fosfátem a akceptorovou AK. Fosfoserin a fosfothreonin jsou stabilnější, k odstranění fosfátu je tedy nutná specifická fosfatáza.

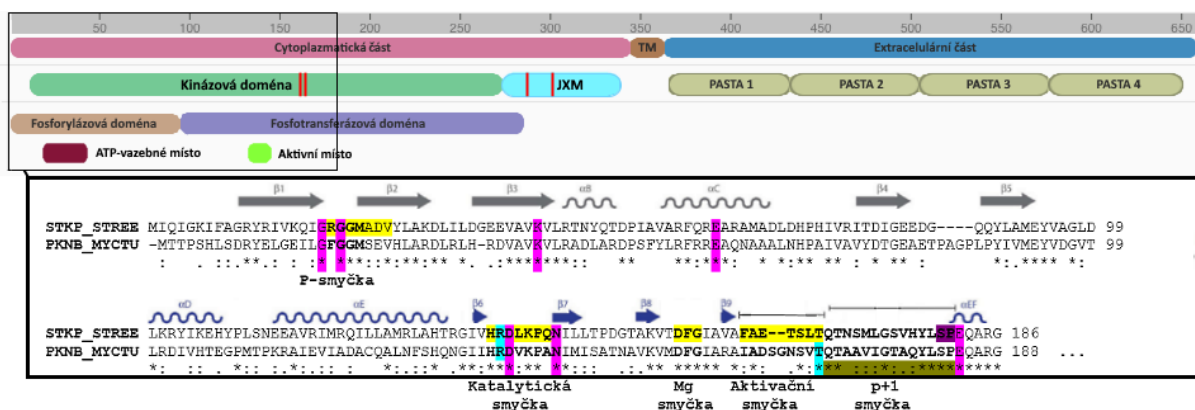
Kinázy eukaryotního typu u bakterií se skládají z konzervované intracelulární kinázové domény, TM segmentu a extracelulárních PASTA domén. Tyto PASTA domény se vyskytují pouze u bakteriálních eSTK a slouží jako receptory stavu BS, vážou například muropeptidy na podjednotkách PG (Yeats et al., 2002; Zucchini et al., 2018).



Obrázek 5: Struktura katalytické domény eSTK. **A:** Struktura KD myši eSTK PKA. N-koncový lalok šedivě, C-koncový modře. **B:** superpozice PKA (modře) s eSTK PknB z *M. tuberculosis* (žlutě). **C:** regulační elementy ve žlábků mezi laloky KD PAK kinázy: P-smyčka zeleně, katalytická smyčka žlutě, Mg-vazebná smyčka fialově, aktivační smyčka s fosforylovaným Thr oranžově. P+1 smyčka světle modře. Mg²⁺ ionty fialově. (Pereira et al., 2011).

Superrodina eSTK vykazuje sekvenční i strukturní homologii v kinázových doménách (Obr. 5B). Tyto domény jsou typicky tvořeny 12 subdoménami, uspořádané do struktury katalytického jádra tvořeného 2 laloky, mezi nimiž je aktivní místo (Obr. 5A). Menší N-koncový lalok váže ATP a orientuje jej, větší C-terminální váže substrát a zahajuje přenos fosfátu. Za správnou vzájemnou orientaci proteinového substrátu a ATP je přímo nebo nepřímo zodpovědných 12 téměř zcela konzervovaných AK zbytků (Obr. 5C). Nejdůležitější regulační jednotkou je aktivační smyčka, kde dochází k fosforylaci Ser/Thr zbytků, která vede ke stabilizaci struktury a umožňuje tak průběh katalytické reakce. Aktivační smyčka také definuje specifitu k substrátu. Jedná se o nejvíce variabilní segment kinázové domény (Pereira et al., 2011).

Další konzervovanou strukturou je P+1 smyčka, která také spoluurčuje specifitu kinázy k substrátu, konkrétně k Ser/Thr AK zbytkům. Obsahuje Ser nebo Thr, který interaguje s katalytickou smyčkou. Jinou konzervovanou oblastí je P smyčka, která je bohatá na glycinové



Obrázek 6: Domény proteinkinázy StkP. Červeně jsou znázorněny fosforylované Threoninové zbytky T167, T169, T293 a T303. Spodní část obrázku obsahuje detail konzervované sekvence části katalytické domény s vyznačenými smyčkami, okolními prvky sekundárních struktur a klíčovými AK zbytky. Srovnány jsou sekvence StkP u *S. Pneumoniae* a PknB u *Mycobacterium tuberculosis*.

zbytky a podílí se na přenosu fosfátu a vazbě ATP. Součástí katalytického jádra kinázy jsou též dva Mg^{2+} ionty vázané v oblasti Mg^{2+} -vazebné smyčky (Pereira et al., 2011).

StkP homology mají konzervovanou strukturu, obsahující dva klastry Thr zbytků, které mohou být fosforylovány (viz **Obrázek 6**). První klaster se nachází uvnitř aktivační smyčky, u StkP *S. pneumoniae* se jedná o T167 a T169 (Ulrych, manuskript v přípravě). Druhý je součástí tzv. juxtamembránového regionu. Juxtamembránové regiony jsou nepostradatelnou součástí eSTK. Podílejí se na navazování substrátů a jsou rovněž zodpovědné za propojení eSTK signalizace s jinými signálními kaskádami (Durán et al., 2005; Madec et al., 2003; Thakur et al., 2008). U StkP obsahuje tento 72 aminokyselin dlouhý region fosforylované threoniny v pozicích T293 a T303 (Ulrych, manuskript v přípravě).

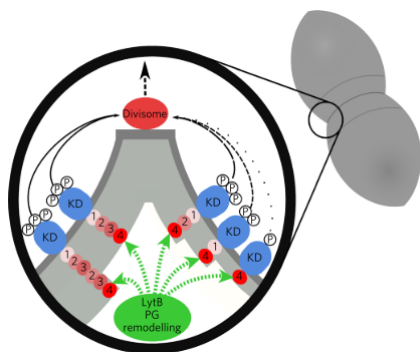
2.3 Kináza StkP a fosfatáza PhpP

Na rozdíl od řady ostatních modelových organismů kóduje genom pneumokoka pouze jeden funkční pár: membránovou kinázu StkP a solubilní fosfatázu PhpP, které jsou kódovány sousedními geny a jsou transkribovány jako jedna molekula mRNA (Nováková et al., 2005). Koimunoprecipitace kinázové domény StkP a PhpP detekovaná PhpP-specifickou protilátkou naznačuje jejich přímou interakci (Osaki et al., 2009). Také bylo prokázáno, že PhpP defosforyluje StkP i její substráty (Nováková et al., 2005; Ulrych et al., 2016).

Kináza StkP je transmembránový protein schopný autofosforylace (Nováková et al., 2005) tvorbou homodimeru. Za tu jsou zodpovědné extracelulární domény i doména transmembránová. Homodimerizace je pravděpodobně také nutná pro autofosforylaci StkP. Může také být klíčová pro interakci StkP s jejími substráty (Pallová et al., 2007). StkP je poměrně stabilní enzym, schopný katalyzovat fosforylaci v širokém rozmezí pH 3-9 (Nováková et al., 2005).

Celkově se StkP skládá ze čtyř extracelulárních PASTA (penicillin-binding protein and STK associated domain) domén, trans-membránového segmentu a KD (kinázová doména) domény (Osaki et al., 2009).

Pomocí svých třech membránově-proximálních PASTA domén vnímá StkP signály vedoucí k její aktivaci nezávisle na BS. Tyto tři PASTA domény také ovlivňují tloušťku BS v septu (Zucchini et al., 2018). Signálními molekulami jsou například volné podjednotky PG nebo β -laktamová antibiotika (Maestro et al., 2011). Bakterie *Staphylococcus aureus* má proteinkinázu PknB homologní k StkP. Jako její aktivační molekula byl potvrzen prekurzor buněčné stěny lipid II (Hardt et al., 2017). Je tedy pravděpodobné, že lipid II bude rovněž sloužit jako aktivátor StkP.



Obrázek 7: Model role StkP v buněčném dělení. BS je znázorněna šedivě, její tloušťka a současně aktivita KD StkP je dána počtem PASTA domén mezi cytoplazmatickou membránou a PASTA4. Intenzita aktivity KD je znázorněna černými přerušovanými čarami (Zucchini et al., 2018).

Čtvrtá, membránově-distální PASTA doména je zodpovědná za septální lokalizaci StkP a interakcí s hydrolázou BS LytB se podílí na separaci buněk (viz **Obrázek 7**). Delece žádné z PASTA domén neovlivnila schopnost autofosforylace a fosforylace substrátů (Zucchini et al., 2018). Kináza StkP má kromě toho vliv na virulenci a kompetenci. V *in vivo* podmínkách je důležitá pro průnik pneumokoka do krevního řečiště (J. Echenique et al., 2004). Fosforylací svých substrátů reguluje StkP celou řadu dalších buněčných procesů.

Fosfatáza PhpP patří do PP2C rodiny fosfatáz, konkrétně jde o PPM typ, závislý na Mg^{2+} iontech (Nováková et al., 2005). PP2C kinázy regulují řadu procesů od reakce na stresy, přes diferenciaci, růst a apoptózu až po metabolismus (Shi, 2009). Eukaryotní typ fosfatáz postrádá jasně definovanou regulační doménu (Dworkin, 2015). Srovnání několika bakteriálních PP2C fosfatáz s lidskou PP2C odhalilo téměř identickou strukturu katalytických domén a konzervované AK v aktivním místě. Struktura katalytického jádra se skládá z beta-sendviče složeného ze dvou beta listů. Každý list je obklopen dvěma antiparalelními alfa-helixy. V centru mezi beta-listy jsou vázány dva katalytické ionty kovu. Bakteriální typ váže jeden kovový iont navíc. Mechanismus defosforylace spočívá v nukleofilním ataku fosfátu molekulou vody (Pereira et al., 2011).

PhpP je neesenciální protein, jeho delece však způsobí nižší odolnost vůči teplotnímu a oxidativnímu stresu a vykazuje méně účinnou kompetenci. AK D192 a D231 jsou esenciální pro funkci PhpP *in vivo* (Ulrych et al., 2016). Po delším pasážování kmenů s inaktivovanou PhpP nejspíš dochází u kmene D39 k hromadění supresorových mutací, což naznačuje esencialitu PhpP na tomto genetickém pozadí (Rued et al., 2017). PhpP se podílí na regulaci řady fyziologických funkcí, mezi něž patří kmenově specifická regulace adherence a tvorby biofilmu, buněčného dělení a syntézy BS (Agarwal et al., 2012; Ulrych et al., 2016).

2.4 Substráty StkP

Doposud bylo identifikováno a podrobněji charakterizováno 12 substrátů kinázy StkP, 5 z nich v naší laboratoři. Největší skupinu tvoří proteiny podílející se na buněčném dělení. Patří sem naší laboratoří *in vitro* i *in vivo* potvrzený substrát DivIVA (Nováková et al., 2010), zodpovědný za buněčnou morfologii, segregaci chromozomů a separaci buněk skrze interakci

s dalšími proteiny (Fadda et al., 2003). Další substrát LocZ (Holečková et al., 2014), označovaný také jako MapZ (Fleurie et al., 2014), hraje roli ve správném umístění septa a určuje budoucí místo buněčného dělení určením místa polymerace FtsZ. Důkaz o jeho fosforylaci *in vivo* přinesla též naše laboratoř (Holečková et al., 2014, Fleurie et al., 2014). Samotný protein FtsZ, tvořící polymerní scaffold Z-kruhu je dalším z možných substrátů StkP, potvrzených *in vitro* (Giefing et al., 2010), stejně tak jako stabilizační protein Z-kruhu FtsA (Beilharz et al., 2012). Nejnověji potvrzeným substrátem z této kategorie je GpsB (Nováková, nepublikovaná data; Hirschfeld et al., 2020).

Jinou funkční skupinou substrátů StkP jsou proteiny syntézy buněčné stěny. Jsou jimi enzymy GlmM, MurC a MacP. Protein GlmM, katalyzující druhý krok biosyntetické dráhy UDP-N-acetylglucosaminu z fruktózy-6-fosfátu, byl v naší laboratoři identifikován jako substrát kinázy StkP v *in vivo* i *in vitro* podmínkách (Nováková et al., 2005). Produkt je univerzálním prekursorem komponent BS, jmenovitě peptidoglykanu, lipopolysacharidů a teichoových kyselin (Heijenoort, 1994; Mengin-Lecreulx & Van Heijenoort, 1996).

Protein MurC, který se řadí mezi ATP-dependentní ligázy je taktéž v *in vitro* podmínkách fosforylován kinázou StkP. Jeho identifikace byla provedena metodou phage-display. S StkP epitopem interagoval fragment se sekvencí YEVCGSDTVGC, která blíže odpovídá sekvenci MurC v pozici 31–37 (Falk & Weisblum, 2013). MurC navazuje první aminokyselinu peptidového spojovacího můstku (L-alanin) na UDP-N-acetyl-muramát. Oba tyto enzymy, GlmM i MurC, se účastní cytoplazmatické fáze syntézy BS (Lovering et al., 2012).

Protein MacP je membránově vázaný protein, který lokalizuje v místě dělení. Jeho fosforylace kinázou StkP byla potvrzena *in vivo*. MacP funguje jako kofaktor syntázy peptidoglykanu PBP2a a je nutný pro její aktivitu (Fenton et al., 2018).

Proteiny MltG a MreC, patřící též do kategorie enzymů syntézy buněčné stěny, spadají do dosud nepotvrzených kandidátů na substráty StkP (Hirschfeld et al., 2020).

StkP ovlivňuje i tři výše popsané response regulátory – CbpRS, RitR a ComE. Jak již bylo zmíněno (viz kapitola 2.2.1.5), CbpR fosforylovaný na threoninu pomocí StkP se váže na *cbpA* promotor i bez fosforylace svou kinázou CbpS na asparaginu a řídí expresi povrchového adhezinu CbpA. Navíc v hyperfosforylovaném $\Delta phpP$ kmeni je produkce CbpA upregulována. Fosforylace pomocí StkP byla potvrzena v *in vitro* i *in vivo* podmínkách (Agarwal et al., 2012).

Druhým response regulátorem fosforylovaný StkP je RitR (viz kapitola 2.2.1.7). Důkaz o fosforylaci RitR v *in vivo* podmínkách chybí. (Uljasz et al., 2009).

StkP tedy reguluje fosforylací enzymů a transkripčních faktorů jednotlivé biochemické procesy. Kromě toho je však také zodpovědná za globální regulaci exprese.

Díky fosforylaci výše popsaného response regulátoru ComE na Thr128 je StkP zodpovědná za globální regulaci při pH stresu. Průkaz fosforylace za podmínek kyselého pH byl podán *in vitro* i *in vivo* podmínkách. Fyziologická role této fosforylace spočívá v umožnění dimerizace ComE a zvýšení jeho afinity k cílové DNA změnou konformace DNA-vazebné domény. K vazbě na DNA dochází nezávisle na RR ComE. Výsledkem je regulace transkripce 104 genů, hrajících roli v mnoha buněčných procesech, včetně dříve popsaného ASIL mechanismu, produkce H₂O₂ a odpověď na oxidativní stres. Míra kompetence však není závislá na této fosforylaci. Exprese ComE se v podmínkách kyselého pH zvyšuje (Piñas et al., 2018).

ComD je také aktivován signální drahou StkP/PhpP, kináza StkP reguluje kompetenci „upstream“ od ComDE systému (Osaki et al., 2009).

Naše laboratoř také identifikovala RNA-vazebný protein Jag jakožto substrát StkP v *in vivo* podmínkách (Ulrych et al., 2016). K fosforylaci dochází na T89. Delece proteinu vede ke zkrácování buněk a prodloužení lag-fáze růstu (Stamsås, Straume, Winther, et al., 2017; Ulrych et al., 2016; Zheng et al., 2017). Fosforylace zřejmě vede k prodlužování buněk. Fosfomimetická mutace T89E je u kmene R6 tolerovaná pouze v přítomnosti supresorových mutací, které omezují činnost elongazomu. Konkrétně se jedná o zkrácení MreC či inaktivaci RodZ (Stamsås, Straume, Winther, et al., 2017). U kmene Rx ani D39 nebyl tento efekt pozorován (Ulrych et al., 2016; Zheng et al., 2017).

Později byla detekována interakce Jag s KhpA a protein získal alternativní označení KhpB (Zheng et al., 2017). Tato interakce (stejně jako homodimerizace proteinu KhpA) je zprostředkována především aminokyselinou I61 na KhpA (Winther et al., 2019). Zdá se, že heterodimer KhpA/KhpB reguluje celkové množství FtsA v buňce na post-transkripční úrovni. Tento RNA-vazebný komplex by navíc mohl mít vliv i na regulaci jiných proteinů (Zheng et al., 2017). Bylo ukázáno, že se Jag podílí i na regulaci buněčné elongace, proto je také označován jako EloR (elongosome regulating protein) (Stamsås, Straume, Winther, et al., 2017). Letos vyšla publikace dokládající, že KhpB tvoří komplex s lytickou transglykosylázou MltG uplatňující se v syntéze periferálního PG. Za interakci s MltG a lokalizaci KhpB do septa je zodpovědná Jag doména proteinu KhpB. Vzhledem k tomu, že MltG lokalizuje v septu nezávisle na KhpB, je možné, že právě ona je zodpovědná za navedení komplexu KhpA/KhpB do místa buněčného dělení (Winther et al., 2021). Samotný protein MltG je dalším domnělým substrátem StkP (Hirschfeld et al., 2020; Ulrych, mansukript v přípravě).

Posledním proteinem z tohoto výčtu potvrzených substrátů je naší laboratoří identifikovaná mangan-dependentní anorganická pyrofosfatáza PpaC katalyzující hydrolýzu

anorganického pyrofosfátu. Důkaz její fosforylace se podařilo získat pouze v *in vivo* podmínkách, což může být způsobeno buď suboptimálními reakčními podmínkami *in vitro* nebo složitější interakční sítí doposud nepopsaných mezičlánků (Nováková et al., 2010).

Dlouhodobým cílem naší laboratoře je identifikovat a charakterizovat substráty StkP. Na základě celkového fosfoproteomu byly v naší laboratoři nedávno identifikovány potenciální substráty proteinkinázy StkP s konkrétními fosforylačními místy (Ulrych, nepublikovaná data). Většina identifikovaných substrátů proteinkinázy StkP hraje významnou roli v buněčném dělení, syntéze PG, syntéze lipidů a proteosyntéze. Avšak konkrétní fyziologický význam těchto fosforylací z celofosfoproteomových dat není jasný. Proto nyní tyto potenciální substráty naše laboratoř podrobně charakterizuje.

2.5 Protein Spr0929

A právě předmětem výzkumu v této práci je další z předpokládaných substrátů kinázy StkP – protein Spr0929, kódovaný stejnojmenným genem. U kmene D39 nese tento gen označení SPV_0911. Ten není doposud nijak charakterizován. Jde o protein o délce 335 aminokyselin, molekulové hmotnosti 38,587 Da s pI = 4,99. Okolí genu je velmi konzervované u různých druhů streptokoků (Pagliero et al., 2005). Nejbližší okolní gen před genem *spr0929* ve směru transkripce – *spr0928* je podle homologie Serin hydroxymethyltransferáza *glyA*. GlyA katalyzuje reverzibilní interkonverzi serinu a glycinu s jednouhlíkovým nosičem tetrahydrofolátem (THF). Tato reakce slouží jako hlavní zdroj jednouhlíkových skupin potřebných pro biosyntézu purinů, thymidylátu, methioninu a dalších důležitých biomolekul.

Gen *spr0930* je podle Jacq a spol. (Jacq et al., 2018) hydroláza buněčné stěny Pmp23. Ta se spolupodílí na jejím remodelingu. Delece vede k morfologickým defektům a problémům s buněčným dělením. Je důležitá pro lokalizaci Z-kruhu. Určuje lokalizaci MapZ/LocZ, dalšího substrátu StkP. Také přímo interaguje se syntásou peptidoglykanu PBP2x.

Protein Spr0929 obsahuje jedinou doménu nazvanou NA37 podle databáze Pfam (El-Gebali et al., 2019) nebo také NdpA podle databáze InterPro (Mitchell et al., 2019). Poprvé byla popsána u *E. coli*, konkrétně u proteinu NdpA - produktu genu *yejK* (Murphy et al., 1999). Tuto doménu však obsahují proteiny u velkého množství druhů; jen u terrabakterií je evidováno přes 3000 výskytů. U žádného z nich však nebyla popsána její funkce. Jedinou její sjednocující vlastností je asociace s nukleoidem. V souladu s tím nemá Spr0929 predikované žádné transmembránové helixy (Artimo et al., 2012; Krogh et al., 2001).

Nedávno byla provedena automatická anotace genomu pneumokoka (kmen *S. pneumoniae* D39) pomocí algoritmu RAST (Slager et al., 2018). Spr0929 byl identifikován

jako *23S RNA-specifická Pseudouridylát syntáza*, jejíž funkcí je syntéza pseudouridin 5'-fosfátu, nicméně Multiple Sequence Alignment ukázal, že Spr0929 je velmi sekvenčně odlišný od všech známých enzymů s touto funkcí.

Data z různých celoproteomových experimentů naznačují, že by mohl být protein Spr0929 klinicky významný nebo alespoň spojený s patogenezí. Jeho gen je například významně nadprodukován při koinkubaci streptokoka s buňkami lidského plicního epitelu (Aprianto et al., 2018). Tato nadprodukce probíhá v horizontu 30–60 minut po infekci. Přestože z našich experimentů vyplývá, že Spr0929 není esenciální v laboratorních podmínkách, screening metodou Genomic Array Footprinting ukázal, že tento protein je esenciální za podmínek experimentální meningitidy (Molzen et al., 2011). Jiná studie ukázala, že exprese genu *spr0929* je snížena při tvorbě biofilmů indukované pyrimidinedionem (Yadav et al., 2015).

3 Cíle práce

Cílem této diplomové práce je potvrzení fosforylace hypotetického proteinu Spr0929 kinázou StkP v několika krocích:

- Potvrdit *in vitro* a *in vivo*, že protein Spr0929 je substrátem kinázy StkP
- Potvrdit místo fosforylace kinázou StkP (T225)

Druhým cílem je základní charakterizace tohoto proteinu, mezi nich patří:

- Připravit deleční kmeny v genu spr0929 a provést jejich charakterizaci (růstové křivky, buněčná morfologie, reakce na stresy)
- Stanovit lokalizaci Spr0929 fúzovaného s fluorescenční značkou

4 Materiál a metody

4.1 Materiály

4.1.1 Bakteriální kmeny

V tabulkách 1-4 jsou uvedeny veškeré použité kmeny *S. pneumoniae* a *E. coli*. Kmeny byly uchovávány v -80°C v 15% glycerolu. OD₆₀₀ skladovaných kmenů byla 0,3-0,4.

4.1.1.1 *Escherichia coli*

Výchozí bakteriální kmeny *E. coli*, použité pro izolaci či transformaci vektorů jsou uvedeny v **Tabulce 1**:

Kmen	Genotyp	Použití	Zdroj
E. coli DH5α	<i>fhuA2 Δ(argFlacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Kompetentní buňky použité pro konstrukci plazmidů	Invitrogen
E. coli BL21(DE3)	<i>F', ompT, hsdSB, (mB', rB'), dcm, gal, λ(DE3)</i>	Expresní buňky použité pro nadprodukcí proteinu, kmen nesoucí profág s genem pro T7 polymerázu	Novagen
EC85	DH5α s plazmidem pJWV25	Izolace plazmidu pJWV25	J.W.Veening
EC70	JM109 s plazmidem pETPhos-link	Izolace plazmidu pETPhos-Link	P. Branny
EC473	DH5α s plazmidem pET42b	Izolace plazmidu pET42b	EMD Biosciences

Tabulka 1: Seznam výchozích bakteriálních kmenů *E. coli*.

Následující **Tabulka 2** obsahuje seznam všech kmenů *E. coli*, připravených transformací plazmidů a použitých v této práci, včetně jejich využití.

Název	Genetické pozadí	Transformovaný vektor	Použití
EC511	DH5α	pZnMin- <i>spr0929-flag</i>	Příprava komplementačního kmene
EC559	DH5α	pETPhosLink- <i>his-spr0929</i>	Příprava expresního kmene
EC560	DH5α	pJWV25- <i>spr0929</i>	Příprava kmene s GFP fúzí
EC567	DH5α	pZnMin- <i>spr0929-T255A-flag</i>	Příprava kmene se záměnou T255A pod kontrolou inducibilního promotoru pZn
EC568	DH5α	pETPhosLink- <i>his-spr0929-T255A</i>	Příprava expresního kmene se záměnou T255A
EC571	BL21(DE3)	pETPhosLink- <i>his-spr0929</i>	Expresce proteinu Spr0929
EC572	BL21(DE3)	pETPhosLink- <i>his-spr0929-T255A</i>	Expresce proteinu Spr0929 se záměnou T255A
EC577	DH5α	pJWV25- <i>spr0929-T255A</i>	Příprava kmene s GFP fúzí se záměnou T255A
EC587	DH5α	pET42b- <i>spr0929-his</i>	Příprava expresního kmene
EC588	BL21(DE3)	pET42b- <i>spr0929-his</i>	Expresce proteinu Spr0929
EC590	DH5α	pET42b- <i>spr0929-T255A-his</i>	Příprava expresního kmene se záměnou T255A
EC592	BL21(DE3)	pET42b- <i>spr0929-T255A-his</i>	Expresce proteinu Spr0929 se záměnou T255A

Tabulka 2: Seznam připravených kmenů *E. coli*.

4.1.1.2 *Streptococcus pneumoniae*

Výchozí kmeny představující WT různých genetických pozadí *S. pneumoniae* a další kmeny, použité v této práci. Jejich vlastnosti, včetně genotypů shrnuje **Tabulka 3**.

Kmen	Genotyp	Fenotyp	Použití	Zdroj
Sp1	Rx derivate; <i>str1</i> , <i>hexA</i>	StrR	Výchozí nevirulentní kmen, použit také jako kontrolní	(Morrison et al., 1984)
Sp208	R6	R6 neopouzdřený kmen divokého typu, StrS	Výchozí nevirulentní kmen, použit také jako kontrolní	(Ottolenghi & Hotchkiss, 1962), poskytl Dr. M. Oggioni (Univerzita Siena, Itálie)
Sp339	D39 (NCTC) <i>cps2A cps2H rpsL41 rpsL+</i>	Stabilní neopouzdřený kmen D39 (NCTC)	Výchozí nevirulentní kmen	(Lanie et al., 2007), poskytl Dr. Malcolm Winkler, PhD (Univerzita Bloomington, Indiana, USA)
Sp113	Rx <i>ΔphpP</i>	Hyperfosforylovaný Rx kmen	Studium fosforylace	(Ulrych et al, 2016)
Sp370	Rx <i>jag-gfp</i>	Expresí fúzního proteinu Jag-GFP, nativní lokus	Příprava fragmentu pro C-koncovou GFP fúzi	(Ulrych et al, 2016)

Tabulka 3: Seznam bakteriálních kmenů *S. pneumoniae*.

V následující **Tabulce 4** je uveden seznam všech kmenů *S. pneumoniae* vytvořených transformací příslušného vektoru nebo PCR konstruktů. použitých v rámci této práce. Účel jejich přípravy je uveden ve sloupci „Použití“.

Název	Genotyp	Výchozí kmen	Transformovaný vektor / konstrukt	Použití
Sp354	Rx, <i>Δspr0929::SJK</i>	Sp1	PCR konstrukt <i>spr0929::SJK</i>	Delece genu <i>spr0929</i> – vložení SJK
Sp355	R6, <i>Δspr0929::SJK</i>	Sp208		
Sp520	D39, <i>Δspr0929::SJK</i>	Sp339		
Sp623	Rx, <i>Δspr0929</i>	Sp354	PCR konstrukt <i>Δspr0929</i>	Delece genu <i>spr0929</i> – Odstranění SJK
Sp550	R6, <i>Δspr0929</i>	Sp355		
Sp551	D39, <i>Δspr0929</i>	Sp520		
Sp604	R6, <i>Δspr0929 bga::pZnMin-spr0929-flag</i>	Sp550	<i>pZnMin-spr0929-flag</i>	Komplementace
Sp605	D39, <i>Δspr0929 bga::pZnMin-spr0929-flag</i>	Sp551	<i>pZnMin-spr0929-flag</i>	Komplementace
Sp645	R6, <i>Δspr0929, bga::pZnMin-gfp-spr0929-flag</i>	Sp550	<i>pJWV25-spr0929-flag</i>	N-koncová GFP fúze <i>spr0929</i> pod indukčním promotorem
Sp661	R6, <i>spr0929-flag</i>	Sp355	PCR konstrukt <i>spr0929-flag</i>	Expresí proteinu s Flagovou značkou
Sp668	R6, <i>spr0929-T255A-flag</i>	Sp355	PCR konstrukt <i>spr0929-T255A-flag</i>	Expresí proteinu s Flagovou značkou
Sp670	R6, <i>bga::pZnMin-spr0929-flag</i>	Sp208	<i>pZnMin-spr0929-flag</i>	Nadprodukce proteinu Spr0929
Sp687	R6, <i>Δspr0929, bga::pZnMin-gfp-spr0929-T255A-flag</i>	Sp550	<i>pJWV25-spr0929-T255A-flag</i>	N-koncová GFP fúze <i>spr0929-T255A</i> pod indukčním promotorem
Sp714	R6, <i>spr0929-gfp</i>	Sp355	PCR konstrukt <i>spr0929-gfp</i>	C-koncová GFP fúze v nativním lokusu
Sp717	Rx, <i>spr0929-flag</i>	Sp354	PCR konstrukt <i>spr0929-flag</i>	Ověření fosforylace proteinu Spr0929 v <i>in vivo</i> podmínkách
Sp718	Rx, <i>spr0929-T255A-flag</i>	Sp354	PCR konstrukt <i>spr0929-T255A-flag</i>	
Sp711	Rx, <i>ΔphpP, spr0929-flag</i>	Sp717	PCR konstrukt <i>ΔphpP</i> -JK	
Sp712	Rx, <i>ΔphpP, spr0929-T255A-flag</i>	Sp718	PCR konstrukt <i>ΔphpP</i> -JK	
Sp744	Rx, <i>ΔstkP, spr0929-flag</i>	Sp717	linearizovaný plazmid pAKCmDK	
Sp750	R6, <i>gfp-spr0929</i>	Sp355	PCR konstrukt <i>gfp-spr0929</i>	N-koncová GFP fúze v nativním lokusu

Tabulka 4: Seznam připravených kmenů *S. pneumoniae*.

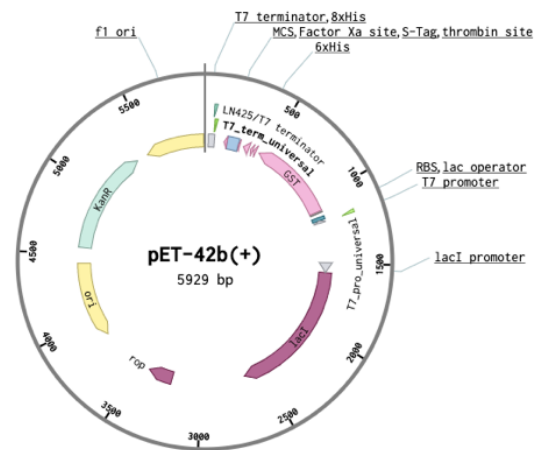
4.1.2 DNA oligonukleotidy

Umístění: WT chromozom – lokus <i>spr0929</i>				
Název oligonukleotidu	Orientace	Sekvence	Délka	Použití
AU143/ <i>spr0929_up_F</i>	F	AGGTGATACGGTTATGGGAA	20	Amplifikace oblasti před genem <i>spr0929</i>
AU144/ <i>spr0929_up_R</i>	R	aatcaaacggatcgatccttaaATAAAAGTTTTAGTCCTCGTATA	45	Amplifikace oblasti před genem <i>spr0929</i>
AU146/ <i>spr0929_dwn_R</i>	R	AGCTAGAGTCATTGGCCAC	19	Amplifikace oblasti za genem <i>spr0929</i>
AU145/ <i>spr0929_dwn_F</i>	F	tactaaacgtccaaaagcataaATCGAGGATATCCAAAGTAAAT	44	Amplifikace oblasti za genem <i>spr0929</i>
LN302/0928-F	F	CCAAGCTAACTGTGCGGC	18	Sekvenační oligonukleotid
LN303/0931-R	R	CCTAGCTTTGAATCTTGCC	20	Sekvenační oligonukleotid
LN300/0928-F	F	CTGAACTCATCATTAAAACCC	21	Sekvenační oligonukleotid
LN301/0930-R	R	GCGGTAAGCTTTATAGCC	18	Sekvenační oligonukleotid
LN298/0929up-R	R	TTATTACTTTGGATATCCTCGATATAAAAAGTTTTAGTCTCGTAT	46	Amplifikace oblasti před genem <i>spr0929</i>
LN299/0929dn-F	F	TTATACGAGGACTAAAACCTTTATATCGAGGATATCCAAAGTAAA	45	Amplifikace oblasti za genem <i>spr0929</i>
AU307/ <i>spr0929_seq_F</i>	F	CGGTGCTAAATTTGCTAATG	20	Vnější sekvenační oligonukleotid
AU308/ <i>spr0929_seq_R</i>	R	GGTGTTC AATCTTGACCTC	20	Vnější sekvenační oligonukleotid
AU282/0929_R	R	CTCGTATAATGGGAAGGCATCTGTCA	26	Konstrukce <i>spr0929-flag</i>
Umístění: SWJ chromozom – lokus <i>spr0929</i>				
Název oligonukleotidu	Orientace	Sekvence	Délka	Použití
DPI/ <i>sweetJanusF</i>	F	ttaaggatcgatccgttgatt	22	Amplifikace SJK
DP2/ <i>sweetJanusR</i>	R	ttatgctttggacgtttagta	22	Amplifikace SJK
Umístění: Chromozom s FLAG tag - lokus <i>spr0929</i>				
Název oligonukleotidu	Orientace	Sekvence	Délka	Použití
AU284/0929-Flag_F	F	gattacaaggatgacgacgataagTAATGTTTAAACGAATTCGAA GAG	48	Konstrukce <i>spr0929-flag</i>
AU283/0929-Flag_R	R	TActtatcgtcgtcatcctgtaateTTTACTTTGGATATCCTCGATA	48	Konstrukce <i>spr0929-flag</i>
Umístění: Chromozom s GFP tag (C-term.) - lokus <i>spr0929</i>				
Název oligonukleotidu	Orientace	Sekvence	Délka	Použití
AU152/ <i>gfp_native_F</i>	F	tctagaggatctggtggag	19	Amplifikace GFP z konstruktu jag-gfp
AU150/ <i>gfp_native_R</i>	R	TTAttgtagagctcatccatg	22	Amplifikace GFP z konstruktu jag-gfp
AU298/GFP+0930_f	F	ggcatggatgagctctacaaaTAATGTTTAAACGAATTCGAAGAGT	46	Fúzní PCR
AU299/0929+hinge_r	R	tcaccaccagatccttagaTTTACTTTGGATATCCTCGATA	42	Fúzní PCR
Umístění: Chromozom s zsGreen tag (C-term.) - lokus <i>spr0929</i>				
Název oligonukleotidu	Orientace	Sekvence	Délka	Použití
AU300/HingeZsGreen_F	F	gcagctaaagctggaactagtatcATGGCTCAGTCAAAGCACGG	44	Příprava <i>spr0929-zsGreen</i>
AU301/ZS_G_r	R	TCAGGGCAATGCAGATCC	18	Příprava <i>spr0929-zsGreen</i>
AU302/ZS_G_ <i>spr0929_f</i>	F	GGATCTGCATTGCCCTGATGTTTAAACGAATTCGAAGAGT	40	Příprava <i>spr0929-zsGreen</i>
AU305/ <i>spr0929_Hinge_R</i>	R	gatactagttccagcttagctgc	24	Příprava <i>spr0929-zsGreen</i>

Umístění:		WT chromozom – lokus stkP-phpP		
Název oligonukleotidu	Orientace	Sekvence	Délka	Použití
LN21	F	TTAAGGAGTAGCTGAAGTTGT	21	Koloniová PCR PhpP
JK013	F	acacaggagaatgtagatgcc	21	Koloniová PCR PhpP
JG73/StkP_seq_R	R	ATCTTTGCCATGAAATCATGA	21	Koloniová PCR PhpP
Umístění:		Vektor pET42b		
Název oligonukleotidu	Orientace	Sekvence	Délka	Použití
AU281/0929_F	F	ATGCCTTCCATTATACGAG	20	Koloniová PCR spolu s LN425
LN425/T7 terminator	R	GGGGTTATGCTAGTTATTGC	20	Sekvenační oligonukleotid
AU271/0929-NdeI_F	F	GGCCATATGCCTTCCATTATACGAGGAC	29	Amplifikace Spr0929 s XhoI RM
AU289/spr0929_XhoI	R	gctcgagTTACTTTGGATATCCTCGATA	29	Amplifikace Spr0929 s NdeI RM
T7_pro_universal	F	TAATACGACTCACTATAGGG	20	Univerzální sekvenační oligonukleotid
T7_term_universal	R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	19	Univerzální sekvenační oligonukleotid
Umístění:		Vektor pJWV25		
Název oligonukleotidu	Orientace	Sekvence	Délka	Použití
AU243/pZn_0929_F	F	GGAAGATAGAGAGGAAGCGATGTAATGCCTTCCCAT TATACGAGG	45	Komplementace: Fúze spr0929 s pZn-min
AU244/pZn0929_R+NotI	R	gcttactatcgtcgtcatcctgtgaateTTACTTTGGATATCCTCGAT A	51	Komplementace: spr0929+FLAG tag
LN119	F	cacacccgctcgtggtatct	20	Komplementace: Amplifikace pZn- min
LN396	R	TACATCGCTTCCTCTCTATCTCCttgtataatagattatgaacac	48	Komplementace: Amplifikace pZn- min
LN164/PczcD oligonukleotid	F	gaattattgcgattactatca	21	Sekvenační oligonukleotid
AU275/0929-F+SpeI	F	ACTAGTATGCCTTCCATTATACGAG	26	GFP fúze: Amplifikace spr0929 se SpeI RM
AU276/0929-R+NotI	R	gcggccgcTTATTACTTTGGATATCCTCG	30	GFP fúze: Amplifikace spr0929 s NotI RM
LN123/pJW25-1b	F	ttcgctactggagccactat	21	Koloniová PCR
LN143/bgaA-R	R	gttacgttgattcatcacc	20	Koloniová PCR
Umístění:		Mutagenní oligonukleotidy		
Název oligonukleotidu	Orientace	Sekvence	Délka	Použití
AU273/0929_T255A_s	S	ATAAAGCTCAAACGAGCCGcCAGATTGTTGTCAAAA AGG	39	Příprava záměny T255A
AU274/0929_T255A_as	A	CCTTTTGGACAACAATCTGgCGGCTCGTTTGAGCTTTA T	39	Příprava záměny T255A
Nepoužité				
AU272/0929-BamHI_R	R	GGATCCTTATTTACTTTGGATATCCTCGA	29	pETPhos0929

Tabulka 5: Seznam DNA oligonukleotidů použitých v PCR reakcích. Orientace F = „forward“ = dopředný oligonukleotid, R = „reverse“ protisměrný, S = „sense“, A = „antisense“.

pET42b od firmy Novagen je klonovací a expresní vektor pro produkci rekombinantních proteinů v bakterii *E. coli*. Kvůli selekci je v sekvenci pET42b gen kódující rezistenci ke kanamycinu, nezbytnou součástí pro udržení v *E. coli* je replikační počátek. Vektor pET42b systému pET byl primárně vyvinut za účelem fúze vkládaného genu s GST (Glutathion-S-Transferáza) (Smith & Johnson, 1988). V této práci však tato vlastnost použita nebyla. GST kotva byla nahrazena genem



Obrázek 10: Vektor pET42b. KanR. Ori je počátek replikace. Ostatní vlastnosti viz text práce.

spr0929 vloženým přes restrikční místa *NdeI/XhoI*. Toto konkrétní místo vložení umožnilo vznik translační fúze 8xHIStagovou kotvou přítomnou na vektoru. Pro účely exprese nese vektor T7 laktózový promotor, T7 terminátor a prvky laktózového operonu: *lac* operační místo a gen pro IPTG-inaktivovatelný *lac* represor. (Dubendorff & Studier, 1991). Nevyužitou vlastností je replikační počátek bakteriofága *f1* umožňující tvorbu virionů obsahujících jednovláknovou DNA odpovídající kódujícímu vláknku.

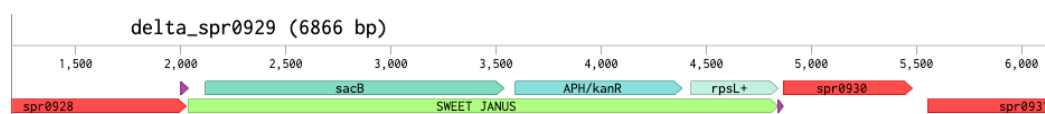
pAkCmDk (Nováková et al., 2005) je vektor pro přípravu mutantu *S. pneumoniae* v genu *stkP*. Obsahuje okolí před a za tímto genem pro účely vložení vektoru pomocí mechanismu homologní rekombinace. Dále vektor obsahuje gen rezistence k chloramfenikolu kvůli pozitivní selekci. Vektor byl v linearizované formě použit pro přípravu kmene Sp744, nesoucích FLAGem značený gen *spr0929* pod nativním promotorem.

Janus kazeta (JK) (Sung et al., 2001) je lineární DNA konstrukt (1333pb) pro delecii vybraného genu *S. pneumoniae*. Obsahuje gen *kan* udělující rezistenci ke kanamycinu (Kan^R). Markerem pro negativní selekci, používané při odstraňování kazety je *rpsL*⁺. Gen *rpsL* kóduje protein S12 malé ribozomální podjednotky. Bodová mutace K52T v S12 způsobuje dominantní citlivost ke streptomycinu (Sm^s). Janus kazeta byla použita pro přípravu kmenů Sp711 a Sp712 při přípravě dvojitého mutant s vloženým FLAG epitopem v nativním lokusu genu *spr0929*.

Sweet Janus kazeta (SJK) (Li et al., 2014) se používá pro delecii genu zájmu. Díky vložené kazetě získají transformanti markery pro pozitivní a negativní selekci. SJK (**Obrázek 11**) je modifikací dříve vyvinuté Janus kazety.

Problémem původní Janus kazety je spontánní konverze *rpsL*⁺ na Sm^r*rpsL* alelu, vedoucí k falešné pozitivitě během negativní selekce. K tomuto jevu dochází s frekvencí 10⁻⁵ až 10⁻³.

SJK tento nedostatek řeší zavedením dalšího markeru pro negativní selekci – genu *sacB* z bakterie *Bacillus subtilis*. Tento gen kóduje enzym levansukrázu, která přeměňuje sacharózu na vysokomolekulární fruktózové polymery. V přítomnosti sacharózy je exprese *sacB* letální. Konverze obou markerů SacB a *rpsL*⁺ je pravděpodobná pouze s frekvencí 10⁻⁹.



Obrázek 11: Sweet Janus kazeta. Mapa lokusu *spr0929* s vloženou SJK. SJK nese dva negativní selekční markery *sacB* a *rpsL*⁺ a jeden pozitivní selekční marker *kan*.

4.1.4 Chemikálie

Použité chemikálie jsou abecedně seřazeny v následující **Tabulce 6**. Ve sloupci označeném Vzorec/zkratka je uvedeno označení používané v textu. Všechny uvedené chemikálie dosahovaly analytické čistoty.

Název	Firma	Vzorec/Zkratka	Použití
1,4 - Dithiothreitol	Sigma-Aldrich	dTT	Kinázová reakce <i>in vitro</i>
2'- deoxyadenosin -5'- trifosfát	Promega	dATP	PCR nukleotidy
2'- deoxythymidin -5'- trifosfát	Promega	dTTP	PCR nukleotidy
2'- deoxycytidin -5'- trifosfát	Promega	dCTP	PCR nukleotidy
2'- deoxyguanosin -5'- trifosfát	Promega	dGTP	PCR nukleotidy
Agaróza	Sevac		Příprava DNA agarózového gelu
Akrylamid	Sigma-Aldrich		Příprava gelu na 1D SDS PAGE
ATP solution	Sigma-Aldrich	ATP	Kinázová reakce <i>in vitro</i>
Amidová čern	Lachema		Příprava roztoku amidové černě
Ampicilin	Sigma	Amp	Příprava selekčních médií
Anti-FLAG® M2 Magnetic Beads	Sigma-Aldrich		Purifikace proteinů s Flagovou kotvou
Bacto agar	Oxoid		Příprava pevných půd na kultivaci
Bromfenolová modř	Lachema	BPB	Příprava vzorkového pufru
Casiton	BD company		Příprava gelózy
Comassie Blue R250	Merck		Barvení SDS-PAGE gelů
Complete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche		Inhibitor proteáz na izolaci proteinů
Kompetenci stimulační peptid	Biopharm	CSP	Indukce kompetence během transformací
Deoxycholát sodný	Merck	DCNa	izolace chDNA a Příprava SEDS
Dihydrogen fosforečnan draselný	Lach-Ner	KH ₂ PO ₄	Příprava PBS
Dihydrogen fosforečnan sodný	Lach-Ner	NaH ₂ PO ₄	Příprava roztoků na purifikaci proteinů s Flagovou kotvou
Dodecylsulfát sodný	Serva	SDS	Příprava roztoků na izolaci DNA a roztoků na přípravu 1D SDS-PAGE
D-glukóza	Lachema		Příprava médií pro kultivaci
Ethanol	Lachema	EtOH	Izolace chDNA, přísadek do Wash pufrů
Ethylendiamintetraoctová kyselina	Sigma-Aldrich	EDTA	Příprava SEDS a pufru TAE, kinázová reakce <i>in vitro</i>

Fenol	Sigma-Aldrich		Příprava fenol/chloroformových směsí na izolaci chDNA
Purple Loading Dye 6x	New England Biolabs		Příprava vzorků na DNA elektroforézu
Gel Red Nucleic Acid Stain	Biotium		Vizualizace DNA na agarózovém gelu
Glycerol	Lach-Ner		Příprava konzerv/prekonzerv a vzorkového pufru
Glycin	Serva	Gly	Příprava pufru na blotování a elektroforézu
Heptahydrát hydrogen fosforečnanu sodného	Lach-Ner	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	Příprava PBS
Hovězí sérový albumin, frakce V	Carl Roth	BSA	Příprava blokovacího roztoku a roztoků protilátek
Chlorid draselný	Serva	KCl	Příprava PBS
Chlorid sodný	Lach-Ner	NaCl	Příprava TBS-T, TBS, SEDS, dezintegračního pufru, gelózy a pufrů na purifikaci proteinů s Flagovou kotvou, složka kinázové reakce <i>in vitro</i>
Chlorid manganatý	Sigma-Aldrich	MnCl ₂	Kinázová reakce <i>in vitro</i>
Chlorid vápenatý	Sigma-Aldrich	CaCl ₂	Příprava kompetenčního média TSB
Chloroform	Lach-Ner		Izolace chDNA a přípravě fenol/chloroformové směsi
Imidazol	Sigma-Aldrich		Příprava roztoků na purifikaci proteinů s histidinovou kotvou
Izopropanol	Lach-Ner		Izolace chDNA
Izopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosidáza	Sigma-Aldrich	IPTG	Indukce vektoru pET42b
Kanamycin	Sigma-Aldrich	Kan	Příprava selekčních médií
Kvasinkový extrakt	Oxoid		Příprava LB média
Kyselina chlorovodíková	Sigma-Aldrich	HCl	Příprava TE pufru a SEDS
Kyselina octová	Lach-Ner		Příprava amidové černě
β-merkптоethanol	Sigma-Aldrich		Příprava vzorkového pufru
Methanol	BDH Prolabo Chemicals	MetOH	Příprava pufru na blotování, aktivace PVDF membrány
Ni-NTA agarose	Qiagen		Purifikace proteinů s histidinovou kotvou
Neopepton	Dufci		Příprava gelózy
Octan Sodný	Sigma-Aldrich	CH ₃ COONa	Izolace chDNA
Paraformaldehyd (16 %)	Thermo Fisher Scientific	OH(CH ₂ O) _n H	Příprava fixovaných preparátů na mikroskopii
Peroxosíran amonný	Lachema	APS	Příprava gelu na 1D SDS PAGE
Síran zinečnatý	Sigma-Aldrich	ZnSO ₄	Indukce exprese proteinu Spr0929
Tetracyklin	USB	Tet	Příprava selekčních médií
Tetramethyldiamid	Serva	TEMED	Příprava polyakrylamidového gelu
Tris-hydroxymethyl aminomethan	Sigma-Aldrich	Tris-base	Příprava gelózy
Tris-hydroxymethyl aminomethan hydrochlorid	Sigma-Aldrich	Tris-HCl	Příprava SEDS, pufru TE a TBS, kinázová reakce <i>in vitro</i>
Tryptone	Oxoid		Příprava LB média
Tween 20	Sigma-Aldrich		Příprava TBS-T, koloniová PCR

Tabulka 6: Seznam chemikálií.

4.1.5 Kultivační média a půdy

Tabulka č. 7 shrnuje chemikálie použité na výrobu 1 l média. Na tento objem byla směs doplněna přidáním destilované vody. Při přípravě pevných půd byl do média přidán 1,5% agar. Pro kultivaci *E. coli* bylo použito LB médium, jako selekční marker byl použit kanamycin (25 µg/ml) nebo ampicilin (100 µg/ml). Ostatní média byla použita pro kultivaci *S. pneumoniae*,

jako selekční marker byla použita sacharóza o výsledné koncentraci 10 %, nebo ATB kanamycin (200 µg/ml) či tetracyklin (2,5 µg/ml). Sterilizace připraveného média proběhla v autoklávu.

Médium	Složení
TSB médium	30 g TSB (Tryptic soy broth) (Oxoid)
Kompetenční TSB médium	TSB médium + 10 ml 0,1mM CaCl ₂ , 25 ml 8% BSA, pH 8 (dosaženo přidáním 67µl NaOH)
Krevní agar (LabMediaServis)	Columbia agar s přidavkem 5 % defibrilované beraní krve
Gelóza	Glukóza (1 g), NaCl (5 g), neopepton (5 g), Tris-base (1,25 g), casiton (10 g), agar (10 g)
LB médium	NaCl (10 g), kvasinkový extrakt (5 g), tryptone (10 g), výsledné pH 7,5
C+Y médium (Lacks & Hotchkiss, 1960)	PreC (L-cystein HCl 0,01125 g; octan sodný 2 g; kasein hydrolyzát 5 g; L-tryptofan 0,006 g; K ₂ HPO ₄ 8,5 g), 0,4 mM MnCl ₂ 1 ml; 20% glukóza 10 ml; roztok ADAMS III 25 ml; 3% glutamin 7,3 ml; 2% pyruvát sodný 15 ml; 1,5 M sacharóza 6,3 ml; 0,2% uridin adenosin 10 ml; 10% kvasničný extrakt 25 ml; 1 M HCl 20 ml Výsledné pH 6,8

Tabulka 7: Složení použitých médií. Vztaženo na 1 l objemu.

4.1.6 Pufrы a roztoky

Seznam pufrů použitých pufrů a dalších roztoků je uveden níže.

Název pufru	Složení	Použití
PBS pufr	NaCl (8 g), KCl (0,2 g), Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O (2,68 g), KH ₂ PO ₄ (0,24 g) výsledné pH 7,4	Promývání buněk před rozbitím, fixace buněk
TAE pufr	40mM Tris, 2mM EDTA, výsledné pH 8,5	DNA elektroforéza
TE pufr	1mM EDTA, 10mM Tris-HCl, výsledné pH 8,0	Izolace chDNA
Lytický pufr	50mM Na ₂ H ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 10mM imidazol, výsledné pH 8	Purifikace proteinů s histidinovou značkou pomocí Ni-NTA agarózy
Promývací pufr	50mM Na ₂ H ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 20mM imidazol, výsledné pH 8	
Eluční pufr	50mM Na ₂ H ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 250mM imidazol, výsledné pH 8	
Dialyzační pufr	25mM Tris, 100mM NaCl, výsledné pH 7,5	
Amidová čerň	40% metanol, 10% kyselina octová, 0,1% amidová čerň	Přenos proteinů na membránu a imunodetekce
Blokovací pufr	5% BSA, TBS-T pufr	
Blotovací pufr	48mM Tris, 39mM glycin, 0,0375% SDS, 20% methanol	
Dezintegrační pufr	20mM Tris, pH 7,0	
TBS-T	0,05% Tween-20, 137mM NaCl, 20mM Tris výsledné pH 7,6	
Elektroforetický pufr	0,025mM Tris, 0,192 M glycin, 0,1% SDS, výsledné pH 8,3	SDS-PAGE
Vzorkový SDS pufr 5x	15% SDS, 20% glycerol, 25% β-merkapt ethanol, bromfenolová modř, 350mM Tris, výsledné pH 6,8	

Tabulka 8: Seznam pufrů, jejich složení a použití.

4.1.7 Gely

Agarózový bloček na mikroskopii

90 mg agarózy bylo povařením rozpuštěno v 9 ml PBS pufru (viz **Tabulka 8**) za vzniku 1% agarózy v PBS Celý objem se nechal utuhnout v Petriho misce a následně byly vyřezány čtvercové bločky cca. 1x1 cm.

DNA agarózový gel

Agaróza byla povařením rozpuštěna v TAE pufru (viz **Tabulka 8**) dle požadované koncentrace.

SDS-PAGE gely

Dělicí gel o objemu 20 ml	12 %	Zaostřovací gel o objemu 6 ml	4 %
30% akrylamid	8ml	30% akrylamid	800 μ l
1,5M Tris pH 8,8	5ml	0,5M Tris pH 6,8	1,5ml
10% SDS	200 μ l	10% SDS	60 μ l
10% APS	200 μ l	10% APS	60 μ l
TEMED	20 μ l	TEMED	7,5 μ l
H ₂ O	6,6ml	H ₂ O	3,6ml

Tabulka 9: Složení gelů na SDS-PAGE.

4.1.8 Enzymy

Seznam použitých enzymů a jejich funkce. Reakční podmínky, včetně volby pufrů byly nastaveny podle doporučení výrobce. Všechny použité restriční enzymy jsou od firmy New England BioLabs.

Modifikační enzymy		Restriční enzymy	
Enzym	Firma	Enzym	Místo štěpení
Benzonáza	Merck	BamHI	G/GATCC
PfuX DNA polymeráza	Jena Bioscience	DpnI	GA/TC
Phusion polymeráza	New England Biolabs	<i>EcoRI</i> -HF	G/AATTC
Proteináza K	Roche	NdeI	CA/TATG
Purple Taq polymeráza	Top Bio	<i>NotI</i> -HF	GC/GGCCGC
T4 DNA ligáza	Fermentas	<i>SpeI</i> -HF	A/CTAGT
---	---	XhoI	C/TCGAG

Tabulka 10: Modifikační a restriční enzymy (RE). RE mají vyznačená restriční místa.

4.1.9 Protilátky

Seznam protilátek použitých pro imunodetekci. Ředění probíhalo do 15 ml TBS-T s přídatkem 1% BSA.

Protilátka	Firma	Typ protilátky	Ředění	Použití
Anti-FLAG F7425	Sigma-Aldrich.	Primární	1:10 000	Králičí protilátka proti FLAG epitopu
Anti-GFP	Santa Cruz Biotechnology	Konjugovaná	1:10 000	Monoklonální myší protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou proti GFP
Anti-His A7058	Sigma-Aldrich.	Konjugovaná	1:25 000	Monoklonální myší protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou proti poly-His
Anti-P-Thr	Cell Signalling Technology	Primární	1:50 000	Polyklonální králičí protilátka proti P-Thr
Anti-StkP	Apronex	Primární	1:700 000	Králičí protilátka proti C-Stk1 (PASTA)
Anti-PhpP	Apronex	Primární	1:20 000	Králičí protilátka na zakázku
Anti-Rabbit IgG PEROXIDASE A0545	Sigma-Aldrich.	Sekundární	1:5000	Protilátka proti králičímu IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou

Tabulka 11: Seznam protilátek použitých na imunodetekci.

4.1.10 Komerční soupravy, standardy a další materiály

Seznam komerčních souprav (kitů) a jiných materiálů, použitých v této diplomové práci.

Komerční soupravy, standardy	Použití
Immobilon-P PVDF membrána (Millipore)	Membrána sloužící k zachycení proteinů z polyakrylamidového gelu
Dialyzační kazety 0,5ml a 3ml (Thermo Fisher Scientific)	Dialýza proteinů
Poly-prep sklíčko (Sigma-Aldrich)	Příprava fixovaných mikroskopických preparátů
Vectashield (Vector Laboratories)	Příprava mikroskopických preparátů s DAPI fluoroforem
Min Elute™ Reaction Cleanup Kit (Qiagen)	Souprava k přečištění fragmentů DNA po proběhlé PCR reakci
Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)	Stanovení koncentrace proteinů
QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)	Souprava k izolaci DNA z agarózového gelu
QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)	Souprava k izolaci plasmidové DNA
WesternBright ECL HRP substrate (Advansta)	Substrát k vyvolání chemiluminiscenčního signálu při imunodetekci
WesternBright Sirius HRP substrate (Advansta)	Substrát k vyvolání chemiluminiscenčního signálu při imunodetekci
SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen)	Barvení proteinových polyakrylamidových gelů
Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England BioLabs)	Proteinový standard (11-245kDa)
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)	DNA standard (75-20000pb)

Tabulka 12: Seznam komerčních sad a dalších materiálů.

4.1.11 Laboratorní přístroje

Centrifugy:

- Centrifuge 5417C
- UNIVERSAL 320 R (Hettich)
- Micro 120 (Hettich)

Cyklery:

- BIOER (GenePro)
- Mastercycler gradient (Eppendorf)

Elektroforézy:

- ATTO (Atto corporation)
- OWL EASYCAST™ B1A (Thermo Fisher Scientific)
- NOVEX XCell SureLock (Invitrogen)

Spektrofotometry:

- DU-730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer (Beckman Coulter)
- NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)
- Prim'Light (Secomam)
- Microplate Absorbance Reader 800 TS (BioTek)

Váhy:

- Sartorius-laboratory (Sartorius)
- Sartorius-handly (Sartorius)

Mikroskopy:

- Mikroskop Olympus CellR IX 81 microscope (Olympus)
 - Kamera Olympus FV2T Digital B/W Fireware Camera (Olympus)
- Mikroskop Olymus CellVivo IX 83 (Olympus)
 - Kamera Photometrics Prime 95B (Photometrics)

Ostatní přístroje:

- Dezintegrátor buněk FastPrep FP120 (ThermoSavant)
- Dokumentace blotů G:Box Chemi XRQ instrument (SynGene)
- Dokumentační systém na agarózové gely InGenius (SynGene)
- Magnetická míchačka (Thermo Fisher Scientific)
- Magnetický separátor Dynal MPC-S (Dynal)
- Třepačka Innova® 42 – Incubator Shakers Series (New Brunswick Scientific)
- Kývačka ProBlot™ Rocker 25 (Labnet)
- Kývačka Everlast Rocker 247 (Benchmark Scientific)
- Rotátor Bio RS-24, Mini-rotator (Biosan)
- Suchý termostatovaný blok ThermoStat Plus (Eppendorf)
- Vortex VX-200 Lab Vortexer Vortex Mixer (Labnet)

- Zařízní pro Western Blot GEL BOX, VERTICAL BLOTTER (Labnet)
- Vodní lázně Julabo 7A, 5M a U3 (Julabo)

4.1.12 Software

Softwarové nástroje použité na získání, zobrazování a analýzu dat, zápis protokolů a bioinformatické metody:

Název	Použití
ImageJ	Program k zobrazení a analýze mikroskopických snímků
MicrobeJ	Doplněk ImageJ pro měření velikosti buněk
Violin_plot.r	Skript pro tvorbu grafů velikostí buněk (vlastní)
Benchlink	Online nástroj na zápis protokolů a práci s genetickými mapami
SnapGene	Zobrazení genetických map
EMBOSS Water	Online nástroj na sekvenční alignment pro vyhodnocení sekvenací
Gene 5	SW příslušenství přístroje Microplate Reader 800 TS
GeneSnap	Příslušenství dokumentačního systému InGenius
GeneSys	Příslušenství dokumentačního systému G:Box Chemi
Excellence RT	Příslušenství mikroskopu Olympus CellR

Tabulka 13: Použitý software.

4.2 Metody

4.2.1 Manipulace s DNA

4.2.1.1 PCR

Molekulárně-biochemická metoda polymerázové řetězové reakce (PCR – Polymerase Chain Reaction) umožňuje syntézu velkého množství požadovaného úseku DNA, ohraničeného krátkými oligonukleotidy z DNA templátu. Je založena na replikaci DNA pomocí termostabilní DNA polymerázy a probíhá v cyklech. Počet cyklů pro amplifikaci templátu byl 35, pokud není uvedeno jinak. Každý cyklus má tři části (denaturace, hybridizace oligonukleotidů a elongace požadovaného úseku DNA) lišící se teplotou. Teplotu hybridizace oligonukleotidů (T_m ; °C) lze určit na základě jejich sekvence, a to podle vzorce:

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

Doba elongace závisí na délce amplifikovaného fragmentu a na použité polymeráze a byla tedy zvolena podle pokynů výrobce. Reakční směs vždy tvořila DNA polymeráza a příslušný pufr v koncentracích doporučených výrobcem, směs dNTP o koncentraci 10 mmol/l a oligonukleotidy „forward a reverse“ o koncentracích 10 μ M. Jako templát byla použita

chDNA nebo plazmidová DNA. Oligonukleotidy použité v reakci byly připraveny firmou Eurofins Genomics. Seznam oligonukleotidů použitých v této práci je uveden v **Tabulce 5**.

PCR sloužila k ověřování modifikace genomu připravovaných kmenů a k amplifikaci fragmentů při konstrukci plasmidů a transformovaných DNA fragmentů.

Pro kontrolní PCR reakce sloužící k ověření správnosti připravovaných konstruktů byla použita Purple Taq polymeráza (Top Bio) bez schopnosti oprav chyb při amplifikaci. Tento typ polymerázy má vysokou enzymatickou aktivitu a představuje ekonomické řešení. Polymerázy PfuX (Jena Bioscience) a Phusion polymeráza (New England Biolabs) byly použity pro klonování a přípravu sekvenačních reakcí. Tyto polymerázy se díky opravné aktivitě vyznačují vysokou přesností.

V této práci byla využívána též metoda fúzní PCR, která umožňuje spojit více fragmentů DNA v jeden celek. Oligonukleotidy pro amplifikaci fúzovaných fragmentů byly navrženy tak, aby jejich konce obsahovaly vzájemně komplementární sekvence. Jinak probíhá tato reakce beze změn oproti klasické PCR.

Další využitou modifikací klasické PCR je koloniová PCR. Ta jako templát používá přímo část kolonie odebraná sterilním párátkem z pevného média nebo 0.5 μ l tekuté kultury. Metoda byla použita pro kontrolu vložení či odstranění konstruktů do chromozomu *S. pneumoniae*. Použitou polymerázou je v tomto případě Taq Purple polymeráza (Top Bio). Do reakční směsi byl kromě reaktantů doporučených výrobcem přidán 10% Tween 20, což je detergent pro dezintegraci bakteriální BS. Počáteční fáze programu PCR byla prodloužena na 8 minut, zbytek probíhal beze změn oproti klasické PCR.

4.2.1.2 Elektroforéza v agarózovém gelu, izolace DNA z gelu

Pro analýzu DNA pomocí gelové elektroforézy byl použit agarózový gel o hmotnostní koncentraci 0,8 %, připravený z 0,32 g agarózy a 40 ml TAE pufru. Pro zviditelnění DNA pod UV zářením bylo přidáno barvivo GelRed (Roche). K nanášeným vzorkům byl přidán 6x Loading Dye (New England Biolabs). Jako standart k určení velikostí fragmentů byl použit GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo scientific). Elektroforéza probíhala v TAE pufru při napětí 5 V/cm za použití přístroje OWL EASYCAST™ B1A (Thermo Fisher Scientific). Separovaná DNA byla následně vizualizována pod UV světlem a v případě potřeby dále izolována z gelu.

Izolace z gelu probíhala s použitím komerční sady QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) podle dodaného protokolu.

4.2.1.3 Izolace chDNA

K izolaci chDNA jsem využíval metodu fenol-chloroformové extrakce následované srážením součinností alkoholu a solí.

200 μ l kmene *S. pneumoniae*, bylo z konzervovaného vzorku zaočkováno do 10 ml TSB média. Po dosažení OD $OD_{600} = 0,8$ byla kultura centrifugována 10 minut při 9000 rpm. Vysušený pelet byl resuspendován ve 250 μ l SEDS a inkubován při 37°C po dobu 20 min, dokud nedošlo k úplnému zlyzování buněk (vyčeření vzorku). Kvůli degradaci proteinů byl v další fázi přidán 1 μ l proteinázy K (2 mg/ml) a vzorek byl inkubován 15 minut při teplotě 56°C. Následně byl objem vzorku doplněn na 500 μ l dodáním 250 μ l TE pufru. Poté bylo přidáno 500 μ l směsi fenol:chloroform v poměru 1:1. Po protřepání byl vzorek centrifugován (10 min, 13 000 rpm) a došlo k oddělení vodné fáze. Ta byla odebrána do nové zkumavky a doplněna o 500 μ l chloroformu. Opět došlo k promíchání a centrifugaci za stejných podmínek a vodná fáze byla opět osamostatněna převedením do nové zkumavky. Následně došlo k vysrážení chDNA přidáním 50 μ l 3M NaOAc a 500 μ l izopropanolu a protřepáním. Po centrifugaci (10 min, 13 000 rpm) byla získaná peleta vysušena a promyta 400 μ l 80 % EtOH. Po opětovném vysušení pelety byla získaná chDNA rozpuštěna ve 100 μ l TE pufru.

4.2.1.4 Izolace plazmidové DNA

Plazmidová DNA byla izolována z nočního inokula buněk *E. coli* kultivovaných v 10ml LB média s přidavkem příslušného antibiotika při stálé teplotě 37°C v třepačce (200 rpm). Pro izolaci plazmidu byla použita komerční souprava QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Při izolaci byly dodrženy pokyny výrobce.

4.2.1.5 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Restrikční endonukleázy (RE; restriktázy) jsou enzymy, které rozpoznávají specifickou sekvenci na DNA (většinou palindrom). Po navázání dochází ke štěpení obou vláken rozrušením vazeb mezi deoxyribózou a fosfátovým zbytkem. Štěpením lze získat DNA s definovanými konci s možností jednovláknových přesahů pro přesnou a orientovanou ligaci.

V této práci byly použity enzymy od firmy New England Biolabs, uvedené v **Tabulce 10**. Pro konkrétní pár enzymů byl použit optimální pufr a podmínky doporučené výrobcem.

V případě potřeby byly vzniklé fragmenty rozděleny na agarózovém gelu a extrahovány, v případě malých přesahů se nabízela možnost přečištění reakční směsi pomocí soupravy MinElute Reaction CleanUp Kit (Qiagen).

4.2.1.6 Ligace DNA

Metoda byla použita ke spojení fragmentů DNA štěpených pomocí RE při konstrukci klonovacích vektorů. Reakci provádí enzym T4 DNA ligáza, který katalyzuje tvorbu fosfodiesterové vazby mezi úseky DNA.

Poměr mezi vektorem a fragmentem byl 1:2. Dále reakční směs tvořily 2 μ l T4 DNA ligázy a 2 μ l ligačního pufru 10X T4 DNA Ligase buffer (Fermentas). Reakce probíhala v celkovém objemu 20 μ l při 22°C po dobu 1 hodiny.

4.2.1.7 Místně specifická mutageneze

Tato metoda *in vitro* mutageneze sloužila ke vnesení bodové mutace do přesně určeného místa na plazmidové DNA. Jedná se o metodu založenou na modifikované PCR s mutagenními oligonukleotidy, která je označovaná jako QuikChange Site-directed Mutagenesis (v této práci označované zkráceně QuikChange).

Pár mutagenních oligonukleotidů použitých pro amplifikaci byl navržen tak, aby byl vzájemně komplementární a nesl požadovanou bodovou záměnu. Jejich délka byla okolo 40 nukleotidů.

Pro PCR reakci se používá polymeráza PfuX. Složení reakční směsi odpovídá běžné PCR s 30ng templátové DNA. Program je nastaven na 16 cyklů a teplota hybridizace oligonukleotidů na konstantní hodnotu 55°C, nezávisle na délce oligonukleotidů.

Po skončení PCR reakce se ve směsi kromě DNA s vnesenou mutací nachází též původní nemutovaná DNA. Její specifické odstranění restriktázou DpnI je založené na odlišné míře metylace, metylovaná jsou pouze původní vlákna. Enzym DpnI štěpící metylovanou DNA byl do reakce přidán ihned po skončení PCR reakce a směs byla inkubována při teplotě 37°C po dobu 1 hodiny. Poté došlo k transformaci mutovaného plazmidu do kompetentních buněk *E. coli*, jeho izolaci a sekvenaci.

V této práci byla metoda využita ke konstrukci plazmidů nesoucích fosfoablativní bodovou záměnu T255A v genu *spr0929*. Mutagenní oligonukleotidy nesou označení AU273 a AU274, viz **Tabulka 5 na str. 44**.

4.2.1.8 Sekvence DNA

Metoda sloužila k ověřování sekvencí plazmidové DNA a správnosti vnášených genetických úprav do chDNA pneumokoka. Sekvenační služby pro tuto práci poskytla firma SeqMe. Při přípravě sekvenačních reakcí byly dodrženy doporučené koncentrace DNA a

oligonukleotidů. Následné vyhodnocení správnosti sekvence bylo provedeno metodou sekvenčního srovnání pomocí online nástroje EMBOSS Water.

4.2.2 Manipulace s proteiny

4.2.2.1 Příprava rychlých proteinových lyzátů (SEDS)

Z exponenciálně rostoucí kultury bylo do čisté 1,5 ml mikrozkušavky odebráno množství, které odpovídá 1 ml kultury o $OD_{600} = 0,4$. Buňky byly centrifugovány (2 min, 17949 g). Supernatant byl odstraněn a buňky byly znovu krátce stočeny. Po odsátí zbytku média byla peleta resuspendována ve 20 μ l roztoku SEDS. Následovala inkubace ve 37°C lázni, kde došlo k lýzi buněk a vyčerení roztoku. Délka inkubace závisela na použitém kmeni, maximální doba byla 15 minut. Následně bylo ke vzorku přidáno 20 μ l 2x koncentrovaného denaturačního vzorkového pufru (ředěn z 5x koncentrovaného destilovanou vodou). Po přidání pufru byl vzorek 5 minut inkubován v termobločku při 99°C.

Tato metoda byla v práci využita pro přípravu celkových proteinových lyzátů *S. pneumoniae* pro SDS-PAGE a následnou imunodetekci. Na SDS-PAGE bylo nanášeno 15 μ l takto připraveného vzorku.

4.2.2.2 Izolace proteinů mechanickou dezintegrací buněk

Druhým způsobem izolace proteinů byla metoda mechanické dezintegrace buněk pomocí přístroje FastPrep FP120 (ThermoSavant).

Narostlá kultura o $OD_{600} = 0,4$ v objemu 50 ml byla centrifugována v centrifuze Hettich Universal 320 R (5 min, 9 000 rpm, 4 ° C), supernatant odstraněn a peleta vysušena. Peleta byla následně resuspendována ve 400 μ l dezintegračního pufru (20 mM Tris, pH 7,0) a doplněna přidáním 150 μ l inhibitoru proteáz cOmplete mini EDTA-free (Roche) a 0,5 μ l benzonázy, která byla držena na ledu. Celý objem byl pak převeden do mikrozkušavek obsahujících skleněné kuličky a jemný zirkoniový písek.

Zkušavky byly vloženy do přístroje Fast Prep FP120, kde byly buňky mechanicky dezintegrovány rychlostí 4,5 m/s po dobu 20 sekund. Po skončení dezintegrace bylo nutné mikrozkušavky chladit 2 minuty na ledu, aby nedošlo k přehřátí vzorku. Tento cyklus se opakoval 4x.

Po rozbití buněk následovala centrifugace v centrifuze Hettich Micro 120 (5000 rpm, 10 min, 4°C). Supernatant obsahující bezbuněčný proteinový extrakt byl převeden do nové zkušavky a uchován při -20°C.

4.2.2.3 Stanovení koncentrace proteinů

Pro kolorimetrické stanovení koncentrace proteinů byla použita komerční souprava Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Provedení této metody bylo dodrženo dle pokynů výrobce.

Principem metody je uvolnění iontů mědi Cu^{2+} po reakci s peptidovou vazbou stanovovaných proteinů. Uvolněné ionty tvoří komplex s kyselinou bicinchoninovou (BCA). Při reakci vzniká zbarvení, jehož intenzita je kvantifikována spektrofotometrickým měřením při vlnové délce 562 nm.

K provedení měření koncentrace je nutné sestavit kalibrační křivku na základě známých koncentrací BSA. Po proložení této křivky přímkou byla získána rovnice lineární regrese. Dosazením hodnoty absorbance naměřené ve vzorcích byla dopočítána koncentrace proteinu. Stanovení koncentrace vzorku probíhalo v triplicátech.

4.2.2.4 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS

Metoda označovaná jako SDS-PAGE slouží k separaci proteinů podle jejich molekulové hmotnosti v polyakrylamidovém gelu s přidavkem dodecylsírany sodného (SDS), který proteiny denaturuje a dodá jim shodný záporný náboj.

Reaktanty pro přípravu 4% zaostřovacího a 12% separačního gelu jsou uvedeny v **Tabulce 9 na str. 50** včetně jejich použitého množství. Po sestavení aparatury na elektroforézu a nalití elektroforetického pufru (viz **Tabulka 8 na str. 49**) byly do jamek nanášeny vzorky o objemu 15 μl , smíchané se vzorkovým pufrem, které byly předem denaturovány povařením v termobločku při 99°C po dobu 5-10 minut. Jako marker molekulových hmotností byl použit Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England BioLabs). Do volných drah bylo nanášeno 10 μl vzorkového pufru, aby se zamezilo „smiling“ efektu.

Elektroforéza probíhala ve vertikálním uspořádání v aparatuře od společnosti ATTO corporation při napětí 15 V/cm^2 do doby, než došlo k dostatečnému rozdělení proteinů na základě viditelného standardu a čela.

Druhou použitou aparaturou byl NOVEX XCell SureLock (Invitrogen) v kombinaci s komerčními 12% gely Novex Tris-Glycine Gels s použitím stejného elektroforetického pufru. Elektroforéza probíhala s napětím 225 V po dobu přibližně 35 minut. Tato sestava byla použita k elektroforézám souvisejícím s průkazem fosforylace v *in vitro* podmínkách.

Pro následné barvení gelů byl zvolen rychlý způsob barvení pomocí SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen). Protokol pro barvení s použitím mikrovlnné trouby byl proveden podle pokynů výrobce.

4.2.2.5 Přenos proteinů na membránu („Western blot“) a jejich imunodetekce

Pro imunodetekci proteinů v analyzovaném vzorku, rozdělených na polyakrylamidovém gelu, bylo potřeba přenést tyto proteiny na membránu. Použitá membrána Immobilon-P™ PVDF (Millipore) byla před sestavením sendviče aktivována metanolem a následně ponořena do blotovacího pufru.

Samotný přenos proteinů probíhal v blotovacím pufru pomocí metody mokrého elektroblotu za použití přístroje Gel BOX Vertical Blotter (Labnet). Proces blotování trval 30 minut při 360 mA a byl proveden za laboratorní teploty. Při práci bylo postupováno podle doporučení výrobce.

Po skončení blotování byla membrána blokována na kývačce v TBS-T pufru s 5 % BSA, délka blokace byla závislá na použité protilátce. Protilátky byly ředěny v roztoku TBS-T s přídavkem 1 % BSA. Seznam použitých protilátek a jejich ředění je uveden v **Tabulce 11**. Při použití protilátek Anti-P-Thr, Anti-StkP a Anti-PhpP a Anti-GFP trvala blokace 1 hodinu. V případě protilátky Anti-FLAG probíhala blokace přes noc při 4°C. Poté byla membrána vystavena sekundární protilátce, ředěné v roztoku TBS-T s přídavkem 1 % BSA a inkubována přes noc při 4°C, s výjimkou Anti-FLAG (inkubace 2 hodiny při laboratorní teplotě). Následovalo vždy promytí membrány v TBS-T po dobu 10 minut. Tento proces byl opakován 3x. V případě použití konjugované Anti-GFP protilátky bezprostředně následovalo vyvolání chemiluminiscenčního signálu, jinak byla přidána sekundární protilátka a po inkubaci 1 hodinu byl zopakován proces promývání v TBS-T pufru 3x10 minut. Po nanesení substrátu na membránu byl zachycen chemiluminiscenční signál za použití přístroje G:Box Chemi XRQ (SynGene).

4.2.2.6 Purifikace proteinů s FLAGovou kotvou pomocí magnetických kuliček

Proteiny značené FLAG-epitopem byly z celkového proteinového lyzátu purifikovány pomocí Anti-FLAG protilátky imobilizované na magnetických kuličkách Anti-FLAG M2 Magnetic Beads (Sigma-Aldrich).

Do 1,5 ml zkumavky bylo přeneseno 100 µl 50% suspenze Anti-FLAG protilátkou značených magnetických kuliček v TBS pufru. Následovala ekvilibrace kuliček dvojitým promytím ve 250 µl TBS pufru. Po odstranění TBS pufru s využitím magnetického separátoru byl ke kuličkám přidán proteinový lyzát o koncentraci 2 mg. Směs byla přes noc inkubována

na automatickém rotátoru při 4°C. Došlo k vytvoření komplexu proteinů značených epitopem FLAG s protilátkou Anti-FLAG imobilizovanou na magnetických kuličkách.

Následující den byl supernatant s nenavázanými proteiny bez FLAG epitopu pomocí magnetického separátoru odebrán a označen jako **Flow**. Vzorek byl následně 3 x promyt pomocí TBS pufru. Jednotlivé odebrané frakce **Wash** 1-3 byly odebírány pro kontrolní elektroforézu. Eluce proteinů byla navozena přidáním 2 x SDS vzorkového pufru a inkubací 5 minut při 99°C. Magnetické kuličky byly následně separovány a byla odebrána **Eluční** frakce s proteiny značené FLAG-epitopem.

Pro kontrolu frakce **Flow** a **Wash** bylo odebráno 10 µl vzorku a toto množství smícháno s 10 µl 2 x SDS vzorkového pufru. Vzorky byly poté denaturovány (5 min při 99°C). Purifikované proteiny a kontrolní vzorky byly separovány pomocí SDS-PAGE, následovala imunodetekce pomocí Anti-FLAG protilátky.

4.2.2.7 Expresse rekombinantních proteinů řízená IPTG inducibilním promotorem

Expresse proteinu probíhala v kmenech *E. coli* BL21-DE3 nesoucích plazmid s genem pro tento protein pod IPTG inducibilním promotorem. Expresse byla navozena přidávkem induktoru IPTG.

Noční inokulum daného kmene *E. coli* kultivovaného v 10 ml LB média s příslušným ATB bylo přeočkováno do 50 ml LB média s antibiotikem v množství odpovídající počátečnímu $OD_{600} = 0,05$. Kultura byla následně kultivována v třepačce (200 rpm, 37°C) dokud OD_{600} nedosáhla hodnoty 0,5 - 0,7. Z takto narostlé kultury byl odebrán 1 ml jako kontrolní vzorek před indukcí exprese proteinu. Poté byl ke kultuře přidán IPTG o finální koncentraci 1mM, čímž došlo k indukci exprese proteinu. Kultura byla nadále držena v třepačce za nižší teploty (200 rpm, 30°C).

Vzorky pro kontrolu exprese byly odebírány po 1, 2 a 3 hodinách po přidání IPTG. Jejich množství bylo normováno na 1 ml kultury o $OD_{600} = 0,5$. Po odebrání poslední kontroly byla kultura centrifugována (4 000 g, 20 minut, 4°C), vzniklá peleta vysušena a uchována v -20°C.

Jednotlivé kontrolní vzorky byly centrifugovány ve stolní centrifuze 5 min na maximální otáčky. Vzniklé pelety byly resuspendovány v 70 µl vzorkového pufru (1x) a povařeny 5 minut při 100°C. Takto připravené vzorky byly separovány na SDS-PAGE gelu a po jeho obarvení SafeStain nebo Comassie Blue R250 barvením byla zkontrolována exprese proteinu.

4.2.2.8 Purifikace proteinů s His-Tagovou kotvou

Buněčné pelety *E. coli* BL21-DE3 s exprimovanými proteiny byly resuspendovány ve 2ml lytického pufru (viz **Tabulka 8 na str. 49**), bylo přidáno 150 µl inhibitoru proteáz

Complete mini EDTA-free 14x a 0,4 µl benzonázy. Následně byly buňky dezintegrovány pomocí přístroje FastPrep a po centrifugaci byl odebrán supernatant s proteiny, viz sekce „Mechanická dezintegrace buněk“.

K purifikaci rekombinantního proteinu nesoucího histidinovou kotvu byla použita kolonka s Ni-NTA agarózou. Histidinové zbytky kotvy interagují s iontem kovu navázaném na sorbentu na agarozovém nosiči, kde vytvoří komplex a zůstávají tak v kolonce zadrženy.

Agaróza byla po promíchání aplikována na kolonku a ekvilibrována 3 ml lytického pufru. Po následném nanesení proteinového lyzátu byla kolonka umístěna na rotátor do 4°C na 1 hodinu, kde došlo k vazbě proteinu na imobilizovaný nosič. Poté byla kolonka zbavena lyzátu nenavázaných proteinů. Část kapaliny byla odebrána pro kontrolní elektroforézu (F). Následovalo dvakrát opakování promytí kolonky 2,5 ml promývacího pufru (**Tabulka 8**). Posledních 0,5 ml bylo odebráno pro kontrolní elektroforézu (W). K uvolnění proteinu z nosiče byl použit eluční pufr s vyšším obsahem imidazolu (**Tabulka 8**). Jednotlivé frakce o objemu 250 µl byly postupně sbírány.

10 µl vzorku F a jednotlivých frakcí a 20 µl vzorku W bylo smícháno s 5x vzorkovým pufrem, krátce povařeno a nanášeno na SDS-PAGE. Proteiny byly vizualizovány SafeStain barvením.

4.2.2.9 Dialýza purifikovaných proteinů

Dialýza sloužila ke zbavení purifikovaných proteinů příměsí solí a jiných nízkomolekulárních látek. Do dialyzační kazety byl injekční stříkačkou vpraven proteinový vzorek. Dialýza probíhala v 1 litru vychlazeného dialyzačního pufru (**Tabulka 8**) za stálého otáčení kazety po dobu 1 hodiny. Dialyzační pufr byl poté vyměněn za čistý a vzorek dialyzován přes noc při 4°C. Druhý den byl dialyzační pufr opět vyměněn a proběhla závěrečná fáze dialýzy po dobu 1 hodiny. Nakonec byl proteinový vzorek pomocí injekční stříkačky vyjmut z dialyzační kazety a doplněn glycerolem do výsledné koncentrace 10 %. Purifikované proteiny byly rozalikvotovány do 1,5 ml zkumavek a uchovány v -80°C.

4.2.2.10 Kinázová reakce *in vitro*

Tato metoda sloužila pro *in vitro* průkaz fosforylace proteinu Spr0929 proteinkinázou StkP a potvrzení místa fosforylace. Testována byla fosforylace proteinu His-Spr0929 a His-Spr0929-T255A s fosfoabativní záměnou v předpokládaném místě fosforylace.

Fúzní proteiny byly přidány do reakčních směsí pro *in vitro* kinázovou reakci. Reakční směsi o celkovém objemu 20 µl byly připraveny smícháním 250 mM Tris-HCl o pH 7,5, 250 mM NaCl, 50 mM MnCl₂, 20 mM DTT a 2 mM EDTA. Ke směsi byl přidán 1 µg purifikované

kinázové domény StkP a 2 µg proteinu Spr0929 nebo Spr0929-T255A. Následným přidáním 100 µM ATP došlo k zahájení průběhu reakce. *In vitro* kinázová reakce probíhala ve 37°C po dobu 20 minut. Poté bylo přidáno 5 µl 5 x vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Vzorky byly povařeny 3 minuty při 100°C a rozděleny na SDS-PAGE. Fosforylace byla vizualizována imunodetekcí s protilátkou proti fosfothreoninu (Anti-P-Thr).

4.2.3 Manipulace s kmeny *S. pneumoniae*

4.2.3.1 Kultivace a tvorba glycerolových konzerv

Jednotlivé bakteriální kultury *S. pneumoniae* byly připraveny zaočkováním 200 µl zásobních buněk ($OD_{600} = 0,4$) do 10 ml tekutého TSB nebo C+Y média. Kultivace bakteriálních kmenů probíhala staticky ve vodní lázni vytemperované na 37°C.

Při indukci exprese proteinu Spr0929 ze zinkem indukovaného promotoru byl do média přidán $ZnSO_4$ v různých koncentracích a pro optimalizaci rychlosti růstu též $MgSO_4$ v poměru k zinku 1:10.

Glycerolové konzervy byly připraveny přidáním 250 µl 60% glycerolu k 750 µl bakteriální kultury narostlé v příslušném tekutém médiu do $OD_{600} = 0,3 - 0,4$. Přesná hodnota OD_{600} byla změřena pomocí spektrofotometru Evolution™ 201/220 UV-Visible (Thermo Scientific) a zaznamenána. Vytvořené glycerolové konzervy byly uchovávány při teplotě -80°C.

Druhým způsobem kultivace byl růst bakteriálních kmenů pneumokoka na miskách s krevním agarem. V tomto případě byly kolonie kultivovány přes noc v termostatu při 37°C.

4.2.3.2 Transformace DNA

Transformace DNA do bakterií *S. pneumoniae* byla provedena v kompetenčním TSB médiu pomocí syntetického peptidu CSP.

K 950 µl kompetenčního TSB média byl přidán vybraný kmen *S. pneumoniae* o objemu 50 µl, 1 µl CSP (250 ng/ml) a DNA (1 µg chDNA či 20-100 ng plasmidové DNA nebo PCR produktu). Transformační směs byla následně inkubována ve vodní lázni vytemperované na 37°C po dobu 2,5 hodiny.

Dále byla z transformační směsi vytvořena ředící řada $0-10^{-5}$ a z každého ředění bylo 100 µl směsi nanášeno na Petriho misku o průměru 6 cm a přelito 6 ml gelózy vytemperované na 50°C. Ředění $0-10^{-3}$ obsahovalo navíc selekční marker – antibiotikum kanamycin (200 µg/ml), nebo tetracyklin (2,5 µg/ml) či 10% sacharózu. Ředění 10^{-4} a 10^{-5} sloužila ke kontrole

životaschopnosti buněk. Misky s vysetou transformační směsí byly následně inkubovány přes noc při 37°C.

Druhý den byly klony narostlé na gelóze s ATB přeočkovány na misky s krevním agarem s příslušným pozitivním selekčním markerem. Přeočkované klony se opět nechaly růst přes noc při 37°C. V případě možnosti využití negativního selekčního markeru byly další den klony přeočkovány na dvě krevní misky obsahující jak pozitivní a negativní marker. Po inkubaci přes noc při 37°C byly klony, které narostly na misce s pozitivním selekčním markerem, ale nikoliv na té s negativním kultivovány ve 2 ml TSB média při 37°C. (Pokud byla provedena pouze jedнокroková pozitivní selekce, k zaočkování došlo o den dříve.) Z kultury byly při dosažení hustého zákalu vytvořeny prekonzervy přidáním 250 µl 60% glycerolu k 750 µl narostlé kultury. Prekonzervy byly uchovány v -80°C.

4.2.3.3 Měření růstových křivek

Měření růstových křivek *S. pneumoniae* probíhalo v přístroji Microplate Absorbance Reader 800 TS. Bakteriálních kmeny byly zaočkovány do 1 ml vytemperovaného TSB média tak, aby počáteční hodnota OD₆₀₀ byla rovna 0.08. Vzorky byly po důkladném promíchání naneseny v triplicátech na mikrotitrační destičku s 96 jamkami, a to v objemu 200 µl. Destička byla umístěna do přístroje 800 TS, který byl předem vytemperován na požadovanou teplotu.

Následně byla po dobu 7 hodin při dané konstantní teplotě automaticky měřena růstová kinetika. V intervalu 10 minut byla zaznamenávána hodnota OD₆₀₀. Destička se vzorky byla inkubována staticky.

Vyhodnocení růstových křivek probíhalo vypočítáním průměrných hodnot ze všech měření při zanedbání nejvíce odchýlených hodnot maximálně jednoho měření. Do grafů byly vyneseny logaritmy o základu 2 ze stonásobku naměřených hodnot. Pro zobrazení chybových úseček byl použit výpočet standartní chyby z těchto hodnot. Doba zdvojení byla stanovena na základě směrnice přímky logaritmického vynesení v exponenciální fázi růstu jako převrácená hodnota koeficientu B v rovnici $y=Ax+B$.

4.2.4 Manipulace s kmeny *E. coli*

4.2.4.1 Kultivace a tvorba glycerolových konzerv

Kultivace bakterií *E. coli* probíhala vždy v LB médiu, a to přes noc při teplotě 37°C. V případě tekutého LB média probíhala kultivace za stálého třepání (200 rpm). Při použití misek s pevným LB médiem byly bakteriální kmeny kultivovány staticky. Při selekci pozitivních

transformantů bylo do média přidáno příslušné antibiotikum – kanamycin (25 µg/ml) nebo ampicilin (100 µg/ml).

Tvorba glycerolových konzerv probíhala odebráním 750 µl narostlé kultury do mikrozkušavky a přidáním 250 µl 60% glycerolu. Takto připravené konzervy byly uchovávány v -80°C.

4.2.4.2 Transformace DNA

Transformace kompetentních buněk *E. coli* byla prováděna pomocí teplotního šoku. K transformaci ligační směsi či produktu QuikChange reakce bylo použito 100 µl kompetentních buněk *E. coli* DH5α, zatímco k transformaci expresních vektorů byly použity expresní buňky *E. coli* BL21. Buněčné kultury uchovávané při -80°C byly rozmrazeny při 4°C. Poté bylo ke kultuře přidáno 10 µl směsi s transformovanou DNA a buňky byly inkubovány na ledu po dobu 30 minut. Následoval teplotní šok, (42°C po dobu 90 sekund, poté 90 sekund na ledu). Ten usnadnil příjem cizorodé DNA. Následovalo přidání 400 µl LB média vytemperovaného na 37°C a proběhla statická kultivace při této teplotě po dobu 1 hodiny. Poté byla buněčná suspenze ve dvou různých objemech (200 a 300 µl) vyseta na misky s LB médiem s přidavkem příslušného antibiotika pro selekci transformovaných buněk. Transformované bakterie byly kultivovány přes noc při 37°C.

4.2.5 Mikroskopie

4.2.5.1 Mikroskopie živých preparátů

Samotné mikroskopii předcházelo nakultivování buněčné kultury v TSB nebo C+Y médiu do OD₆₀₀ = 0,4. Mikroskopické preparáty byly připraveny nanesením 2 µl narostlé kultury na krycí sklíčko, a to bylo poté překryto pomocí agarózového bločku. Vzorek s živými buňkami byl následně mikroskopován pomocí přístroje Olympus CellR IX 81 s imerzním objektivem O2PH-UPLFLN/1.3 N.A. při zvětšení 100x. Snímky byly zaznamenány kamerou Olympus FV2T Digital B/W Fireware.

Pro morfologickou analýzu buněk byly mikroskopické snímky pořízeny v režimu fázového kontrastu. Poté byly analyzovány pomocí programu ImageJ a jeho doplňku MicrobeJ, který dokáže dle nastavených parametrů kvantifikovat morfologické parametry buněk. Statistické zhodnocení naměřených hodnot probíhalo v programu GraphPad Prism. Statistická významnost v rozdílu u jednotlivých měřených kmenů byla určena použitím neparametrického Mann Whitneyho testu na hladině významnosti $p < 0,05$. Srovnání bylo vyneseno v grafické podobě ve formě violin grafů a významnost rozdílu buněčných délek byla zanesena do tabulek.

Pro studium lokalizace proteinu Spr0929 byly mikroskopické snímky pořízeny s použitím filtru pro GFP a výsledné obrázky byly vytvořeny překryvem těchto fotografií s fotografiemi stejné oblasti pořízenými pomocí fázového kontrastu.

4.2.5.2 Mikroskopie fixovaných preparátů

Pro studium kolokalizace proteinu Spr0929 s bakteriálním nukleoidem byly připraveny fixované preparáty s DNA-specifickým fluoroforem DAPI.

Fixace probíhala podle následujícího protokolu: 1 ml bakteriální kultury kultivované v TSB médiu byl při dosažení $OD_{600} = 0.4$ stočen ve stolní centrifuze (5 min, 6000 rpm). Po odsátí supernatantu byl pelet promyt v 0,5 ml PBS pufru. Po opětovném stočení byl vzorek fixován v 4 % roztoku paraformaldehydu v PBS. Fixace probíhala 15 minut při laboratorní teplotě a poté 45 minut na ledu. Fixované buňky byly uchovávány při teplotě 4°C.

Pro přípravu mikroskopických preparátů byly fixované buňky stočeny 5 min při 5000 rpm ve stolní centrifuze. Poté byl pelet resuspendován v 1 ml PBS pufru (viz **Tabulka 6**). Následovala centrifugace 3 min při 5000 RPM a opětovné resuspendování v 1 ml PBS. Na Poly-prep sklíčko bylo nanášeno 10 μ l suspenze a sklíčko bylo vysušeno. Na místo, kde byly zachyceny buňky, byly nanášeny 2 μ l přípravku Vectashield s fluoroforem DAPI. Po překrytí krycím sklíčkem byl preparát zafixován čirým lakem na nehty, aby se zabránilo vysychání.

Výsledky

Na základě globálního fosfoproteomu závislého na proteinkináze StkP a fosfatáze PhpP byl threonin v pozici 255 proteinu Spr0929 identifikován jako fosforylovaný v hyperfosforylovaném kmeni s odstraněnou fosfatázou PhpP (Ulrych, nepublikovaná data).

V rámci svého diplomového projektu se zabývám podrobnější charakterizací proteinu Spr0929 a studiem jeho fosforylace kinázou StkP.

4.3 Delece genu *spr0929*

Ke studiu fenotypového projevu konkrétního proteinu je nutné vytvořit kmen s odstraněným genem pro tento protein.

Prvním krokem k vytvoření delečního kmene v určitém genu u pneumokoka schopného přijmout lineární cizorodou DNA je tvorba konstruktů s rezistenční kazetou. DNA sekvence kazety je obklopena sekvencemi, homologními k místu na bakteriálním chromozomu, kam chceme tuto kazetu vložit. Konstrukt vzniká v několika krocích. Nejprve byly amplifikovány pomocí příslušných oligonukleotidů jednotlivé oblasti DNA, označené jako **A_{SJK}**, **B_{SJK}** a **C_{SJK}**, viz **Tabulka 14**. Ty byly následně spojeny metodou fúzní PCR, tedy amplifikací směsi těchto dílčích fragmentů z vnějších oligonukleotidů AU143 a AU146 za vzniku fragmentu **F_{SJK}** spojením komplementárních oblastí mezi AU144 a DP1 a mezi DP2 a AU145.

Fragment	Obsahující	Oligonukleotidy	Délka
A_{SJK}	Oblast před genem <i>spr0929</i>	AU143 / AU144	953bp
B_{SJK}	SJK	DP1 / DP2	2807bp
C_{SJK}	Oblast za genem <i>spr0929</i>	AU145 / AU146	1001bp
F_{SJK}	Celý konstrukt <i>spr0929::SJK</i>	AU143 / AU146	4717bp

Tabulka 14: Tvorba konstruktů *spr0929::SJK*. Fragменты použité pro fúzní PCR.

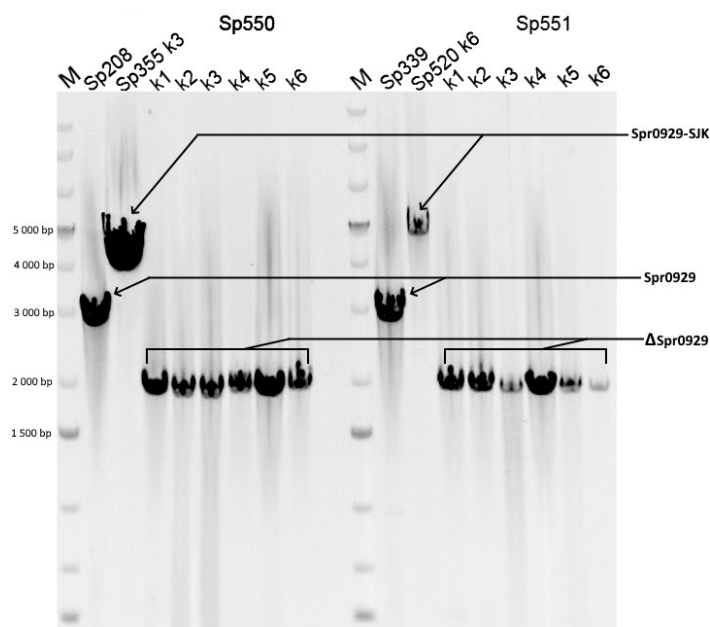
Vytvořený konstrukt **F_{SJK}** byl pomocí transformace vložen do divokých kmenů ve všech třech genetických pozadích *S. pneumoniae* používaných v naší laboratoři, Rx1, R6 a D39, za vzniku kmenů Sp354, Sp355 a Sp520 (viz **Tabulka 4**). V těchto kmenech byla nahrazena původní oblast s genem *spr0929* za SJK a přilehlými oblastmi, která má na chromozomu u divokého typu (wild type, WT) délku 2859bp. Jako pozitivní selekční marker byl použit kanamycin o koncentraci 200 µg/ml. Přechárkováním odpovídajících klonů na misky s negativním selekčním markerem (10% sacharózou) byly vyloučeny falešně pozitivní klony.

Ve druhém kroku byl stejnou metodou připraven konstrukt pro odstranění SJK kazety, a to fúzí dvou DNA fragmentů přes 48bp dlouhou komplementární oblast mezi oligonukleotidy LN298 a LN299, viz **Tabulka 15**.

Fragment	Obsahující	Oligonukleotidy	Délka
A Δ	Oblast před genem <i>spr0929</i>	AU143 / LN298	955bp
B Δ	Oblast za genem <i>spr0929</i>	LN299 / AU146	1016bp
F Δ	Celý konstrukt Δ <i>spr0929</i>	AU143 / AU146	1923bp

Tabulka 15: Tvorba konstruktů Δ *spr0929*. Fragменты použité pro fúzní PCR.

Tento konstrukt F Δ (Δ *spr0929*) byl transformován do kmenů se SJK za vzniku kmenů Sp550, Sp551 a Sp623, viz **Tabulka 4**. Jako pozitivní selekční marker byla použita 10 % sacharóza, negativním selekčním markerem byl kanamycin ve stejné koncentraci jako v předchozím případě. Všechny vzniklé kmeny byly testovány metodou koloniové PCR s oligonukleotidy LN302 a AU146, jejichž vzdálenost na chromozomu u WT je 2898bp. U kmene se SJK má být vzdálenost rovna



Obrázek 12: Delece u kmenů R6 a D39. Délky: WT: 2898bp, SJK: 4756bp, Δ *spr0929*: 1962bp.

4756bp a u delečního kmene 1962bp. Délky amplikonů na gelu odpovídaly těmto hodnotám, jak je patrné z **Obrázku 12** (kmen na genetickém pozadí Rx není zobrazen).

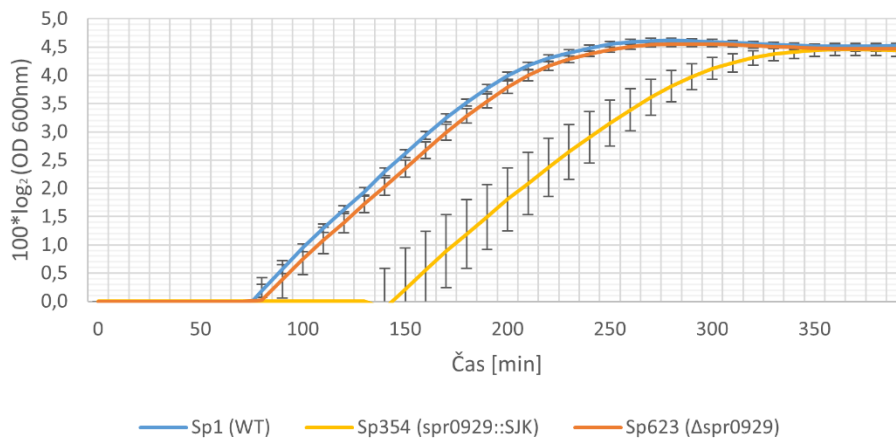
Z kmenů nesoucích úplnou delecí byla izolována chDNA, vždy ze dvou pozitivních klonů. DNA jednoho klonu od každého kmene byla po amplifikaci z vnějších sekvenčních oligonukleotidů LN302 a LN303 sekvenována. Jelikož sekvenace neodhalila žádnou chybu v sekvenci, byly tyto klony používány pro další experimenty.

4.4 Růstová charakterizace delečních kmenů

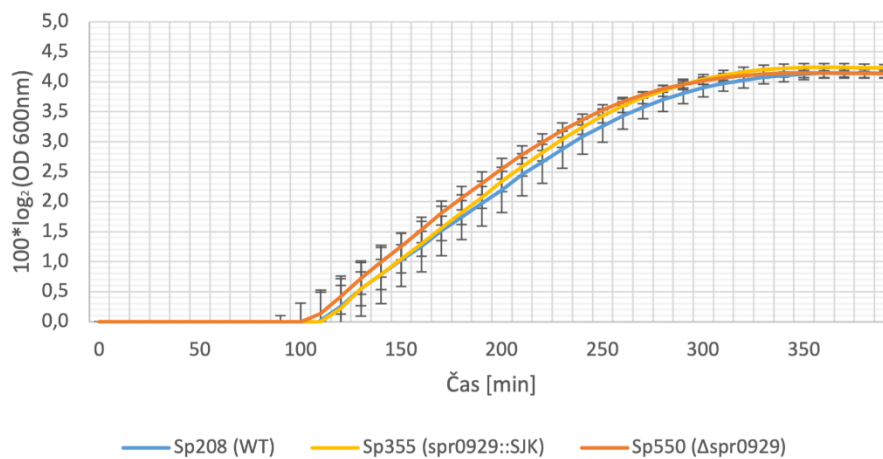
Úspěšné vytvoření kmenů, nesoucích úplnou delecí genu *spr0929* otevřelo cestu k jejich charakterizaci. Prvním experimentem bylo stanovení schopnosti růstu v tekutém médiu TSB při standardní teplotě 37°C. Byly testovány též kmeny se zavedenou SJK. Srovnán byl růst WT se čtyřmi klony se zavedenou SJK a čtyřmi klony s úplnou delecí, a to na všech genetických

pozadích. V následujících grafech jsou vyneseny křivky odpovídající průměru hodnot ze všech klonů a měření.

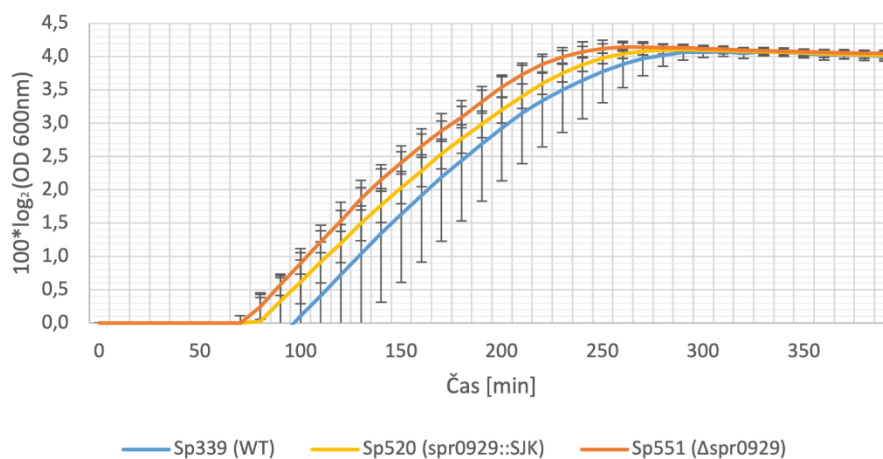
Δspr0929 na pozadí Rx (průměr)



Δspr0929 na pozadí R6 (průměr)



Δspr0929 na pozadí D39 (průměr)



Obrázek 13: Růst *Δspr0929*. Porovnání růstu WT a několika klonů kmene nesoucího SJK v lokusu *spr0929* a úplnou delecí genu *spr0929* na všech třech genetických pozadích.

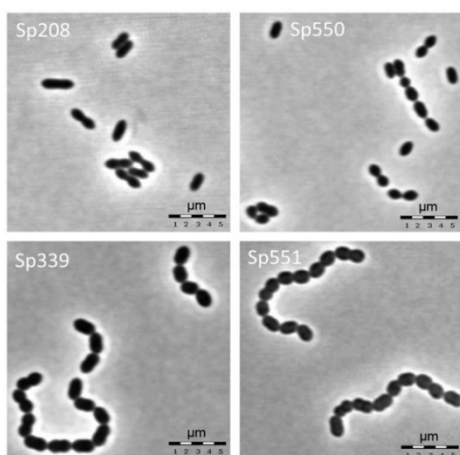
Kmeny Rx	Doba z. [min]	Kmeny R6	Doba z. [min]	Kmeny D39	Doba z. [min]
Sp1 (WT)	30,6	Sp208 (WT)	30,6	Sp339 (WT)	37,0
Sp354 k1	33,6	Sp355 k2	33,6	Sp520 k1	41,3
Sp354 k3	34,2	Sp355 k3	34,2	Sp520 k6	41,5
Sp354 k4	34,8	Sp355 k4	34,8	Sp520 k7	37,2
Sp354 k5	32,1	Sp355 k6	32,1	Sp520 k21	45,5
Sp623 k1	31,5	Sp550 k1	31,5	Sp551 k1	35,5
Sp623 k2	31,0	Sp550 k2	31,0	Sp551 k2	35,8
Sp623 k4	31,1	Sp550 k3	31,1	Sp551 k4	35,3
Sp623 k6	31,3	Sp550 k4	31,3	---	---
Průměr					
Sp354 (spr0929::SJK)	33,6	Sp355 (spr0929::SJK)	33,6	Sp520 (spr0929::SJK)	37,6
Sp623 (Δspr0929)	31,3	Sp550 (Δspr0929)	31,3	Sp551 (Δspr0929)	36,4

Tabulka 16: Doba zdvojení u jednotlivých kmenů. Vyloučené klony jsou červeně.

Grafy růstových křivek, prezentované na **Obrázku 13**, jsou výsledkem třech biologických replikátů, měřených vždy v technických triplikátech. Na základě směrnice přímky logaritmického vynesení v exponenciální fázi růstu byla stanovena doba zdvojení jednotlivých klonů, viz **Tabulka 16**.

Zavedení SJK do kmene Rx vede ke zpomalení růstu, ovšem delece proteinu růst významně neovlivňuje u žádného genetického pozadí.

4.5 Morfologická charakterizace kmenů s delecí *spr0929*



Obrázek 14: Morfologie Δ*spr0929*. Porovnání WT kmene R6 (Sp208) a D39 (Sp339) s Δ*spr0929* kmeny Sp550 (R6) a Sp551 (D39). Kultivováno v C+Y médiu. Rozměr výřezu je 20x20μm.

Většina doposud popsanych substrátů kinázy StkP hraje roli v buněčném dělení, mají tedy vliv na morfologii buněk. U kmenů nesoucích delecí *spr0929* na genetickém pozadí R6 a D39 jsem proto zjišťoval odlišnosti v morfologii.

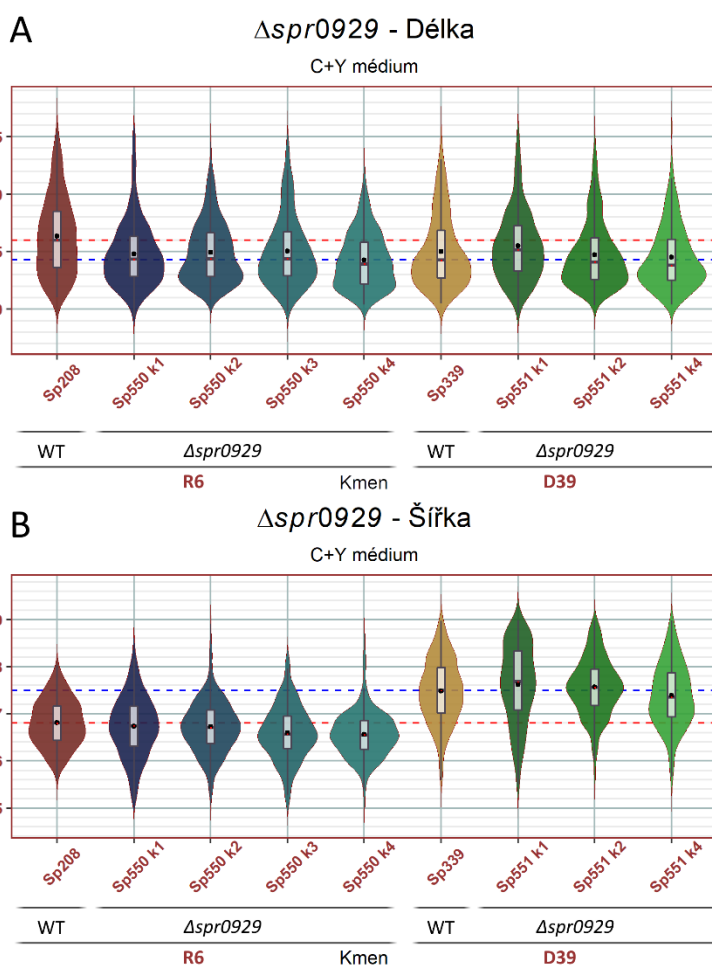
Mikroskopické preparáty jsem připravil z živých kultur kultivovaných v semidefinovaném C+Y médiu, kde jsou na základě zkušenosti naší laboratoře morfologické rozdíly obecně výraznější. S pomocí mikroskopie za použití metody fázového kontrastu jsem získal mikroskopické snímky, viz

Obrázek 14.

Následně jsem pomocí SW měření s použitím programu ImageJ a doplňku MicrobeJ stanovil morfologické parametry buněk. Sledovanými parametry byla délka a maximální šířka buněk. Graf rozložení těchto hodnot je na **Obrázku 15**.

Výsledné datasey jsem podrobil statistické analýze významnosti rozdílů v naměřených hodnotách. K tomuto vyhodnocení jsem použil neparametrický Kruskal-Wallisův t-test. Testovány byly tři klony *Δspr0929* u každého ze dvou genetických pozadí v porovnání s příslušným WT. Statisticky významné rozdíly ve velikosti, v délce i

šířce buněk, jsem pozoroval pouze u *Δspr0929* u R6 kmene, což dokládá **Tabulka 17** Klon Sp551 k1 vykazoval odlišnost v morfologii z hlediska obou sledovaných parametrů.

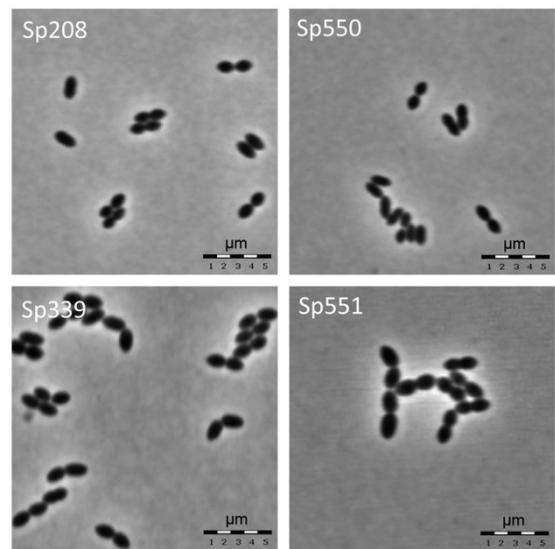


Obrázek 15: Morfologické parametry *Δspr0929*. Graf znázorňuje rozložení hodnot délky (A) a šířky (B) buněk kultivovaných v C+Y médiu. Červená přerušovaná čára značí hodnotu mediánu R6 WT, modrá totéž pro D39. Černé body značí průměrnou hodnotu velikosti příslušných sledovaných parametrů. Každý graf obsahuje krabicový podgraf se středem v hodnotě mediánu, jeho horní a spodní hranice odpovídá intervalu velikostí, ve kterém se nachází 75 % buněk.

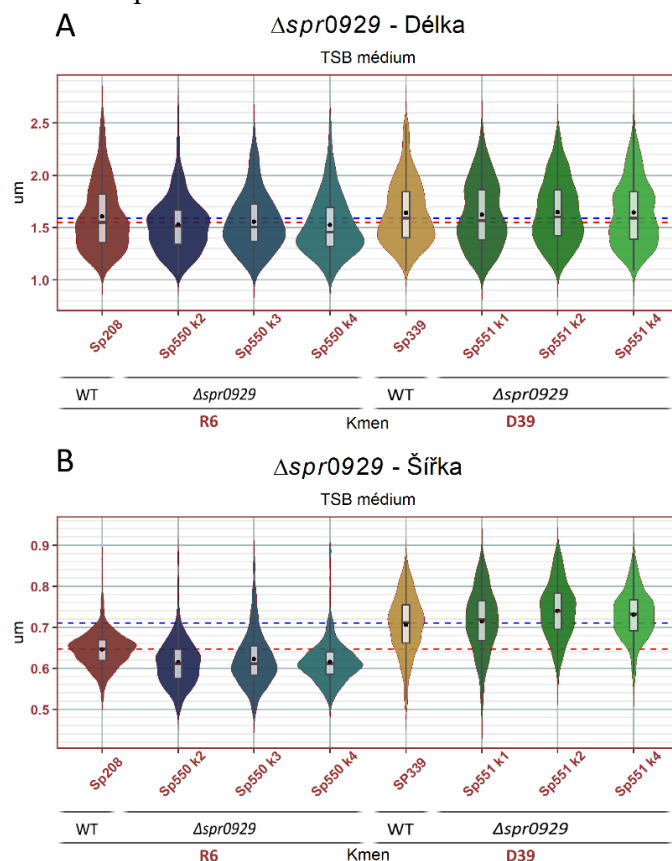
Gen. pozadí	Kmen	Délka			Šířka		
		Průměr	St. odchylka	SVO (P < 0.05)	Průměr	St. odchylka	SVO (P < 0.05)
R6	Sp208 (WT)	1.6310	0.3727	---	0.6808	0.04999	---
	Sp550 k2	1.5000	0.2799	ANO	0.6725	0.056	ANO
	Sp550 k3	1.5060	0.3013	ANO	0.6586	0.05972	ANO
	Sp550 k4	1.4300	0.2461	ANO	0.6539	0.05305	ANO
D39	Sp339 (WT)	1.5090	0.3252	---	0.7478	0.06853	---
	Sp551 k1	1.5650	0.3297	ANO	0.7603	0.08873	ANO
	Sp551 k2	1.4870	0.3110	NE	0.7568	0.06153	NE
	Sp551 k4	1.4600	0.2900	NE	0.7397	0.06807	NE

Tabulka 17: Významnost. Statistické zhodnocení morfologických parametrů kmenů *Δspr0929* kultivovaných v C+Y médiu. SVO = statisticky významná odchylka.

Abych toto pozorování potvrdil, sledoval jsem morfologii třech klonů $\Delta spr0929$ na genetickém pozadí R6 a stejný počet klonů s genetickým pozadím D39 při kultivaci v komplexním médiu TSB. Porovnání s příslušným WT je na **Obrázku 16**. V tomto médiu nedochází u D39 kmenů k tvorbě řetízků. Po změření morfologických parametrů buněk jsem získal graf jejich rozložení, který je na **Obrázku 17**, statistické zhodnocení prezentuji v **Tabulce 18**. Odlišné chování klonu 1 u kmene Sp551 se v tomto médiu neprojevalo. U kmene R6 s delecí genu *spr0929* jsem i v C+Y médiu pozoroval statisticky významné zmenšení buněk oproti WT.



Obrázek 16: Morfologie WT a kmene $\Delta spr0929$ kultivovaných v TSB médiu. Sp208 je WT R6 kmene, Sp550 je odvozený kmen s $\Delta spr0929$. Spodní výřezy představují kmen D39 ve stejném uspořádání. Rozměr výřezu je 20x20 μ m.

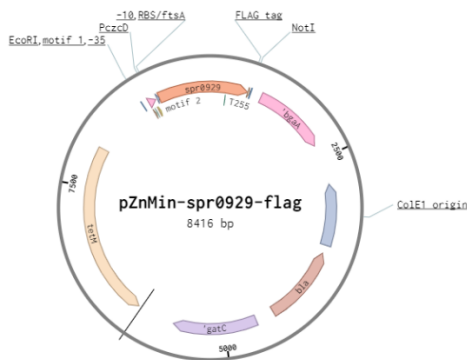


Obrázek 17: Graf rozložení hodnot šířky a délky buněk kultivovaných v TSB médiu. Červená přerušovaná čára značí hodnotu mediánu R6 WT, modrá totéž pro D39. Černé body značí průměrnou hodnotu velikosti. Každý graf obsahuje krabicový podgraf se středem v hodnotě mediánu, jeho horní a spodní hranice odpovídá intervalu velikostí, ve kterém se nachází 75 % buněk.

Gen. pozadí	Kmen	Délka			Šířka		
		Průměr	St. odchylka	SVO (P < 0.05)	Průměr	St. odchylka	SVO (P < 0.05)
R6	Sp208 (WT)	1.6180	0.3426	---	0.6463	0.04566	---
	Sp550 k2	1.5220	0.2895	ANO	0.6146	0.06266	ANO
	Sp550 k3	1.5480	0.2819	NE	0.6198	0.06801	ANO
	Sp550 k4	1.5250	0.3074	ANO	0.6163	0.05551	ANO
D39	Sp339 (WT)	1.6990	0.4054	---	0.7053	0.07596	---
	Sp551 k1	1.6290	0.3326	NE	0.7129	0.08009	NE
	Sp551 k2	1.6450	0.3015	NE	0.7386	0.06772	ANO
	Sp551 k4	1.6560	0.3276	NE	0.7304	0.05965	ANO

Tabulka 18: Významnost. Statistické zhodnocení morfologických parametrů kmenů $\Delta spr0929$ kultivovaných v TSB médiu.

4.6 Merodiploidní kmeny a komplementace fenotypu WT



Obrázek 18: Komplementační vektor

pZnMin-spr0929-flag. Gen *bla* je nositelem Amp rezistence v *E. coli*, *tetM* udává rezistenci k tetracyklinu u *S. pneumoniae*.

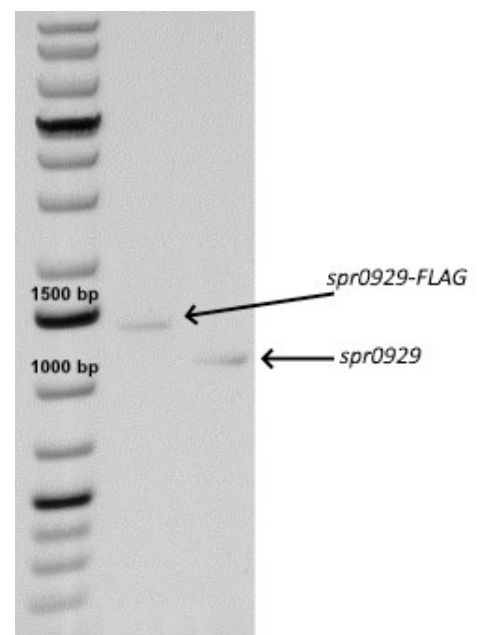
připravil jsem tzv. komplementační kmen. Takový kmen obsahuje alelu studovaného genu pouze pod inducibilním promotorem. Množství produkovaného proteinu je tedy přímo závislé na množství induktoru přidaného do média. Intenzita fenotypového projevu by v případě přímého vlivu genu měla korelovat s množstvím induktoru.

K vytvoření komplementačního kmene je nejprve třeba připravit komplementační vektor, jehož základem byl v tomto případě pJWV25. V tomto vektoru byl nahrazený gen kódující protein GFP konstruktem pZnMin-*spr0929-flag* (**Obrázek 18**).

Jediný kmen pneumokoka, u kterého jsem za standartních podmínek byl schopen pozorovat fenotypový projev delece genu byl R6. Tento odlišný fenotyp, projevující se zmenšením velikosti buněk oproti WT, se opakoval u všech pozorovaných klonů. Abych vyloučil možnost, že tento fenotyp ve skutečnosti není způsoben jinou mutací a je skutečně

výsledkem

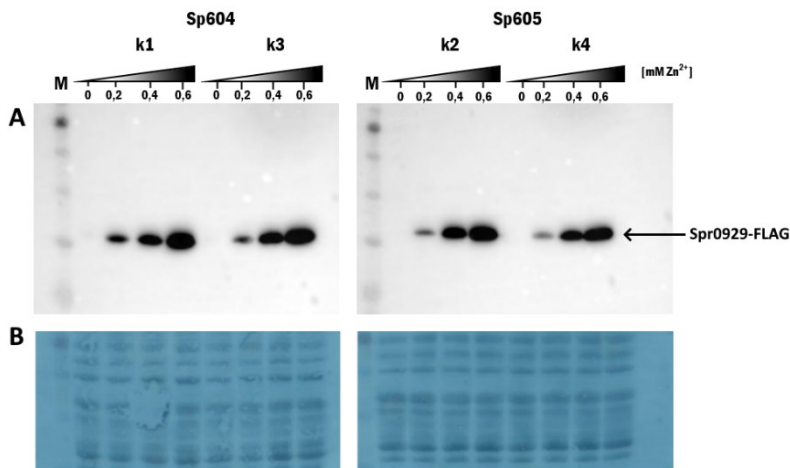
samotné delece genu *spr0929*,



Obrázek 19: Fúze fragmentu vkládaného do vektoru pJWV25. *spr0929-FLAG* představuje fúzovaný fragment, níže je oblast kódující gen *spr0929*.

Příprava tohoto konstruktů proběhla ve dvou fázích. Nejprve byl pomocí oligonukleotidů LN123 a LN396 amplifikován fragment o velikosti 282bp, obsahující promotorovou oblast pZn a v protisměru jeho transkripce také EcoRI restrikční místo.

Zároveň byl z chDNA pneumokoka (Rx kmene) amplifikována pomocí Phusion polymerázy oblast kódující gen *spr0929*. Pro tuto amplifikaci byl použit oligonukleotid AU243



Obrázek 20: Test exprese proteinu Spr0929 u komplementačního kmene na genetickém pozadí R6 a D39. Kmeny Sp604 (R6, $\Delta spr0929$ *bga::pZnMin-spr0929-flag*) a Sp605 (D39, $\Delta spr0929$ *pZnMin-spr0929-flag*) kultivovány v TSB médiu v gradientu Zn^{2+} iontů.

A: imunodetekce s antiFLAG protilátkou;

B: kontrola nanášek ověřená pomocí barvení membrány amidočerní.

komplementární k LN396 a k začátku genu *spr0929*. Druhý oligonukleotid AU244 obsahoval přesah se sekvencí pro epitop FLAG a část štěpného místa pro NotI. Délka tohoto ampikonu byla 1058bp. Oba získané fragmenty byly fúzovány přes komplementární přesahy pomocí PfuX polymerázy a oligonukleotidů

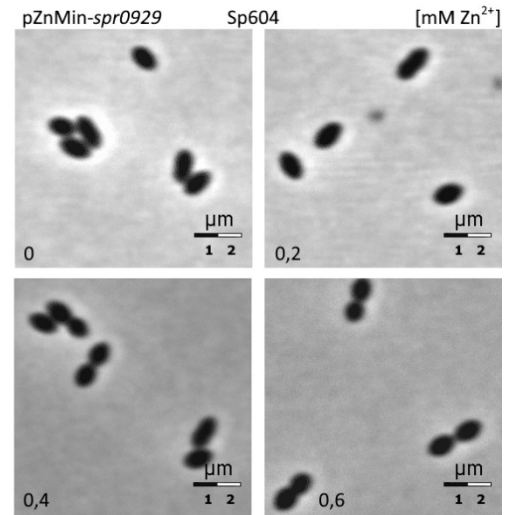
LN123/AU244. Délka

fúzního fragmentu LN123/AU244 (1316bp) byla ověřena na gelu, viz **Obrázek 19**.

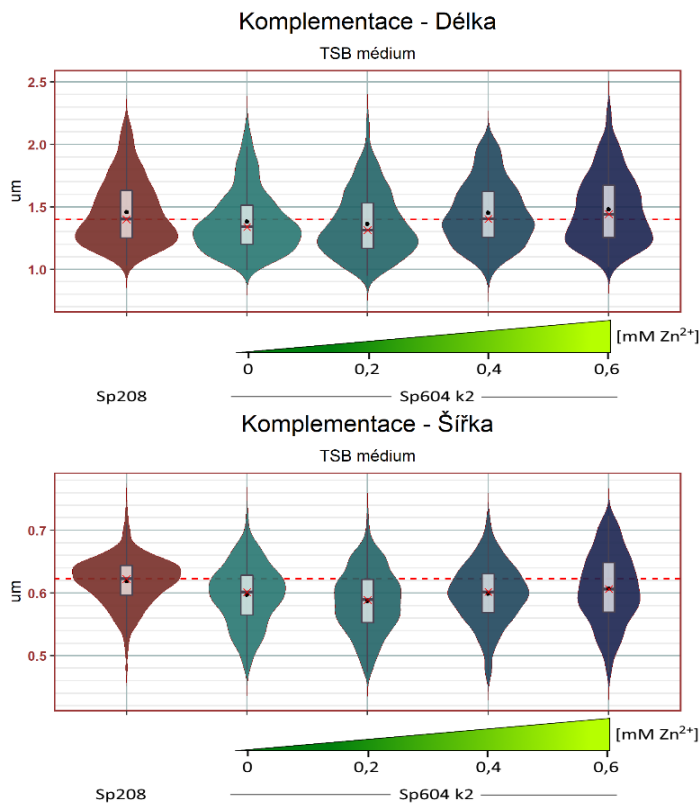
Následovala restrikce fragmentu i vektoru pomocí dvojice enzymů EcoRI_HF a NotI_HF. Velikost štípaného vektoru byla 7188bp, fragmentu 1229bp. Po ligaci jsem provedl transformaci do buněk *E. coli* DH5 α za vzniku kmene EC511. Získaný plazmid pZnMin-spr0929-flag z kmene 9 byl ověřen koloniovou PCR a následně sekvenací.

Posledním krokem v přípravě komplementačních kmenů byla transformace do ověřených kmenů pneumokoka s úplnou delecí genu *spr0929* na genetickém pozadí R6 a D39. Transformací kmene Sp550 k2 (R6) byl získán kmen Sp604 (R6, $\Delta spr0929$ *bga::pZnMin-spr0929-flag*) a kmen Sp551 k1 (D39) dal vzniknout kmeni Sp605 (RD39, $\Delta spr0929$ *pZnMin-spr0929-flag*). U těchto kmenů došlo ke vložení vektoru do postradatelného *bga* lokusu na chDNA pneumokoka. Společně s genem zájmu byla vnesena rezistence pro tetracyklin, která sloužila jako selekční marker. Koloniová PCR byla použita k ověření úspěšnosti transformace u třech vybraných kmenů.

K ověření, zda produkce proteinu po přidání induktoru do média funguje podle očekávání jsem provedl test exprese. Dva vybrané klony od každého kmene byly kultivovány v TSB médiu v gradientu Zn^{2+} s přidáním Mg^{2+} iontů pro lepší růst. Byl použit gradient 0; 0,2; 0,4 a 0,6mM Zn^{2+} . Rychlé proteinové SEDS lyzáty z těchto vzorků byly rozděleny na SDS-PAGE a byla provedena imunodetekce s použitím Anti-Flag protilátky. Pro kontrolu stejnoměrných nanásek jsem PVDF membránu po imunodetekci obarvil pomocí barvení amidovou černí (**Obrázek 20 B**).



Obrázek 21: Mikroskopie buněk komplementačního kmene Sp604. Různé koncentrace Zn^{2+} iontů. Velikost výřezu je 10x10μm.



Obrázek 22: Komplementace. Graf znázorňující rozložení velikostí buněk komplementačního kmene Sp604 k2 (R6, $\Delta spr0929 bga::pZnMin-spr0929-flag$) v různých koncentracích Zn^{2+} iontů v porovnání k Sp208 (R6 WT) Červená přerušovaná čára značí hodnotu mediánu R6 WT.

na **Obrázku 22**, který dokazuje funkční komplementaci.

Pro statistické zhodnocení významnosti rozdílu ve velikostech byl, stejně jako v případě měření kmene s delecí genu *spr0929* použit neparametrický Kruskal-Wallisův t-test. Výsledky jsou společně s dalšími parametry měření uvedeny v **Tabulce 19**.

Intenzita exprese proteinu s FLAGovou značkou skutečně koreluje s množstvím Zn^{2+} , jak je vidět na **Obrázku 20 A**, test byl tedy úspěšný.

Komplementace fenotypu WT byla možná pouze u R6 kmene, protože delece na pozadí D39 nenesou žádný doposud objevený fenotyp. Mikroskopii živých preparátů s použitím fázového kontrastu tedy byl podroben pouze kmen R6 (**Obrázek 21**). Analyzovány byly velikosti buněk WT a kmene komplementačního, kultivovaného za stejných podmínek, jako při testu exprese. Výsledky jsou prezentovány

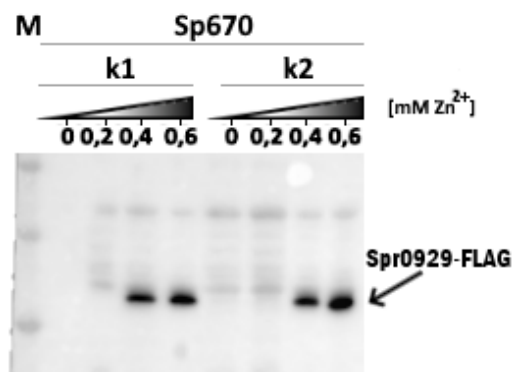
Pro přípravu konstruktů *spr0929-T255A-flag*, nutného pro testování fosforylace Spr0929 pomocí kinázy StkP (viz **Kapitola 4.9.2**), bylo nutné připravit též vektor s fosfoablativní záměnou. Ten jsem připravil pomocí metody QuikChange s mutagenními oligonukleotidy AU273 a AU274. Jako templát reakce sloužil vektor pZnMin-*spr0929-flag* izolovaný z kmene EC511. Vektor jsem transformoval do kmene *E. coli* DH5α a nechal sekvenčně ověřit.

Kmen	Délka			Šířka			
	Průměr	St. odchylka	SVO (P < 0.05)	Průměr	St. odchylka	SVO (P < 0.05)	
Sp208	1.458	± 0.2602	ANO	0.6186	± 0.0401	ANO	
Sp604 k2 0mM	1.380	± 0.2420	ANO	0.5951	± 0.0505	ANO	ANO
Sp604 k2 0,2mM	1.360	± 0.2583	ANO	0.5842	± 0.0529	ANO	ANO
Sp604 k2 0,4mM	1.455	± 0.2613	ANO	0.5979	± 0.0526	ANO	ANO
Sp604 k2 0,6mM	1.479	± 0.2771		0.6115	± 0.0616		ANO

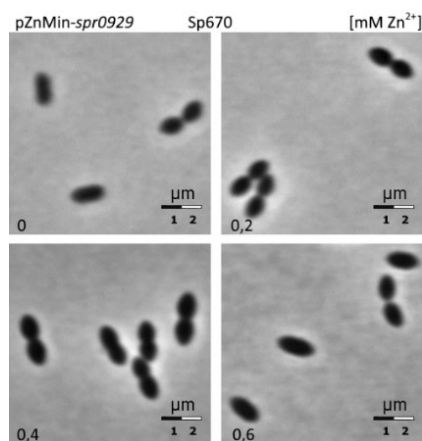
Tabulka 19: Významnost. Statistika měření buněk komplementačního kmene. Výsledek statistické významnosti dvojice kmenů je zobrazen v odpovídajících řádcích.

4.6.1 Nadprodukce proteinu Spr0929

Jelikož zvyšování exprese proteinu Spr0929 vedlo u komplementačního kmene Sp604 ke zvětšování buněk, přistoupil jsem k experimentu, který měl objasnit, zda je tento trend patrný i při dalším zvyšování exprese. V tomto případě jsem očekával větší buňky, než jaké má WT. Za tímto účelem jsem do divokého kmene R6 transformoval komplementační vektor. Tím došlo ke vložení druhé kopie genu *spr0929* opatřené FLAGovou značkou do *bga* lokusu, pod zinkem indukovatelný promotor.



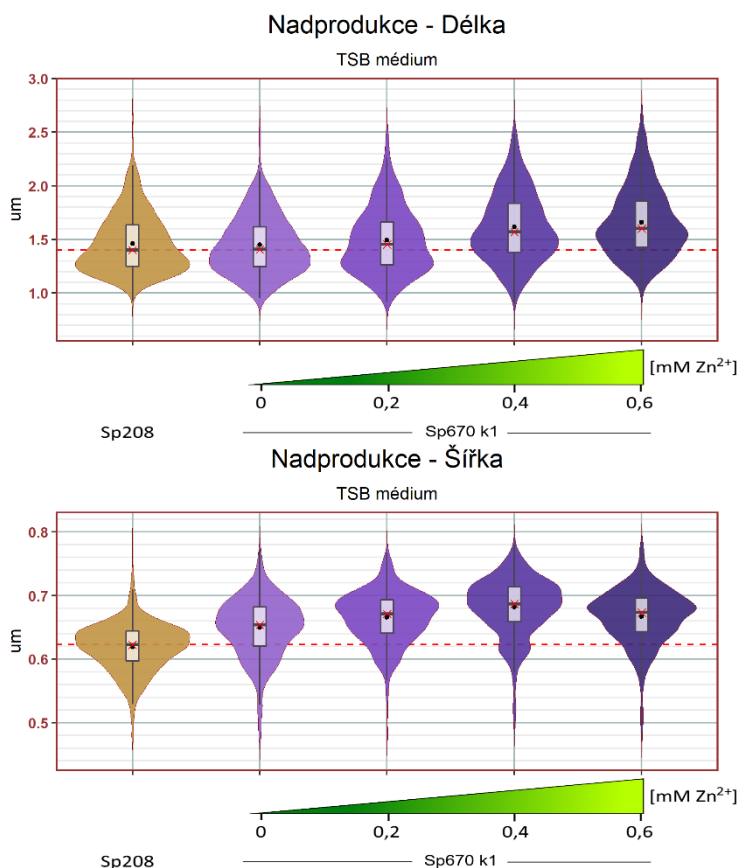
Obrázek 23: Test exprese proteinu Spr0929 v nadprodukčním kmeni Sp670. Kultivace v TSB médiu. Imunodetekce pomocí Anti-FLAG protilátky.



Obrázek 24: Mikroskopie nadprodukčního kmene. Kmen Sp670 (R6, *bga::pZnMin-spr0929-flag*) byl kultivován v různých koncentracích Zn^{2+} iontů (0; 0,2; 0,4 a 0,6 mM).

Získaný merodiploidní kmen označený Sp670 (R6, *bga::pZnMin-spr0929-flag*) (klon k1) jsem podrobil testu exprese, kultivovaném v TSB médiu v gradientu Zn^{2+} iontů, přípravou SEDS lyzátů, jejich elektroforézou a imunodetekcí s Anti-FLAG protilátkou. Jak je vidět na **Obrázku 23**, exprese se skutečně zvyšovala s přibývajícím množstvím induktoru v médiu, ale až při vyšších koncentracích. Při nízké hladině zinečnatých iontů nebyla exprese Spr0929-FLAG pozorována.

Buňky ze stejného dne jsem též mikroskopoval (**Obrázek 24**) a provedl jejich analýzu velikosti. Z výsledku měření, prezentovaném na **Obrázku 25** je patrný očekávaný trend. Při zvyšování hladiny exprese dochází ke zvětšování buněk oproti WT, a to v obou sledovaných parametech – délce i šířce. Pozorování je opět potvrzeno statistickým Kruskal-Wallisovým testem, viz **Tabulka 20**.



Obrázek 25: Nadprodukce Spr0929. Graf velikosti buněk merodiploidního kmene Sp670 (R6, *bga::pZnMin-spr0929-flag*) kultivovaného v příslušné koncentraci Zn^{2+} v porovnání s kmenem Sp208 (R6 WT). Červená přerušovaná čára značí hodnotu mediánu R6 WT

Kmen	Délka			Šířka		
	Průměr	St. odchylka	SVO (P < 0.05)	Průměr	St. odchylka	SVO (P < 0.05)
Sp208	1.458	± 0.2602	NE	0.6211	± 0.0466	ANO
Sp670 0mM	1.447	± 0.2681		0.6492	± 0.0481	
Sp670 0,2mM	1.488	± 0.3051	ANO	0.6644	± 0.0448	ANO
Sp670 0,4mM	1.627	± 0.3363		0.6822	± 0.0454	
Sp670 0,6mM	1.680	± 0.3607	ANO	0.6716	± 0.0567	ANO

Tabulka 20: Významnost. Statistika měření buněk kmene s nadprodukcí Spr0929. Výsledek statistické významnosti dvojice kmenů je zobrazen v odpovídajících rádcích. SVO = Statisticky významná odchylka.

Fyziologické stresy

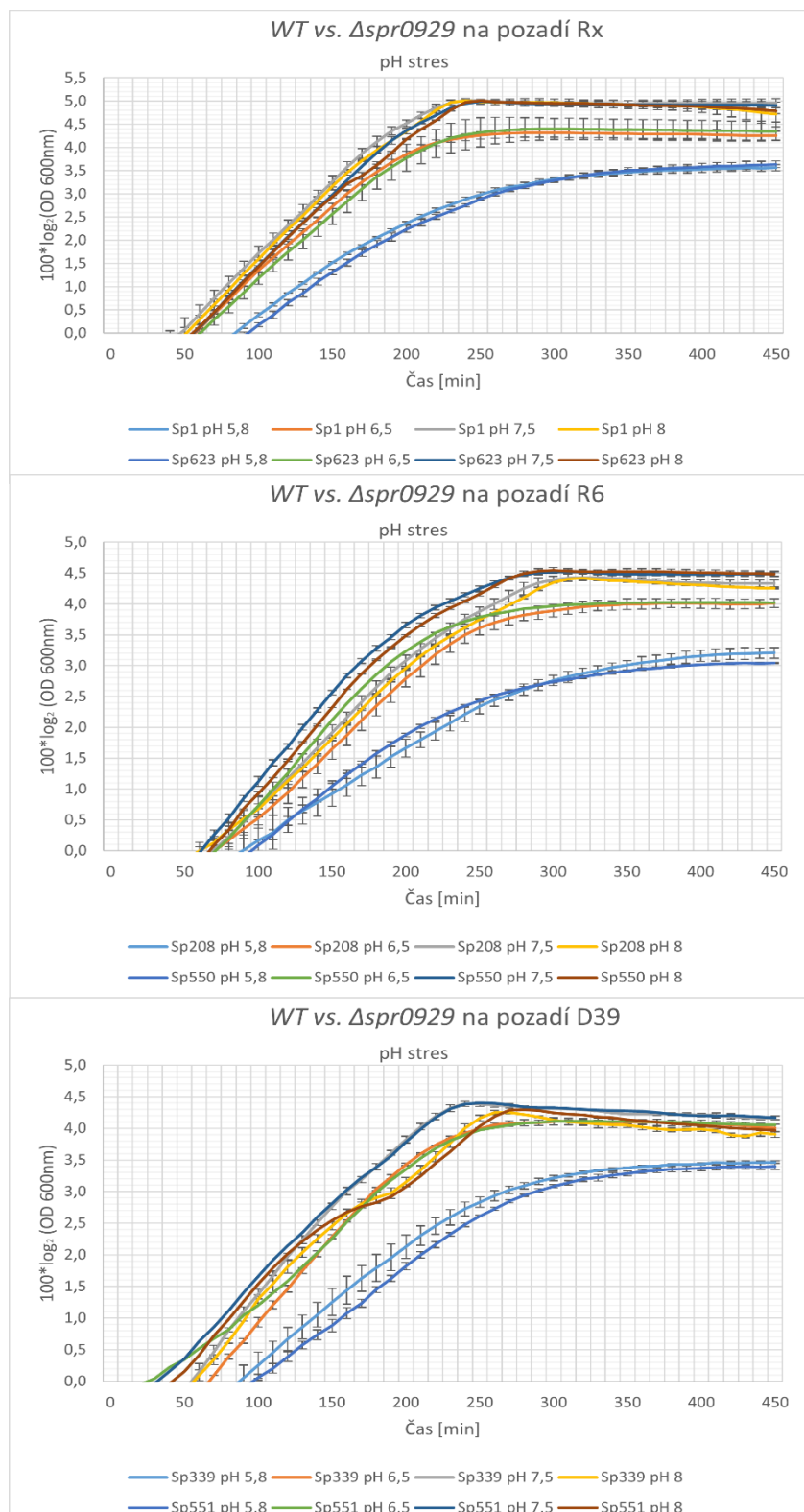
Kmeny se zavedenou delecí genu *spr0929* byly vystavovány různým typům fyziologických stresů. Stejný typ stresu byl vždy aplikován na WT příslušného genetického pozadí. Z porovnání chování WT a mutantního kmene lze usoudit, zda má gen *spr0929* úlohu ve vypořádávání se s daným typem stresu. Stresové podmínky byly voleny tak, aby co nejlépe simulovaly různé typy prostředí, které se vyskytují při stavu patogeneze a zároveň byly proveditelné v laboratorních podmínkách.

Konkrétně se jedná o měření růstových křivek v tekutém médiu za vyšší teploty a různých pH. pH stresy byly navíc nezávisle provedeny i na pevném médiu. Testování reakce na oxidativní stresy je metodicky náročnější. Z důvodu nejednoznačných výsledků testování, nekonzistentnosti metody a malého množství opakování nejsou tato data v práci prezentována.

4.6.2 pH stres

Pro otestování schopnosti kmenů postrádajících protein Spr0929 vypořádat se s výkyvy pH byly zvoleny dva nezávislé typy experimentů. Prvním byl test přežití na pevném médiu o různém pH. Ranní inokulum bylo zaočkováno do TSB média a nechalo se růst do exponenciální fáze. Následně byla připravena ředící řada a byl proveden výsev na krevní misky o pH 6,9; 5,5; 4,5. V případě pH 6,9 a 5,5 nebyl mezi počtem kolonií delečního kmene $\Delta spr0929$ a WT výrazný rozdíl. Na miskách s pH 4,5 nerostly žádné kolonie ani u jednoho ze srovnávaných kmenů.

Druhým typem testu byla charakterizace růstu v tekutém TSB médiu o různém pH. Testovány byly hodnoty pH 5,8; 6,5; 7,5 a 8. Růstové křivky jsou prezentovány na **Obrázku 26**.

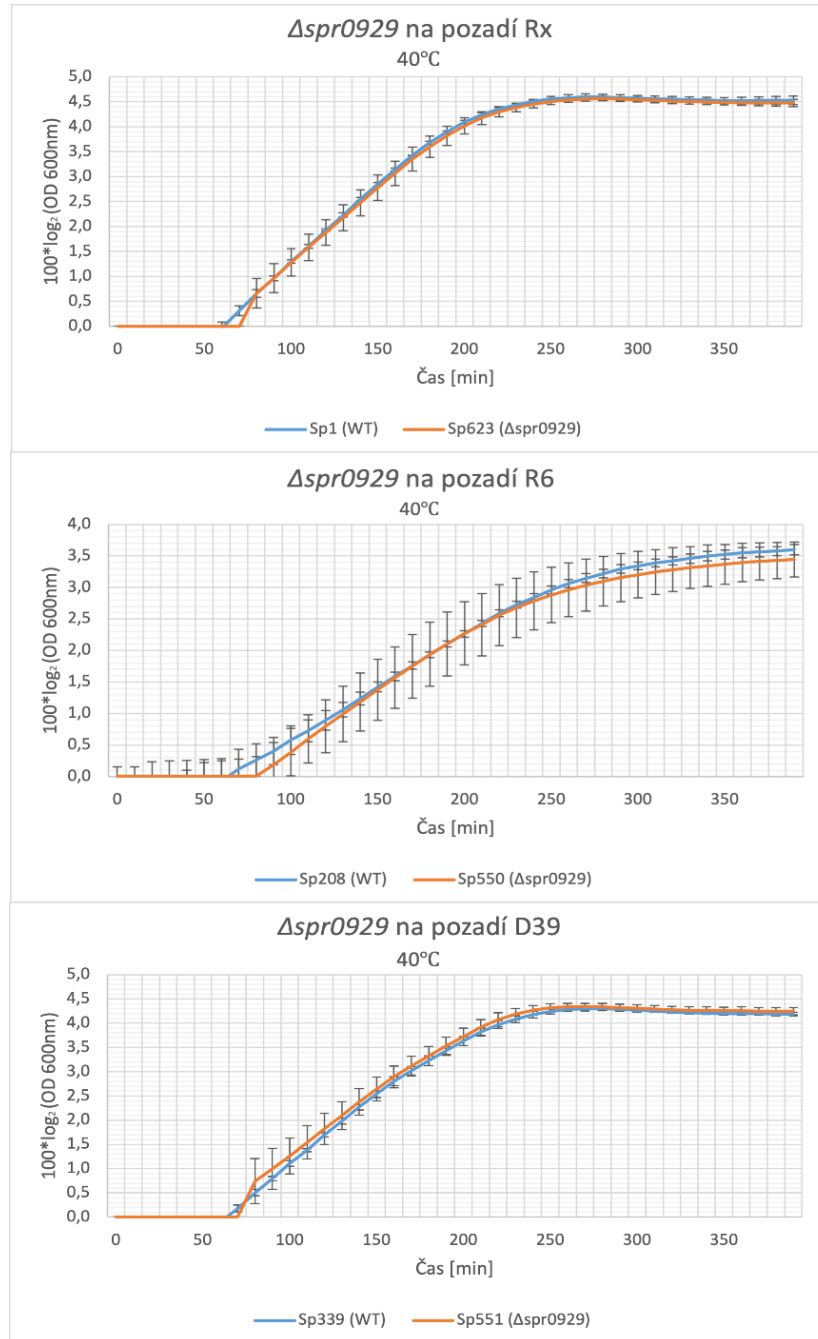


Obrázek 24: Růstové křivky při pH stresu. TSB médium. Sp1, Sp208 a Sp339 představují WT (genetická pozadí Rx, R6 a D39), Sp520, Sp550 a Sp551 jsou kmeny nesoucí delecí genu *spr0929*.

Z naměřených křivek vyplývá, že protein Spr0929 nejspíš nemá vliv na odolnost pneumokoka vůči pH stresu. Mírné rozdíly růstových křivek jsou pravděpodobně dány nepřesností v pipetování.

4.6.3 Teplotní stres

Na **Obrázku 27** jsou růstové křivky pneumokoka kultivovaného v TSB médiu při stálé teplotě 40°C. Graf je výsledkem dvou nezávislých měření provedeného v technických triplikátech.



Obrázek 25 Teplotní stres. Znázorněné růstové křivky jsou výsledkem dvou měření růstu pneumokoka v TSB médiu při 40°C v triplikátech na třech genetických pozadích.

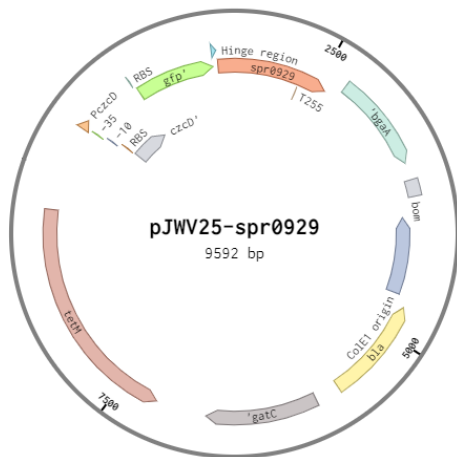
Z výsledku vyplývá, že v případě kmene Rx a D39 nedochází ke změně růstových vlastností za těchto podmínek. Kmen R6 vykazuje největší výkyvy. Zdá se, že lag fáze je u kmene s delecí delší než u WT a kultura dosahuje ve stacionární fázi nepatrně nižších optických denzit. Delece genu *spr0929* nevede však k výraznému zpomalení růstu ani zde.

4.7 Určení lokalizace proteinu Spr0929

Podle bioinformatických predikcí tento protein neobsahuje TM helixy, jeho NA37 doména je popsána jako „asociovaná s nukleoidem“. Za účelem stanovení skutečné lokalizace proteinu Spr0929 v buňce jsem připravil několik kmenů exprimujících tento protein translačně zřizovaný s fluorescenční značkou GFP (Green Fluorescent Protein). K fúzi jsem se pokusil použít též alternativní fluorescenční značku zsGreen (Matz et al., 1999), avšak její fluorescence nebyla dostatečná, proto neuvádím tuto část mezi výsledky. Součástí této sady experimentů bylo stanovení morfologie kmenů exprimujících fúzní protein.

4.7.1 N-koncová fúze s GFP ektopicky exprimována z indukibilního promotoru

Abych byl schopen určit lokalizaci, bylo nutné, aby bylo fúzního proteinu produkováno dostatečné množství. Prvním krokem ve stanovení lokalizace tedy byla příprava kmene, který nese fúzovaný gen vložený za indukibilním promotorem. Přidáním různého množství induktoru je u takového kmene možné ovlivnit množství exprimovaného proteinu.



Obrázek 26: Vektor pJWV25 nesoucí gen pro GFP s vloženým genem *spr0929*. Pro selekci v klonovacím kmeni *E. coli* slouží gen *bla* pro ampicilinovou rezistenci (*ampR*). Po inzerci do *bga* lokusu na chromozomu *S. pneumoniae* je využit gen pro rezistenci k tetracyklinu (*tetM*).

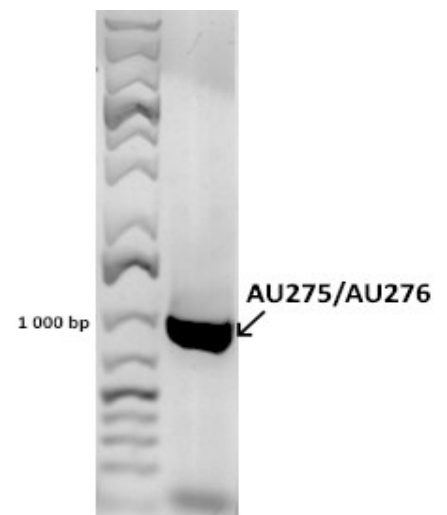
pod kontrolu pZn, za kterým je vložen flexibilní hinge region (**Obrázek 28**). Ten umožňuje vzájemnou prostorovou nezávislost GFP a vloženého proteinu. Fúzní

protein má 68,6kDa, oproti samotnému Spr0929 s hmotností 38,6kDa je tedy o 44% těžší.

Klonování probíhalo metodou restrikce vektoru i vkládaného konstrukt a následné ligace obou lineárních fragmentů. Přímou za flexibilním regionem se nachází DNA sekvence,

Pro vložení fúzního genu do chromozomu *S. pneumoniae* jsem stejně jako v případě testu komplementace využil vektor pJWV25, který umožňuje klonování genu zájmu za GFP značku. Vznikla tedy N-koncová fúze, v tomto případě GFP-Spr0929 a jeho vložení do postradatelného *bga* lokusu na chromozomu pneumokoka.

Vektor obsahuje gen pro protein GFP

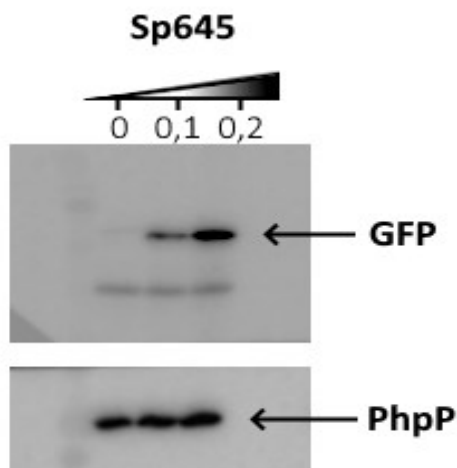


Obrázek 27: Fragment obsahující gen *spr0929* pro vložení do vektoru pJWV25. Amplifikováno z chDNA z kmene R6 pomocí vyznačených oligonukleotidů. Délka = 1022bp.

rozeznávaná a štěpená restrikcí enzymem SpeI. Druhá použitá RE NotI má cílové místo o 10 nukleotidů dále.

Vkládaný konstrukt obsahoval sekvenci genu *spr0929*. Na koncích byla zavedena restrikcí místa pro SpeI a NotI, která byla použita pro klonování. Tvorba tohoto konstrukt probíhala metodou PCR s přesahujícími oligonukleotidy, nesoucími sekvenci pro dané restrikcí místo. Z chDNA kmene R6 byla ampifikována oblast DNA s genem *spr0929* o délce 1022bp s použitím oligonukleotidů AU275 nesoucími SpeI místo a AU276 s místem NdeI (**Obrázek 29**). Po izolaci fragmentu z gelu byl společně s vektorem pJWV25 restrikcí štěpen restriktázami SpeI/NdeI. Poté následovala ligace vektoru a konstrukt podle standartního protokolu uvedeného v kapitole Metody.

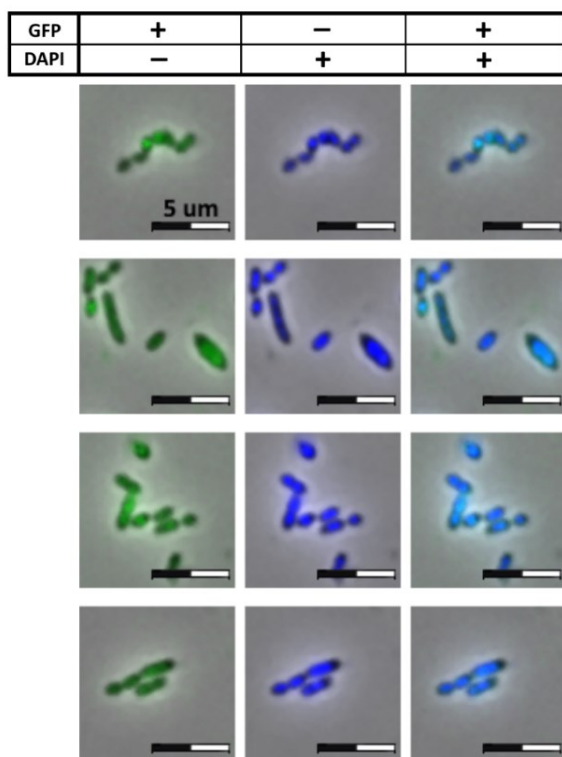
Výsledný vektor byl ve formě ligační směsi transformován do kompetentních buněk DH5 α kmene bakterie *E. coli*. Na LB misce s Amp a výsevem 200 μ l média s transformovanými buňkami vyrostlo 40 kolonií kmene, označeného jako EC560 (DH5 α ; pJWV25-*spr0929*). Následná koloniová PCR 8 klonů s oligonukleotidy LN123 a LN143 potvrdila správnou délku vloženého fragmentu u 4 klonů. Sekvence klonu k2 potvrdila úspěšnou přípravu vektoru.



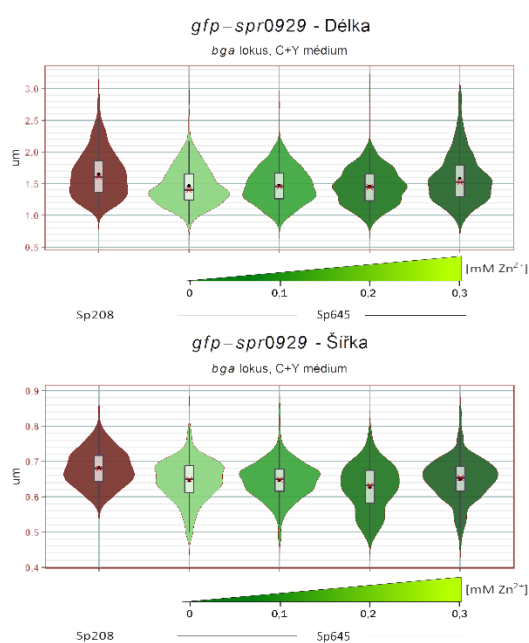
Obrázek 28: Test exprese Spr0929-GFP. Sp645 (R6; Δ *spr0929* *bga*::pJWV25-*spr0929*) byl kultivován v C+Y médiu s přidavkem příslušného množství Zn²⁺. Sp645 je komplementační kmen R6 s vloženým pJWV-*spr0929*. Detekce probíhala pomocí Anti-GFP protilátky, jako kontrola nanášek sloužila imunodetekce s Anti-PhpP protilátkou na téže membráně.

Vektor byl transformován do kmene Sp208 (R6 WT) za vzniku kmene Sp646 (R6; *bga*::pJWV25-*spr0929*) a do kmene Sp550 (R6; Δ *spr0929*) za vzniku kmene Sp645 (R6; Δ *spr0929* *bga*::pJWV25-*spr0929*). Došlo k inzerci vektoru do *bga* lokusu obdobně jako v případě transformace komplementačního vektoru. Jako selekční marker byl použit tetracyklin. 6 klonů od každého kmene bylo otestováno koloniovou PCR se stejným složením a nastavením jako v případě testu *E. coli*. Všechny klony byly pozitivní.

Následoval test exprese proteinu. Kmen Sp645 byl kultivován v C+Y médiu s gradientem Zn^{2+} iontů 0; 0,1 a 0,2 mM. Při $OD_{600} = 0,4$ byly vytvořeny SEDS lyzáty. Imunodetekce pomocí Anti-GFP protilátky potvrdila rostoucí míru exprese při vyšších hladinách zinečnatých iontů. Jako kontrola nanášek byla použita imunodetekce fosfatázy PhpP na stejné membráně (**Obrázek 30**).



Obrázek 29: Fluorescenční mikroskopie fixovaného kmene Sp645 (R6; $\Delta spr0929$ *bga::pJWV25-spr0929-flag*). Vlevo GFP, uprostřed DAPI barvení, vpravo překryv. Mikroskop Olympus IX 83 s kamerou Photometrics Prime 95B.

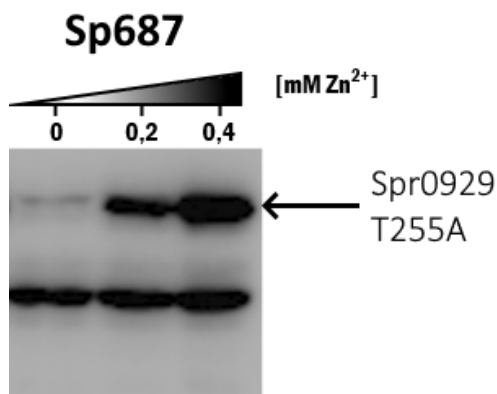


Obrázek 30: Velikost buněk kmene s exprimovaným rekombinantním proteinem GFP-Spr0929. Kultivováno v C+Y médiu s přidavkem Zn^{2+} iontů o příslušné koncentraci.

Mikroskopie kmene Sp645 pomocí fluorescenční mikroskopie umožnila stanovit lokalizaci proteinu jako cytoplazmatickou s nerovnoměrným rozložením fluorescenčního signálu, což odpovídá předpokládané lokalizaci s bakteriálním nukleoidem. Pro potvrzení této hypotézy byly připraveny fixované preparáty s DNA specifickým fluoroforem DAPI. Překryv snímků je vidět na **Obrázku 31**, který potvrzuje kolokalizaci Spr0929 s bakteriálním nukleoidem.

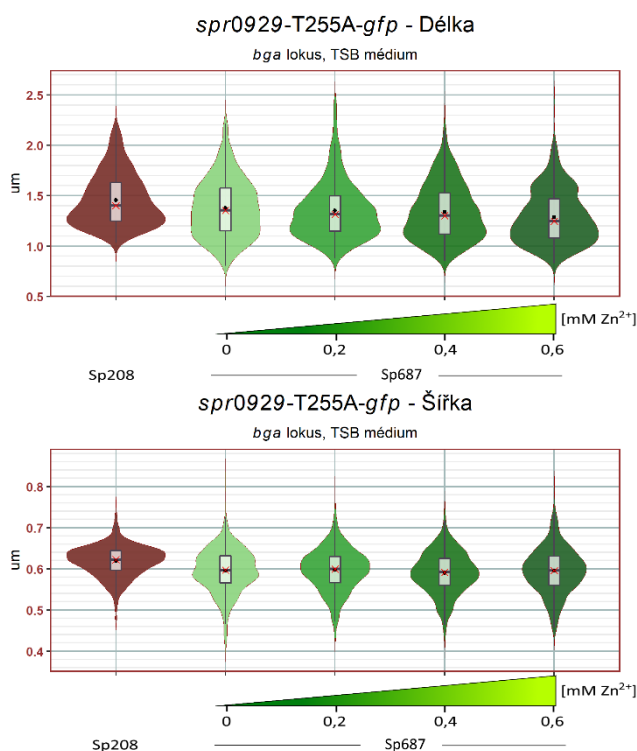
Mikroskopie kmene Sp645, kultivovaného v C+Y médiu metodou fázového kontrastu a následné měření velikosti buněk naznačily komplementaci při vyšších koncentracích zinečnatých iontů v médiu (**Obrázek 32**). Zdá se tedy, že i přes výraznou velikost GFP proteinu je fúzní protein GFP-Spr0929 funkční, podobně jako fúzní protein Spr0929-Flag.

Za účelem ověření, zda má threonin v pozici 255 a jeho případná fosforylace vliv na lokalizaci proteinu Spr0929 byl připraven vektor pJVW25-*spr0929*-T255A, nesoucí bodovou fosfoablativní záměnu této AK za alanin.



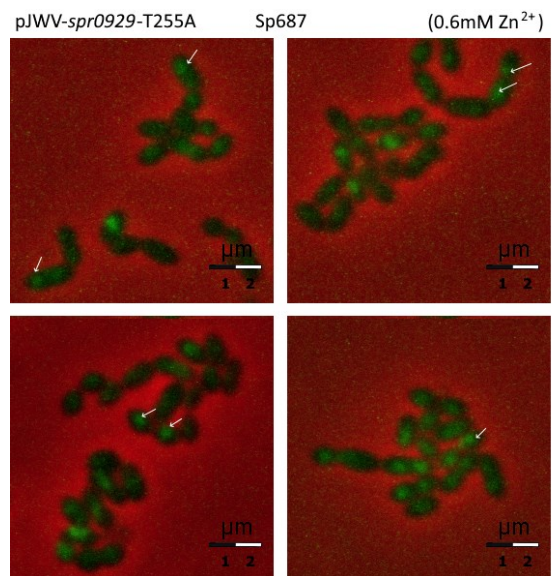
Obrázek 33: Expresse GFP-Spr0929-T255A v gradientu Zn²⁺. Pro imunodetekci byla použita Anti-GFP protilátka.

Všechny klony byly identifikovány jako pozitivní. U jednoho klonu kmene Sp687 byla úspěšně otestována exprese fúzního proteinu v gradientu zinečnatých iontů při kultivaci v TSB médiu. Imunodetekce s GFP



Obrázek 35: Morfologie kmene s GFP-Spr0929-T255A. Graf rozložení délky a šířky buněk kmene Sp687, exprimujících GFP-Spr0929-T255A v gradientu Zn²⁺ iontů.

Izolovaný plazmid z kmene EC560 (pJVW25-*spr0929*) byl použit jako templát QuikChange reakce s mutagenními oligonukleotidy AU273 a AU274. Následovalo opět klonování do DH5α buněk za vzniku kmene EC577 (pJVW25-*spr0929*-T255A). Transformační účinnost byla srovnatelná. 5 klonů Sp687 (R6; Δ*spr0929*, *bga*::pJVW25-*spr0929*-T255A), vzniklého transformací vektoru do Sp550 (R6; Δ*spr0929*) bylo otestováno koloniovou PCR.



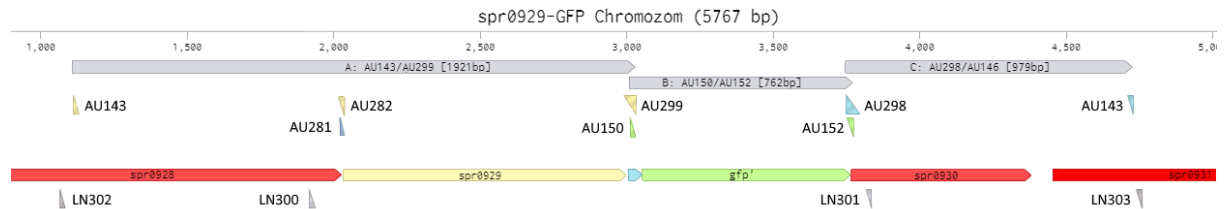
Obrázek 34: Fluorescenční mikroskopie kmene Sp687. Kmen exprimuje fúzní protein GFP-Spr0929-T255A. Bílé šipky ukazují na místa s naboženým fluorescenčním signálem.

protilátkou je na **Obrázku 33**.

Fluorescenční mikroskopie těchto kmenů ukázala, že záměna T255A nemá vliv na lokalizaci, která je obdobná jako u kmene s nativní formou proteinu (**Obrázek 34**). Analýza mikroskopických snímků pořízených fázovým kontrastem zcela vyloučilo schopnost kmene komplementovat (**Obrázek 35**).

4.7.2 C-koncová fúze s GFP v nativním lokusu

Výše popsany způsob vložení fúzního genu fluorescenční značky a *spr0929* pod zinkem ovládaný indukibilní promotor je do určité míry umělý. Navíc integraci vektoru dochází k inzerci tohoto genu do *bga* lokusu pneumokoka, který sice není nijak důležitý pro jeho růst v běžných laboratorních podmínkách, přesto však exprese Spr0929 s GFP z nativního promotoru



v nativním lokusu více odráží přirozený stav.

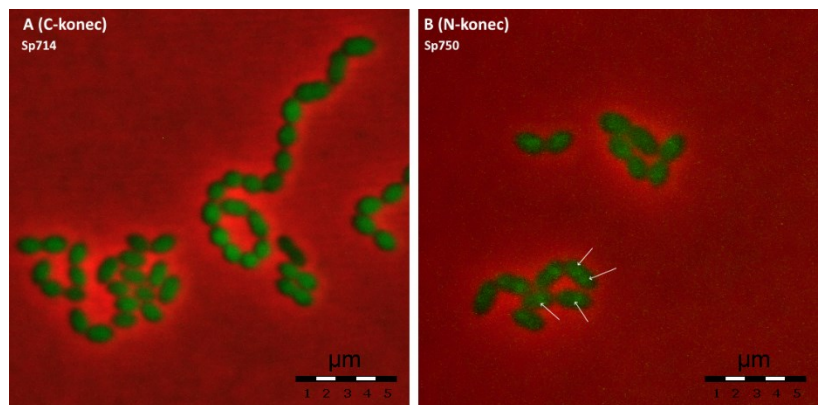
Obrázek 36: Genetická mapa C-koncové fúze genu *spr0929* s *gfp*. Písmeny A, B a C jsou vyznačeny fragmenty použité pro fúzní PCR (šedá). Modře je naznačen flexibilní „Hinge“ region.

Jak z předchozích experimentů, tak z fosfoproteomových dat víme, že je protein Spr0929 za standardních podmínek exprimován. Dalším cílem tedy byla konstrukce kmene, který obsahuje fúzní protein přímo pod nativním promotorem genu *spr0929*. V tomto případě jsem zvolil fúzi na C-konci, abych ověřil, zda tato varianta nebude lépe komplementovat velikost buněk než N-koncová fúzní forma exprimovaná ektopicky z indukibilního promotoru pZn.

Příprava kmenů probíhala, podobně jako v případě druhé fáze delece genu *spr0929*. Nejprve bylo nutné připravit konstrukt nesoucí fúzní gen obklopený okolními oblastmi homologními k nativnímu lokusu kolem genu *spr0929* na chromozomu pneumokoka. Pomocí metody PCR s využitím PfuX polymerázy byly amplifikovány jednotlivé fragmenty DNA (**Obrázek 36**). Fragment B s genem pro GFP a Hinge region byl amplifikován z chDNA kmene

Sp370 nesoucí C-koncovou fúzi *jag-gfp*. Byly použity oligonukleotidy AU152 a AU150 (na obrázku zeleně).

Pro přípravu konstruktů byl použit pár LN302/LN303 (šedě). Finální fúze proběhla přes překryvné oblasti na oligonukleotidech AU299 (žlutě) a AU152 pro fúzi fragmentů A a B. Druhý překryv mezi AU298 (modře) a AU150 zajistil připojení oblasti C.

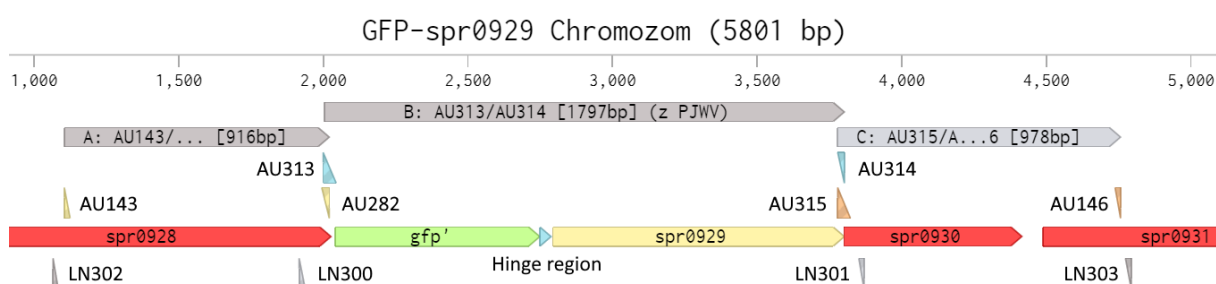


Obrázek 37: Porovnání lokalizace C- a N-koncové fúze Spr0929 s GFP. U C koncové fúze – kmen Sp714 (*spr0929-gfp*) je cytoplazmatický signál zcela difuzní. U N-koncové fúze – kmen Sp750 (*gfp-spr0929*) je patrná nerovnoměrná fluorescence, nabořený fluorescenční signál je vyznačen šipkami. Velikost výřezu je 20x20µm

Transformace vzniklého konstruktů do kmene Sp355 (R6, $\Delta spr0929::SJK$) proběhla úspěšně, velikost fragmentu LN302/AU146 z koloniové PCR odpovídala na gelu teoretické délce. Následná mikroskopie kmene Sp714 (R6, *spr0929-gfp*) potvrdila expresi fluorescenčního fúzního proteinu Spr0929-GFP (**Obrázek 37 A**).

Z **Obrázku 37 A** je patrné, že vložení GFP za C-koncovou oblast došlo ke ztrátě lokalizace pozorované u N-koncová fúzní formy proteinu exprimovaná z inducibilního promotoru pZn. Proto jsem vyzkoušel připravit i N-koncovou fúzi pod nativním promotorem.

4.7.3 N-koncová fúze s GFP v nativním lokusu



Obrázek 38: Genetická mapa C-koncové fúze genu *spr0929* s *gfp*. Písmeny A, B a C jsou vyznačeny fragmenty použité pro fúzní PCR. Modře je naznačen flexibilní „Hinge“ region.

Příprava kmene probíhala analogicky, jako v případě fúze na C-konci, jen s odlišnou metodou přípravy konstruktů. Ten byl opět fúzován ze 3 segmentů DNA (**Obrázek 38**). Tentokrát však fúze probíhala mezi koncovými homologními částmi chromosomální DNA a prostředním segmentem, obsahujícím gen pro celý fúzní protein GFP-Spr0929. Tento segment byl amplifikován pomocí oligonukleotidů AU313 a AU314 z vektoru pJVW25-*spr0929*. AU313 obsahuje přesah, komplementární k AU282, použitého spolu s AU143 k amplifikaci oblasti před genem *spr0929* ve směru transkripce. Stejně tak oligonukleotid AU314 je částečně komplementární k AU315, který byl použit spolu s AU146 k získání fragmentu za genem *spr0929* ve směru transkripce. Finální fúzní konstrukt GFP-*spr0929* byl amplifikován pomocí oligonukleotidů AU143 a AU146.

Kmen vzniklý transformací takto připraveného konstruktů do kmene R6 se SJK v lokusu genu *spr0929* (Sp355) byl označen jako Sp750 (R6, *gfp-spr0929*) a podroben fluorescenční mikroskopii (**Obrázek 37 B**). Fluorescenční signál u tohoto kmene není zcela difúzní, jako v případě C-koncové fúze v nativním lokusu a odpovídá svým rozložením spíše N-koncové fúzi exprimované z inducibilního promotoru pZn.

Test exprese obou variant fúzních proteinů GFP-Spr0929 a Spr0929-GFP, exprimovaných z nativního promotoru jsem z časových důvodů již nestihl provést. Rovněž jsem kmeny nesoucí fúzní geny nestihl podrobit testu komplementace.

4.8 Průkaz fosforylace proteinu Spr0929 kinázou StkP

4.8.1 Průkaz fosforylace v podmínkách *in vitro*

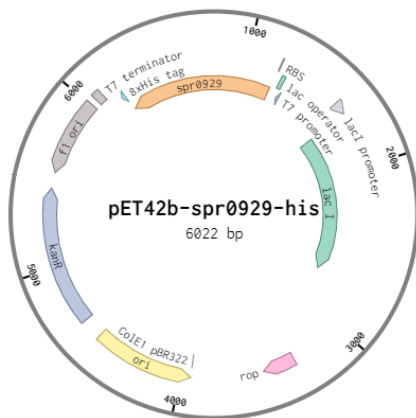
Na základě fosfoproteomu provedeného naší laboratoří byl identifikován T255 proteinu Spr0929 jako fosforylovaný v hyperfosforylovaném Rx kmeni *S. pneumoniae* s odstraněnou fosfatázou PhpP a u WT Rx kmene kultivovaného v přítomnosti ampicilinu. Některé dříve provedené fosfoproteomy pneumokoka kultivovaného za standartních podmínek tuto fosforylaci nedetekovaly (Sun et al., 2010).

Jedním z cílů práce bylo ověřit, zda je za tuto fosforylaci zodpovědná kináza StkP, a to pomocí kinázové reakce *in vitro* a potvrdit konkrétní místo fosforylace v pozici T255 testováním hladiny fosforylace proteinu nesoucím bodovou záměnu tohoto fosfoakceptorového místa za alanin. Za tímto účelem byly připraveny expresní vektory, které nesou gen pro studovaný protein opatřený histidinovou značkou, umožňující jeho purifikaci. Použité expresní vektory obsahují promotor pro T7 polymerázu, která je v expresních kmenech *E. coli* BL-21 aktivní při indukci pomocí syntetického analogu alolaktózy IPTG.

Konkrétně byl použit nejprve vektor pETPhos-Link (**Obrázek 9**), speciálně navržený pro studium fosforylace proteinů. Ten se používá pro vnesení genu za 7xHis značku, výsledný protein tedy tuto značku nese na N-konci. Vkládaný gen *spr0929* byl amplifikován z chDNA divokého kmene R6 pomocí oligonukleotidů AU271/0929-NdeI_F a AU272/0929-BamHI_R s restričními místy pro dané enzymy.

Pomocí restrikce fragmentu těmito enzymy a jeho následné ligace do vektoru štěpeného stejným párem RE byl vytvořen vektor pETPhos-*his-spr0929*. Ten byl naklonován do buněk *E. coli* DH5 α , označeného EC559 (pETPhosLink-*his-spr0929*). Selektce tohoto kmene proběhla na LB miskách s Amp, 13 klonů bylo otestováno koloniovou PCR s oligonukleotidy AU271 a AU272. Vektor byl z pozitivního klonu k1 izolován pomocí komerční sady Miniprep a vložená oblast byla sekvenována. Tento izolovaný vektor byl poté použit k tvorbě vektoru pETPhosLink-*his-spr0929*-T255A pomocí metody QuikChange (QCh), s mutagenními oligonukleotidy AU273 a AU274. Reakční směs byla transformována do kompetentních buněk *E. coli* DH5 α za vzniku kmene EC568 (pETPhosLink-*his-spr0929*-T255A), selektce probíhala

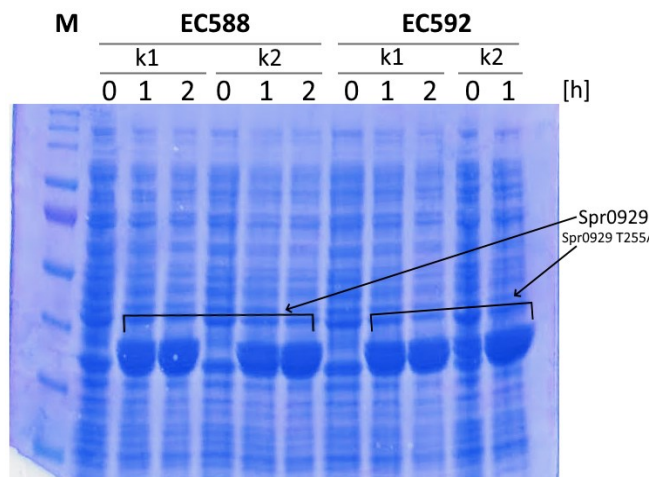
také na pevném LB médiu s přídatkem Amp. Izolovaný vektor z klonu 16 byl sekvenčně ověřen.



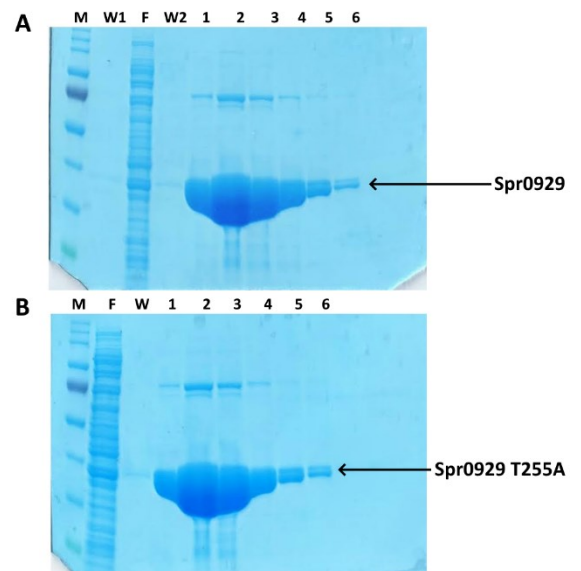
Obrázek 39: Vektor pET42b0929. Ori označuje počátek replikace v *E. coli*, KanR determinant pro antibiotickou rezistenci. Mezi T7 promotor a T7 terminátor byl vložen gen kódující Spr0929-His.

Oba vzniklé vektory byly vneseny do expresního kmene *E. coli* BL-21(DE3). Ty získaly označení EC571 v případě vektoru nesoucího WT formu genu a EC572 u fosfoablativní T255A varianty. Na základě několikrát opakovaného testu exprese proteinu s různými klony jsem zjistil, že takto připravené vektory nejsou funkční, proto jsem přistoupil k návrhu nového expresního systému, založeného na jiném typu vektoru.

Druhým zvoleným vektorem byl pET42b, jehož genetická mapa je zobrazena na **Obrázku 10**. Histidinová kotva byla v tomto případě fúzována na C-konec proteinu Spr0929. Pro restrikci byl použit pár RE NdeI a XhoI. K amplifikaci genu z chDNA byl tentokrát použit pár oligonukleotidů AU271/0929-NdeI_F a AU289/0929_XhoI. Kmen *E. coli* DH5 α transformovaný vektorem pET42b-*spr0929* (**Obrázek 39**) nese označení EC587. Koloniovou PCR bylo úspěšně otestováno 5 klonů. Výsledný vektor pET42b-*spr0929* byl transformován do expresního kmene *E. coli* BL-21(DE3) za vzniku kmene EC588.



Obrázek 40: Test exprese proteinů Spr0929-His a Spr0929-His T255A. EC592 exprimuje fosfoablativní variantu proteinu Spr0929 T255A, EC588 variantu bez záměny (WT). Dráhy „0“ označují stav před indukci, „1“ a „2“ počet hodin po indukci IPTG. M – marker molekulových hmotností. 12 % polyakrylamidový gel obarvený pomocí Coomassie Blue R-250.

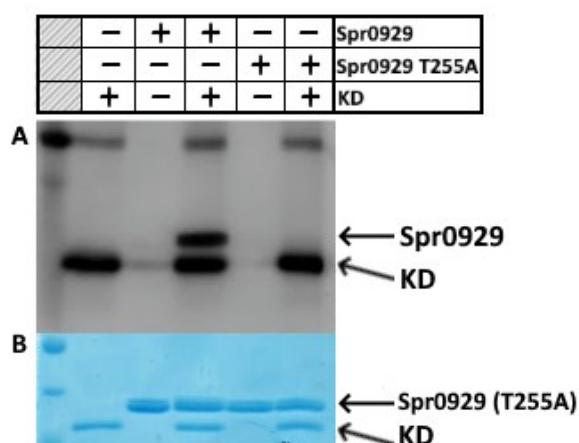


Obrázek 41: Purifikace proteinů Spr0929-His (A) a Spr0929-His T255A (B). F značí proteinový lyzát nezachycený na agaróze, W je vzorek odebraný po posledním promytí. Následují jednotlivé eluční frakce. M – marker molekulových hmotností. 12 % polyakrylamidový gel obarvený pomocí SafeStain barvení.

Obdobně, jako v případě vektoru pETPhos byl i do vektoru pET42b zaveden gen pro fosfoablativní formu proteinu Spr0929. Produkt QCh reakce byl transformován do kmene *E. coli* DH5 α za vzniku kmene EC590 (pET42b-*spr0929*-T255A-*his*) a poté do expresního kmene *E. coli* BL21(DE3) za vzniku kmene EC592 (pET42b-*spr0929*-T255A-*his*).

Test exprese probíhal kultivováním dvou klonů od každého ze dvou kmenů EC588 a EC592 v 50ml LB média. Vzorky byly odebírány před indukcí exprese (zhruba po 2 hodinách po zaočkování při dosažení OD₆₀₀ = 0,4) a poté 1 a 2 hodiny po indukci exprese pomocí IPTG. Z **Obrázku 40** je patrné, že i po 1 hodině po indukci bylo naprodukováno dostatečné množství obou proteinů.

Následovala purifikace obou proteinů pomocí afinitní chromatografie Ni-NTA agarózou a dialýza. Proteinu bylo nejvíce ve 2. a 3. eluční frakci, pro dialýzu byly použité první 4 frakce (**Obrázek 41**).



Obrázek 42: Průkaz místa fosforylace Spr0929 proteinkinázou StkP na T255 *in vitro*.

A: kinázová reakce na 12% gelu - imunodetekce Anti-P-Thr protilátkou; **B:** kontrola nanášek proteinu na gelu pomocí SafeStain barvení. KD = kinázová doména, T255A = fosfoablativní záměna.

imunodetekce s Anti-P-Thr protilátkou s využitím chemiluminiscenčního substrátu WesternBright ECL. Výsledný **Obrázek 42 A** vznikl po expozici 25 sekund. Z výsledku vyplývá, že v podmínkách *in vitro* je protein Spr0929 substrátem kinázy StkP a místem fosforylace je threonin v pozici 255.

4.8.2 Průkaz fosforylace v podmínkách *in vivo*

Na základě fosfoproteomu byla stanovena fosforylace proteinu Spr0929 v pozici T255 v Rx kmeni kultivovaném v přítomnosti Amp. V těchto podmínkách jsou hladiny fosforylace obecně vyšší. Ještě větší míra fosforylace byla detekována v hyperfosforylovaném kmeni Sp113, postrádajícím fosfatázu PhpP (Ulrych, nepublikované výsledky). Při imunodetekci

Kolorimetrickým stanovením koncentrace proteinů pomocí BCA soupravy byla stanovena koncentrace a ta byla normována ředěním proteinu destilovanou vodou. Purifikované proteiny byly použity v kinázové reakci *in vitro*. Byla porovnána fosforylace WT formy Spr0929 a formy s fosfoablativní bodovou záměnou T255A. Kontrola nanášek proběhla pomocí barvení gelu s paralelně analyzovanými vzorky (**Obrázek 42 B**).

Stanovení fosforylace proběhlo metodou

imunodetekce s Anti-P-Thr protilátkou s využitím chemiluminiscenčního substrátu WesternBright ECL. Výsledný **Obrázek 42 A** vznikl po expozici 25 sekund. Z výsledku vyplývá, že v podmínkách *in vitro* je protein Spr0929 substrátem kinázy StkP a místem fosforylace je threonin v pozici 255.

celkového proteinového lyzátu Sp1 (WT) a Sp113 ($\Delta phpP$) pomocí Anti-P-Thr protilátky není vidět na membráně rozdíl v detekovaném signálu v oblasti odpovídající putování Spr0929 (data nejsou uvedena). Touto metodou tedy nelze fosforylaci v *in vivo* podmínkách potvrdit.

Za účelem studia fosforylace v podmínkách *in vivo* jsem připravil kmeny nesoucí FLAG epitop na C-konci proteinu Spr0929 a obdobné kmeny s fosfoablativní záměnou T255A. Gen kódující tento fúzní protein byl vnesen do nativního lokusu, náhradou za SJK.



Obrázek 43: Genetické mapy FLAGovaných forem *spr0929*. Zeleně jsou vyznačeny fragmenty pro fúzní PCR konstrukt pro vložení FLAGované nativní formy proteinu do nativního lokusu, modře pro fosfoablativní záměnu T255A. Fragment B je pro obě formy společný.

Vzhledem k faktu, že jediným kmenem, kde jsem za standardních podmínek pozoroval fenotypový projev odstranění genu *spr0929* byl kmen R6, pokusil jsem se nejprve o potvrzení fosforylace na tomto genetickém pozadí.

Konstrukt pro transformaci *spr0929-flag* byl opět vytvořen pomocí metody fúzní PCR, jejím templátem byly dva fragmenty DNA amplifikované z chDNA kmene R6, viz **Obrázek 43**. Oligonukleotidy ke vnesení Flag kotvy AU283 a AU284 nesou přesah se sekvencí pro tuto značku. AU283 byl použitý společně s AU143 k amplifikaci genu *spr0929* a části genu *spr0928*. Dále AU284 spolu s AU146 k přípravě fragmentu obsahujícího oblast za genem *spr0929* ve směru transkripce.

K vytvoření konstruktu *spr0929-T255A-flag* byl použit stejný fragment pro oblast za genem zájmu ve směru transkripce (na **Obrázku 43** fragment **B**). Ten byl fúzován se dvěma dalšími. Oblast před genem ve směru transkripce pocházela z PCR s oligonukleotidy AU143/AU282 z R6 chDNA templátu. Oblast genu *spr0929* se záměnou T255A byla amplifikována z vektoru pZnMin-*spr0929-T255A-flag*, pocházejícího z kmene EC567. Pro tuto oblast byl použit oligonukleotid AU281 (částečně komplementární k AU282) a AU283 s komplementaritou k AU284.

Koncová fúze probíhala u obou konstruktů pomocí PCR s využitím vnějších oligonukleotidů LN302 a LN303.

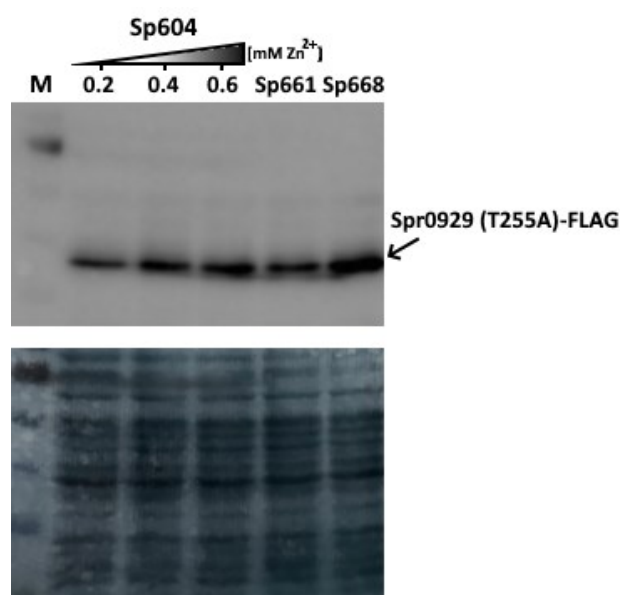
Oba tyto konstrukty byly transformovány do kmene R6, nesoucího SJK v lokusu pro *spr0929* (kmen Sp355). Kmen s nativní formou *spr0929* získal označení Sp661. Kmen s fosfoablativní záměnou T255A je veden pod číslem Sp668. Oba kmeny byly sekvenačně ověřeny.

Imunodetekce s Anti-FLAG protilátkou ukázala funkční expresi genu. Jako kontrola byl použit komplementační kmen Sp604 (R6, $\Delta spr0929$ *bga::pZnMin-spr0929-flag*), kultivovaný v gradientu Zn^{2+} iontů 0,2; 0,4 a 0,6 mM. Po obarvení membrány v amidové černi jsem získal kontrolu nanášek (**Obrázek 44**).

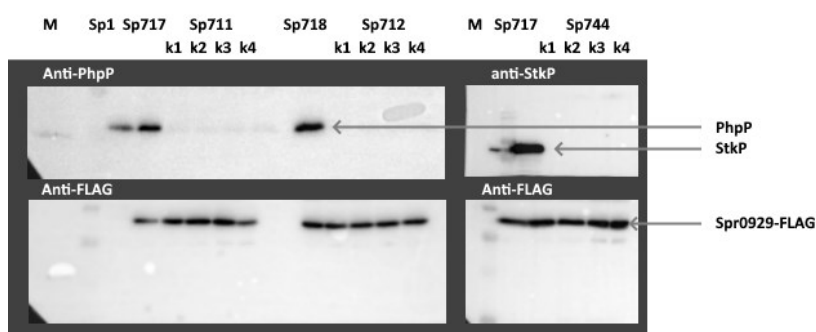
Pro určení fosforylace proteinu Spr0929 v těchto kmenech je možné využít dvou metod. První alternativou je použití elektroforézy proteinového lyzátu na speciálním Phos-tagovém gelu, který způsobuje retardaci v putování u fosforylovaných proteinů. Následná imunodetekce pomocí Anti-FLAG protilátky umožňuje vizualizovat rozdíl v putování fosforylované a nefosforylované formy.

Druhou možností je purifikace proteinu značeného Flagovou kotvou přes Anti-FLAG značené magnetické kuličky. Následuje jeho nanášení na SDS-PAGE gel ve stejných koncentracích a imunodetekce s použitím Anti-P-Thr protilátky, případně i protilátky Anti-FLAG z důvodu kontroly rovnoměrnosti nanášek.

Jelikož se mi nepodařilo pomocí Phos-tagového gelu určit jednoznačný výsledek (data nejsou prezentována), přikročil jsem k tvorbě hyperfosforylovaného kmene, abych zvýšil šanci úspěšné detekce fosforylace. Takový kmen je možné získat pouze na genetickém pozadí Rx. Proto jsem konstrukty nesoucí gen s Flagovou kotvou transformoval do Rx kmene Sp354 (Rx,



Obrázek 44: Test exprese proteinu Spr0929-FLAG. Pod indukibilním pZnMin a nativním promotorem na genetickém pozadí R6. Kmen Sp661 nese nativní formu genu *spr0929* s FLAGovou kotvou na C-konci a Sp668 fosfoablativní záměnu T255A. Nahoře imunodetekce pomocí Anti-FLAG protilátky, dole membrána barvená v amidové černi.



Obrázek 45: Imunodetekce FLAGovaných forem Spr0929 na Rx pozadí. Sp717 nese FLAGovou kotvu, Sp711 má navíc deletovanou *PhpP*, Sp744 *StkP*. Kmeny Sp718 a Sp712 nesou fosfoablativní záměnu T255A, genotypy analogicky.

$\Delta spr0929::SJK$). Kmen nesoucí nativní formu genu *spr0929* byl označen jako Sp717 (Rx, *spr0929-flag*) a kmen s fosfoablativní záměnou T255A v tomto genu byl veden pod číslem Sp718 (Rx, *spr0929-T255A-flag*). Po ověření

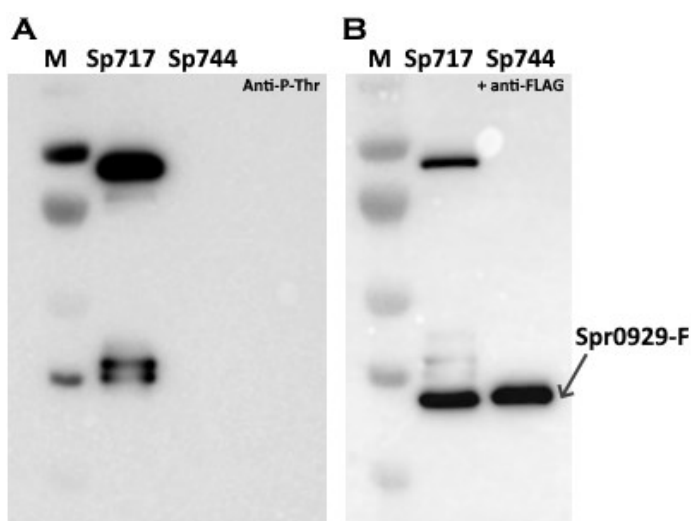
správnosti sekvence jsem tyto kmeny použil pro transformaci konstruktů $\Delta phpP::JK$ za účelem odstranění fosfatázy *PhpP*. Získal jsem tak kmeny Sp711 (Rx, $\Delta phpP$, *spr0929-flag*) a Sp712 (Rx, $\Delta phpP$, *spr0929-T255A-flag*).

Pro případ, že by za standardních podmínek protein fosforylovaný byl jsem připravil též kmen nesoucí Flagovou značku na $\Delta stkP$ pozadí, a to vložením linearizovaného vektoru pAKCmDK do kmene Sp717. Tímto způsobem vznikl kmen Sp744 ($\Delta stkP$, *spr0929-flag*), sloužící jako negativní kontrola.

Všechny kmeny s Flagovou značkou na genetickém pozadí Rx jsem podrobil testu exprese pomocí imunodetekce s Anti-FLAG protilátkou. Zároveň jsem provedl imunodetekci s Anti-*PhpP* protilátkou k ověření delece *phpP* a s Anti-*StkP* protilátkou k ověření delece *stkP*. **Obrázek 45** dokumentuje expresi proteinů s Flagovou značkou, stejně jako úspěšné delece genů pro kinázu a fosfatázu u příslušných kmenů.

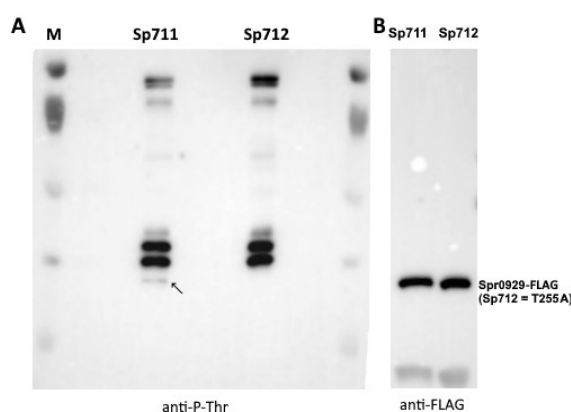
Ze všech získaných kmenů jsem po kultivaci v 50 ml TSB média izoloval celkový proteinový lyzát a po určení koncentrace pomocí BCA stanovení normoval koncentraci na 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Stanovení fosforylace pomocí posunu na Phos-tagovém gelu opět neukázalo spolehlivý výsledek (data nejsou prezentována), přistoupil jsem tedy k imunoprecipitaci pomocí Anti-FLAG protilátky imobilizované na magnetických kuličkách. Získané



Obrázek 46: Imunodetekce elučnicích frakcí z kmenů Sp717 a Sp744. A: Anti-P-Thr protilátka, B: Anti-FLAG protilátka na téže membráně, je vidět též zbytkový signál z původní Anti-P-Thr detekce.

eluční frakce z kmenů Sp717 (*spr0929-flag*) a Sp744 (Δ *stkP*, *spr0929-flag*) jsem ve stejných nanáškách analyzoval pomocí imunodetekce s použitím Anti-P-Thr protilátky (**Obrázek 46 A**). U kmene s odstraněnou kinázou, který sloužil jako negativní kontrola, není dle očekávání patrný žádný fosforylační signál. Přestože signál z imunodetekce Anti-FLAG protilátkou tvořil pouze jeden band, velikostně odpovídající proteinu Spr0929-FLAG, na tomto obrázku je vidět, že jsem v eluátu získal i proteiny o jiné hmotnosti. Fakt, že ani jeden z proteinů, fosforylovaných v kmeni Sp717 demonstrováných na **Obrázku 46 A** není Spr0929-FLAG je dokumentován na **Obrázku 46 B**, kde jsem na tutéž membránu aplikoval Anti-FLAG protilátku. Signál z předchozí detekce je vidět i zde a protein Spr0929-FLAG skutečně putuje níže než pozorovaný fosforylovaný dvojband. Tímto způsobem tedy nelze detekovat fosforylaci proteinu Spr0929 za standardních podmínek.



Obrázek 47: Detekce fosforylace proteinu Spr0929 v *in vivo* podmínkách na Δ *phpP* pozadí. Purifikované proteiny byly rozděleny na 10 % PAA gelu, pro detekci byly použity Anti-P-Thr (A) a Anti-FLAG (B) protilátky. Šipka označuje fosforylovaný protein Spr0929-FLAG.

potvrzení konkrétního místa fosforylace v podmínkách *in vivo*.

Na **Obrázku 47 A** je výsledek imunodetekce imunoprecipitovaných proteinů z těchto kmenů s použitím Anti-P-Thr protilátky. Pro jednoznačnější odlišení fosforylačního signálu proteinu Spr0929 od výše zmíněného dvojbandu jsem použil větší, 10 % PAA gel a proteiny jsem nechal separovat na elektroforéze delší dobu, takže na výsledné membráně není celé spektrum proteinů, ale pouze úsek zájmu s většími rozestupy mezi jednotlivými proteiny. Obrázek představuje důkaz fosforylace proteinu Spr0929 na threoninu 255, jelikož slabě fosforylovaný proužek putující ve stejné velikosti jako signál z Anti-FLAG detekce (**Obrázek 47 B**) je detekován pouze u WT formy proteinu, nikoliv však u fosfoablativní formy T255A.

Také jsem provedl imunodetekci imunoprecipitovaných proteinů pomocí Anti-FLAG protilátky. Ta ověřila, jak protein Spr0929-FLAG putuje na gelu a zároveň sloužila jako kontrola nanášek. Výsledek této detekce je prezentován na **Obrázku 47 B**.

V dalším kroku jsem přistoupil k obdobné analýze hyperfosforylovaných kmenů s odstraněnou fosfatázou PhpP s Flagovou značkou fúzovanou s proteinem Spr0929. Šance, že v tomto experimentálním uspořádání bude fosforylace detekovatelná je vyšší, čemuž odpovídá i vyšší signál z fosfoproteomové analýzy. Kromě kmene Sp711, nesoucího nativní formu Flagem značeného proteinu Spr0929 jsem testoval též kmen Sp712, nesoucí fosfoablativní záměnu T255A, za účelem

5 Diskuze

Grampozitivní bakterie *Streptococcus pneumoniae* kóduje ve svém genomu jedinou Ser/Thr proteinkinázu eukaryotního typu StkP a funkčně spřaženou fosfatázu PhpP (Nováková et al., 2005). Fosforylací svých substrátů řídí StkP několik důležitých buněčných procesů, jako je buněčné dělení či syntéza BS (Fadda et al., 2003; Fleurie et al., 2014; Nováková et al., 2005). Popis těchto substrátů je nezbytný pro pochopení fungování klíčových signálních drah u pneumokoka. Za účelem identifikace substrátů StkP provedla naše laboratoř ve spolupráci s Centrem biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice Hradec Králové analýzu globálního fosfoproteomu pomocí hmotnostní spektrometrie. V tomto experimentu byl porovnán fosfoproteom WT s delečním kmenem v proteinkináze StkP ($\Delta stkP$) a také s hyperfosforylovaným kmenem s odstraněnou fosfatázou PhpP ($\Delta phpP$) na genetickém pozadí Rx. U hyperfosforylovaného kmene byl jedním z identifikovaných substrátů i protein Spr0929, u něhož byl identifikován jediný fosforylovaný threonin v pozici 255 (Fabrik & Ulrych, nepublikované výsledky). U divokého typu však fosforylace proteinu Spr0929 nebyla

```
Streptococcus pneumoniae R6   SPEKLANDLFDNNLTARLSFIDQVREAVPEPVQFDEIDASRQLKKFENQKLSLSNGIELI 300
Streptococcus sp. DD10       SPEKLANDLFDNNLTARLSFIDQVKEAVPEPVQFDEIDASRQLKKFENQKLSLSNGIELI 289
Streptococcus infantis SK970 SPEKLANDLFDNNLTARLSFIDRVKEAVPEPVQFDEIDASRQLKRFENQKLSLSNGIELI 289
Streptococcus cristatus      SPEKLADDELFDNSLTARLTFIDQVKETVPEPIKFDEIDSSRQKKKFENQKLSLSNGIELI 289
Streptococcus intermedius B196 SPEKLADDELFDNNLTARLTFIDRVKEVPIPETVKFDEVDSSRQKKKFENQKLSLSNGIELI 289
Streptococcus sanguinis SK36 SPEKLADDLFDSNLTARLTFIDQVKEAIPPEPVKFEIDSSRQKKKFENQKLSLSNGIELI 289
Streptococcus gordonii      SPEKLADDLFDSNLTARLSFIDQVKEAIPPEPVKFEIDSSRQKKKFENQKLSLSNGIELI 289
Streptococcus massiliensis   SPEKLADDLFDSNLTARLSFIDQVKEVMPEPIVFEIDSSRQKKKFENQKLSLSNGIELI 289
*****::***.***:***:***:*.:.** : *.*:*:*** *:*****
```

328 shod z 335 = 97,9%

Obrázek 48: Sekvenční srovnání homologů Spr0929 u různých druhů streptokoka. Zobrazena je oblast v okolí T255, tento threonin je znázorněn červeně.

detekována. Důvodem může být slabá fosforylace, která je pod detekčním limitem použité metody. Tato slabá fosforylace by mohla být způsobena defosforylací fosfatázou PhpP za standartních podmínek. V takovém případě se fosforylace projeví právě jejím odstraněním či působením nějakých (doposud neznámých) stresových podmínek. Jak bylo v literární rešerši demonstrováno na několika případech, fosforylace substrátů je častou součástí odpovědi na různé typy stresů. HK reagují velmi často na přítomnost určitých stresových podmínek. Samotná StkP pak reguluje fosforylací za podmínek kyselého pH RR ComE (Piñas et al., 2018).

Spr0929 je doposud nepopsaný protein s predikovanou nukleoid-asociovanou doménou NA37. Cílem této práce je základní charakterizace tohoto proteinu a potvrzení jeho fosforylace kinázou StkP v pozici T255. Vzhledem k absenci publikací, které se tomuto proteinu věnují byly jediným zdrojem informací o něm bioinformatické databáze, které nabízejí u podobných hypotetických proteinů jejich predikované vlastnosti. Dle sekvenčního srovnání a prohledávání

sekvenčních databází algoritmem BLASTp je Spr0929 unikání pro rod *Streptococcus*. Sekvenční srovnání ukázalo sekvenční identitu mezi nevdálenějšími zástupci těchto druhů 56,7%, aminokyseliny s podobnými vlastnostmi se vyskytují na 23% míst. Pokud však vezmeme v potaz pouze několik druhů, které vykazují největší shodu, konzervovanost dosahovala 97,9% (viz **Obrázek 48**). Těsně přilehlé okolí T255 bylo konzervováno u všech nalezených homologů Spr0929 u streptokoků. Na **Obrázku 48** je tato oblast vyznačena zeleně. Zajímavé je, že ostatní organismy kromě pneumokoka kódují verzi proteinu, která je na N-konci o 11 aminokyselin kratší, začínají tedy sekvencí odpovídající methioninu v pozici 12 (Bateman, 2019). Dobře konzervovaná je též organizace genomu v okolí *spr0929* (Pagliero et al., 2005).

Pro studium funkce konkrétního proteinu v buňce je nezbytné mít k dispozici kmen, který postrádá gen pro tento protein. Případné rozdíly ve fenotypu divokého kmene a kmene nesoucího delecii v genu kódujícího studovaný protein poukazují na roli tohoto proteinu v konkrétní oblasti fyziologických procesů. Prvním cílem tedy byla příprava delečního kmene v genu *spr0929*. Obecně, pokud se jedná o esenciální protein, připravit kmeny nesoucí čistou delecii není možné. V takovém případě je nutné zavést nejprve druhou alelu studovaného genu pod inducibilní promotor a za podmínek, kdy je exprese aktivní, provést delecii genu v nativním lokusu.

Proces odstranění genu je dvoukrokový, nejprve se místo něj vkládá rezistenční kazeta, ve druhém kroku dochází k úplné delecii genu. Konkrétně u genu *spr0929* se podařilo nahradit tuto oblast genomu kazetou SJK s vysokou účinností. Delece genu byla provedena na třech různých genetických pozadích *S. pneumoniae*. Jedná se o neopouzdrěné nepatogenní laboratorní kmeny Rx, R6 a D39. Z transformace na všech třech genetických pozadích jsem získal více než 50 klonů, což naznačuje neesencialitu tohoto genu za standardních podmínek.

Úspěšně jsem tedy připravil kmeny *S. pneumoniae* nesoucí čistou delecii genu *spr0929* na všech třech genetických pozadích Rx, R6 a D39. Tyto kmeny jsem následně charakterizoval z hlediska schopnosti růstu v laboratorních podmínkách v tekutém komplexním médiu TSB. Testování růstu probíhalo u třech nezávislých klonů kmene s úplnou delecí na všech genetických pozadích. Dále byly testovány i kmeny nesoucí vloženou SJK do lokusu genu *spr0929*.

Z porovnání růstových křivek oproti divokému typu vyplývá, že úplná delece genu nemá zásadní vliv na schopnost růstu pneumokoka v těchto podmínkách. Drobný rozdíl jsem pozoroval u kmenů Rx a R6, kde dochází k prodloužení doby zdvojení z 30,6 na 31,3 minut.

Tento rozdíl nejspíš není významný a je pravděpodobně způsoben odchylkami v experimentálně získaných hodnotách OD₆₀₀.

U kmene s vloženou SJK dochází k výraznému prodloužení lag fáze růstu. U kmene R6 ani D39 nebyl tento efekt pozorován. Také dochází k prodloužení doby zdvojení na 33,6 minut. Tento efekt může být způsoben vlivem vnesených genů, kódovaných rezistenční kazetou nebo polárním efektem kazety. Stanovení hladiny exprese okolních genů však nebylo u těchto kmenů provedeno vzhledem k tomu, že se nejednalo o kmeny, se kterými byly prováděny další fyziologické experimenty. Podobný vliv vložení SJK do genomu pneumokoka na jeho růst byl však pozorován u delece proteinu Jag, kde přítomnost této rezistenční kazety skutečně způsobovala polární efekt (Ulrych et al., 2016). Jelikož sousední gen ve směru transkripce (*spr0930*) kóduje hydrolázu BS Pmp23, důležitý protein buněčného dělení, jehož malfunkce vede k defektu v buněčném dělení (Jacq et al., 2018), narušení genetického kontextu by skutečně mohlo tento efekt způsobit.

Dalším předmětem výzkumu v této práci bylo porovnání schopnosti růstu kmenů bez Spr0929 s divokým typem za stresových podmínek. Růst za zvýšené teploty (40°C) simuloval situaci akutní infekce a cílem bylo ověřit, zda se protein Spr0929 nějakým způsobem podílí na přežití pneumokoka v těchto podmínkách, což by mohlo ukázat na participaci ve virulenci. Z měření růstových křivek však vyplývá, že k výraznějším změnám v růstu nedochází. Podíl na virulenci v tomto případě nelze vyloučit, je však jisté, že se protein Spr0929 nepodílí na reakci pneumokoka na teplotní stres.

Dalším testovaným fyziologickým středem byl pH stres. Ten byl testován na pevném médiu stejně tak jako v médiu tekutém. Na základě růstových křivek lze usoudit, že se růst Δ spr0929 kmenů významně neliší od WT. Náznak rozdílu je možné vidět u kmene R6, kultivovaného v pH 6,5; 7,5 a 8. Toto pozorování však může být způsobeno nepřesností pipetování při přípravě vzorků. Na pevném médiu nebyl pozorován rozdíl v počtu narostlých kolonií. Celkově se tedy dá předpokládat, že protein Spr0929 není účasten procesů obrany pneumokoka proti výkyvům pH.

Testování míry přežití při oxidativním stresu bylo též předmětem zájmu, nicméně vzhledem k nekonzistentnosti metody a nejednoznačným výsledkům jsem tyto experimenty neuvedl mezi Výsledky. Jedná se o důležitý experiment, který plánuji v budoucnu opakovat s použitím aktualizovaného protokolu.

U kmene nesoucího deleci *spr0929* nás dále zajímala jeho morfologie. Změna morfologických parametrů obvykle ukazuje na defekt v buněčném dělení, v syntéze BS či v nějakém procesu, který je s těmito ději funkčně spřažen. Vzhledem ke genetickému kontextu

by se Spr0929 mohl s hydrolázou Pmp23 (Jacq et al., 2018) spolupodílet na procesu remodelingu peptidoglykanu, vzhledem k jeho predikované lokalizaci však spíše na regulaci. StkP tyto procesy též reguluje (Falk & Weisblum, 2013; Lovering et al., 2012; Nováková et al., 2005).

Pozorování morfologie kmenů s delecí *spr0929* odhalilo kmenově-specifický efekt. Zatímco u kmene $\Delta spr0929$ na genetickém pozadí D39 nedochází k významným změnám v délce a šířce buněk v porovnání s WT, v případě kmene R6 je situace odlišná. U všech testovaných klonů kmene s delecí *spr0929* jsem pozoroval zmenšení buněk jak v délce, tak i v šířce v porovnání s WT, což bylo experimentálně potvrzeno ve dvou odlišných kultivačních médiích TSB a C+Y. V sekci o dvoukomponentových systémech je popsáno několik příkladů kmenově-specifických fenotypových projevů různých proteinů. Například u TCS04 je vliv na virulenci dán genetickým pozadím. Tři typy genetického pozadí, studované v této práci se od sebe poměrně významně liší. Nejblíže klinickým izolátům je kmen D39, jediný rozdíl je v absenci *cps* lokusu pro expresi proteinů syntézy polysacharidového pouzdra. Kmen R6 naproti tomu obsahuje 81 mutací, většina z nich představuje bodové záměny. Část těchto mutací se nachází v genech pro proteiny důležité pro některé fyziologické funkce (Lanie et al., 2007). To může vysvětlit odlišný fenotypový projev absence proteinu Spr0929. Je možné, že je jeho funkce v případě kmene D39 zastoupena nějakým proteinem, který má R6 kmen mutovaný. Třetí kmen Rx, který byl velmi široce používán po dlouhou dobu, nese mutaci v *hexA* kódující protein mismatch repair systému. Jedná se tedy o mutátorový kmen, který v průběhu pasážování nejspíš nasbíral přes 600 mutací (Rued et al., 2017). Přesto je naší laboratoří stále využíván. Na tomto genetickém pozadí lze totiž například připravit $\Delta stkP$ a $\Delta phpP$ kmene, nutné pro studium fosforylace. U tohoto kmene jsem morfologii netestoval, vzhledem k vysoké pravděpodobnosti supresorových mutací. Tento test a následný komplementační test u Rx kmene může být předmětem budoucí práce.

Abych ověřil, že pozorovaný odlišný fenotyp je skutečně způsoben delecí *spr0929* a nejde o polární efekt či o efekt nějaké supresorové mutace, provedl jsem test komplementace, kdy byl do postradatelného *bga* lokusu kmene s delecí klonován komplementační konstrukt, nesoucí alelu genu *spr0929* s FLAG epitopem pod inducibilním promotorem. Konkrétně se jednalo o zinkem ovládaný promotor. Při zvyšování hladiny zinku v médiu jsem pozoroval očekávaný trend – zvětšování buněk u obou pozorovaných parametrů, a to u všech testovaných klonů. V souladu s tímto pozorováním dopadl i test morfologie u nadprodukčního R6 kmene. Při zvyšování míry exprese genu *spr0929-flag* nad úroveň WT dochází ke zvětšování buněk jak v délce, tak i v šířce. Je tedy jisté, že za tento fenotyp je zodpovědný protein Spr0929. Ve

výsledcích je uvedena statistická významnost ve velikosti. Oproti očekávání dochází u nadprodukčního kmene ke změně v šířce i bez přidání zinečnatých iontů do média. Toto pozorování může být vysvětleno nízkým obsahem zinku v komplexním TSB médiu jako takovém. Nejedná se tedy skutečně o nulový obsah zinku. Alternativním vysvětlením může být bazální transkripce z promotoru i bez působení induktoru. Pokud je tato interpretace správná, znamená to, že i relativně malá změna v množství proteinu má významný fenotypový projev. Toto množství je tak malé, že není viditelné na provedené imunodetekci s použitím anti-FLAG protilátky.

Jak již bylo zmíněno, protein Spr0929 obsahuje dle predikcí nukleoid-asociovanou doménu NA37, označovanou též NdpA. Tato doména byla popsána u proteinu YejK u *E. coli*. Její funkce není známá. Nachází se u mnoha bakteriálních druhů, v databázi InterPro evidováno okolo 12 000 výskytů. Naprostá většina proteinů s touto doménou, včetně Spr0929, neobsahuje žádné další domény, u třech proteinů se tato doména vyskytuje ve formě dimeru (Mitchell et al., 2019). Jiné tři proteiny z různých organismů obsahují kromě NdpA domény ještě doménu FtsK, která je zodpovědná za DNA translokaci a segregaci chromozomů a mutace v této doméně obecně znemožňuje vazbu na DNA (Mitchell et al., 2019; Sivanathan et al., 2006). To, zda se i samotná NdpA doména podílí na přímé vazbě na DNA nebylo popsáno. Doména NdpA je u proteinu Spr0929 lokalizována mezi 20 a 331 aminokyselinou, pokrývá tedy většinu proteinu a je blíže C-konci. Vzhledem k tomu, že prvních 12 aminokyselin na N-konci je unikátních pro pneumokoka, homologní proteiny u ostatních bakterií z rodu *Streptococcus* jsou tvořeny téměř výhradně touto doménou.

Dalším cílem této práce bylo tedy stanovení lokalizace proteinu Spr0929 v buňce pneumokoka a potvrzení hypotézy kolokalizace s bakteriálním nukleoidem. Za tímto účelem byly připraveny kmeny exprimující fúzní protein GFP-Spr0929 z inducibilního promotoru pZn. V souladu s očekávanou absencí transmembránových helixů byl fluorescenční signál cytoplazmatický. Šlo však o nerovnoměrnou distribuci signálu, která není typická pro čistě cytoplazmaticky lokalizovaný protein. Už toto pozorování naznačilo kolokalizaci s DNA. Pro potvrzení této domněnky jsem připravil fixované preparáty s přidavkem interkalačního DNA-specifického fluoroforu DAPI pro vizualizaci bakteriální DNA. Překryv fluorescenčních signálů ukazuje velmi spolehlivě na kolokalizaci.

Jelikož je protein Spr0929 poměrně malý (38,6 kDa), může navěšení fluorescenční značky GFP (27 kDa) poměrně významně ovlivnit chování tohoto proteinu a jeho správné fungování. Toto riziko, stejně jako riziko špatného sbalení, bylo minimalizováno vložením flexibilního regionu mezi Spr0929 a GFP. Za účelem ověření správného fungování proteinu jsem u kmenů

s fúzním proteinem opět provedl test komplementace. Fúzní protein GFP-Spr0929 komplementoval fenotyp WT až při vyšších koncentracích zinku, což může znamenat, že protein není zcela funkční a pro plnění jeho funkce je třeba, aby jej v buňce bylo větší množství.

Z tohoto důvodu jsem přistoupil k přípravě kmene, exprimujícího C-koncovou fúzi s GFP, tedy Spr0929-GFP. Tentokrát jsem konstrukt pro tento fúzní protein vložil do nativního lokusu a tím pádem byla jeho exprese pod kontrolou nativního promotoru. Jelikož je za standardních podmínek protein exprimován (Ulrych, publikace v přípravě), bylo toto experimentální uspořádání umožněno. Pozorování těchto kmenů odhalilo odlišnou lokalizaci, než u N-koncové fúze. Cytoplazmatický signál byl v tomto případě zcela difuzní. Napojením fluorescenční značky na C-konec mohla být porušená funkce NdpA domény, která je blíže tomuto konci.

Abych zjistil, který z konstruktů Spr0929-GFP a GFP-Spr0929 je funkční, připravil jsem též N-koncovou fúzi s GFP pod nativním promotorem. Expese C-koncové fúze byla opět dostatečná a podle očekávání jsem pozoroval stejnou lokalizaci, jako v případě exprese z indukibilního promotoru. Vzhledem ke shodné lokalizaci se dá předpokládat, že je N-koncová fúze funkční. K úplnému potvrzení této domněnky je však ještě třeba provést porovnání morfologických parametrů buněk. Stanovení délky a šířky, u C-koncové fúze, stejně tak jako u N-koncové fúze exprimované z nativního promotoru jsem neprovedl z časových důvodů. Výsledek tohoto experimentu bude nicméně důležitý pro pochopení, jak přítomnost reportéru ovlivňuje fungování proteinu Spr0929 a plánuji jej provést v budoucnu.

Paralelně s přípravou kmenů s GFP fúzí jsem připravoval též fúzi s alternativním reportérovým genem pro fluorescenční značku zsGreen (Matz et al., 1999). Míra fluorescence však u tohoto proteinu byla méně intenzivní než v případě GFP.

Potvrzení kolokalizace proteinu Spr0929 s bakteriálním nukleoidem otevřelo cestu k experimentům, testujícím hypotézu jeho přímé vazby na bakteriální DNA. To je možné provést několika metodami. Nabízí se například metoda ChipSeq, díky které se u streptokoků například nedávno podařila rozklíčovat regulace pomocí CcpA (DebRoy et al., 2021) a objasnila roli proteinu SMC při segregaci chromozomů (Minnen et al., 2011). Alternativou je jednodušší metoda DNase footprinting (DJ & A, 1978), založená na ochraně DNA sekvence navázaným proteinem před naštěpením DNAsou I. Těmito způsoby by bylo možné nejen stanovit schopnost proteinu interagovat s DNA, ale v případě metody ChipSeq také odhalit konkrétní sekvence, kde k tomuto jevu dochází. Vzhledem k tomu, že pro protein Spr0929 ani žádný jeho homolog není k dispozici 3D struktura, nedá se říct, zda protein obsahuje nějaký strukturální motiv, který by byl široce konzervovaný a měl DNA-vazebnou funkci. Pokud se však vazba na DNA podaří dokázat, lze předpokládat, že je Spr0929 regulační protein. Pokud by

tomu tak nebylo a výsledek takového experimentu by byl negativní, může se jednat o protein, který ke své lokalizaci potřebuje nějakého interakčního partnera. Testování protein-proteinových interakcí je obecně vzato další oblastí, která by mohla o roli Spr0929 u pneumokoka hodně vypovídat.

Testování hypotézy, zda je Spr0929 regulačním proteinem je možné provést stanovením komparativního transkriptomu / proteomu mezi WT a kmenem $\Delta spr0929$.

Stěžejní částí práce bylo potvrzení fosforylace proteinu proteinkinázou StkP. Fosforylace se obecně dá studovat *in vitro* a *in vivo* podmínkách. Přístup *in vivo* má pochopitelně větší biologickou relevanci, ne vždy však používané metody dovolují průkaz fosforylace v tomto uspořádání podat. Metodicky nejjednodušším způsobem, jak fosforylaci potvrdit v *in vivo* podmínkách je detekce signálu pomocí anti-P-Thr protilátky, putujícího v místě, odpovídajícím hmotnosti proteinu přímo z celkových proteinových lyzátů (a jeho absence u lyzátů delečního kmene). Tento přístup však v případě proteinu Spr0929 selhal. Proto jsem testoval fosforylaci alespoň v podmínkách *in vitro*, kde je možné získat větší množství čistého proteinu a úspěšná detekce fosforylace je tím pádem pravděpodobnější. Navíc zde odpadá nutnost hledat specifické kultivační podmínky, kdy k fosforylaci dochází.

Přístup *in vitro* vyžaduje přípravu expresního kmene *E. coli*, nesoucího expresní vektor s vloženým genem *spr0929*. Vložením dojde k fúzi s His-kotvou, která je následně použita k purifikaci proteinu a jeho kontrolní detekci. Prvním použitým vektorem byl pETPhos-Link, který vkládá His-kotvu na N-konci a je naší laboratoří hojně používán. Bohužel, exprese z tohoto vektoru opakovaně nebyla úspěšná. Druhým vektorem byl pET42b, u něhož jsem nahradil sekvenci pro GST kotvu konstruktem Spr0929-His. Z tohoto vektoru exprese fúzního proteinu s His-kotvou na C-konci fungovala dle očekávání. Je možné, že umístění His-kotvy na N-konec znemožnilo expresi proteinu.

Následnou kinázovou reakcí jsem podal *in vitro* důkaz hypotézy, že protein Spr0929 je substrátem kinázy StkP. Paralelně s přípravou expresního vektoru jsem připravil též vektor nesoucí fosfoablativní záměnu T255A v očekávaném místě fosforylace. V tomto případě jsem detekoval nulový fosforylační signál, čímž jsem potvrdil i konkrétní fosforylační místo. Zároveň se zdá, že žádné jiné místo fosforylace touto kinázou protein Spr0929 neobsahuje.

Identifikace proteinu Spr0929 jakožto substrátu kinázy StkP v podmínkách *in vivo* byla i nadále cílem práce. Bylo však nutné použít jiné metody studia tohoto fenoménu. Jedním z vyzkoušených přístupů bylo použití speciálního proteinového gelu s přídavkem PhosTagu, molekuly, která interakcí s fosforylovanými proteinovými zbytky způsobuje posun fosforylovaných proteinů na gelu. Jde o metodu, která se v naší laboratoři používá relativně

nově a doposud byla úspěšná pouze pro identifikaci fosforylace u jediného proteinu. V případě Spr0929 jsem získal ze dvou provedených experimentů dva protichůdné výsledky. Jednalo se o porovnání pohyblivosti FLAGovaných forem Spr0929 a Spr0929-T255A na genetickém pozadí R6. FLAGem značený protein byl exprimovaný z nativního lokusu pod nativním promotorem.

Třetím vyzkoušeným přístupem byla imunoprecipitace proteinu pomocí Anti-FLAG protilátky imobilizované na magnetických kuličkách. Tímto způsobem došlo k nabožení proteinu a jeho purifikaci. Tato metoda byla v naší laboratoři použita k úspěšnému potvrzení fosforylace proteinu Spr0175 v *in vivo* podmínkách (Kleinová, 2019). Na základě výsledků z této práce jsem předpokládal, že využití protilátky shodné s tou, která byla použita v případě *in vitro* průkazu fosforylace Spr0929 povede po nabožení proteinu k úspěšné detekci fosforylačního signálu.

Pro imunoprecipitaci jsem zvolil kmeny s odlišným genetickým pozadím oproti experimentům využívajícím PhosTagové gely. Tentokrát jsem pracoval s kmenem Rx, do nativního lokusu genu *spr0929* jsem také vložil konstrukt obsahující FLAG kotvu. Na tomto genetickém pozadí totiž lze, jak již bylo zmíněno, připravit kromě WT i hyperfosforylovaný Δ *phpP* kmen. Současně s těmito kmeny jsem připravil též kontrolní kmen s FLAG kotvou na genetickém pozadí Rx Δ *stkP*.

U Δ *stkP* kmene jsem podle očekávání nedetekoval žádný signál. Situace však byla zajímavější u WT kmene s vloženým konstruktem Spr0929-FLAG. Oproti očekávání jsem detekoval hned několik fosforylovaných proteinů, z nichž ani jeden velikostně neodpovídal proteinu Spr0929. Identita proteinů nebyla stanovena, tyto proteiny nicméně putují na proteinovém gelu obdobně jako kináza StkP a její dříve popsané substráty Jag a DivIVA (Nováková et al., 2005, 2010; Ulrych et al., 2016). Je možné, že jsem tyto proteiny co-imunoprecipitoval společně se Spr0929 a mohlo by tak jít o interakční partnery. Abych si tímto tvrzením byl jist, je potřeba nejprve vzorky srovnat s negativní kontrolou v podobě eluční frakce z divokého kmene Sp1, který neobsahuje ve svém proteomu žádnou FLAGovou kotvu. Pokud bych nedetekoval žádný fosforylační signál, nejedná se o nespecificky navázané proteiny, ale skutečně o interakční partnery. Jejich přímou identifikaci bych mohl následně potvrdit pomocí specifických Anti-StkP, Anti-Jag a Anti-DivIVA protilátek, které má naše laboratoř k dispozici. Potvrzení interakce by bylo nadále možné validovat například pomocí bakteriálního dvouhybridního systému.

Každopádně fosforylace proteinu Spr0929 se tímto způsobem též nedala u WT nesoucího Spr0929-FLAG detekovat. Stejný postup imunoprecipitace jsem tedy zopakoval na lyzátu

z hyperfosforylovaného Rx kmene. Porovnáním nativní formy proteinu Spr0929-FLAG s fosfoablativní záměnou Spr0929-T255A-FLAG na genetickém pozadí s odstraněnou fosfatázou PhpP jsem podal důkaz fosforylace proteinu Spr0929 kinázou StkP na T255 v *in vivo* podmínkách.

Biologická relevance tohoto důkazu je diskutabilní, jelikož jde o test v $\Delta phpP$ kmeni. Fosforylační signál je i v tomto případě poměrně slabý, což však nutně neznamená nízkou hladinu fosforylace. Na vině může být omezená schopnost vazby použité Anti-P-Thr protilátky na epitop, což je v souladu s pozorováním poměrně vysokého fosforylačního signálu proteinu Spr0929 u $\Delta phpP$ kmene stanoveného pomocí LC-MS v kombinaci s obohacením fosfopeptidu na TiO₂ kuličkách (Ulrych, publikace v přípravě). Jelikož pro protein Spr0929 není k dispozici 3D struktura, příčinu slabé vazby protilátky na epitop můžeme jen hádat. Threonin 255 je však jistě někde na povrchu proteinu, jelikož kináza StkP k němu má přístup. Může však být vnořený v jakési „kapse“. Obecně nějaký biochemický nebo strukturní kontext, tvořený okolními AK nebo proteiny může částečně bránit této vazbě. V takovém hypotetickém scénáři je jasné, že u kmene s PhpP není signál vidět, přestože je fosforylace do jisté míry přítomná. Schopnost protilátky detekovat fosforylaci samotného proteinu v *in vitro* podmínkách by tak mohla být v *in vivo* podmínkách snížena právě přítomností interakčního partnera. Mohlo by se jednat o vazbu proteinu na DNA nebo nějakou protein-proteinovou interakci. Pokud však existují specifické kultivační podmínky, za kterých PhpP protein nedefosforyluje, případně dochází k větší míře fosforylace pomocí StkP, bylo by snad možné detekovat tuto fosforylaci i u WT. Kultivace pneumokoka za jiných než standardních podmínek (působení ATB, teplota, pH, oxidativní stres atd.) a následná analýza fosforylace však nebyla v této práci provedena.

Pokud fosforylace za standardních podmínek existuje (ačkoliv jí nejsem schopen detekovat), může mít vliv jak na morfologii, tak i na lokalizaci. Tyto hypotézy jsem ověřoval společným experimentem. Do vektoru, nesoucího gen pro fúzní protein GFP-Spr0929 jsem zavedl fosfoablativní bodovou záměnu T255A. Protein s touto záměnou lokalizoval obdobně, jako v případě nativní formy nesoucí v dané pozici threonin. Komplementační test tohoto kmene nicméně odhalil neschopnost komplementace fenotypového projevu, týkajícího se velikosti buněk. Při odlišných hladinách proteinu zůstávala velikost buněk nezměněná a odpovídala kmeni s delecí *spr0929*. Ačkoliv se tedy nezdá, že by absence T255 (a tím pádem fosforylace) ovlivňovala lokalizaci, mohla by mít u R6 kmene vliv na doposud nepopsanou funkci, která vede k ovlivňování buněčné morfologie.

Existuje několik cest, jak tuto problematiku podrobněji prostudovat. Prvním krokem je stanovení morfologie u kmenů s FLAG epitopem a srovnání schopnosti komplementace nativní formy proteinu a proteinu se záměnou T255A. Tímto se eliminuje možnost, že je za defektní komplementaci zodpovědné samotné GFP. Je možné též připravit kmeny s touto záměnou T255A v nativním lokusu na pozadí R6 kmene bez jakékoliv značky. Dalším potenciálně informativním experimentem je příprava fosfomimetických forem proteinu a stanovení jejich schopnosti komplementace alterovaného fenotypu u R6 kmene a celkového vlivu na morfologii.

Vztah mezi fosforylací Spr0929 a morfologií je obtížné určit. U WT pozadí není fosforylace detekovatelná, jediný způsob je tedy test fosfoablativní formy proteinu. Problémem, je v tomto případě fakt, že za změnou fenotypu u mutace T255A nemusí stát chybějící fosforylace. Protein může mít tímto zásahem porušenou strukturu. Na druhou stranu, hyperfosforylovaný kmen, u kterého fosforylace Spr0929 dokázána byla, má sám o sobě abnormální morfologii kvůli absenci PhpP (Nováková et al., 2005).

Konkrétní funkce proteinu Spr0929 zůstává neznámá. Na základě provedených experimentů jsem získal výsledky, které vedly k jeho základní charakterizaci a ukázaly další možný směr výzkumu. Jak už to tak bývá, čím více člověk získá odpovědi, tím více vyvstane otázek. Jelikož se tímto projektem budu zabývat i nadále, je pravděpodobné, že na některé z nich dokážu nalézt odpověď. Osobně mě nejvíce zajímá prověření hypotézy Spr0929 jakožto regulačního proteinu. Mohlo by se tak jednat o prostředníka mezi signály vnímané kinázou StkP a regulací transkripce. Nicméně i samotné potvrzení vazby na DNA by bylo zajímavým výsledkem, protože by se jednalo o DNA-vazebný protein, který je regulován pomocí StkP, ale nespadá mezi DNA-vazebné response regulátory. Princip jeho fungování v buněčné signalizaci tedy bude značně odlišný od popsaných substrátů CbpR, RitR a ComE (Agarwal et al., 2012; Piñas et al., 2018; Uliasz et al., 2009). Asociace s nukleoidem je každopádně zajímavá vlastnost, která stojí za hlubší vhléd. I v případě, že se nejedná o regulační protein, může být důležitý pro jinou funkci asociovanou s DNA. Jelikož hlavní funkcí StkP je pleiotropní regulace buněčného dělení, nelze vyloučit, že Spr0929 se na tomto procesu též podílí, například jako protein, který má podíl na strukturním uspořádání chromozomální DNA. Takto odvážnou hypotézu však bude možné vznést až na základě dalšího výzkumu.

6 Souhrn

Protein Spr0929 je novým substrátem proteinkinázy StkP u *Streptococcus pneumoniae*. Na základě provedeného globálního fosfoproteomu byla v hyperfosforylovaném kmeni identifikována jeho fosforylace v pozici T255. Tuto fosforylaci jsem potvrdil v *in vitro* i *in vivo* podmínkách.

Mé výsledky dále ukazují, že delece tohoto neesenciálního proteinu vede u kmene R6 ke statisticky významnému zmenšení buněk v obou sledovaných parametrech – délce i šířce. Na morfolonii má nejspíš vliv zmíněná fosforylace, jelikož komplementační kmen nesoucí fosfoablativní záměnu T255A není schopen komplementovat. Na rychlost růstu za standartních podmínek nemá delece genu *spr0929* vliv. Fyziologická funkce proteinu Spr0929, který je konzervovaný pouze u streptokoků, není známá. Vzhledem k velmi podobnému chování z hlediska rychlosti růstu v prostředí s různým pH lze však vyloučit role v ochraně před jeho výkyvy. Výsledky této práce též naznačují, že zvýšená teplota neovlivňuje kmen s chybějícím genem kódujícím protein Spr0929 výrazněji než kmen divoký.

Protein Spr0929 obsahuje „nukleoid-asociovanou“ doménu NA37 bez blíže známé funkce. Výsledky podané v rámci této práce naznačují možnou kolokalizaci proteinu Spr0929 s bakteriálním nukleoidem, která pravděpodobně není závislá na jeho fosforylaci.

7 Seznam použité literatury

- Agarwal, S., Agarwal, S., Pancholi, P., & Pancholi, V. (2012). Strain-Specific Regulatory Role of Eukaryote-Like Serine/Threonine Phosphatase in Pneumococcal Adherence. *Infection and Immunity*, *80*(4), 1361–1372. <https://doi.org/10.1128/IAI.06311-11>
- Andreassen, P. R., Trappetti, C., Minhas, V., Nielsen, F. D., Pakula, K., Paton, J. C., & Jørgensen, M. G. (2020). Host-glycan metabolism is regulated by a species-conserved two-component system in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathogens*, *16*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008332>
- Aprianto, R., Slager, J., Holsappel, S., & Veening, J. W. (2018). High-resolution analysis of the pneumococcal transcriptome under a wide range of infection-relevant conditions. *Nucleic Acids Research*, *46*(19), 9990–10006. <https://doi.org/10.1093/nar/gky750>
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., De Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., ... Stockinger, H. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research*, *40*(W1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks400>
- Avery, O. T., Macleod, C. M., & 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. *Journal of Experimental Medicine*, *79*(2), 137–158. <https://doi.org/10.1084/jem.79.2.137>
- Bartual, S. G., Straume, D., Stamsås, G. A., Muñoz, I. G., Alfonso, C., Martínez-Ripoll, M., Håvarstein, L. S., & Hermoso, J. A. (2014). Structural basis of PcsB-mediated cell separation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature Communications*, *5*. <https://doi.org/10.1038/ncomms4842>
- Bateman, A. (2019). UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D506–D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>
- Bechet, E., Gruszczyk, J., Terreux, R., Gueguen-Chaignon, V., Vigouroux, A., Obadia, B., Cozzone, A. J., Nessler, S., & Grangeasse, C. (2010). Identification of structural and molecular determinants of the tyrosine-kinase Wzc and implications in capsular polysaccharide export. *Molecular Microbiology*, *77*(5), 1315–1325. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07291.x>
- Beilharz, K., Nováková, L., Fadda, D., Branny, P., Massidda, O., & Veening, J. W. (2012). Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein

- kinase StkP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119172109>
- Bender, M. H., Cartee, R. T., & Yother, J. (2003). Positive correlation between tyrosine phosphorylation of CpsD and capsular polysaccharide production in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, *185*(20), 6057–6066. <https://doi.org/10.1128/JB.185.20.6057-6066.2003>
- Bender, M. H., & Yother, J. (2001). CpsB Is a Modulator of Capsule-associated Tyrosine Kinase Activity in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(51), 47966–47974. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105448200>
- Canova, M. J., Kremer, L., & Molle, V. (2008). pETPhos: A customized expression vector designed for further characterization of Ser/Thr/Tyr protein kinases and their substrates. *Plasmid*, *60*(2), 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2008.05.002>
- Carvalho, S. M., Kloosterman, T. G., Kuipers, O. P., & Neves, A. R. (2011). CcpA Ensures Optimal Metabolic Fitness of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS ONE*, *6*(10), e26707. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026707>
- Casino, P., Rubio, V., & Marina, A. (2010). The mechanism of signal transduction by two-component systems. In *Current Opinion in Structural Biology* (Vol. 20, Issue 6, pp. 763–771). <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.09.010>
- Chang, K. S., & Morrison, D. A. (2005). Two distinct functions of ComW in stabilization and activation of the alternative sigma factor ComX in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, *187*(9), 3052–3061. <https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3052-3061.2005>
- Chertow, D. S., & Memoli, M. J. (2013). Bacterial coinfection in influenza: A grand rounds review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *309*(3), 275–282. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.194139>
- Cortay, J. C., Duclos, B., & Cozzone, A. J. (1986). Phosphorylation of an *Escherichia coli* protein at tyrosine. *Journal of Molecular Biology*, *187*(2), 305–308. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90236-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90236-6)
- Cortes, P. R., Piñas, G. E., Cian, M. B., Yandar, N., & Echenique, J. (2015). Stress-triggered signaling affecting survival or suicide of *Streptococcus pneumoniae*. *International Journal of Medical Microbiology*, *305*(1), 157–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.12.002>
- Cozzone, A. J. (2009). Bacterial tyrosine kinases: novel targets for antibacterial therapy? *Trends in Microbiology*, *17*(12), 536–543. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.09.005>
- Dagkessamanskaia, A., Moscoso, M., Hénard, V., Guiral, S., Overweg, K., Reuter, M., Martin, B., Wells, J., & Claverys, J.-P. (2004). Interconnection of competence, stress and CiaR

- regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of *ciaR* mutant cells. *Molecular Microbiology*, 51(4), 1071–1086. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2003.03892.x>
- De Saizieu, A., Gardes, C., Flint, N., Wagner, C., Kamber, M., Mitchell, T. J., Keck, W., Amrein, K. E., & Lange, R. (2000). Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *Journal of Bacteriology*, 182(17), 4696–4703. <https://doi.org/10.1128/JB.182.17.4696-4703.2000>
- DebRoy, S., Aliaga-Tobar, V., Galvez, G., Arora, S., Liang, X., Horstmann, N., Maracaja-Coutinho, V., Latorre, M., Hook, M., Flores, A. R., & Shelburne, S. A. (2021). Genome-wide analysis of in vivo CcpA binding with and without its key co-factor HPr in the major human pathogen group A *Streptococcus*. *Molecular Microbiology*, 115(6), 1207–1228. <https://doi.org/10.1111/MMI.14667>
- DJ, G., & A, S. (1978). DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Research*, 5(9), 3157–3170. <https://doi.org/10.1093/NAR/5.9.3157>
- Dubrac, S., Bisicchia, P., Devine, K. M., & Msadek, T. (2008). A matter of life and death: Cell wall homeostasis and the WalKR (YycGF) essential signal transduction pathway. In *Molecular Microbiology* (Vol. 70, Issue 6, pp. 1307–1322). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06483.x>
- Duclos, B., Grangeasse, C., Vaganay, E., Riberty, M., & Cozzone, A. J. (1996). Autophosphorylation of a bacterial protein at tyrosine. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 259, Issue 5, pp. 891–895). Academic Press. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0366>
- Durán, R., Villarino, A., Bellinzoni, M., Wehenkel, A., Fernandez, P., Boitel, B., Cole, S. T., Alzari, P. M., & Cerveñansky, C. (2005). Conserved autophosphorylation pattern in activation loops and juxtamembrane regions of *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr protein kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333(3), 858–867. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.173>
- Dworkin, J. (2015). Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 24, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.005>
- Eberhardt, A., Wu, L. J., Errington, J., Vollmer, W., & Veening, J. W. (2009). Cellular localization of choline-utilization proteins in *streptococcus pneumoniae* using novel fluorescent reporter systems. *Molecular Microbiology*, 74(2), 395–408. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06872.x>
- Echenique, J., Kadioglu, A., Romao, S., Andrew, P. W., & Trombe, M. C. (2004). Protein

- Serine/Threonine Kinase StkP Positively Controls Virulence and Competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 72(4), 2434–2437. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2434-2437.2004>
- Echenique, J. R., & Trombe, M. C. (2001). Competence repression under oxygen limitation through the two-component MicAB signal-transducing system in *Streptococcus pneumoniae* and involvement of the PAS domain of MicB. *Journal of Bacteriology*, 183(15), 4599–4608. <https://doi.org/10.1128/JB.183.15.4599-4608.2001>
- Echenique, José R., Chapuy-Regaud, S., & Trombe, M. C. (2000). Competence regulation by oxygen in *Streptococcus pneumoniae*: Involvement of ciaRH and comCDE. *Molecular Microbiology*, 36(3), 688–696. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01891.x>
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Qureshi, M., Richardson, L. J., Salazar, G. A., Smart, A., Sonnhammer, E. L. L., Hirsh, L., Paladin, L., Piovesan, D., Tosatto, S. C. E., & Finn, R. D. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D427–D432. <https://doi.org/10.1093/nar/gky995>
- Eldholm, V., Gutt, B., Johnsborg, O., Brückner, R., Maurer, P., Hakenbeck, R., Mascher, T., & Håvarstein, L. S. (2010). The pneumococcal cell envelope stress-sensing system LiaFSR is activated by murein hydrolases and lipid II-interacting antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 192(7), 1761–1773. <https://doi.org/10.1128/JB.01489-09>
- Ercoli, G., Fernandes, V. E., Chung, W. Y., Wanford, J. J., Thomson, S., Bayliss, C. D., Straatman, K., Crocker, P. R., Dennison, A., Martinez-Pomares, L., Andrew, P. W., Moxon, E. R., & Oggioni, M. R. (2018). Intracellular replication of *Streptococcus pneumoniae* inside splenic macrophages serves as a reservoir for septicaemia. *Nature Microbiology*, 3(5), 600–610. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0147-1>
- Fabret, C., Feher, V. A., & Hoch, J. A. (1999). Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: How one organism sees its world. In *Journal of Bacteriology* (Vol. 181, Issue 7, pp. 1975–1983). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/jb.181.7.1975-1983.1999>
- Fadda, D., Pischedda, C., Caldara, F., Whalen, M. B., Anderluzzi, D., Domenici, E., & Massidda, O. (2003). Characterization of divIVA and other genes located in the chromosomal region downstream of the dcw cluster in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 185(20), 6209–6214. <https://doi.org/10.1128/JB.185.20.6209-6214.2003>
- Falk, S. P., & Weisblum, B. (2013). Phosphorylation of the *Streptococcus pneumoniae* cell wall biosynthesis enzyme MurC by a eukaryotic-like Ser/Thr kinase. *FEMS Microbiology*

- Letters*, 340(1), 19–23. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12067>
- Federle, M. J., McIver, K. S., & Scott, J. R. (1999). A response regulator that represses transcription of several virulence operons in the group A streptococcus. *Journal of Bacteriology*, 181(12), 3649–3657. <https://doi.org/10.1128/jb.181.12.3649-3657.1999>
- Fenton, A. K., Manuse, S., Flores-Kim, J., Garcia, P. S., Mercy, C., Grangeasse, C., Bernhardt, T. G., & Rudner, D. Z. (2018). Phosphorylation-dependent activation of the cell wall synthase PBP2a in *Streptococcus pneumoniae* by MacP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(11), 2812–2817. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715218115>
- Fleurie, A., Lesterlin, C., Manuse, S., Zhao, C., Cluzel, C., Lavergne, J. P., Franz-Wachtel, M., MacEk, B., Combet, C., Kuru, E., VanNieuwenhze, M. S., Brun, Y. V., Sherratt, D., & Grangeasse, C. (2014). MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature*, 516(7530), 260–262. <https://doi.org/10.1038/nature13966>
- Gao, R., & Stock, A. M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 63, pp. 133–154). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073214>
- Garnak, M., & Reeves, H. C. (1979). Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Science*, 203(4385), 1111–1112. <https://doi.org/10.1126/science.34215>
- Ghosh, P., Shah, M., Ravichandran, S., Park, S.-S., Iqbal, H., Choi, S., Kim, K. K., & Rhee, D. K. (2019). Pneumococcal VncR Strain-Specifically Regulates Capsule Polysaccharide Synthesis. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2279. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02279>
- Giefing, C., Jelencsics, K. E., Gelbmann, D., Senn, B. M., & 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 (Reading)*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.036335-0>
- Glanville, D. G., Han, L., Maule, A. F., Woodacre, A., Thanki, D., Abdullah, I. T., Morrissey, J. A., Clarke, T. B., Yesilkaya, H., Silvaggi, N. R., & Uljasz, A. T. (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 Pathogens*, 14(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007052>
- Gómez-Mejía, A., Gámez, G., & Hammerschmidt, S. (2018). *Streptococcus pneumoniae* two-component regulatory systems: The interplay of the pneumococcus with its environment. In *International Journal of Medical Microbiology* (Vol. 308, Issue 6, pp. 722–737).

- Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.012>
- Gómez-Mejía, A., Gámez, G., Hirschmann, S., Kluger, V., Rath, H., Böhm, S., Voss, F., Kakar, N., Petruschka, L., Völker, U., Brückner, R., Mäder, U., & Hammerschmidt, S. (2018). Pneumococcal Metabolic Adaptation and Colonization Are Regulated by the Two-Component Regulatory System 08. *MSphere*, 3(3). <https://doi.org/10.1128/msphere.00165-18>
- Grangeasse, C. (2016). Rewiring the Pneumococcal Cell Cycle with Serine/Threonine- and Tyrosine-kinases. In *Trends in Microbiology* (Vol. 24, Issue 9, pp. 713–724). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.04.004>
- Grangeasse, C., Cozzone, A. J., Deutscher, J., & Mijakovic, I. (2007). Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 32, Issue 2, pp. 86–94). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.12.004>
- Grangeasse, C., Nessler, S., & Mijakovic, I. (2012). Bacterial tyrosine kinases: Evolution, biological function and structural insights. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 367, Issue 1602, pp. 2640–2655). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0424>
- Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *Journal of Hygiene*, 27(2), 113–159. <https://doi.org/10.1017/S0022172400031879>
- Guenzi, E., Gasc, A. -M, Sicard, M. A., & Hakenbeck, R. (1994). A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 12(3), 505–515. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01038.x>
- Hakenbeck, R. (Regine), & Chhatwal, S. (2007). *Molecular Biology of Streptococci*. Horizon Bioscience.
- Halfmann, A., Kovács, M., Hakenbeck, R., & Brückner, R. (2007). Identification of the genes directly controlled by the response regulator CiaR in *Streptococcus pneumoniae*: five out of 15 promoters drive expression of small non-coding RNAs. *Molecular Microbiology*, 66(1), 110–126. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05900.x>
- Hammerschmidt, S., Talay, S. R., Brandtzaeg, P., & Chhatwal, G. S. (1997). SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory Immunoglobulin A and secretory component. *Molecular Microbiology*, 25(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5391899.x>
- Hardt, P., Engels, I., Rausch, M., Gajdiss, M., Ulm, H., Sass, P., Ohlsen, K., Sahl, H. G.,

- Bierbaum, G., Schneider, T., & Grein, F. (2017). The cell wall precursor lipid II acts as a molecular signal for the Ser/Thr kinase PknB of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.12.001>
- Hausdorff, W. P., Bryant, J., Paradiso, P. R., & Siber, G. R. (2000). Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: Implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clinical Infectious Diseases*, 30(1), 100–121. <https://doi.org/10.1086/313608>
- Håvarstein, L. S., Coomaraswamy, G., & Morrison, D. A. (1995). An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(24), 11140–11144. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.11140>
- Håvarstein, L. S., Gaustad, P., Nes, I. F., & Morrison, D. A. (1996). Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor. *Molecular Microbiology*, 21(4), 863–869. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.521416.x>
- Håvarstein, L. S., Martin, B., Johnsborg, O., Granadel, C., & Claverys, J. P. (2006). New insights into the pneumococcal fratricide: Relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Molecular Microbiology*, 59(4), 1297–1037. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05021.x>
- Heijenoort, J. Van. (1994). Biosynthesis of the bacterial peptidoglycan unit. *New Comprehensive Biochemistry*, 27(C), 39–54. [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(08\)60406-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60406-8)
- Hemsley, C., Joyce, E., Hava, D. L., Kawale, A., & Camilli, A. (2003). MgrA, an Orthologue of Mga, Acts as a Transcriptional Repressor of the Genes within the rlrA Pathogenicity Islet in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 185(22), 6640–6647. <https://doi.org/10.1128/JB.185.22.6640-6647.2003>
- Hendriksen, W. T., Silva, N., Bootsma, H. J., Blue, C. E., Paterson, G. K., Kerr, A. R., De Jong, A., Kuipers, O. P., Hermans, P. W. M., & Mitchell, T. J. (2007). Regulation of gene expression in *Streptococcus pneumoniae* by response regulator 09 is strain dependent. *Journal of Bacteriology*, 189(4), 1382–1389. <https://doi.org/10.1128/JB.01144-06>
- Hirakawa, H., Kurushima, J., Hashimoto, Y., & Tomita, H. (2020). Progress overview of bacterial two-component regulatory systems as potential targets for antimicrobial chemotherapy. In *Antibiotics* (Vol. 9, Issue 10, pp. 1–15). MDPI AG.

- <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100635>
- Hirschfeld, C., Gómez-Mejia, A., Bartel, J., Hentschker, C., Rohde, M., Maaß, S., Hammerschmidt, S., & Becher, D. (2020). Proteomic Investigation Uncovers Potential Targets and Target Sites of Pneumococcal Serine-Threonine Kinase StkP and Phosphatase PhpP. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03101>
- Hirschmann, S., Gómez-Mejia, A., Mäder, U., Karsunke, J., Driesch, D., Rohde, M., Häussler, S., Burchhardt, G., & Hammerschmidt, S. (2021). The two-component system 09 regulates pneumococcal carbohydrate metabolism and capsule expression. *Microorganisms*, *9*(3), 1–26. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030468>
- Hoch, J. A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 3, Issue 2, pp. 165–170). Current Biology Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00070-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00070-9)
- Holečková, N., Doubravová, L., Massidda, O., Molle, V., Buriánková, K., Benada, O., Kofroňová, O., Ulrych, A., & Branny, P. (2014). LocZ is a new cell division protein involved in proper septum placement in *Streptococcus pneumoniae*. *MBio*, *6*(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.01700-14>
- Hoskins, J., Alborn, W. E., Arnold, J., Blaszcak, L. C., Burgett, S., Dehoff, B. S., Estrem, S. T., Fritz, L., Fu, D.-J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J. S., Khoja, H., Kraft, A. R., Lagace, R. E., Leblanc, D. J., Lee, L. N., Lefkowitz, E. J., ... Glass, J. I. (2001). Genome of the Bacterium *Streptococcus pneumoniae* Strain R6. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, *183*(19), 5709–5717. <https://doi.org/10.1128/JB.183.19.5709-5717.2001>
- Ihekweazu, C., Basarab, M., Wilson, D., Oliver, I., Dance, D., George, R., & Pebody, R. (2010). Outbreaks of serious pneumococcal disease in closed settings in the post-antibiotic era: A systematic review. In *Journal of Infection* (Vol. 61, Issue 1, pp. 21–27). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.03.032>
- Iyer, R., Baliga, N. S., & Camilli, A. (2005). Catabolite control protein A (CcpA) contributes to virulence and regulation of sugar metabolism in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, *187*(24), 8340–8349. <https://doi.org/10.1128/JB.187.24.8340-8349.2005>
- Jacq, M., Arthaud, C., Manuse, S., Mercy, C., Bellard, L., Peters, K., Gallet, B., Galindo, J., Doan, T., Vollmer, W., Brun, Y. V., Vannieuwenhze, M. S., Di Guilmi, A. M., Vernet, T., Grangeasse, C., & Morlot, C. (2018). The cell wall hydrolase Pmp23 is important for assembly and stability of the division ring in *Streptococcus pneumoniae*. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25882-y>

- Jayaraman, G. C., Penders, J. E., & Burne, R. A. (1997). Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans* *hrcA*, *grpE* and *dnaK* genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. *Molecular Microbiology*, *25*(2), 329–341. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4671835.x>
- Jers, C., Pedersen, M. M., Paspaliari, D. K., Schütz, W., Johnsson, C., Soufi, B., MacEk, B., Jensen, P. R., & Mijakovic, I. (2010). *Bacillus subtilis* BY-kinase PtkA controls enzyme activity and localization of its protein substrates. *Molecular Microbiology*, *77*(2), 287–299. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07227.x>
- Johnston, J. W., Myers, L. E., Ochs, M. M., Benjamin, W. H., Briles, D. E., & Hollingshead, S. K. (2004). Lipoprotein PsaA in virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Surface accessibility and role in protection from superoxide. *Infection and Immunity*, *72*(10), 5858–5867. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5858-5867.2004>
- Jordan, S., Junker, A., Helmann, J. D., & Mascher, T. (2006). Regulation of LiaRS-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*: Identification of inhibitor proteins, regulator binding sites, and target genes of a conserved cell envelope stress-sensing two-component system. *Journal of Bacteriology*, *188*(14), 5153–5166. <https://doi.org/10.1128/JB.00310-06>
- Kadioglu, A., Echenique, J., Manco, S., Trombe, M. C., & Andrew, P. W. (2003). The MicAB Two-Component Signaling System Is Involved in Virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, *71*(11), 6676–6679. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.11.6676-6679.2003>
- Kennelly, P. J. (2002). Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. *FEMS Microbiology Letters*, *206*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb10978.x>
- Kietzman, C. C., & Rosch, J. W. (2015). Regulatory Strategies of the Pneumococcus. In *Streptococcus Pneumoniae: Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions* (pp. 109–128). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410530-0.00006-5>
- Kleinová, S. (2019). *Identifikace nových substrátů Ser/Thr proteinkinázy StkP*. Univerzita Karlova.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, *305*(3), 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Lacks, S., & Hotchkiss, R. D. (1960). A study of the genetic material determining an enzyme activity in *Pneumococcus*. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*, *39*(3), 508–518.

[https://doi.org/10.1016/0006-3002\(60\)90205-5](https://doi.org/10.1016/0006-3002(60)90205-5)

- Lange, R., Wagner, C., De Saizieu, A., Flint, N., Molnos, J., Stieger, M., Caspers, P., Kamber, M., Keck, W., & Amrein, K. E. (1999). Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene*, *237*(1), 223–234. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00266-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00266-8)
- Lanie, J. A., Ng, W.-L., Kazmierczak, K. M., Andrzejewski, T. M., Davidsen, T. M., Wayne, K. J., Tettelin, H., Glass, J. I., & Winkler, M. E. (2007). Genome Sequence of Avery's Virulent Serotype 2 Strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and Comparison with That of Unencapsulated Laboratory Strain R6. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, *189*(1), 3. <https://doi.org/10.1128/JB.01148-06>
- Leipe, D. D., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2003). Evolution and classification of P-loop kinases and related proteins. *Journal of Molecular Biology*, *333*(4), 781–815. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.08.040>
- Li, Y., Thompson, C. M., & Lipsitch, M. (2014). A Modified Janus Cassette (Sweet Janus) to Improve Allelic Replacement Efficiency by High-Stringency Negative Selection in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS ONE*, *9*(6), e100510. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100510>
- Libby, E. A., Goss, L. A., & Dworkin, J. (2015). The Eukaryotic-Like Ser/Thr Kinase PrkC Regulates the Essential WalRK Two-Component System in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genetics*, *11*(6), e1005275. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005275>
- Lovering, A. L., Safadi, S. S., & Strynadka, N. C. J. (2012). Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 81, pp. 451–478). Annu Rev Biochem. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061809-112742>
- Lux, T., Nuhn, M., Hakenbeck, R., & Reichmann, P. (2007). Diversity of bacteriocins and activity spectrum in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, *189*(21), 7741–7751. <https://doi.org/10.1128/JB.00474-07>
- Ma, Z., & Zhang, J. R. (2007). RR06 activates transcription of *spr1996* and *cbpA* in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, *189*(6), 2497–2509. <https://doi.org/10.1128/JB.01429-06>
- Madec, E., Stensballe, A., Kjellström, S., Cladière, L., Obuchowski, M., Jensen, O. N., & Séror, S. J. (2003). Mass spectrometry and site-directed mutagenesis identify several autophosphorylated residues required for the activity of PrkC, a Ser/Thr kinase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, *330*(3), 459–472.

[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00579-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00579-5)

- Maestro, B., Novaková, L., Heseck, D., Lee, M., Leyva, E., Mobashery, S., Sanz, J. M., & Branny, P. (2011). Recognition of peptidoglycan and β -lactam antibiotics by the extracellular domain of the Ser/Thr protein kinase StkP from *Streptococcus pneumoniae*. *FEBS Letters*, *585*(2), 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.12.016>
- Martín-Galiano, A. J., Overweg, K., Ferrándiz, M. J., Reuter, M., Wells, J. M., & de la Campa, A. G. (2005). Transcriptional analysis of the acid tolerance response in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*, *151*(12), 3935–3946. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28238-0>
- Mascher, T. (2006). Intramembrane-sensing histidine kinases: A new family of cell envelope stress sensors in Firmicutes bacteria. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 264, Issue 2, pp. 133–144). FEMS Microbiol Lett. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00444.x>
- Mascher, T., Zähler, D., Merai, M., Balmelle, N., De Saizieu, A. B., & Hakenbeck, R. (2003). The *Streptococcus pneumoniae* cia regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *Journal of Bacteriology*, *185*(1), 60–70. <https://doi.org/10.1128/JB.185.1.60-70.2003>
- Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L., & Lukyanov, S. A. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology*, *17*(10), 969–973. <https://doi.org/10.1038/13657>
- McCluskey, J., Hinds, J., Husain, S., Witney, A., & Mitchell, T. J. (2004). A two-component system that controls the expression of pneumococcal surface antigen A (PsaA) and regulates virulence and resistance to oxidative stress in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, *51*(6), 1661–1675. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2003.03917.x>
- McKessar, S. J., & Hakenbeck, R. (2007). The two-component regulatory system TCS08 is involved in cellobiose metabolism of *Streptococcus pneumoniae* R6. *Journal of Bacteriology*, *189*(4), 1342–1350. <https://doi.org/10.1128/JB.01170-06>
- Mengin-Lecreulx, D., & Van Heijenoort, J. (1996). Characterization of the essential gene glmM encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(1), 32–39. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.1.32>
- Minnen, A., Attaiech, L., Thon, M., Gruber, S., & Veening, J.-W. (2011). SMC is recruited to oriC by ParB and promotes chromosome segregation in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, *81*(3), 676–688. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2011.07722.X>
- Mitchell, A. L., Attwood, T. K., Babbitt, P. C., Blum, M., Bork, P., Bridge, A., Brown, S. D.,

- Chang, H. Y., El-Gebali, S., Fraser, M. I., Gough, J., Haft, D. R., Huang, H., Letunic, I., Lopez, R., Luciani, A., Madeira, F., Marchler-Bauer, A., Mi, H., ... Finn, R. D. (2019). InterPro in 2019: Improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D351–D360. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1100>
- Mohedano, M. Luz, Overweg, K., De La Fuente, A., Reuter, M., Altabe, S., Mulholland, F., De Mendoza, D., López, P., & Wells, J. M. (2005). Evidence that the essential response regulator YycF in *Streptococcus pneumoniae* modulates expression of fatty acid biosynthesis genes and alters membrane composition. *Journal of Bacteriology*, *187*(7), 2357–2367. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2357-2367.2005>
- Mohedano, Maria L., Amblar, M., de la Fuente, A., Wells, J. M., & López, P. (2016). The Response Regulator YycF Inhibits Expression of the Fatty Acid Biosynthesis Repressor FabT in *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, *7*(AUG), 1326. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01326>
- Molzen, T. E., Burghout, P., Bootsma, H. J., Brandt, C. T., Der Gaast-De Jongh, C. E. V., Eleveld, M. J., Verbeek, M. M., Frimodt-Møller, N., Ostergaard, C., & Hermans, P. W. M. (2011). Genome-wide identification of streptococcus pneumoniae genes essential for bacterial replication during experimental meningitis. *Infection and Immunity*, *79*(1), 288–297. <https://doi.org/10.1128/IAI.00631-10>
- Morona, J. K., Morona, R., & Paton, J. C. (2006). Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae* type 2 is required for invasive disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(22), 8505–8510. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602148103>
- Morona, J. K., Paton, J. C., Miller, D. C., & Morona, R. (2000). Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, *35*(6), 1431–1442. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01808.x>
- Muñoz-Dorado, J., Inouye, S., & Inouye, M. (1991). A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell*, *67*(5), 995–1006. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90372-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90372-6)
- Murphy, L. D., Rosner, J. L., Zimmerman, S. B., & Esposito, D. (1999). Identification of Two New Proteins in Spermidine Nucleoids Isolated from *Escherichia coli*. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 181, Issue 12). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Ng, W.-L., Robertson, G. T., Kazmierczak, K. M., Zhao, J., Gilmour, R., & Winkler, M. E.

- (2003). Constitutive expression of PcsB suppresses the requirement for the essential VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae* R6§. *Molecular Microbiology*, *50*(5), 1647–1663. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03806.x>
- Ng, W.-L., Tsui, H. C. T., & Winkler, M. E. (2005). Regulation of the *pspA* virulence factor and essential *pcsB* murein biosynthetic genes by the phosphorylated VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, *187*(21), 7444–7459. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7444-7459.2005>
- Nguyen, H. A., El Khoury, T., Guiral, S., Laaberki, M. H., Candusso, M. P., Galisson, F., Foucher, A. E., Kesraoui, S., Ballut, L., Vallet, S., Orelle, C., Zucchini, L., Martin, J., Page, A., Attieh, J., Aghajari, N., Grangeasse, C., & Jault, J. M. (2017). Expanding the Kinome World: A New Protein Kinase Family Widely Conserved in Bacteria. *Journal of Molecular Biology*, *429*(20), 3056–3074. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.08.016>
- Normark, B. H., Novak, R., Örtqvist, Å., Källenius, G., Tuomanen, E., & Normark, S. (2001). Clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* that exhibit tolerance of vancomycin. *Clinical Infectious Diseases*, *32*(4), 552–558. <https://doi.org/10.1086/318697>
- Nourikyan, J., Kjos, M., Mercy, C., Cluzel, C., Morlot, C., Noirot-Gros, M.-F., Guiral, S., Lavergne, J.-P., Veening, J.-W., & Grangeasse, C. (2015). Autophosphorylation of the Bacterial Tyrosine-Kinase CpsD Connects Capsule Synthesis with the Cell Cycle in *Streptococcus pneumoniae*. *PLOS Genetics*, *11*(9), e1005518. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005518>
- Nováková, L., Bezoušková, S., Pompach, P., Špidlová, P., Sasková, L., Weiser, J., & Branny, P. (2010). Identification of multiple substrates of the StkP Ser/Thr protein kinase in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, *192*(14), 3629–3638. <https://doi.org/10.1128/JB.01564-09>
- Nováková, L., Sasková, L., Pallová, P., Janeček, J., Novotná, J., Ulrych, A., Echenique, J., Trombe, M. C., & Branny, P. (2005). Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. *FEBS Journal*, *272*(5), 1243–1254. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04560.x>
- Olafsdottir, T. A., Lingnau, K., Nagy, E., & Jonsdottir, I. (2012). Novel protein-based pneumococcal vaccines administered with the Th1-promoting adjuvant IC31 induce protective immunity against pneumococcal disease in neonatal mice. *Infection and Immunity*, *80*(1), 461–468. <https://doi.org/10.1128/IAI.05801-11>
- Olivares-Illana, V., Meyer, P., Bechet, E., Gueguen-Chaignon, V., Soulat, D., Lazereg-Riquier,

- S., Mijakovic, I., Deutscher, J., Cozzone, A. J., Lapr evote, O., Morera, S., Grangeasse, C., & Nessler, S. (2008). Structural basis for the regulation mechanism of the tyrosine kinase CapB from *Staphylococcus aureus*. *PLoS Biology*, *6*(6), 1321–1331. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060143>
- Ong, C. L. Y., Potter, A. J., Trappetti, C., Walker, M. J., Jennings, M. P., Paton, J. C., & McEwan, A. G. (2013). Interplay between manganese and iron in pneumococcal pathogenesis: Role of the orphan response regulator ritr. *Infection and Immunity*, *81*(2), 421–429. <https://doi.org/10.1128/IAI.00805-12>
- Orihuela, C. J., Gao, G., Francis, K. P., Yu, J., & Tuomanen, E. I. (2004). Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *Journal of Infectious Diseases*, *190*(9), 1661–1669. <https://doi.org/10.1086/424596>
- Osaki, M., Arcond guy, T., Bastide, A., Touriol, C., Prats, H., & Trombe, M. C. (2009). The StkP/PhpP signaling couple in *Streptococcus pneumoniae*: Cellular organization and physiological characterization. *Journal of Bacteriology*, *191*(15), 4943–4950. <https://doi.org/10.1128/JB.00196-09>
- Pagliero, E., Dideberg, O., Vernet, T., & Di Guilmi, A. M. (2005). The PECACE domain: A new family of enzymes with potential peptidoglycan cleavage activity in Gram-positive bacteria. *BMC Genomics*, *6*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-19>
- Pallova, P., Hercik, K., Saskova, L., Novakova, L., & Branny, P. (2007). A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP of *Streptococcus pneumoniae* acts as a dimer in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *355*(2), 526–530. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.184>
- Pelletier, A., Freton, C., Gally, C., Trouve, J., Cluzel, C., Franz-Wachtel, M., Macek, B., Jault, J. M., Grangeasse, C., & Guiral, S. (2019). The Tyrosine-Autokinase UbK Is Required for Proper Cell Growth and Cell Morphology of *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01942>
- Pereira, S. F. F., Goss, L., & Dworkin, J. (2011). Eukaryote-Like Serine/Threonine Kinases and Phosphatases in Bacteria. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, *75*(1), 192–212. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00042-10>
- Peterson, S. N., Sung, C. K., Cline, R., Desai, B. V., Snesrud, E. C., Luo, P., Walling, J., Li, H., Mintz, M., Tsegaye, G., Burr, P. C., Do, Y., Ahn, S., Gilbert, J., Fleischmann, R. D., & Morrison, D. A. (2004). Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Molecular Microbiology*, *51*(4), 1051–1070. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03907.x>

- Piñas, G. E., Cortes, P. R., Albarracín Orió, A. G., & Echenique, J. (2008). Acidic stress induces autolysis by a CSP- independent ComE pathway in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*, *154*(5), 1300–1308. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/015925-0>
- Piñas, G. E., Reinoso-Vizcaino, N. M., Yandar Barahona, N. Y., Cortes, P. R., Duran, R., Badapanda, C., Rathore, A., Bichara, D. R., Cian, M. B., Olivero, N. B., Perez, D. R., & Echenique, J. (2018). Crosstalk between the serine/threonine kinase StkP and the response regulator ComE controls the stress response and intracellular survival of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathogens*, *14*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007118>
- Reinoso-Vizcaíno, N. M., Cian, M. B., Cortes, P. R., Olivero, N. B., Hernandez-Morfa, M., Piñas, G. E., Badapanda, C., Rathore, A., Perez, D. R., & Echenique, J. (2020). The pneumococcal two-component system SirRH is linked to enhanced intracellular survival of *Streptococcus pneumoniae* in influenza-infected pulmonary cells. *PLoS Pathogens*, *16*(8), e1008761. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1008761>
- Republic, D., PcvS, S., Nations, U., Alliance, V., Advance, P., Commitment, M., Lics, G., & Pneumosil, A. (2020). *Fact sheet: pneumococcal disease, pneumococcal conjugate vaccines, and PNEUMOSIL® | PATH*. https://path.azureedge.net/media/documents/PNEUMOSIL_PQ_backgrounder_FINAL_CmsYOvM.pdf
- Rosch, J. W., Mann, B., Thornton, J., Sublett, J., & Tuomanen, E. (2008). Convergence of regulatory networks on the pilus locus of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, *76*(7), 3187–3196. <https://doi.org/10.1128/IAI.00054-08>
- Rued, B. E., Zheng, J. J., Mura, A., Tsui, H. C. T., Boersma, M. J., Mazny, J. L., Corona, F., Perez, A. J., Fadda, D., Doubravová, L., Buriánková, K., Branny, P., Massidda, O., & Winkler, M. E. (2017). Suppression and synthetic-lethal genetic relationships of Δ gpsB mutations indicate that GpsB mediates protein phosphorylation and penicillin-binding protein interactions in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Molecular Microbiology*, *103*(6), 931–957. <https://doi.org/10.1111/mmi.13613>
- Schnorpfeil, A., Kranz, M., Kovács, M., Kirsch, C., Gartmann, J., Brunner, I., Bittmann, S., & Brückner, R. (2013). Target evaluation of the non-coding csRNAs reveals a link of the two-component regulatory system CiaRH to competence control in *Streptococcus pneumoniae* R6. *Molecular Microbiology*, *89*(2), 334–349. <https://doi.org/10.1111/mmi.12277>
- Sebert, M. E., Palmer, L. M., Rosenberg, M., & Weiser, J. N. (2002). Microarray-based identification of htrA, a *Streptococcus pneumoniae* gene that is regulated by the CiaRH

- two-component system and contributes to nasopharyngeal colonization. *Infection and Immunity*, 70(8), 4059–4067. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4059-4067.2002>
- Sebert, M. E., Patel, K. P., Plotnick, M., & Weiser, J. N. (2005). Pneumococcal HtrA protease mediates inhibition of competence by the CiaRH two-component signaling system. *Journal of Bacteriology*, 187(12), 3969–3979. <https://doi.org/10.1128/JB.187.12.3969-3979.2005>
- Shi, Y. (2009). Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. In *Cell* (Vol. 139, Issue 3, pp. 468–484). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.006>
- Sivanathan, V., Allen, M. D., Bekker, C. de, Baker, R., Arciszewska, L. K., Freund, S. M., Bycroft, M., Löwe, J., & Sherratt, D. J. (2006). The FtsK γ domain directs oriented DNA translocation by interacting with KOPS. *Nature Structural & Molecular Biology* 2006 13:11, 13(11), 965–972. <https://doi.org/10.1038/nsmb1158>
- Skerker, J. M., Perchuk, B. S., Siryaporn, A., Lubin, E. A., Ashenberg, O., Goulian, M., & Laub, M. T. (2008). Rewiring the Specificity of Two-Component Signal Transduction Systems. *Cell*, 133(6), 1043–1054. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.040>
- Slager, J., Aprianto, R., & Veening, J.-W. (2018). Deep genome annotation of the opportunistic human pathogen *Streptococcus pneumoniae* D39. *Nucleic Acids Research*, 46(19), 9971–9989. <https://doi.org/10.1093/nar/gky725>
- Stamsås, G. A., Straume, D., Salehian, Z., & Håvarstein, L. S. (2017). Evidence that pneumococcal WalK is regulated by StkP through protein–protein interaction. *Microbiology (United Kingdom)*, 163(3), 383–399. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000404>
- Stamsås, G. A., Straume, D., Winther, A. R., Kjos, M., Frantzen, C. A., & Håvarstein, L. S. (2017). Identification of EloR (Spr1851) as a regulator of cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 105(6), 954–967. <https://doi.org/10.1111/mmi.13748>
- Standish, A. J., Stroehner, U. H., & Paton, J. C. (2005). The two-component signal transduction system RR06/HK06 regulates expression of *cbpA* in *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(21), 7701–7706. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409377102>
- Standish, A. J., Stroehner, U. H., & Paton, J. C. (2007). The pneumococcal two-component signal transduction system RR/HK06 regulates CbpA and PspA by two distinct mechanisms. *Journal of Bacteriology*, 189(15), 5591–5600. <https://doi.org/10.1128/JB.00335-07>
- Standish, A. J., Whittall, J. J., & Morona, R. (2014). Tyrosine phosphorylation enhances activity of pneumococcal autolysin LytA. *Microbiology (United Kingdom)*, 160, 2745–2754.

- <https://doi.org/10.1099/mic.0.080747-0>
- Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 69, pp. 183–215). Annu Rev Biochem. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>
- Stock, J. B., Stock, A. M., & Mottonen, J. M. (1990). Signal transduction in bacteria. In *Nature* (Vol. 344, Issue 6265, pp. 395–400). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/344395a0>
- Stülke, J., & Schmalisch, M. H. (2004). *The bacterial phosphotransferase system: a perfect link of sugar transport and signal transduction* (pp. 179–205). <https://doi.org/10.1007/b95776>
- Sun, X., Ge, F., Xiao, C. Le, Yin, X. F., Ge, R., Zhang, L. H., & He, Q. Y. (2010). Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Proteome Research*, 9(1), 275–282. <https://doi.org/10.1021/pr900612v>
- Sung, C. K., Li, H., Claverys, J. P., & Morrison, D. A. (2001). An rpsL Cassette, Janus, for Gene Replacement through Negative Selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3–12), 5190–5196. <https://doi.org/10.1128/aem.67.11.5190-5196.2001>
- Thakur, M., Chaba, R., Mondal, A. K., & Chakraborti, P. K. (2008). Interdomain interaction reconstitutes the functionality of PknA, a eukaryotic type Ser/Thr kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 8023–8033. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707535200>
- Throup, J. P., Koretke, K. K., Bryant, A. P., Ingraham, K. A., Chalker, A. F., Yigong, G., Marra, A., Wallis, N. G., Brown, J. R., Holmes, D. J., Rosenberg, M., & Burnham, M. K. R. (2000). A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 35(3), 566–576. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01725.x>
- Tu, A. H. T., Fulgham, R. L., Mccrory, M. A., Briles, D. E., & Szalai, A. J. (1999). Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 67(9), 4720–4724. <https://doi.org/10.1128/iai.67.9.4720-4724.1999>
- Ulijasz, A. T., Andes, D. R., Glasner, J. D., & Weisblum, B. (2004). Regulation of iron transport in *Streptococcus pneumoniae* by RitR, an orphan response regulator. *Journal of Bacteriology*, 186(23), 8123–8136. <https://doi.org/10.1128/JB.186.23.8123-8136.2004>
- Ulijasz, A. T., Falk, S. P., & Weisblum, B. (2009). Phosphorylation of the RitR DNA-binding

- domain by a Ser-Thr phosphokinase: implications for global gene regulation in the streptococci. *Molecular Microbiology*, 71(2), 382–390. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06532.x>
- Ulrych, A., Holečková, N., Goldová, J., Doubravová, L., Benada, O., Kofroňová, O., Halada, P., & Branny, P. (2016). Characterization of pneumococcal Ser/Thr protein phosphatase phpP mutant and identification of a novel PhpP substrate, putative RNA binding protein Jag. *BMC Microbiology*. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0865-6>
- Ween, O., Gaustad, P., & Håvarstein, L. S. (1999). Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 33(4), 817–827. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01528.x>
- Whitmore, S. E., & Lamont, R. J. (2012). Tyrosine phosphorylation and bacterial virulence. *International Journal of Oral Science*, 4, 1–6. <https://doi.org/10.1038/ijos.2012.6>
- Whittall, J. J., Morona, R., & Standish, A. J. (2015). Topology of streptococcus pneumoniae CpsC, a polysaccharide copolymerase and bacterial protein tyrosine kinase adaptor protein. *Journal of Bacteriology*, 197(1), 120–127. <https://doi.org/10.1128/JB.02106-14>
- WHO. (2013). *Introduction of pneumococcal vaccine PCV13, A handbook for district and health facility staff World Health Organization*. www.who.int/vaccines-health-facility-staff
- WHO. (2019). *WHO weekly epidemiological record 8/2019*. <http://www.who.int/immu>
- WHO. (2020). *Pneumonia*. WHO. <https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/pneumonia>
- Winther, A. R., Kjos, M., Herigstad, M. L., Håvarstein, L. S., & Straume, D. (2021). EloR interacts with the lytic transglycosylase MltG at midcell in *Streptococcus pneumoniae* R6. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/jb.00691-20>
- Winther, A. R., Kjos, M., Stamsås, G. A., Håvarstein, L. S., & Straume, D. (2019). Prevention of EloR/KhpA heterodimerization by introduction of site-specific amino acid substitutions renders the essential elongasome protein PBP2b redundant in *Streptococcus pneumoniae*. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38386-6>
- Wuichet, K., Cantwell, B. J., & Zhulin, I. B. (2010). Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 13, Issue 2, pp. 219–225). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.12.011>
- Yadav, M. K., Go, Y. Y., Chae, S.-W., & Song, J.-J. (2015). The Small Molecule DAM Inhibitor, Pyrimidinedione, Disrupts *Streptococcus pneumoniae* Biofilm Growth In Vitro. *PLOS ONE*, 10(10), e0139238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139238>
- Yeats, C., Finn, R. D., & Bateman, A. (2002). The PASTA domain: A β -lactam-binding

- domain. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 27, Issue 9, pp. 438–440). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02164-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02164-3)
- Yu, J., Chen, X., Li, B., Gu, T., Meng, X., Kong, W., & Wu, Y. (2018). A pneumococcal vaccine combination with two proteins containing PspA families 1 and 2 can potentially protect against a wide range of *Streptococcus pneumoniae* strains. *Immunologic Research*, *66*(4), 528–536. <https://doi.org/10.1007/s12026-018-9016-5>
- Zhang, C. C. (1996). Bacterial signalling involving eukaryotic-type protein kinases. In *Molecular Microbiology* (Vol. 20, Issue 1, pp. 9–15). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02483.x>
- Zheng, J. J., Perez, A. J., Tsui, H. C. T., Massidda, O., & 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. *Molecular Microbiology*, *106*(5), 793–814. <https://doi.org/10.1111/mmi.13847>
- Zucchini, L., Mercy, C., Garcia, P. S., Cluzel, C., Gueguen-Chaignon, V., Galisson, F., Freton, C., Guiral, S., Brochier-Armanet, C., Gouet, P., & Grangeasse, C. (2018). PASTA repeats of the protein kinase StkP interconnect cell constriction and separation of *Streptococcus pneumoniae*. *Nature Microbiology*, *3*(2), 197–209. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0069-3>